# THIẾT LẬP QUY TRÌNH REAL-TIME PCR PHÁT HIỆN GEN *TROPOMYOSIN* GÂY DỊ ỨNG CÓ NGUỒN GỐC HẢI SẢN

**Phan Đặng Hoàng Nam*, Nguyễn Thanh Tùng, Quang Trọng Minh, Võ Thanh Nhàn, Lê Thị Tuyết Trinh, Lao Đức Thuận**

*Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*

*Tác giả liên lạc: kingleys1459@gmail.com

## TÓM TẮT

*Hải sản là nguồn thực phẩm cung cấp protein quan trọng trong khẩu phần ăn trên thế giới. Bên cạnh nhiều lợi ích do hải sản mang lại như ngăn ngừa tim mạch, bổ sung lượng vi lượng, đa lượng cao, v.v…thì chính hải sản lại là nguồn gây dị ứng ảnh hưởng đến sức khỏe, thậm chí đe dọa đến tính mạng của con người với các triệu chứng liên quan đến hệ miễn dịch: phát ban đỏ, viêm da, hen suyễn, v.v... Gen Tropomyosin – mã hóa cho protein Tropomyosin, phân tử gây dị ứng chính có nguồn gốc hải sản. Do đó, nghiên cứu này hướng tới thiết lập một quy trình phát hiện, cụ thể là quy trình Real-time PCR, để phát hiện gen Tropomyosin - thành phần gây dị ứng có nguồn gốc hải sản có thể ứng dụng tại Việt Nam. Kết quả, xây dựng thành công chứng dương cho quy trình Real-time phát hiện gen Tropomyosin: vectơ tái tổ hợp pUC19-Tropo; thiết kế thành công quy trình Real-time PCR với cặp mồi TropoF và TropoR (khuếch đại gen Tropomyosin), cặp mồi N18SF và N18SR (khuếch đại gen 18S rRNA - chứng nội) ứng dụng trong khuếch đại gen Tropomyosin có nguồn gốc hải sản với các thông số: giới hạn phát hiện: $10^1$ , %CV của nội phản ứng: 3,64%, %CV của liên phản ứng: 2,81%. Tỷ lệ mẫu thực phẩm thương mại dương tính với gen Tropomyosin là 37/56 mẫu đạt 66,1%. Việc phát hiện thành công thành phần gây dị ứng có thể hỗ trợ cho nhà sản xuất thực phẩm có thể đánh dấu trên nhãn hiệu giúp người tiêu dùng có thể lựa chọn sử dụng hay không? Từ đó, giúp giảm tỷ lệ gây dị ứng ở người sử dụng các thực phẩm chế biến sẵn.*

***Từ khóa**: Dị ứng thực phẩm, dị ứng hải sản, Tropomyosin, 18S rRNA.*

# ESTABLISHING THE REAL-TIME PCR ASSAY TO DETECT *TROPOMYOSIN* GENE CAUSING ALLERGY OF SEAFOOD ORIGIN

**Phan Dang Hoang Nam*, Nguyen Thanh Tung, Quang Trong Minh, Vo Thanh Nhan, Le Thi Tuyet Trinh, Lao Duc Thuan**

*Ho Chi Minh City Open University*

*Corresponding author: kingleys1459@gmail.com

## ABSTRACT

*Seafood is an important dietary source of protein in the world. In addition to the many benefits of seafood such as heart prevention, micronutrient supplementation, high macronutrients, etc., seafood itself is the source of allergies affecting health, even threatening to human's life with symptoms related to the immune system: red rash, dermatitis, asthma, etc. Gen Tropomyosin - encodes for the protein Tropomyosin, the main allergenic molecule of seafood origin. Therefore, this study aims to establish a detection process, namely Real-time PCR assay, to detect the Tropomyosin gene - a seafood-derived allergen that can be applied in Vietnam. The results, successfully built a positive control for the Real-time assay of detecting the Tropomyosin gene: recombinant vector pUC19-Tropo; Successful design of Real-time PCR assay with TropoF and TropoR primers (amplification of Tropomyosin gene), N18SF and N18SR primers (amplification of 18S rRNA gene – internal control) applied in Tropomyosin gene*

*amplification of seafood origin with the following parameters: detection limit: $10^1$,% CV of the intra assay: 3.64%,% CV of the inter assay: 2.81%. The percentage of commercial food samples positive for Tropomyosin gene was 37/56, reaching 66.11%. Can the successful detection of an allergen help food manufacturers to put a mark on the label so that consumers can choose to use it? Thereby, it helps to reduce the rate of allergies in people using processed foods.*

***Keywords**: Food Allergy, Allergic seafood, Tropomyosin, 18S rRNA.*

## TỔNG QUAN

Việc tiêu thụ hải sản là một nguyên nhân phổ biến dẫn đến dị ứng. Hải sản bao gồm các sinh vật biển đa dạng và con người bị dị ứng với nhiều trong số chúng. Trong số tất cả các dị ứng thực phẩm, dị ứng động vật có vỏ là một trong những loại phổ biến nhất với tỷ lệ mắc 0,60% trong dân số thế giới, và đặc biệt phổ biến ở các nước châu Á (Lehrer và cộng sự.., 1992). Động vật có vỏ cũng được coi là một trong bốn loại thực phẩm phổ biến nhất, có thể gây sốc phản vệ. Động vật có vỏ được phân loại thành động vật thân mềm và động vật giáp xác. Trên toàn cầu, các loài động vật có vỏ gây bệnh phổ biến nhất là tôm, cua, tôm hùm, trai, sò và trai. Tỷ lệ dị ứng động vật có vỏ được ước tính là 0,50-2,50 % dân số nói chung nhưng cao hơn ở các nước ven biển châu Á nơi động vật có vỏ chiếm tỷ lệ lớn trong chế độ ăn uống. (Faber và cộng sự.., 2017). Dị ứng hải sản là một rối loạn quá mẫn với tỷ lệ lưu hành ngày càng gia tăng trên toàn thế giới. Các triệu chứng phổ biến của dị ứng hải sản là: phát ban, ngứa hoặc chàm (viêm da dị ứng); sưng môi, mặt, lưỡi và cổ họng hoặc các bộ phận khác của cơ thể; thở khò khè, nghẹt mũi hoặc khó thở; đau bụng, tiêu chảy, buồn nôn hoặc nôn mửa; chóng mặt, choáng hoặc ngất xỉu; ngứa ran trong miệng;... Dị ứng nặng có thể gây ra một phản ứng nghiêm trọng có khả năng đe dọa tính mạng được gọi là sốc phản vệ. Các dấu hiệu và triệu chứng của sốc phản vệ bao gồm: cổ họng bị sưng hay nghẹn trong cổ họng (co thắt phế quản) làm cho việc hít thở khó khăn; huyết áp sụt giảm một cách nghiêm trọng; mạch đập nhanh, chóng mặt, choáng hoặc bất tỉnh;…(Sampson và cộng sự.., 2003).

Shanti và cộng sự (1993) đã xác định được chất gây dị ứng ổn định nhiệt chính của tôm, Tropomyosin, có khả năng gây ra phản ứng quá mẫn khi tiêu thụ tôm. Sau đó, Tropomyosin cũng được xác định là chất gây dị ứng trong động vật có vỏ, bao gồm nhóm động vật giáp xác, bao gồm cua, tôm và một nhóm động vật thân mềm, bao gồm động vật thân mềm 2 mảnh vỏ, động vật chân bụng và động vật chân đầu. Do đó, Tropomyosin được xác định là mục tiêu phân tử để xác định chất gây dị ứng trong tôm, thức ăn có thành phần từ tôm và các loại thức ăn có vỏ khác. Lượng Tropomyosin gây ra phản ứng dị ứng phụ thuộc vào độ nhạy cảm của từng cá nhân và chưa có báo cáo lâm sàng.

Hiện tại, Việt Nam vẫn chưa có một nghiên cứu nào thật sự rõ ràng về dị ứng hải sản. Các nghiên cứu vẫn mang tính chất rời rạc, chủ yếu phân tích về nguyên nhân chủ quan đến từ cơ địa người bệnh mà chưa đi sâu về tính chất phân tử của các gen có trong thực phẩm, điển hình là *Tropomyosin*. Vì vậy, hướng nghiên cứu về tính chất biểu hiện, định lượng phân tử Tropomyosin là một hướng nghiên cứu rất tiềm năng, mở ra tầm nhìn bao quát hơn về dị ứng hải sản, dị ứng tôm tại Việt Nam, phát triển phân tử Tropomyosin trở thành một dấu chứng sinh học hàng đầu trong dị ứng hải sản.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

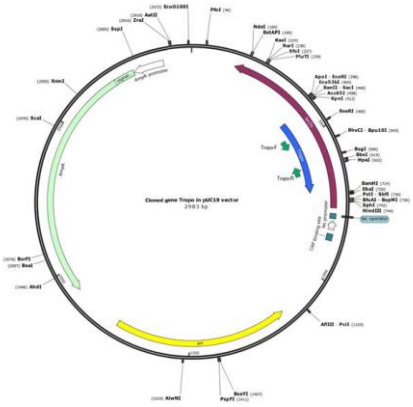
**Thiết kế 2 cặp mồi: TropoF-TropoR và N18SF-N18S**Trình tự và các thông số vật lý của 2 cặp mồi được thể hiện trong **bảng 1**.

**Bảng 1:** Trình tự và các thông số vật lý của hai cặp mồi

| Ký hiệu mồi | Trình tự mồi 5'-3' | Chiều dài | %GC | Tm (˚C) | (1) Kcal/ mole | (2) Kcal/ mole | (3) Kcal/ mole |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TropoF | TGTCTGA GGA GAA GGCCAAC | 20 | 55 | 56,81 | -1,56 | -0,19 | 0,04 |
| TropoR | CAGCTCGTCGGTAATGGACT | 20 | 55 | 56,72 | -0,42 | -0,32 | |
| N18SF | CAGGTCTGTGATGCCCTTA G | 20 | 55% | 55,10 | 0,42 | -4,67 | -6,14 |
| N18SR | ACTGGGAATTCCTCGTTC | 18 | 50% | 51,70 | -0,64 | -3,61 | |

**Xây dựng thành công chứng dương cho quy trình Real-time PCR phát hiện gen *Tropomyosin*: vectơ tái tổ hợp pUC19-Tropo**

Trình tự gen *Tropomyosin* được nối vào vectơ pUC19, sau đó vectơ tái tổ hợp pUC19-Tropo được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. Coli* TOP10 và được nuôi cấy chọn lọc bằng Ampicillin. Các plasmid tái tổ hợp sẽ được thu nhận bằng bộ kit GeneEluteTM Plasmid Miniprep Kit và được sử dụng như là chứng dương trong nghiên cứu. Sơ đồ vectơ pUC19-Tropo được thể hiện ở **hình 1**

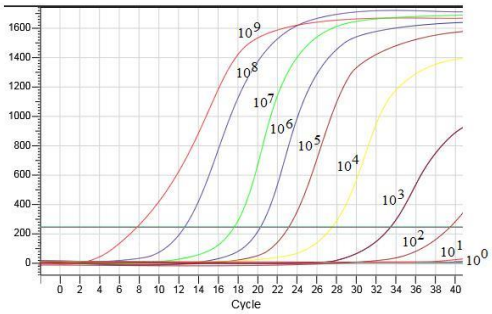


**Hình 1**: Sơ đồ vector pUC19 Tropo

**Giới hạn phát hiện của phản ứng Real-time PCR**

Giới hạn phát hiện của phản ứng cho thấy số lượng bản sao gen thấp nhất, Tropomyosin được phát hiện bởi kỹ thuật

Real-time PCR này. Dung dịch chứa vector pUC19-Tropo được tiến hành pha loãng theo bậc 10 để đạt các nồng độ giảm từ $10^9$ bản sao/phản ứng đến $10^0$ bản sao/phản ứng. Kết quả phản ứng Real-time PCR được thể hiện ở **hình 2**.



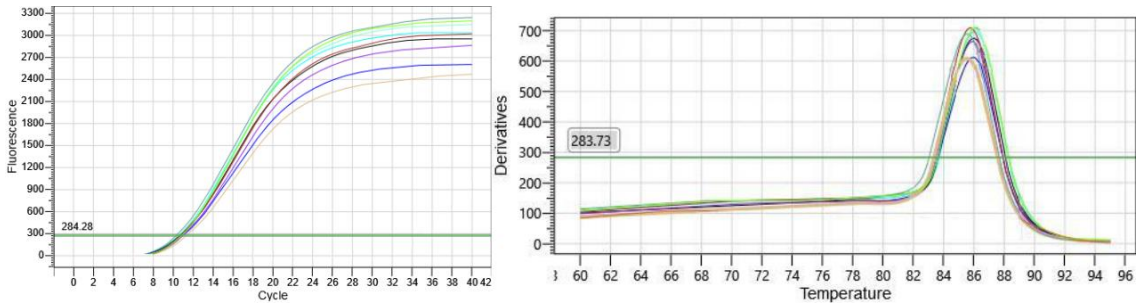

**Hình 2**: Kết quả Real-time PCR ở các mẫu có nồng độ $10^9$ đến $10^0$ bản sao/phản ứng

Phản ứng được tiến hành lặp lại 10 lần để xác định được giới hạn phát hiện của kỹ thuật này Dựa trên kết quả lặp lại cho thấy, tỷ lệ số lần dương tính đạt 100% ở các mẫu có lượng bản sao $10^2$ đến $10^9$. Tỷ lệ số lần dương tính ở các mẫu $10^1$ và $10^0$ lần lượt là 90% và 0%. Do đó, giá trị phát hiện thấp nhất được xác định là $10^1$ bản sao/mẫu/phản ứng.

nghiệm. Như vậy, quy trình Real-time PCR ứng dụng để phát hiện gen *Tropomyosin* được xây dựng thành công với độ giới hạn phát hiện là **$10^1$** bản sao, %CV nội phản ứng là **3,61%**, liên phản ứng là **2,81%**, với chứng dương là pUC-Tropo, chứng nội là 18S rRNA.

**Khảo sát chứng nội 18S rRNA**

Sau khi tách chiết DNA từ các mẫu thực nghiệm, phản ứng Real-time PCR được thực hiện với cặp mồi N18SF và N18SR khuếch đại gen *18S rRNA* – chứng nội cho các phản ứng khuếch đại gen mục tiêu sau này. Kết quả Real-time PCR và kết quả của thí nghiệm khảo sát chứng nội được thể hiện ở **hình 3.**.



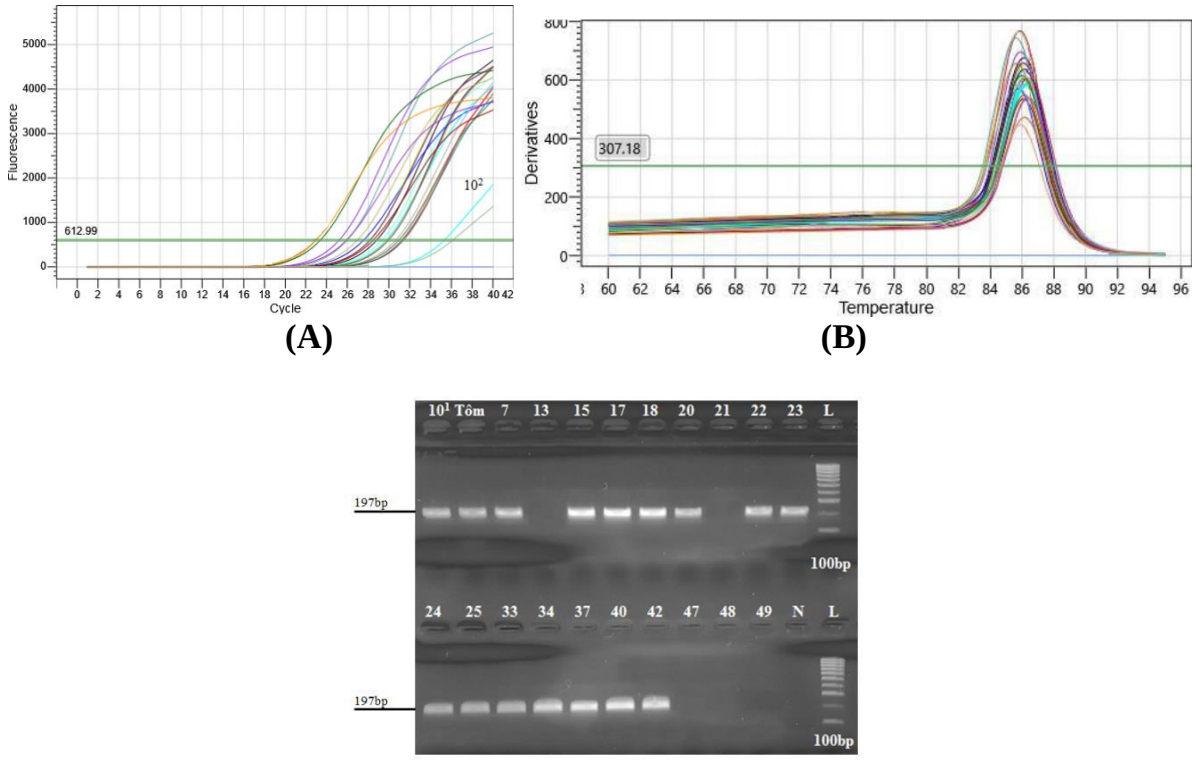

**(A)** **(B)**

**Hình 3**: Kết quả khảo sát chứng nội.
**(A)** Biểu đồ khuếch đại, **(B)** Biểu đồ phân tích đường cong nóng chảy

Như vậy, kết quả thực nghiệm cho thấy phản ứng Real-time PCR khuếch đại hoàn toàn đặc hiệu với gen *18S rRNA*. Hay nói cách khác, quá trình tách chiết DNA từ các mẫu thực nghiệm thành công và sản phẩm tách chiết DNA được sử dụng cho những phản ứng khuếch đại sau này.

**Khảo sát sự hiện diện của gen *Tropomyosin* trên một số mẫu thực nghiệm**

Tổng số mẫu thực phẩm là 54 mẫu bao gồm: 44 mẫu thực phẩm có thành phần tôm và 10 mẫu thực phẩm không chứa thành phần tôm. Kết quả Real-time PCR khảo sát sự hiện diện của gen *Tropomyosin* trên các mẫu thực phẩm đại diện được thể hiện ở **hình 4**




**Hình 4:** Kết quả khảo sát sự hiện diện của gen *Tropomyosin*. **(A)** Biểu đồ khuếch đại, **(B)** Biểu đồ phân tích đường cong nóng chảy, **(C)** Kết quả điện di

Phản ứng được tiến hành khảo sát trên một số mẫu thực phẩm đại diện và trong đó, chứng dương của phản ứng là mẫu nồng độ $10^1$ bản sao/phản ứng. Phân tích đường cong nóng chảy (**hình 3B**), kết quả cho thấy, ở các mẫu dương tính đều xuất hiện một đỉnh nóng chảy duy nhất tương ứng trong khoảng nhiệt độ 85-86 $^oC$. Điều này khẳng định sản phẩm khuếch đại là duy nhất. Kết quả điện di (**hình 4C**) cho thấy chỉ xuất hiện một băng duy nhất ở các mẫu dương tính với kích thước là **197bp**. Như vậy, kết quả thực nghiệm cho thấy phản ứng Real-time PCR khuếch đại hoàn toàn đặc hiệu và chuyên biệt với gen *Tropomyosin*. Kết quả dương tính được ghi nhận khi 2/3 lần thí nghiệm cho kết quả dương tính. Tổng số mẫu dương tính với gen *Tropomyosin* được tính là **37/56** mẫu (2 mẫu tôm và 54 mẫu thực phẩm), tỷ lệ dương tính đạt **66,11%**. Trong tổng số các mẫu thực phẩm có chứa thành phần là tôm, tỷ lệ mẫu tôm dương tính là 2/2 đạt tỷ lệ 100%, tỷ lệ số mẫu thực phẩm dương tính là 35/44 mẫu đạt 79,50%. Và trong tổng số 10 mẫu đối chứng (không chứa thành phần tôm), không phát hiện được bất kì trường hợp nào dương tính với Tropomyosin.

Thông qua kết quả thực nghiệm, các mẫu sản phẩm đóng gói dương tính với gen *Tropomyosin*, điều này chứng tỏ rằng quy trình tách chiết DNA và quy trình Real-time PCR của nhóm nghiên cứu rất hiệu quả và rất nhạy vì chỉ với một lượng mẫu rất nhỏ nhóm nghiên cứu vẫn có thể phát hiện được phân tử Tropomyosin có trong thực phẩm thương mại.

Ngược lại với công trình nghiên cứu của Kim và cộng sự (2019), mẫu được sử

dụng là các loài tôm như tôm hồng (*Pandallus borealis*), tôm đỏ (*Feneropenaeus chiensis*), tôm sú Nhật Bản (*Marsupenaeus jabonicus*),… là những loài tôm đặc trưng cho vùng biển Đông Á. Các sản phẩm thương mại tại Việt Nam sử dụng nguồn nguyên liệu chính thường là loài tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*), vì tôm thẻ là nguồn nguyên liệu giàu dinh dưỡng nhưng giá thành lại thấp và do các công ty chế biến, xuất khẩu thực phẩm chú trọng đến doanh thu, lợi nhuận của sản phẩm nên tôm thẻ được chú trọng nhiều hơn các nguồn tôm khác. Trong nghiên cứu này, từ kết quả thu nhận được, nhóm nghiên cứu khẳng định được kết quả này đặc hiệu với gen *Tropomyosin* trên loài tôm thẻ - đặc trưng cho Việt Nam. Khẳng định rằng, đây là công trình nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR để phát hiện gen *Tropomyosin* có nguồn gốc hải sản, góp phần bổ sung vào nguồn dữ liệu to lớn về dị ứng hải sản trên thế giới, dựa vào nền tảng Y học thực chứng kết hợp với thực nghiệm chứng minh.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Bước đầu áp dụng quy trình Real-time PCR trên 54 mẫu thực phẩm thương mại thực tế. Tỷ lệ mẫu dương tính với gen *Tropomyosin* là **37/56** mẫu đạt **66,11%**.

Như vậy, đây là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam xây dựng thành công quy trình Real-time PCR phát hiện gen *Tropomyosin* – gây dị ứng hải sản. Nhóm nghiên cứu đề nghị tiến hành kiểm tra ngoài với quy trình Real-time PCR này để hướng tới phát .

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

FABER, M. A., PASCAL, M., EL KHARBOUCHI, O., SABATO, V., HAGENDORENS, M. M., DECUYPER, I. I., ... & EBO, D. G (2017). Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. Allergy, 72(6), 842-848

KIM, M. J., KIM, H. I., KIM, J. H., SUH, S. M., & KIM, H. Y. (2019). Rapid on-site detection of shrimp allergen tropomyosin using a novel ultrafast PCR system. Food science and biotechnology, 28(2), 591-597.

LEHRER, S. B., HELBLING, A., & DAUL, C. B. (1992). Seafood allergy: prevalence and treatment. Journal of food safety, 13(1), 61-76.

SAMPSON, H. A. (2003). Anaphylaxis and emergency treatment. Pediatrics, 111(Supplement 3), 1601-1608.

SHANTI, K. N., MARTIN, B. M., NAGPAL, S., METCALFE, D. D., & RAO, P. V. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. The Journal of Immunology, 151(10), 5354-5363.