

Nghiên cứu khoa học

GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM GEN UL5 CỦA VIRUS DỊCH TẢ VỊT TẠI VIỆT NAM

*Đoàn Thị Thanh Hương¹, Tạ Hoàng Long², Đỗ Thị Roan¹,
Lê Thị Kim Xuyên¹, Nguyễn Thị Khuê¹, Lê Thanh Hòa¹*

TÓM TẮT

Virus dịch tả vịt (DEV) là tác nhân gây ra bệnh truyền nhiễm cấp tính, lây lan nhanh với tỷ lệ chết cao cho loài thủy cầm ở mọi lứa tuổi. Trong nghiên cứu này, toàn bộ gen helicase UL5 của hai chủng virus dịch tả vịt tại Việt Nam, bao gồm một chủng cường độc (kí hiệu là DTVCDKN) và một chủng nhược độc vaccin (kí hiệu là DTVVXKN) do Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I cung cấp đã được dòng hóa vào vector tách dòng và giải trình tự bao gồm 2568 nucleotide mã hóa cho 856 amino acid. Thành phần cấu trúc gen UL5 của các chủng virus dịch tả vịt Việt Nam gồm có: 769 adenine (29,95%), 556 cytosine (21,65%), 533 guanine (20,76%) và 710 thymine (27,65%). Kết quả so sánh giữa gen UL5 của chủng virus cường độc và chủng virus nhược độc vaccin Việt Nam với gen UL5 của các chủng DEV đăng ký trên Ngân hàng gen thế giới cho thấy mức tương đồng của chúng là 100%, trong khi có 9 vị trí sai khác về nucleotide, dẫn đến 4 vị trí sai khác về amino acid khi so sánh giữa 2 chủng virus của Việt Nam với các chủng của thế giới. Đây là công bố đầu tiên về giải mã gen virus dịch tả vịt tại Việt Nam.

Từ khóa: Virus dịch tả vịt, Cường độc, Gen UL5, Vaccin, Việt Nam

UL5 gene decoding and sequence analysis of Duck Enteritis Virus isolated in Viet Nam

*Doan Thi Thanh Huong, Ta Hoang Long, Do Thi Roan,
Le Thi Kim Xuyen, Nguyen Thi Khue, Le Thanh Hoa*

SUMMARY

Duck enteritis virus (DEV) is an agent causing the fatal, contagious, acute disease in all age groups of duck. In this study, the entire of helicase UL5 gene of two DEV strains in Viet Nam including a virulent strain (DTVCDKN) and an attenuated vaccine strain (DTVVXKN) from National Centre of Veterinary Medicine Control No.1 was cloned, decoded, it consisted of 2568 nucleotides encoding 855 amino acids. The composition of DEV UL5 gene included 769 adenine (29.95%), 556 cytosine (21.65%), 533 guanine (20.76%) and 710 thymine (27.65%). Comparison result between two Vietnamese DEV UL5 genes and the DEV UL5 genes in GenBank indicated that the similarity level of the nucleotide and amino acid of these genes was 100%, while there were 9 different sites of nucleotide leading on 4 different sites of amino acid in comparison between two Vietnamese virus strains and the respective virus strains in GenBank. This is the first report of molecular characterization of DEVs in Viet Nam.

Key words: Duck enteritis virus, Virulent, UL5 gene, Vaccine, Viet Nam

¹ Phòng Miễn dịch học – Viện Công nghệ sinh học

² Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc Thú y trung ương I

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch tả vịt (duck plague) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính, lây lan nhanh cho nhiều loài thủy cầm, ở hầu hết mọi lứa tuổi, có tỷ lệ chết cao và gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi vịt trên thế giới cũng như tại Việt Nam (Wobeser, 1997; OIE, 2010). Virus dịch tả vịt (Duck enteritis virus (DEV)) là thành viên của họ *Herpesviridae*, có hệ gen là DNA sợi đôi, dài khoảng 150-170 kb, bao gồm hai vùng gen (unique region, U) là UL (vùng dài) và US (vùng ngắn). Bao bọc hai đầu của vùng gen ngắn là hai vùng lặp IR và TR. Thành phần nucleotide trong hệ gen thiên về G+C (Guanine và Cytosine), chiếm tỷ lệ 64,3%, cao hơn rất nhiều so với các *herpesvirus* khác của gia cầm (Gardner et al., 1993). Vì hệ gen của virus dịch tả vịt tương đối lớn nên đến nay mới chỉ có một vài hệ gen được giải mã (Wang et al., 2011).

Trong số các gen của hệ gen virus dịch tả vịt, một số gen được sử dụng làm chỉ thị di truyền trong chẩn đoán, giám định bệnh và phân tích phả hệ nguồn gốc, bao gồm gen DNA-polymerase (DNA-pol), gen UL32 (Hansen et al., 2000) và gen UL5 (Pan et al., 2008).

UL5 là một trong ba tiểu đơn vị của phức hợp helicase-primase. Các tiểu đơn vị của helicase - primase gồm UL5/UL8/UL52, là những enzyme hoạt động, bao gồm một helicase từ đầu 5' - 3', một DNA đơn có chức năng như một NTPase và môi hoạt động. Các helicase đóng vai trò thiết yếu trong nhiều quá trình sinh học quan trọng của virus như quá trình sao chép, sửa chữa, tái tổ hợp, sao mã và dịch mã DNA của *herpesvirus* (Marintcheva và Weller, 2001). UL5 chứa 7 motif bảo tồn được tìm thấy trong tất cả các thành viên của họ helicase, chịu trách nhiệm cho việc tháo xoắn chuỗi cũng như quá trình sao chép DNA và hoàn thiện chu kỳ sống của virus (Zhu và Weller, 1992). Các thay đổi nhỏ về cấu trúc trong tiểu đơn vị UL5 cũng có thể ảnh hưởng đến hoạt động của primase (Biswas và Weller, 2001). Tuy nhiên, trên thế giới, các công bố về trình tự gen UL5 vẫn còn rất hạn chế.

Cho đến nay, sinh học phân tử gen và hệ gen

của virus cường độc và vaccin dịch tả vịt tại Việt Nam chưa được hiểu rõ. Chính vì vậy, việc nghiên cứu giải mã về gen/hệ gen và phân tích đặc tính phân tử trong phân loại virus dịch tả vịt tại Việt Nam là điều rất cần thiết. Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu toàn bộ chuỗi gen UL5 của chủng virus dịch tả vịt cường độc và chủng virus dịch tả vịt nhược độc vaccin có nguồn gốc tại Việt Nam, đồng thời so sánh sự biến đổi thành phần gen với các chủng virus khác trên thế giới đăng ký ở Ngân hàng gen.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chủng virus dịch tả vịt cường độc (DTVC-DKN) và nhược độc vaccin (DTVXXKN) dùng trong nghiên cứu do Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I cung cấp. Quá trình xử lý mẫu được tiến hành như sau: Chủng virus cường độc và nhược độc dịch tả vịt đông khô được hòa tan bằng nước muối sinh lý với tỉ lệ 1:5 và ly tâm 8000 vòng/ phút trong 5 phút để thu dịch nổi chứa virus. Dịch chứa virus được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng để tách chiết DNA tổng số.

Các chủng virus dịch tả vịt của nước ngoài sử dụng trong nghiên cứu, so sánh với chủng virus của Việt Nam được thu nhận từ Ngân hàng gen thế giới.

Bộ kit chuẩn PCR (QIAGEN Inc, USA) và cặp mồi đặc hiệu (Macrogen Inc, Hàn Quốc) sử dụng để nhân toàn bộ gen UL5.

2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc.) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3. Thiết kế mồi và thực hiện phản ứng PCR

Cặp mồi dùng cho phản ứng PCR thu nhận gen UL5, bao gồm:

- Mồi xuôi

UL5F: 5'-CCTTGGTTCATCATATTCAT-3'

- Môi ngược

UL5R-GGGCAAGGTACCAGCAGTT-3'.

Các phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: 94°C/5 phút; 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 48°C/1 phút, 72°C/3 phút] và chu kỳ cuối cùng ở 72°C/10 phút. Bảo quản sản phẩm ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên thạch agarose 1%, sau đó tinh sạch bằng bộ sinh phẩm AccuPrep™ PCR Purification kit (Bioneer, Hàn Quốc), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR đã tinh sạch được nối vào vector pCR2.1® (Invitrogen), chuyển nạp vào tế bào khả biến *E.coli* dòng DH5α, tách chiết DNA plasmid, chọn lọc DNA tái tổ hợp mang gen UL5 và giải trình trình tự.

2.4. Giải trình trình tự và phân tích số liệu

Plasmid tái tổ hợp chứa gen UL5 được giải trình tự trên máy Applied Biosystems (ABI) Model 3730XL. Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03, sau đó sắp xếp chuỗi và xử lý tiếp bằng chương trình AssemblyLIGN1.9, hệ chương trình MacVector 8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh. Các chuỗi gen UL5 trong nghiên cứu này được đem so sánh với trình tự nucleotide và amino acid của các chủng trên thế giới, sử dụng chương

trình GenDOC2.7; phân tích phả hệ bằng chương trình MEGA6.06 với hệ số tin cậy 1000 bootstrap.

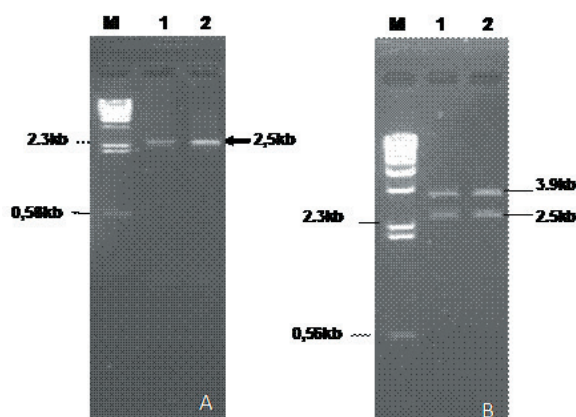
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số và thu nhận gen helicase (UL5)

DNA tổng số sau khi tách chiết được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để nhân vùng gen UL5 của hai mẫu virus cường độc và vaccin với cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt đã được trình bày. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR và sản phẩm dòng hóa được thể hiện ở Hình 1. Sản phẩm PCR khi điện di trên thạch agarose 1% thể hiện ở Hình 1A là một băng đơn nhất, có kích thước khoảng 2,5 kb, đúng với kích thước dự kiến ban đầu của gen UL5 với chất lượng tốt. Kết quả cắt kiểm tra DNA plasmid tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn *EcoRI* (Fermentas) được thể hiện ở Hình 1B. Trên Hình 1B thu được 2 băng, một băng có kích thước xấp xỉ 3,9kb, bằng kích thước của vector pCR2.1, một băng có kích thước xấp xỉ 2,5kb, bằng kích thước của gen UL5 chèn vào. Điều đó chứng tỏ quá trình dòng hóa, gắn gen UL5 vào vector tách dòng đã được thực hiện thành công.

3.2. Kết quả giải trình tự gen helicase (UL5)

Plasmid tái tổ hợp chứa gen UL5 của hai



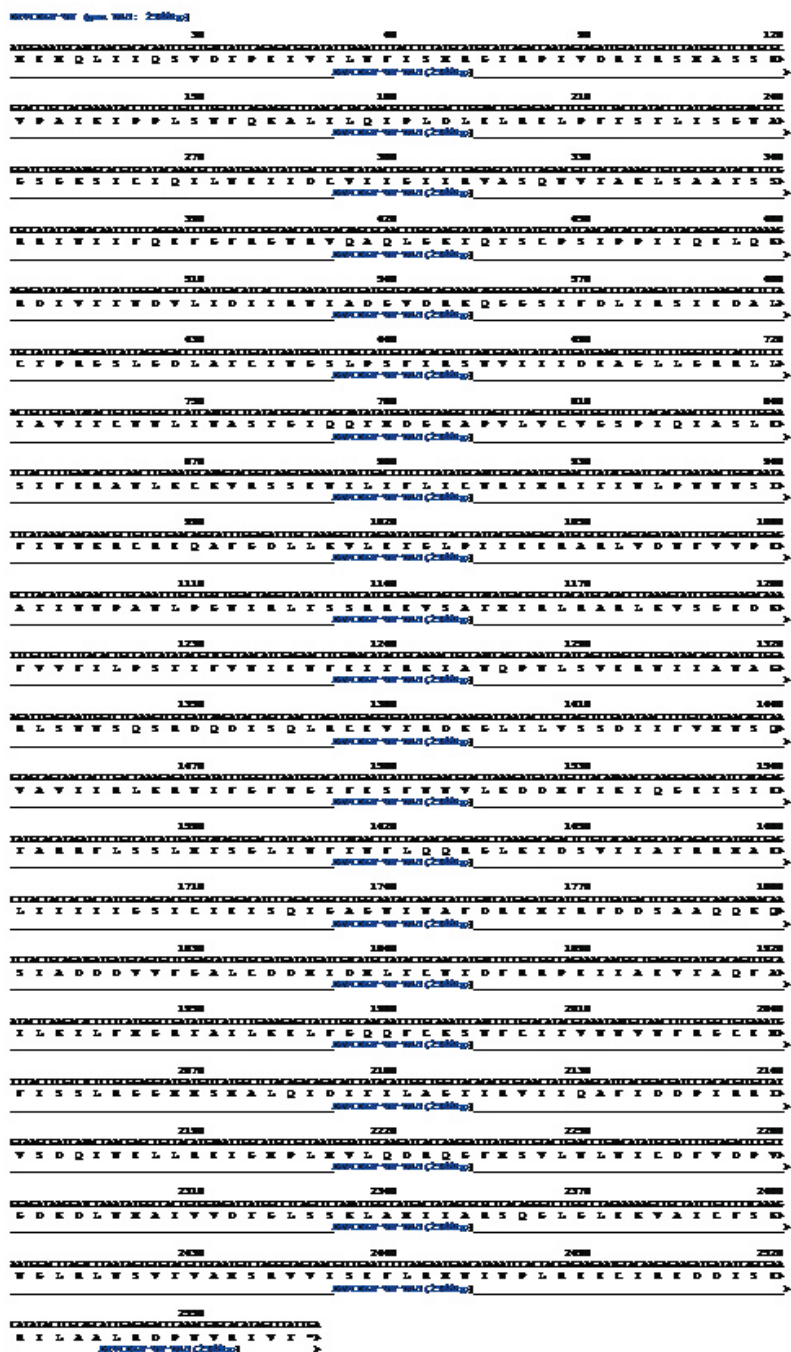
Hình 1A. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên thạch agarose 1%.

M: chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme *HindIII*; 1: sản phẩm PCR nhân gen helicase (UL5) của chủng virus cường độc DTVCĐKN; 2: sản phẩm PCR nhân gen helicase (UL5) của chủng virus nhược độc vaccin DTVVXKN.

B: Kết quả điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp được cắt bằng enzyme *EcoRI* trên thạch agarose 1%. M: Chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể λ cắt bằng enzyme *HindIII*; 1: DNA plasmid tái tổ hợp chứa gen UL5 của chủng DTVCĐKN sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI*; 2: DNA plasmid tái tổ hợp chứa gen UL5 của chủng DTVVXKN sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI*.

chủng nghiên cứu được giải trình trình tự (MacroGen, Hàn Quốc). Kết quả thu nhận chuỗi nucleotide và amino acid suy diễn tương ứng

của gen UL5 chủng DTVCDKN được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Trình tự gen UL5 chủng virus cường độc DTVCDKN Việt Nam
(dòng trên là thành phần nucleotide, dòng dưới là thành phần amino acid tương ứng biểu thị bằng chữ cái (1 chữ cái) ký hiệu của chúng).

Hai chủng virus cường độc và vaccin của Việt Nam hoàn toàn đồng nhất và tương đồng về nucleotide và amino acid, bao gồm 2568 nucleotide, mã hóa cho 856 amino acid. Thành phần cấu trúc gen UL5 bao gồm: 769 adenine (29,95%), 556 cytosine (21,65%), 533 guanine (20,76%) và 710 thymine (27,65%). Trong đó, tỷ lệ (G+C) là 42,41%, thấp hơn nhiều so với tỷ lệ (A+T) là 57,59%. Gen UL5 nghiên cứu có mã khởi đầu là ATG, mã kết thúc là TGA, giống như cấu trúc của một gen thông thường.

3.3. Phân tích biến đổi thành phần gen UL5 của virus cường độc và nhược độc dịch tả vịt

Việt Nam

Cho đến nay, mới chỉ có 9 trình tự gen UL5 của virus DEV được đăng ký trên Ngân hàng gen, bao gồm: 1 chủng 2085 của Đức (JF999965), 1 chủng của Mỹ (KF693236), và 7 chủng của Trung quốc (JQ647509, KF263690, JQ673560, KF487736, EU195103, EU082088, EF554398). Các chủng trên được sử dụng để so sánh về thành phần nucleotide và amino acid với 2 chủng nghiên cứu của Việt Nam. Kết quả so sánh trình tự amino acid gen UL5 được trình bày ở Hình 3.

	280	*	300	*	320	*	340	*	360
DTVCDKN	: GSPTQTASLESTFEHANLKCRVRSSENILTELCNRCMTYTNLPNWSIFINNKKCRQAFGDLIKVLEYCLPITEEHARUVDNFWPE	:	360						
DTWXKN	:	:	360						
(2085) JF99	:	:	360						
(CHV) JQ647	:	:	360						
(C-KCE) KF2	:	:	360						
(CV) JQ6735	:	:	360						
DEV(VAC)EU	:	:	360						
DEV-UL5.EF	:	:	360						
EU195103(C	:	:	360						
KF487736(C	:	:	360						
KF693236(U	:	:	360						

-----//-----

	640	*	660	*	680	*	700	*	720
DTVCDKN	: TTAEVYAQFAILKTLNMGRYAILKELFGQQCKSNFCTYVNVNFRGCEMFTSSLRGGMMSMALQIDTYTLAGYTRVTIQAFTDDPTIRY	:	720						
DTWXKN	:	:	720						
(2085) JF99	:	:	720						
(CHV) JQ647	:	:	720						
(C-KCE) KF2	:	:	720						
(CV) JQ6735	:	:	720						
DEV(VAC)EU	:	:	720						
DEV-UL5.EF	:	:	720						
EU195103(C	:	:	720						
KF487736(C	:	:	720						
KF693236(U	:	:	720						

	740	*	760	*	780	*	800	*
DTVCDKN	: VSDQTNELLHEIGMPIMVLQGHQCFMEVLNINICDFVDPVCKDLNMTVVDYGLSSKLAMTIARSSQLGLEKVAICFSKNGRLNSVYV	:	810					
DTWXKN	:	:	810					
(2085) JF99	:	:	810					
(CHV) JQ647	:	:	810					
(C-KCE) KF2	:	:	810					
(CV) JQ6735	:	:	810					
DEV(VAC)EU	:	:	810					
DEV-UL5.EF	:	:	810					
EU195103(C	:	:	810					
KF487736(C	:	:	810					
KF693236(U	:	:	810					

Hình 3. So sánh trình tự amino acid chuỗi polypeptide UL5 (rút gọn để minh họa) của chủng cường độc DTVCDKN (dòng trên cùng) với chủng vaccin DTVVKKN (dòng thứ hai) và các chủng khác trên thế giới.

Ghi chú: Dấu (.) biểu thị sự giống với trình tự amino acid với chủng DTVCDKN. Sự sai khác về amino acid được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng.

Kết quả so sánh cho thấy giữa hai chủng virus cường độc và vaccin của Việt Nam (DTVCDKN và DTVVXKN), tỷ lệ đồng nhất đạt được là 100%, cả về nucleotide và amino acid; đồng thời cũng có tỷ lệ tương đồng rất cao với các chủng khác trên thế giới (9 vị trí sai khác về nucleotide và 4 vị trí sai khác về amino acid). Sai khác về nucleotide gồm các vị trí 19, 161, 819, 833, 972, 1037, 1413, 2150, 2197 và 2217. Trong đó có 4 vị trí sai khác về nucleotide (833; 1037; 2150; 2197) đã dẫn đến sai khác ở 4 vị trí amino acid (vị trí S278F; I346M; T717I, G733S). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy gen UL5 là một gen có mức độ bảo tồn cao trong hệ gen của virus dịch tả vịt. Đồng thời cho thấy sự tương đồng cao giữa các chủng virus dịch tả vịt giữa các quốc gia khác nhau. Sự tương đồng hoàn toàn về nucleotide và amino acid giữa 2 chủng cường độc và vaccin của Việt Nam cho thấy, chủng vaccin nghiên cứu là phù hợp để sử dụng cho những vùng bị nhiễm chủng virus cường độc DTVCDKN. Tuy nhiên, đây mới chỉ là những nghiên cứu giải mã virus dịch tả vịt đầu tiên tại Việt Nam. Các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai về sinh học phân tử gen/hệ gen của virus dịch tả vịt cường độc và nhược độc vaccin tại Việt Nam là vô cùng cần thiết để xác định nguồn gốc phân loại của các chủng virus đương nhiễm, góp phần giúp cho công tác phòng chống bệnh dịch tả vịt đạt hiệu quả hơn.

IV. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sinh học phân tử, toàn bộ chuỗi gen UL5 của 2 chủng virus cường độc và nhược độc vaccin dịch tả vịt tại Việt Nam đã được giải mã bao gồm 2568 nucleotide mã hóa cho 856 amino acid. Gen UL5 có mức độ bảo tồn cao trong hệ gen của virus dịch tả vịt. Các chủng virus dịch tả vịt Việt Nam trong nghiên cứu có tỷ lệ tương đồng 100% về gen này. Cho đến nay, các dữ liệu về sinh học phân tử virus dịch tả vịt còn rất thiếu, do đó việc phân lập, giải mã và nghiên cứu đặc tính phân tử gen/hệ gen của các chủng virus dịch tả vịt Việt Nam cần được tiến hành.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.04-2012.60.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biswas N., Weller K. (2001) The UL5 and UL52 subunits of the Herpes Simplex Virus Type 1 helicase-Primase subcomplex exhibit a complex interdependence for DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 17610-17619.
2. Gardner R., Wilkerson J., Johnson J. C. (1993) Molecular characterization of the DNA of Anatid herpesvirus 1. *Intervirology*, 36: 99-112.
3. Hansen W. R., Nashold S. W., Dochert, D. E., Brown S. E., Knudson D. L. (2000) Diagnosis of duck plague in waterfowl by polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 44: 266-274.
4. Marintcheva B., Weller S. K. (2001) A tale of two HSV-1 helicases: roles of phage and animal virus helicases in DNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 70: 77-118.
5. OIE Terrestrial Manual 2010. Duck Virus Hepatitis. Chapter 2.3.8.
6. Pan H., Cao R., Liu L., Niu M., Zhou B., Chen P., Hu, J. (2008) Molecular cloning and sequence analysis of the duck enteritis virus UL5 gen. *Virus Research*, 136: 152-156.
7. Wang J., Hoper D., Beer M., Osterrieder N. (2011) Complete genome sequence of virulent duck enteritis virus (DEV) strain 2085 and comparison with genome sequences of virulent and attenuated DEV strains. *Virus Research*, 160: 316-325.
8. Wobeser G. A. (1997) Duck plague, in *Diseases of wild waterfowl* (2nd ed): New York, N.Y., Plenum Press. 15-27.
9. Zhu L. A., Weller S. K. (1992) The six conserved helicase motifs of the UL5 gen product, a component of the herpes simplex virus type 1 helicase-primase, are essential for its function. *Journal of Virology*, 66: 469-479.

Nhận ngày 10-6-2015

Phản biện ngày 10-7-2015