

XÂY DỰNG VÀ THỬ NGHIỆM BỘ KIT TRIPLEX-PCR PHÂN BIỆT BA LOÀI SÁN DÂY (TAENIA ASIATICA; T. SAGINATA VÀ T. SOLIUM) TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Khuê¹, Hoàng Thị Minh Châu¹, Nguyễn Văn Đê², Lê Thanh Hòa¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Y Hà Nội

TÓM TẮT

Phản ứng uni- và triplex-PCR đặc hiệu phát hiện đơn và ba loài sán dây gây bệnh trên người từ nguồn lấy là thực phẩm thịt lợn, bò nhiễm bệnh (ấu trùng sán) là cần thiết. Chúng tôi thiết kế và thử nghiệm bộ kit chẩn đoán phân biệt các loài sán dây lợn (*Taenia solium*); bò (*T. saginata*) và sán dây châu Á (*T. asiatica*), sử dụng chỉ thị phân tử hệ gen ty thể. Mỗi ngược (TASSR) chung cho cả 3 loài, cho sản phẩm PCR với mỗi một mẫu xuôi riêng của *T. solium* (TSOF) là 474 bp; của *T. saginata* (TSAF) là 609 bp, và của *T. asiatica* (TASF) là 706 bp. Phản ứng PCR đơn loài (uniplex PCR) đã được kiểm tra với khuôn và mỗi đặc hiệu đơn loài, chéo khuôn và chéo môi, cho kết quả đặc hiệu cao. Trên cơ sở độ dài chênh lệch của sản phẩm, bộ kit triplex-PCR (ký hiệu: kit D(Tso+Tsa+Tas)) được xây dựng và thử nghiệm với khuôn chung của 3 loài và mỗi chung của 2 hoặc 3 loài. Kết quả cho thấy, chỉ có cặp mỗi đặc hiệu của loài mới phát hiện đúng loài chủ đích có trong hỗn hợp khuôn, mới cho sản phẩm PCR. Độ nhạy của bộ kit cho phép phát hiện khuôn DNA tổng số có hàm lượng khoảng 0,8 ng của 3 loài. Bộ kit sử dụng thuận lợi, chính xác, đa dụng phát hiện dễ dàng ấu trùng sán dây bò, lợn trong thực phẩm và sản trường thành ở người và động vật.

Từ khóa: Kit D(Tso+Tsa+Tas), multiplex-PCR, PCR, *Taenia asiatica*, *T. saginata*, *T. solium*, triplex-PCR, Uniplex-PCR

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay họ sán dây Taeniidae Ludwig, 1886. có rất nhiều loại, gồm các loài thuộc giống *Multiceps*, giống *Echinococcus* và giống *Taenia*. Trong đó quan trọng nhất là giống *Taenia*, với sán dây lợn *T. solium* và ấu trùng sán dây lợn (cysticercosis), sán dây bò *T. saginata* và sán dây, sán dây châu Á *T. asiatica* ở người (Eom, 2006; Willingham *et al.*, 2010). *Taenia* sử dụng người là vật chủ chính duy nhất và trâu bò (*T. saginata*) và lợn (*T. solium* và *T. asiatica*) là vật chủ trung gian. Hiện nay loài *T. solium* gây bệnh ấu trùng sán lợn ở người, gọi là bệnh ấu trùng sán lợn (cysticercosis) được coi là bệnh nguy hiểm nhất do sán dây gây ra (Willingham *et al.*, 2010).

T. saginata và *T. asiatica*, cho đến gần đây, chưa được phân biệt thành hai loài riêng biệt và *T. asiatica* được coi là dưới loài của *T. saginata* với tên gọi *T. saginata asiatica* (Eom, 2006). Trong 5 năm trở lại đây, *T. asiatica*, được chính thức phân loại, gọi là sán dây châu Á phát hiện trên người, nhưng vòng đời và một số đặc tính sinh học còn chưa sáng tỏ (Eom, 2006). Chỉ thị phân tử ty thể được sử dụng có giá trị trong chẩn đoán phân loại, di truyền quần thể và thẩm định loài, đặc biệt là loài mới phát hiện (Le *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2006). PCR (polymerase

chain reaction) đã trở thành công cụ giá trị trong giám định, phát hiện loài, ứng dụng rộng rãi trong mọi lĩnh vực, trước hết là chẩn đoán các loài gây bệnh, kể cả ký sinh trùng với độ chính xác cao (Ishmael, Stellato, 2008). Mỗi cặp môi trong phản ứng PCR, phát hiện đặc hiệu mỗi một gen đích với độ nhạy cao, bao gồm đơn gen (uniplex-), hai gen (duplex-), ba gen (triplex-) và nhiều gen (multiplex-PCR), đánh giá kết quả do kích thước sản phẩm chênh lệch, khi điện di trên thạch agarose (Deng *et al.*, 2000). Xây dựng multiplex-PCR đòi hỏi thiết kế môi và thử/kiểm nghiệm phản ứng hết sức chuẩn xác (Kaderali, 2007; Nguyễn Văn Đê, Lê Thanh Hòa, 2010).

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả thiết kế và thử nghiệm bộ kit triplex-PCR, ký hiệu D(Tso+Tsa+Tas), phân biệt giữa các loài *Taenia asiatica*; *T. saginata*; *T. solium* tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu ký sinh trùng sử dụng cho nghiên cứu

Được các đơn vị phối hợp cung cấp là Trường Đại học Y Hà Nội, Viện Sốt rét Ký sinh trùng và Côn trùng Quy Nhơn, Viện Thú y Trung ương và

một số cơ sở khác. Nguồn mẫu được thu từ người có sản dây và ấu trùng sản lợn, ở các địa phương khác nhau (Hà Nội, Phú Thọ, Quảng Ninh, Nam Định, Thanh Hoá, Nghệ An, Quảng Trị, Huế, Quảng Nam, Bình Định, Quy Nhơn). Tất cả các mẫu đã được thẩm định bằng hình thái học.

Một số mẫu đại diện của các vùng được chọn bao gồm: i) *T. asiatica* thu từ người, ký hiệu TaN3 (Hà Tây cũ); TasDV (Hà Nội); ii) *T. saginata* từ người ký hiệu: TQN (Quy Nhơn); TNS1 (Nga Sơn, Thanh Hóa), TsaDV (Hà Nội); iii) *T. solium* từ người, ký hiệu Ts0N1b (Hà Nội); TsBN12 (Bắc Ninh). Tất cả các mẫu này đã được thẩm định loài bằng phương pháp sinh học phân tử (Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa, 2010).

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Hàn Quốc). Mô tả như sau: Mẫu ký sinh trùng (bảo quản trong cồn 70° hoặc mẫu tươi) được nghiền trong bộ cối chày nhựa, cho thêm 200 µl dung dịch Tissue Lysis buffer (ATL), nghiền tiếp đến khi thành huyền dịch đồng nhất. Tiếp theo, bổ sung 20 µl proteinase K (100mg/ml) và 4 µl RNase-A, ủ 56°C trong 2 giờ; bổ sung 200 µl Binding buffer (AL), lắc đều, rồi ủ ở 70°C trong 20 phút. Thêm 200 µl dung dịch isopropanol (100%), lắc trong 15 giây; ly tâm

10.000 vòng/phút trong 1 phút. Chuyển hỗn dịch sang cột có màng lọc, ly tâm, loại bỏ phần dung dịch phía dưới. Cho 500 µl dung dịch Washing buffer 1 (AW1) vào cột lọc để rửa DNA, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch ly tâm bên dưới. Cho 500 µl Washing buffer 2 AW2 vào cột lọc để tiếp tục rửa DNA, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới. Ly tâm lại 13.000 vòng/phút trong 1 phút làm khô màng. Chuyển cột lọc sang ống Eppendorf mới, cho 60 µl dung dịch Elution buffer (EL), để ở nhiệt độ phòng trong 4 - 5 phút; sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút. Bỏ cột, thu dịch bên dưới là DNA tổng số. Ghi ký hiệu mẫu và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Khuôn DNA tổng số được pha ở nồng độ 50 ng/µl.

Thiết kế mồi và thực hiện PCR và multiplex-PCR

Thiết kế các cặp mồi dựa trên nguyên tắc nhân vùng gen đặc hiệu đã được chọn lựa, cho sản phẩm PCR có độ dài chênh lệch giữa các đôi tương ứng để phân biệt, để dễ đánh giá bằng phương pháp điện di trên thạch. Các cặp mồi được thiết kế theo Jeon và đồng tác giả (2009), trên cơ sở so sánh trình tự nucleotide của một vùng gen trong hệ gen ty thể của *T. asiatica* (số đăng ký Ngân hàng gen: AF445798), *T. saginata* (AY684274) và *T. solium* (AB086256). Trình tự các chuỗi mồi liệt kê ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự chuỗi nucleotide của các mồi sử dụng trong phản ứng multiplex-PCR phân biệt các loài *Taenia* spp (dựa theo Jeon *et al.*, 2009)

Tên mồi	Trình tự chuỗi mồi (5' → 3')	Vị trí bám	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
TASF (mồi xuôi)	5' GGGTTTAAGTTATAAAATGTGATGT 3'	Riêng cho <i>T. asiatica</i>	706
TSAF (mồi xuôi)	5 ACTACATTTGGTTTGTTTTGTAG 3'	Riêng cho <i>T. saginata</i>	629
TSOF (mồi xuôi)	5' CTAGGCCACTTAGTAGTTTAGTTA 3'	Riêng cho <i>T. solium</i>	474
TASSR (mồi ngược)	5' CATAAAACACTCAAACCTTATAGA 3'	Chung cho cả 3 loài	

Ghi chú: Sản phẩm PCR giữa 2 mồi là TASF-TASSR 706 bp; TSAF-TASSR 629 bp; TSOF-TASSR 474 bp.

Phản ứng PCR đơn loài (uniplex-PCR) được phối hợp gồm: 25 µl PCR Mastermix, 2 µl mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược (10 pmol/µl), 2,5 µl DMSO (dimethyl sulfoxide), 1 µl khuôn DNA tổng số và lượng nước vừa đủ đến 50 µl. DMSO có tác dụng tăng cường chất lượng PCR (Kitade *et al.*, 2003). Phản ứng multiplex-PCR đa mồi (2 cặp hoặc 3 cặp mồi) với khuôn đơn loài (uniplex) hoặc 3 loài (triplex-PCR), được bổ trí mỗi loại mồi là 10 picomol; mỗi loại khuôn là 50 ng, cùng với các thành phần của phản ứng như trên. Chu trình nhiệt thực hiện PCR: 1 chu kỳ ở

95°C/5 phút; 35 chu kỳ [95°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút 30 giây]; 1 chu kỳ cuối ở 72°C/5 phút; sau đó giảm xuống 4°C bảo quản sản phẩm. Điện di trên thạch agarose 1% để kiểm tra sản phẩm PCR và đánh giá kết quả trên cơ sở chênh lệch kích thước sản phẩm PCR ở mỗi phản ứng.

Một số sản phẩm PCR/multiplex-PCR được tinh sạch, giải trình tự để kiểm tra chuỗi nucleotide của từng loài bổ sung cho kết quả đánh giá bằng điện di trên thạch.

Thử nghiệm chẩn đoán phân biệt và xác định độ nhạy của bộ kit triplex-PCR

Khuôn chung DNA tổng số của các loài (nồng độ ban đầu là 50 ng/ul), được hỗn hợp bằng cách trộn chung theo tỉ lệ như nhau. Các khuôn chung được hỗn hợp như sau:

Hỗn hợp khuôn 1: Trộn khuôn chung 2 loài *T. saginata* và *T. solium*: TQN/TsoN1b = 3 μ l (50 ng/ μ l) TNS1 + 3 μ l (50 ng/ μ l) TsoN1b.

Hỗn hợp khuôn 2: Trộn khuôn chung 2 loài *T. asiatica* và *T. solium*: TaN3/TsoN1b = 3 μ l (50 ng/ μ l) TaN3 + 3 μ l (50 ng/ μ l) TsoN1b.

Hỗn hợp khuôn 3: Trộn khuôn chung 2 loài *T. asiatica* và *T. saginata*: TaN3/TQN = 3 μ l (50 ng/ μ l) TaN3 + 3 μ l (50 ng/ μ l) TQN.

Hỗn hợp khuôn 4: Trộn khuôn chung 3 loài *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium*: TaN3/TQN/TsoN1b = 3 μ l (50 ng/ μ l) TNS1 + 3 μ l (50 ng/ μ l) TsoN1b + 3 μ l (50 ng/ μ l) TsoN1b.

Phản ứng PCR với các loại khuôn hỗn hợp trên, được thực hiện với 4 môi TASF-TSAF-TSOF-TASSR cho 1 phản ứng PCR (triplex-PCR: 4 môi; phát hiện 3 loài).

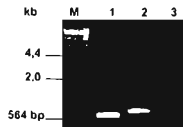
Để xác định độ nhạy của kit triplex-PCR, kỹ hiệu kit là kit D(Tso+Tsa+Tas), từ khuôn chung 3 loài, tiến hành pha loãng như sau: 2¹ (25ng/ μ l); 2² (12,5 ng/ μ l); 2³ (6,25 ng/ μ l); 2⁴ (3,125 ng/ μ l); 2⁵ (1,5625 ng/ μ l); 2⁶ (0,78125 ng/ μ l); 2⁷ (0,390625 ng/ μ l). Thực hiện phản ứng triplex-PCR với thành phần và chu trình nhiệt như đã mô tả, bắt đầu với khuôn là 1 μ l (25ng/ μ l) đến 2⁷ (khoảng 0,39 ng/ μ l). Sản phẩm được điện di trên thạch agarose 1%, nhuộm ethidium bromide và đánh giá kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thử nghiệm cặp môi TASF-TASSR, TSAF-TASSR, TSOF-TASSR với các chủng *Taenia spp*

Để kiểm tra các cặp môi TASF-TASSR, TSAF-TASSR, TSOF-TASSR được thiết kế có thực sự đặc hiệu đối với các chủng sán dây và ấu trùng sán lợn *Taenia spp* hay không, chúng tôi sử dụng khuôn DNA tổng số của các chủng *Taenia spp* đã được cung cấp và thực hiện phản ứng PCR đơn loài (uniplex-PCR). Các mẫu gồm: TaN3 (*T. asiatica*); TQN (*T. saginata*); và TsoN1b (*T. solium*). Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt đã được tối ưu hoá như đã mô tả. Sản phẩm uniplex-PCR được

điện di trên thạch agarose 1%, kết quả trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sản phẩm uniplex-PCR của các mẫu *Taenia spp* Ghi chú: M chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể Lambda được cắt bằng HindIII, giêng số 1 là từ khuôn TQN (*T. saginata*), có băng DNA kích thước 629 bp, giêng số 2 là TaN3 (*T. asiatica*), kích thước 706 bp, giêng số 3 là TsoN1b (*T. solium*), kích thước 474 bp.

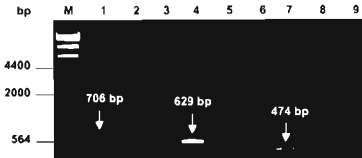
Kết quả cho thấy, ở tất các các giêng đều xuất hiện một băng DNA đơn nhất có chất lượng rất tốt, có kích thước đúng như dự kiến, lần lượt là 629 bp của TQN, tương ứng với loài *T. saginata*; 706 bp của TaN3, tương ứng với loài *T. asiatica*; và 474 bp của TsoN1b, tương ứng với loài *T. solium*. Các sản phẩm được tinh sạch và giải trình tự, kết quả cho biết các chuỗi nucleotide đúng với trình tự vùng gen ty thể tương ứng (không trình bày ở đây). Uniplex-PCR cũng được thực hiện với một số mẫu *Taenia spp* khác, kết quả cho thấy mẫu TasDV (Hà Nội) là *T. asiatica*, mẫu TNS1 (Thanh Hóa) là *T. saginata*; và mẫu TsBN12 (Bắc Ninh) là *T. solium* (không trình bày ở đây). Như vậy, quá trình thực hiện uniplex-PCR đã khẳng định các cặp môi rất đặc hiệu đối với từng loài sán dây và ấu trùng sán lợn tương ứng.

Thử nghiệm chéo các cặp môi TASF-TASSR, TSAF-TASSR và TSOF-TASSR phân biệt giữa 3 loài *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium*

Các cặp môi TASF-TASSR, TSAF-TASSR và TSOF-TASSR thiết kế với các loài *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium* có thực sự đặc hiệu chỉ riêng đối với loài đích hay không được kiểm tra bằng cách thực hiện uniplex-PCR, với cặp môi của loài này trên khuôn DNA tổng số của loài khác. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên thạch agarose 1% trình bày ở hình 2 cho thấy, chỉ những khuôn thực hiện bằng đúng cặp môi được thiết kế đặc hiệu cho chính loài đó, thì PCR cho sản phẩm rõ ràng, băng sáng, đơn nhất, kích thước 706 bp đặc hiệu cho *T. asiatica* (giêng 1), kích thước 629 bp đặc hiệu cho *T. saginata* (giêng 4), kích thước 474 bp đặc hiệu cho *T. solium* (giêng 7). Các giêng còn lại không có băng

DNA do thực hiện chéo mỗi nên không bám vào khuôn DNA của loài khác. Kết quả này cho thấy, không thấy xuất hiện sự bất cặp lẫn nhau giữa cặp

mỗi này với các nguồn khuôn khác loài trong cùng một phản ứng PCR. Đây là yếu tố cần thiết để xây dựng kit multiplex-PCR phân biệt các loài với nhau.



Hình 2. Sản phẩm PCR thực hiện thử nghiệm đối chéo mỗi, đối chéo khuôn tương ứng. M: chỉ thị phân tử DNA; 1: khuôn TaN3 (*T. asiatica*), bằng cặp mồi TASF-TASSR (của *T. asiatica*), 706 bp, 2, 3: khuôn TaN3, lần lượt bằng cặp mồi TSAF-TASSR (của *T. saginata*) và TSOF-TASSR (của *T. solium*), không cho sản phẩm, 4: khuôn TQN (*T. saginata*) bằng cặp mồi TSAF-TASSR (của *T. saginata*), 629 bp, 5, 6: khuôn TQN, lần lượt bằng cặp mồi TASF-TASSR (của *T. asiatica*) và TSOF-TASSR (của *T. solium*), không cho sản phẩm, 7: khuôn TsoN1b (*T. solium*), bằng cặp mồi TSOF-TASSR (của *T. solium*), 474 bp; 8, 9: khuôn TsoN1b, lần lượt bằng cặp mồi TASF-TASSR (của *T. asiatica*) và TSAF-TASSR (của *T. saginata*), không cho sản phẩm

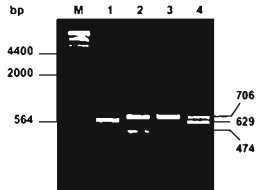
Kết quả thử nghiệm bộ kit multiplex-PCR chẩn đoán phân biệt giữa 3 loài *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium*

Sau khi hoàn thành các phản ứng PCR riêng biệt với khuôn DNA đơn loài, kit multiplex-PCR phân biệt 3 loài *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium*, gọi là triplex-PCR, ký hiệu là kit D(Tso+Tsa+Tas). Kit D(Tso+Tsa+Tas) được thử nghiệm trên các mẫu DNA tổng số, hỗn hợp giữa TaN3 (*T. asiatica*), TQN (*T. saginata*) và TsoN1b (*T. solium*).

Thực hiện phản ứng PCR với thành phần, theo chu trình nhiệt như đã trình bày; sau đó điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên thạch agarose 1% (hình 3). Kết quả ở cho thấy, ở giếng 1, 2, 3, với hỗn hợp khuôn của 2 loài, chỉ xuất hiện 2 băng DNA; giếng 4, với hỗn hợp khuôn của 3 loài, có 3 băng DNA hiển thị. Như vậy, tuy có cả 3 cặp mồi TASF-TASSR, TSAF-TASSR và TSOF-TASSR trong phản ứng triplex-PCR, nhưng chỉ xuất hiện 2 băng DNA đặc hiệu, có độ dài tương ứng với mỗi loài: *T. saginata* và *T. solium* (giếng 1), *T. asiatica* và *T. solium* (giếng 2), *T. asiatica* và *T. saginata* (giếng 3). Ở giếng 4, khuôn của 3 loài đã cho 3 sản phẩm PCR, với kích thước tương ứng của loài *T. asiatica* (706 bp), *T. saginata* (629 bp) và *T. solium* (474 bp).

Như vậy, bộ kit triplex-PCR D(Tso+Tsa+Tas) sử dụng 3 cặp mồi (TASF-TASSR, TSAF-TASSR

và TSOF-TASSR), phát hiện 3 loài loài sản dây và ấu trùng sản lợn, đã được thử nghiệm thành công.



Hình 3. Sản phẩm PCR của kit triplex-PCR giữa *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium* (bộ Kit D(Tso+Tsa+Tas)) sử dụng 3 cặp mồi TASF-TASSR, TSAF-TASSR và TSOF-TASSR. Ghi chú: M: chỉ thị phân tử DNA (Lambda cắt bằng *Hind*III); Giếng 1: Từ hỗn hợp khuôn số 1, TQN/TsoN1b (2 loài: *T. saginata* + *T. solium*); Giếng 2: Từ hỗn hợp khuôn số 2, TaN3/TsoN1b (2 loài: *T. asiatica* + *T. solium*); Giếng 3: Từ hỗn hợp khuôn số 3, TaN3/TQN (2 loài: *T. asiatica* + *T. saginata*); Giếng 4: Từ hỗn hợp khuôn số 4, TaN3/TQN/TsoN1b (3 loài: *T. asiatica* + *T. saginata* + *T. solium*).

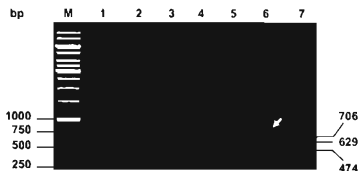
Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của kit

Kiểm tra độ nhạy của phản ứng PCR là nhằm xác định ở độ pha loãng cao nhất mà phản ứng thực hiện được, cho kết quả dương tính. Phản ứng được

tiến hành với khuôn DNA tổng số của mẫu TaN3 (*T. asiatica*), TQN (*T. saginata*) và TsoN1b (*T. solium*), được pha ở nồng độ gốc 50 ng/μl. Từ nồng độ này, DNA tổng số của các mẫu được pha loãng theo cơ số 2 (2^{-1} đến 2^{-7}) và thực hiện PCR bắt đầu từ khuôn có nồng độ 2^{-1} (25 ng/μl) (Hình 4).

Với các độ pha loãng khác nhau, 1 μl của mỗi một nồng độ được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR đa môi gồm 4 môi (TASF-TSAF-TSOF/TASSR), thực hiện theo thành phần và chu

trình nhiệt đã trình bày, sau đó điện di kiểm tra kết quả trên thạch agarose 1%. Kết quả điện di kiểm tra độ nhạy bộ kit trình bày ở hình 4, cho thấy, ở nồng độ 2^{-6} (0,78125ng/μl), khi sử dụng 1 μl làm khuôn, phản ứng PCR vẫn cho phép phát hiện được sản phẩm. Tuy nhiên, ở các nồng độ khuôn thấp hơn (khoảng 0,78 ng/phản ứng và sau đó), sản phẩm PCR hiển thị không được rõ lắm để cho phép đánh giá kết quả. Kết quả cũng cho phép khẳng định, nếu mẫu bệnh phẩm có hàm lượng khuôn DNA tổng số từ khoảng 0,78 ng trở lên, đều cho kết quả PCR dương tính.



Hình 4. Độ nhạy của phản ứng triplex-PCR của bộ kit ở các nồng độ khác nhau của khuôn trộn chung DNA tổng số của *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium*. Ghi chú: M: Chỉ thị DNA (thang 1 kb ladder). Giếng 1: 25 ng (2^1); Giếng 2: 12,5 ng (2^2); Giếng 3: 6,25 ng (2^3); Giếng 4: 3,13 ng (2^4); Giếng 5: 1,56 ng (2^5); Giếng 6: 0,78 ng (2^6); Giếng 7: 0,39 ng (2^7). Môi ten cho biết với hàm lượng khuôn DNA ở 0,78 ng, vẫn có băng DNA phát hiện được.

KẾT LUẬN

Thiết kế, kiểm tra và xác định hiệu quả bộ kit triplex-PCR (ký hiệu bộ kit là D(Tso+Tas+Tsa)) phân biệt giữa 3 loài sán dây và ấu trùng sán lợn *T. asiatica*, *T. saginata* và *T. solium*, đã được thực hiện thành công. Bộ kit đã được xây dựng và thử nghiệm đánh giá trên các loại khuôn đơn và hỗn hợp giữa 2 và 3 loài, cho kết quả với độ nhạy và đặc hiệu cao.

Lời cảm ơn: Chúng tôi cảm ơn Bộ Y tế hỗ trợ kinh phí cho đề tài cấp Bộ do PGS. TS. Lê Thanh Hòa chủ nhiệm (2010-2011): "Sử dụng phương pháp phân tử xây dựng kit để chẩn đoán các loài ký sinh trùng chủ yếu ở Việt Nam"; và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học cung cấp trang thiết bị để hoàn thành công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Deng HW, Zhou Y, Recker RR, Johnson ML, Li J (2000) Fragment size difference between multiplex and singleplex

PCR products and their practical implications *Biotechniques* 29(2): 298-304

Eom KS (2006) What is Asian *Taenia*? *Parasitol Int* 55 Suppl. S137-141. Review.

Ishmael FT, Stellato C (2008) Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol* 101(4): 437-443.

Jeon HK, Chai JY, Kong Y, Waikagul J, Insiengmay B, Rim HJ, Eom KS (2009) Differential diagnosis of *Taenia asiatica* using multiplex PCR. *Exp Parasitol* 121(2): 151-156.

Kaderali L (2007) Primer design for multiplexed genotyping. *Methods Mol Biol* 402: 269-286. Review.

Kitade Y, Ootsuka S, Iitsuka O, Saga N (2003) Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. *J Appl Phycol* 15: 555-557.

Le TH, Blair D, McManus DP (2002) Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol* 18(5): 206-213.

Nguyễn Văn ĐỀ, Lê Thanh Hòa (2010) Sách chuyên khảo

"Sân dầy lâu trùng sản tợn và sinh học phân tử ứng dụng".
Nhà xuất bản Y học (326 trang).

Willingham AL 3rd, Wu HW, Conlan J, Satrija F (2010)
 Combating *Taenia solium* cysticercosis in Southeast Asia
 an opportunity for improving human health and livestock

production. *Adv Parasitol* 72: 235-266. Review.

Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, Sato MO,
 Ito A (2006) Mitochondrial DNA diagnosis for
 taeniasis and cysticercosis. *Parasitol Int* 55 Suppl:
 S81-85.

DEVELOPMENT OF A TRIPLEX-PCR KIT FOR DETECTION OF THREE TAPEWORMS (*TAENIA ASIATICA*; *T. SAGINATA* VÀ *T. SOLIUM*) IN VIETNAM

Nguyễn Thị Khuê¹, Hoàng Thị Minh Châu¹, Nguyễn Văn Đức², Lê Thanh Hoa¹

¹*Institute of Biotechnology*

²*Hanoi Medical University*

SUMMARY

Specific uni- and triplex-PCR for detection of single and three tapeworms transmitted from food to humans including beef and pork meat (cysticerci) (food-borne zoonoses) are needed to be developed. We have developed and tested diagnostic kit(s) for single and multiple, i.e. pig (*Taenia solium*); cattle (*T. saginata*) and human (*T. asiatica*) tapeworms, using mitochondrial genetic markers. The reverse primer (namely, TASSR) common for three species, which was used to pair with the forward primer specific to each species in PCR reaction. The PCR product for *T. solium* (with forward primer, TSOF) is 474 bp, for *T. saginata* (with TSAF) is 609 bp, and for *T. asiatica* (with TASF) is 706 bp. Uniplex-PCR examined with single DNA template and species specific primers, and with crossing templates and crossing primers, generated highly specific products. Based on the length difference of the PCR products specific to each tapeworm, a triplex-PCR kit (designated as D(Tso+Tsa+Tas)) was developed and tested with a mix of three genomic DNA templates and with a mix of primers for two or three species, respectively. As results, triplex-PCR kit, namely kit D(Tso+Tsa+Tas) had very high specificity and sensitivity. It revealed that only the target species- specific primers could generate PCR product from the target species in the template-mix. Sensitivity of the kit allows PCR to obtain product with the limit of diluted genomic DNA template mix of three species as little as 0.8 ng. This kit is accurate, easy performing and sensitive, which can detect any target *Taenia* species among the above three species in a form of cysticerci in food (meat) and adult worms in humans and animals

Keywords: Kit D(Tso+Tsa+Tas), multiplex-PCR, PCR, *Taenia asiatica*, *T. saginata*, *T. solium*, triplex-PCR, uniplex-PCR