

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT LAMP PHÁT HIỆN VIRUS GÂY BỆNH LỢN TAI XANH, DỊCH TẢ LỢN, TIÊU CHẢY CẤP VÀ CÒI CỌC Ở LỢN

Phạm Minh Hằng, Phan Thanh Hương, Phạm Thị Thu Thủy, Nguyễn Việt Không
Viện Thú y

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện gen ORF-6 của PRRSV, gen NS5B của CSFV, gen M của PEDV và gen ORF-2 của PCV2. Phương pháp khuếch đại này có thể thu được trong 1 giờ ở điều kiện đẳng nhiệt (63°C) với bốn mỗi đặc hiệu. Độ nhạy của phương pháp là 0,1ng/μl và không có phản ứng chéo đối với các plasmid tái tổ hợp khác nhau.

Từ khóa: Phương pháp LAMP, PRRSV, CSFV, PEDV, PCV2.

Development of loop mediated isothermal amplification assay for detecting PRRSV, CSFV, PEDV and PCV2

Pham Minh Hang, Phan Thanh Huong, Pham Thi Thu Thuy, Nguyen Viet Khong

SUMMARY

In this study, we developed loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the ORF-6 gene for the detection of PRRSV, the NS5B gene for the detection of CSFV, the M gene for the detection of PEDV and the ORF-2 gene for the detection of PCV2. This amplification method could be obtained in 1 hr. under isothermal conditions (63°C) employing a set of four specific primers mixtures. The sensitivity was 0.1ng/μl and no cross-reactivity for different recombinant plasmids.

Keywords: LAMP assay, PRRSV, CSFV, PEDV, PCV2.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm, các kỹ thuật khuếch đại gen có thể cung cấp sự nhận dạng mầm bệnh nhanh và nhạy hơn so với phương pháp nuôi cấy, đặc biệt với số lượng mẫu lớn. Các kỹ thuật đó bao gồm Polymerase chain reaction (PCR), strand displacement amplification (SDA), ligase chain reaction (LCR) hay helicase dependant amplification (HDA). Tuy nhiên, các kỹ thuật này có một số hạn chế bởi số lượng nhiều thuốc thử với độ ổn định khác nhau cho sự khuếch đại cũng như sự phụ thuộc vào các thiết bị đắt tiền.

Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt (LAMP-Loop mediated isothermal amplification)

là kỹ thuật tổng hợp DNA bằng 4 mỗi đặc hiệu nhận biết 6 vùng khác biệt trên một gen đích từ một khuôn mẫu duy nhất, tạo nên một dạng sản phẩm DNA có cấu trúc vòng lặp đã được phát triển bởi Notomi *et al.* (2000). Kỹ thuật này khắc phục sự phụ thuộc vào thiết bị đắt tiền thông qua việc loại bỏ sự luân nhiệt và khuếch đại DNA trong thời gian ngắn. Do có những ưu điểm nói trên, LAMP đã trở thành một công cụ chẩn đoán sàng lọc nhanh các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.

Cũng như kỹ thuật khuếch đại axit nucleic khác, mỗi có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong kỹ thuật LAMP, quyết định độ nhạy cũng như độ đặc hiệu của phép thử. Hiện đã có một số nghiên cứu trên thế giới công bố các bộ mỗi cho phép phát hiện nhanh các

tác nhân PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus), CSFV (Classical swine fever virus), PEDV (Porcine epidemic diarrhea virus) và PCV2 (Porcine circovirus type 2). Tuy nhiên, các bộ môi này mới chỉ được thử nghiệm trên một số chủng virus lưu hành tại quốc gia nghiên cứu nên có thể không bao trùm được tập hợp chủng đang lưu hành tại Việt Nam. Chính vì các lý do này, dựa trên trình tự gen của các chủng virus đang lưu hành tại Việt Nam, chúng tôi đã thiết kế mới các bộ môi đối với từng loại virus và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng để đảm bảo trong cùng điều kiện phản ứng tối ưu như nhau, cho phép phát hiện cả 4 tác nhân virus với độ nhạy tương đương nhau.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Dung dịch đệm, các loại enzyme
- Betaine, dNTPs, nước cất và thuốc nhuộm

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thiết kế môi

Gen ORF-6 (open reading frame-6) của PRRSV, NS5B của CSFV, gen M của PEDV và gen ORF-2 (open reading frame-2) của PCV2 được lấy từ Genbank và được sắp xếp, chỉnh lề bằng chương trình CLUSTALW. Đoạn gen ít biến đổi đã được chọn làm vùng đích và được sử dụng để thiết kế các môi LAMP theo phương pháp của Notomi *et al.* (2000). Tất cả các môi oligonucleotide được tổng hợp bởi công ty Biosearch technologies, USA.

2.2.2. Phương pháp LAMP

Phản ứng LAMP được thực hiện với tổng thể tích 25 μ L bao gồm hỗn hợp dung dịch đệm 1 $\times$ Thermo (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA) chứa 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mM MgSO_4 và 0,1% Triton X-100, betaine 0,8 M (Sigma-Aldrich, USA), hỗn hợp dNTP

1,0 mM (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA), 8U *Bst* 3 DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA), 0,8 μ M cho mỗi môi BIP (backward inner primer), FIP (forward inner prime) và 0,2 μ M cho mỗi môi FW (forward), BW (backward) và 2 μ L gen đích. Hỗn hợp được ủ ở 63°C trong 60 phút và sau đó 85°C trong 5 phút để dừng phản ứng.

2.2.3. Phương pháp đọc kết quả

Phân tích sản phẩm LAMP bằng phương pháp điện di trên thạch (agarose gel electrophoresis). Sau khi được khuếch đại, sản phẩm LAMP được nhuộm bởi thuốc nhuộm runSAFE (Clever Scientific, UK), được điện di trên thạch agarose 2% và được phát hiện dưới đèn UV.

2.2.4. Phương pháp xác định độ nhạy và độ đặc hiệu

Các đoạn gen dùng để thiết kế môi cho phương pháp LAMP phát hiện PRRSV, CSFV, PCV2, PEDV được lựa chọn làm gen đích (đối chứng dương), được tổng hợp và được đưa vào plasmid pBluescript II SK (Biomatik, USA).

Độ nhạy của LAMP: được xác định bằng cách kiểm tra độ pha loãng 10 lần liên tiếp của plasmid pBluescript II SK chứa gen đích từ 0,001ng-10ng/ μ L.

Độ đặc hiệu của LAMP: Mỗi LAMP-PRRSV được kiểm tra với các plasmid pBluescript II SK chứa các đoạn gen đích của CSFV, PEDV, PCV2; LAMP-CSFV được kiểm tra với các plasmid pBluescript II SK chứa các đoạn gen đích của PRRSV, PEDV, PCV2; Mỗi LAMP- PEDV được kiểm tra với các plasmid pBluescript II SK chứa các đoạn gen đích của PRRSV, CSFV, PCV2 và mỗi LAMP- PCV2 được kiểm tra với các plasmid pBluescript II SK chứa các đoạn gen đích của PRRSV, CSFV, PEDV.

2.2.5. Phương pháp PCR

PCR được thực hiện với thể tích phản ứng 25 μ L bao gồm 0,4 μ M mỗi môi, 0,2 mM mỗi loại

deoxynucleoside triphosphate, 1,5 mM MgCl₂, 1× PCR buffer, 1 μL plasmid và 2,5 U *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, USA). Chu trình khuếch đại 30 vòng ở 95°C trong 5 phút, 95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 68°C trong 1 phút, và 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên agarose gel 2%.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Lựa chọn gen đích và thiết kế mồi

Như đã mô tả trong phần nguyên liệu và phương pháp, để tìm những đoạn gen ít biến đổi được sử dụng thiết kế mỗi LAMP cho việc phát hiện PRRSV, CSFV, PEDV và PCV2, chúng tôi đã tải trình tự gen của các chủng virus từ Genbank có số hiệu như trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự gen các chủng virus tham khảo được sử dụng trong nghiên cứu này

TT	PRRSV (Accession No.)	CSFV (Accession No.)	PEDV (Accession No.)	PCV2 (Accession No.)
1	KF523302	KY849594	LC101733	KU359277
2	PRU87392	KT119352	MG373540	KC238438
3	DQ473474	KP233071	KX253991	HQ693093
4	EF112445	Z46258	KM048294	JX912915
5	KY190046	X87939	JX435310	MF981845

Ghi chú: Accession No. (Accession number)

1
gtcaatatgggtgcaaaaagagggcaactggttagttaatgcagatagactggtgagcagt
FIP1 BIP1
aagactggaaataggtacatacctgggagagggaacacacccctacaagggagggcatatgaa
BIP2-BW
gaactggtgtttggttaagaaaacagaccagtagcttgaagggacggacaggtataatcta
BW
ggcccaatagtcaacatagtggttaagaaggctgaagatcatgatgatggccctgatggg

2
tagggctgcgcctcaactatggggagcagtagttgcacttcttttggggagtgtactcagccat
FW FIP-1 FIP-2
agaaacctggaaattcatcaacctccagatgccgtttgtgcttgetagggcgcaagttacat
BIP-1
tctggcccttgcccaccacgtcgaaagtgcgcgggctttcatccgattgcggcaaatga
BIP-2
BW
taaccacgcattttgtcgtccggcgtcccggtccactacgggtcaacggcacattgggtgc

3
gtggataatgtattttgtcaatagcattcggttgtggcgacaggacacattottggtggto
FW
tttcaatcctgaaactgaacgcgttctcactacttctgtgatgggcccagacaggtotgcat
FIP-2
FIP-1
tccagtgtcttgagacaccaactgggtgtaacgctaacactccttagtggtacattgottgt
BIP-1
agagggtatataaggtttgctactggcgtaacggttaagtcaattgootgatttoggacagtt
BIP-2
BW
cgccaaggccactacaacaattgtotatggacgtgttggtcggttcagttcaatgottcato

Hình 1. Mỗi LAMP phát hiện 1. PRRSV 2.CSFV 3.PEDV

Mỗi LAMP cho từng loại virus bao gồm BW, FW, BIP, và FIP (hình 1 và hình 2) và chiều dài của các gen đích xấp xỉ 300bp.

Các Plasmid pBluescript II SK chứa các gen đích của bốn loại virus được pha loãng ở nồng độ 1ng/1μl và được sử dụng cho tối ưu hóa các điều kiện hoạt động của phản ứng LAMP.

```

FW
cgagcctacgtggtctacatttctagagggttgtagcctcagccaa
agctgattccttt

FIP-2
tggtatttgggttggaagtaatcaatagtgaggagtcagaacaggtttg
gggtggaagtaac

FIP-1
gggagtggttaggagaagggttgggggattgtatggcgggaggagtag
tttacatatgggt

BIP-1
gggagtggttaggagaagggttgggggattgtatggcgggaggagtag
tttacatatgggt

BIP-2
BW
cataggttagggctgtggcctttgttacaagttatcatctagaata
acagcagtgaggc
ccactccctatcacccctgggtgatgggggagcagggccagaattca
accttgacctttc

```

Hình 2. Mỗi LAMP phát hiện PCV2

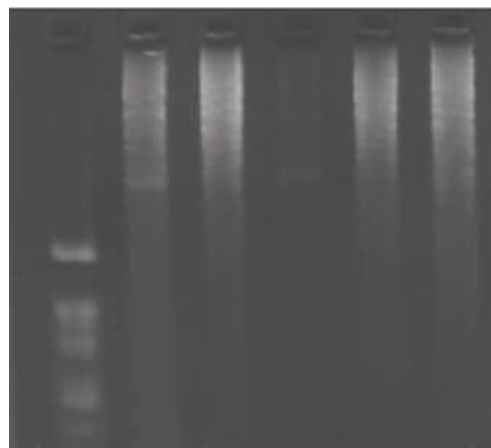
Kiểm tra khả năng khuếch đại của các cặp môi ngoài của LAMP, chúng tôi đã sử dụng phương pháp PCR và kết quả ở hình 3 cho thấy cả 4 cặp môi ngoài đều khuếch đại rất rõ ràng các gen đích cho PRRSV, CSFV, PEDV và PCV2.



Hình 3. Phản ứng PCR cho các cặp môi ngoài của LAMP

Giếng 1, 2, 3, 4: PCV2, PRRSV, CSFV và PEDV; Giếng 5, 6, 7, 8: âm tính; Marker

Tiếp đến chúng tôi kiểm tra các môi LAMP khuếch đại các gen đích và kết quả hình 4 cho thấy sản phẩm của LAMP sau 1h ủ ở nhiệt độ 63°C.



Hình 4. Phản ứng LAMP khuếch đại các gen đích

Giếng 1, 2, 3, 4, 5: PCV2, PRRSV, âm tính, CSFV và PEDV

Phát triển kỹ thuật LAMP là phát triển một phương pháp khuếch đại axit nucleic mới để sử dụng cho việc phát hiện các tác nhân gây bệnh. Đây là một kỹ thuật chẩn đoán đơn giản, trong đó phản ứng được thực hiện trong một ống đơn bằng cách trộn buffer, môi, DNA polymerase và ủ hỗn hợp ở nhiệt độ không đổi (60°C-65°C) trong 60-120 phút. Phản ứng LAMP không yêu cầu bất kỳ thiết bị phức tạp nào, chỉ cần bể ủ nhiệt, bể điện di và đèn UV, và sản phẩm cuối cùng là các đoạn DNA có kích thước khác nhau đặc trưng bởi các dải trong hình ảnh điện di (hình 4).

Tối ưu hóa kỹ thuật LAMP

Với các dải nhiệt độ 55°C, 60°C, 63°C, 65°C và thời gian 30 phút, 40 phút, 50 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, kết quả phản ứng tối ưu nhất cho cả 4 gen đích là 63°C trong 60 phút. Nhiệt độ thấp 55°C và thời gian ngắn 30 phút, 40 phút không cho kết quả dương tính (bảng 2). Kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Chen *et al.* (2010), Ren *et al.* (2011), Rovira *et al.* (2009), Zhou *et al.* (2011).

Các nồng độ betaine và môi LAMP khác nhau cũng đã được kiểm tra, trong đó cho kết quả tốt nhất là nồng độ betaine 0,8M và nồng độ môi ngoài (BW, FW) là 0,2μM; môi trong

Bảng 2. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện cho phản ứng LAMP

	PRRSV	CSFV	PEDV	PCV2
Nhiệt độ 55°C	-	-	-	-
Nhiệt độ 60°C	-	-	+	+
Nhiệt độ 63°C	+	+	+	+
Nhiệt độ 65°C	+	+	+	+
Thời gian 30 phút	-	-	-	-
Thời gian 40 phút	-	-	-	-
Thời gian 50 phút	+	-	+	-
Thời gian 60 phút	+	+	+	+
Thời gian 90 phút	+	+	+	+
Thời gian 120 phút	+	+	+	+
Betaine 0,4M	-	-	-	+
Betaine 0,6M	-	-	+	+
Betaine 0,8M	+	+	+	+
Betaine 1M	+	+	+	+
BW; FW 0,8µM	+	+	+	+
BW; FW 0,2 µM	+	+	+	+
BW; FW 0,1 µM	-	-	-	-
BIP; FIP 1,6 µM	+	+	+	+
BIP; FIP 0,8 µM	+	+	+	+
BIP; FIP 0,4 µM	-	-	-	-

Ghi chú: BW (backward); FW (forward); BIP (backward inner); FIP (forward inner)

(BIP, FIP) là 0,8µM (bảng 2). Mặc dù với nồng độ betaine 1M, mỗi ngoài (BW, FW) là 0,8µM và mỗi trong (BIP, FIP) là 1,6µM cũng cho kết quả dương tính. Tuy nhiên, nồng độ betaine và mỗi được sử dụng thấp sẽ tiết kiệm chi phí hơn so với nồng độ cao. Do đó, chúng tôi đã chọn nồng độ betaine và mỗi LAMP như đã trình bày bên trên là tối ưu nhất.

Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật LAMP

Để xác định độ nhạy của kỹ thuật LAMP, chúng tôi đã pha loãng 10 lần liên tiếp plasmid chứa các gen đích của PRRSV, CSFV, PEDV và PCV2. Các sản phẩm của phản ứng LAMP được phân tích bằng điện di trên thạch 2%. Giới hạn cho việc phát hiện gen đích ở nồng độ 0,1ng/µl hay ở độ pha loãng 10^{-4} (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả kiểm tra độ nhạy cho phản ứng LAMP

	100ng/µl (10^{-1})	10ng/µl (10^{-2})	1ng/µl (10^{-3})	0,1ng/µl (10^{-4})	0,01ng/µl (10^{-5})	0,001ng/µl (10^{-6})
LAMP-PRRSV	+	+	+	+	-	-
LAMP-CSFV	+	+	+	+	-	-
LAMP-PEDV	+	+	+	+	-	-
LAMP-PCV2	+	+	+	+	-	-

Xác định độ đặc hiệu của LAMP, chúng tôi đã kiểm tra mỗi LAMP-PRRSV cho các gen đích của CSFV, PEDV và PCV2; mỗi LAMP-CSFV cho các gen đích của PRRSV, PEDV và PCV2; mỗi LAMP-PEDV cho các

gen đích của PRRSV, CSFV và PCV2; mỗi LAMP-PCV2 cho các gen đích của PRRSV, CSFV và PEDV. Kết quả bảng 4 cho thấy không có sản phẩm LAMP với các môi khác gen đích.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu cho phản ứng LAMP

	PRRSV	CSFV	PEDV	PCV2
LAMP-PRRSV	+	-	-	-
LAMP-CSFV	-	+	-	-
LAMP-PEDV	-	-	+	-
LAMP-PCV2	-	-	-	+

Mặc dù LAMP có nhiều ưu điểm, nhưng nó còn có một số nhược điểm sau: LAMP dường như kém nhạy hơn so với PCR đối với chất ức chế trong trường hợp mẫu phức tạp như máu hoặc phân, có thể là do sử dụng DNA polymerase *Bst* chứ không phải *Taq* polymerase như trong PCR (Kermekchiev *et al.*, 2009). Trong mẫu sữa, LAMP đã có những sản phẩm rõ ràng nếu mẫu DNA được tinh sạch; mặt khác sẽ không có sản phẩm được khuếch đại nếu mẫu DNA chưa được tinh sạch hoặc bước chiết tách DNA bị bỏ qua và giới hạn phát hiện gen đích của LAMP thấp hơn đáng kể so với PCR. Trường hợp này có thể được gây ra bởi hai lý do: thứ nhất, một loạt các chất ức chế bao gồm các chất hữu cơ và vô cơ như chất tẩy rửa, kháng sinh, hợp chất phenolic, enzyme, polysaccharit, chất béo, protein và muối có thể ức chế phản ứng LAMP; thứ hai, các môi có thể có ảnh hưởng gián tiếp đến phản ứng LAMP (Wang *et al.*, 2007). Hơn nữa LAMP kém linh hoạt hơn PCR do LAMP chủ yếu được sử dụng như một kỹ thuật chẩn đoán hoặc phát hiện nhưng không được sử dụng đối với mục đích nhân bản (cloning). Thiết kế mỗi đúng cách là một hạn chế lớn trong kỹ thuật này (Torres *et al.*, 2011). LAMP cũng không thể thực hiện cùng lúc phát hiện nhiều gen đích chung một ống phản ứng so với multiplex-PCR. Với số lượng môi lớn trên một gen đích

ở LAMP đã làm tăng các tương tác môi-môi. Vì độ nhạy cao, dễ nhiễm chéo sản phẩm dẫn đến kết quả dương tính giả ở LAMP. Lý do cho sự nhiễm chéo này chưa được làm sáng tỏ một cách chính xác, nhưng khả năng nhiễm sẽ nhiều hơn khi nắp của các ống phản ứng được mở ở cuối phản ứng để thêm thuốc nhuộm cho việc hiển thị kết quả (Lau *et al.*, 2010) hoặc không sử dụng đầu col có lọc như trong nghiên cứu này. Sản phẩm của LAMP gồm đoạn DNA có kích thước khác nhau đặc trưng bởi các dải chứ không phải là một vạch đơn như trong phản ứng PCR nên không xác định được vạch đặc hiệu (Torres và cs, 2011).

Do đó, để áp dụng kỹ thuật LAMP một cách có hiệu quả, cần có một số nghiên cứu sâu hơn nữa để loại bỏ các nhược điểm của kỹ thuật này.

IV. KẾT LUẬN

- Các bộ môi và các đoạn gen đích thích hợp cho việc phát hiện PRRSV, CSFV, PEDV và PCV2 bằng kỹ thuật LAMP đã được lựa chọn, được thiết kế và tổng hợp.

- Với nhiệt độ 63°C, thời gian 60 phút, nồng độ betain 0,8M, nồng độ môi ngoài (BW, FW) 0,2μM; môi trong (BIP, FIP) 0,8μM là những điều kiện tối ưu cho kỹ thuật LAMP khuếch đại các gen đích.

- Giới hạn cho việc phát hiện gen đích của LAMP ở nồng độ 0,1ng/μl hay ở độ pha loãng 10⁻⁴.

- Độ đặc hiệu của LAMP cho thấy không có sản phẩm LAMP với các môi khác gen đích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, L., Fan, X. Z., Wang, Q., Xu, L., Zhao, Q. Z., Zhou, Y. C., Liu, J., Tang, B., Zou, X. Q. 2010. A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus. *Virol Sin.* 25: 59-64.
2. Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., Barnes, W. M. 2009. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allows DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic. Acids Res.* 37(5): e40
3. Lau, Y. L., Meganathan, P., Sonaimuthu, P., Thiruvengadam, G., Nissapatorn, V., Chen Y. 2010. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *J. Clin. Microbiol.* 48(10): 3698 – 3702.
4. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: p. E63
5. Ren, X., Li, P. 2011. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes* 42: 229 - 235.
6. Rovira, A., Abrahante, J., Murtaugh, M., Muñoz-Zanzi, C. 2009. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 350 - 354.
7. Torres, C., Vitalis, E. A., Baker, B. R., Gardner, S. N., Torres, M. W., Dzenitis, J. M. 2011. LAVA: An open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Biochem.* 12: 240.
8. Wang, L., Shi, L., Alam, M. J., Geng, Y., Li, L. 2007. Specific and Rapid Detection of Foodborne *Salmonella* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Food Res. Inte.* 41(1): 69 - 74.
9. Zhou, S., Han, S., Shi, J., Wu, J., Yuan, X., Cong, X., Xu, S., Wu, X., Li, J., Wang, J. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for detection of porcine circovirus type 2. *Virol J.* 8: 497.

Ngày nhận 21-9-2019

Ngày phản biện 18-11-2019

Ngày đăng 1-1-2020