

# PHÁT HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN SỰ SINH ĐỘC TỔ CYLINDROSPERMOPSIN TRONG MẪU SINH KHỐI VI KHUẨN LAM BẰNG KỸ THUẬT PCR

## Detection of genes responsible for biosynthesis of cylindrospermopsin in cyanobacterial biomass by PCR method

Nguyễn Thị Thu Liên<sup>1,2\*</sup>, Hoàng Thị Thanh<sup>2</sup>, Lê Thị Tuyết Nhân<sup>1</sup>, Ngô Thị Diễm My<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Thu Liên (Thư điện tử: nhtuliencnsh@gmail.com)

(Ngày nhận bài (received): 25–7–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 12–10–2019)

**Tóm tắt.** Nghiên cứu sử dụng các cặp mồi đặc hiệu M4 1F/M5 1R và M13 1F/M14 1R để khuếch đại các đoạn gen liên quan đến sự sinh tổng hợp độc tố cylindrospermopsin – CYN (PKS và PS) trong sinh khối vi khuẩn lam. Kỹ thuật PCR đã được sử dụng để phát hiện gen liên quan đến sự sinh độc tố này trong mẫu sinh khối cũng như sự xuất hiện các loài vi khuẩn lam tiềm năng sinh độc tố CYN trong các mẫu nở hoa vi khuẩn lam ngoài tự nhiên. Thí nghiệm được thực hiện với 23 mẫu tại 23 điểm thuộc 9 tỉnh (thành) trong nước. Kết quả cho thấy các gen PKS và PS trong mẫu tự nhiên có thể được khuếch đại ở điều kiện: nồng độ DNA khuôn mẫu từ 140 đến 160 ng DNA/25 µL thể tích phản ứng; thời gian bắt mồi là 20 giây; nhiệt độ bắt mồi 55 °C. Trong số 23 mẫu nghiên cứu, gen PS được phát hiện trong 7 mẫu; gen PKS được phát hiện trong 5 mẫu, trong đó có 5 mẫu thuộc 5 địa điểm phát hiện cả hai gen PS và PKS. So sánh với kết quả phân tích sự xuất hiện của loài gây độc *Cylindrospermopsis raciborskii* và hàm lượng độc tố CYN trong nước cho thấy tiềm năng của việc sử dụng phương pháp PCR trong việc phát hiện các loài tảo độc trong các mẫu tự nhiên.

**Từ khóa:** Polyketide synthetase (PKS), peptide synthetase (PS), cylindrospermopsin, cyanobacteria, PCR

**Abstract.** In this study, M4 1F/M5 1R and M13 1F/M14 1R specific primers were used to amplify gene fragment responsible for the biosynthesis of cylindrospermopsin – CYN (PKS and PS) in cyanobacterial biomass. The PCR technique was used to detect genes related to the synthesis of CYN in biomass samples as well as the presence of potential cyanobacteria producing CYN toxins in the natural cyanobacteria blooms. The experiments were performed with 23 samples at 23 points in 9 provinces (cities) in Vietnam. The results showed that the PKS and PS genes were amplified from genomic DNA templates under the following conditions: DNA template concentration from 140–160 ng/25 µL reaction volume; incubation time 20 sec; and annealing temperature 55 °C. The PS gene was detected in 7/23 samples, while the PKS gene was detected in 5/23 samples. In addition, both PS and PKS genes were detected in 5/23 samples from 5 different sampling locations. There is a potential of using PCR technique in detecting toxic algae species in natural samples.

**Keywords:** Polyketide synthetase (PKS), peptide synthetase (PS), cylindrospermopsin, cyanobacteria, PCR

## 1 Đặt vấn đề

Cylindrospermopsin (CYN) là một loại độc tố alkaloid được tách chiết đầu tiên từ loài *Cylindrospermopsis raciborskii* [1]. Cylindrospermopsin có tác dụng gây ngộ độc tế bào, cản trở quá trình sinh tổng hợp protein, ảnh hưởng đến vật chất di truyền, làm đứt gãy DNA, RNA, gây tổn thương các cơ quan của cơ thể người và động vật như tuyến nội tiết, gan, thận, ruột, phổi. Nó cũng được ghi nhận là chất sinh ung thư, kích thích sự phát triển các khối u trong cơ thể [2-3]. Một số loài vi khuẩn lam (VKL) nước ngọt có khả năng sản sinh CYN đã được biết thuộc các chi *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia*, *Raphidiopsis*, *Lynghya* và *Oscillatoria*. Các loài tiết CYN hiện đã được biết là phân bố rất rộng từ vùng nhiệt đới đến vùng ôn đới và trên khắp thế giới [4-7]. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp được sử dụng để thăm dò, phát hiện và phân tích sự xuất hiện của VKL độc hại và độc tố của chúng. Các phương pháp phân tử ra đời kết hợp với hệ thống phân loại truyền thống đã giúp cho việc xác định loài có khả năng sinh độc tố một cách chính xác và hiệu quả hơn [8]. Polyketide synthetase (PKS) và peptide synthetase (PS) là tập hợp những enzyme đa chức năng, tham gia chính vào quá trình tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở vi khuẩn, nấm và tảo lam [9]. Kỹ thuật PCR đã được sử dụng rất thành công để xác định các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các độc tố ở các mẫu vi khuẩn lam nghiên cứu [9-10]. Ở Việt Nam, gần đây một số tác giả đã sử dụng các cặp mồi đặc hiệu khuếch đại thành công các gen có liên quan đến sự sinh độc tố CYN đối với các chủng vi khuẩn lam có nguồn gốc từ một số ao hồ ở Việt Nam. Tuy nhiên, những nghiên cứu ở Việt Nam về gen liên quan của nhóm VKL độc chưa nhiều, đặc biệt là các nghiên cứu trong lĩnh vực phân tử áp dụng trực tiếp đối với các mẫu ngoài tự nhiên.

Vì vậy, chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu sử dụng các cặp mồi đặc hiệu để phát hiện sự xuất hiện của gen liên quan đến khả năng sinh độc tố CYN sử dụng kỹ thuật PCR với mục đích phát hiện gen liên quan đến sự sinh độc tố CYN trong mẫu sinh khối vi khuẩn lam cũng như sự xuất hiện các loài vi khuẩn lam tiềm năng sinh độc tố CYN trong các mẫu nở hoa vi khuẩn lam ngoài tự nhiên. Kết quả đạt được sẽ là cơ sở cho việc xác định tiềm năng ô nhiễm độc tố CYN trong các thủy vực nghiên cứu và cũng là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo để quản lý và giám sát nhóm tảo độc này.

## 2 Phương pháp

### Thu mẫu ngoài thực địa

Mẫu vi khuẩn lam tự nhiên được thu trong thời gian từ tháng 1/2011 đến tháng 6/2011, chúng tôi đã tiến hành thu mẫu ngẫu nhiên từ một số điểm thuộc 9 tỉnh (thành) với 23 mẫu tại 23 điểm. Vị trí các tỉnh thành thu mẫu được trình bày ở Bảng 1.

Mẫu sinh khối vi khuẩn lam: Mẫu được thu bằng lưới vớt thực vật phù du (phytoplankton). Sinh khối tảo sau đó được cho vào trong chai để nơi thoáng mát và đưa về phòng thí nghiệm.

Mẫu phân tích độc tố: lấy 3 ống eppendorf, mỗi ống 1 mL nước trực tiếp, ghi nhãn và bảo quản lạnh ngay ở 4-5 °C. Sau khi chuyển về phòng thí nghiệm bảo quản mẫu ở -18 °C cho đến khi phân tích.

**Bảng 1.** Địa điểm thu mẫu

STT	Kí hiệu	Điểm thu mẫu	
		Tên địa điểm	Tỉnh (thành)
1	HHK	Hồ Hoàn Kiếm	Hà Nội
2	TTQ	Hồ Thanh Quảng	Thanh Hóa
3	TĐV	Hồ Đông Vệ	
4	THT	Hồ Thành	
5	TTT	Hồ Trường Thi	
6	NG	Hồ Goong	Nghệ An
7	NCN	Hồ Cửa Nam	
8	QbLT	Hồ Lũy Thầy	Quảng Bình
9	QbĐ	Hồ Đài	
10	QbR	Hồ Rào	
11	THĐĐ	Đập Đá	TT Huế
12	THNY	Sông Như Ý	
13	ĐHT	Hồ Tây	Đà Nẵng
14	ĐHN	Hồ Hàm Nghi	
15	ĐCV	Hồ Công viên 29/3	
16	QnND	Hồ Nguyễn Du	Quảng Nam
17	QNTN	Đập Thạch Nham	Quảng Ngãi
18	QNNC	Hồ Nghĩa Chánh	
19	QNBC	Hồ Bàu Cả	
20	QNBT	Bến Tam Thương	Bình Định
21	BHL	Hồ Hưng Long	
22	BAL	Hồ An Lão	
23	BTĐB	Hồ Thiết Đính Bắc	

## Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

### *Phương pháp sinh học phân tử*

Mẫu sinh khối tế bào sống từ các điểm thu mẫu sau khi đưa về phòng thí nghiệm được tiến hành ly tâm bằng máy ly tâm lạnh ở 1.500 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C rồi cho vào ống eppendorf bảo quản ở –18 °C cho tới khi sử dụng để tách chiết DNA.

### *Tách chiết DNA tổng số*

Sử dụng phương pháp CTAB [11]. Lấy 3–5 gam mẫu nghiền trong 500 µL đệm 2 × CTAB và 5 µL β-mercaptoethanol, ủ ở 65 °C trong 1 giờ; cứ 15 phút trộn mẫu một lần. Bổ sung một thể tích dung dịch chloroform:isopentylethanol. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4 °C trong 10 phút rồi thu dịch nổi và chiết lại với một thể tích dung dịch chloroform:isopentylethanol. Sau đó, DNA được kết tủa bằng ethanol 100% và rửa lại bằng ethanol 70%. Thu tiểu thể DNA ở 14.000 vòng/phút ở 4 °C trong 10 phút. Để khô ở nhiệt độ phòng sau đó bổ sung 25 µL nước cất. Bảo quản ở –20 °C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Chất lượng DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Đo nồng độ DNA tổng số bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 260 và 280 nm.

#### *Phương pháp PCR*

Phân đoạn gen PKS (650 bp) và PS (597 bp) được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các môi đặc hiệu [9]. Đối với gen PKS sử dụng cặp môi M4 1F và M5 1R (TAG Copenhagen A/S) có trình tự:

M4 1F: 5'- GAAGCTCTTGGAATCCGGTAA (Tm: 64 °C)

M5 1R: 5'-AATCCTTACGGGATCCGGTGC (Tm: 69 °C).

Đối với gen PS sử dụng cặp môi M13 1F và M14 1R (TAG Copenhagen A/S) có trình tự:

M13 1F: 5'- GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC (Tm: 70 °C)

M14 1R: 5'- GATGGAACATCGCTCACTGGTG (Tm: 69 °C).

Thành phần PCR bao gồm: 10 pmol primer mỗi loại, 6  $\mu$ L 2  $\times$  Go Taq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, Mỹ), bổ sung nước cất vô trùng vừa đủ 12  $\mu$ L. Chu trình nhiệt chuẩn cho các phản ứng: Phản ứng khuếch đại DNA được tiến hành trong máy luân nhiệt (iCycler, Biorad) theo chu trình: 94 °C trong 4 phút; 30 chu kỳ: 94 °C trong 10 giây, 55 °C trong 20 giây, 72 °C trong 1 phút; 72 °C trong 6 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,4% ở 50 V trong đệm 1  $\times$  TAE, nhuộm với ethidium bromide và phân tích hình ảnh điện di bằng hệ thống Gel Documentation (Biorad).

Phương pháp ELISA: Phân tích hàm lượng độc tố cylindrospermopsin bằng phương pháp ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), sử dụng Kit Cylindrospermopsin ELISA (Abraxis, USA). Các bước thực hiện theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất. Phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm trong 3 phút, sau đó tiến hành ly tâm 10.000 vòng trong 10 phút ở 4 °C, thu dịch nổi. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kiểm tra nồng độ của độc tố ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) trong mẫu bằng máy phân tích ELISA của hãng BIO-RAD (Mỹ) ở bước sóng 450 nm. Hàm lượng cylindrospermopsin trong mẫu được so sánh với đường chuẩn của cylindrospermopsin.

### **3 Kết quả và thảo luận**

#### **3.1 Kết quả thăm dò một số điều kiện để thực hiện phản ứng PCR khuếch đại gen PKS và PS đối với mẫu tự nhiên**

Trong nghiên cứu các điều kiện cho phản ứng PCR, việc đầu tiên là thăm dò các điều kiện cho phản ứng bao gồm trình tự primer, nhiệt độ của quá trình ủ, nồng độ  $\text{Mg}^{2+}$ , các dNTP, nồng độ Tag DNA polymerase, đệm ổn định hoạt động của Tag polymerase, nồng độ DNA khuôn mẫu, tỷ lệ giữa primer và DNA khuôn mẫu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thăm dò một số điều kiện chủ yếu cho phản ứng PCR đối với mẫu tự nhiên dựa trên quy trình chuẩn của Schembri và cs. [9]. Một số điều kiện được thăm dò gồm nồng độ khuôn mẫu, thời gian bắt môi và nhiệt độ bắt môi.

### Nồng độ DNA khuôn mẫu

Trong thí nghiệm này, các mẫu DNA từ sinh khối của một số điểm được sử dụng để nghiên cứu, đó là: HHK, TTT, THĐĐ, THNY. Các mẫu này được chọn để thăm dò do đều có sự xuất hiện của loài *Cylindrospermopsis raciborskii*, được xem là đối chứng dương tính trong nghiên cứu. Nồng độ DNA tổng số được lấy trong khoảng từ 80 ng đến 220 ng DNA/25  $\mu$ L thể tích phản ứng PCR. Kết quả khuếch đại gen PKS và PS ở các mức nồng độ DNA khuôn mẫu khác nhau được trình bày ở Bảng 2.

Nồng độ DNA trong khoảng từ 80 ng/25  $\mu$ L đến 120 ng/25  $\mu$ L thể tích phản ứng không cho thấy sự xuất hiện của băng gen PKS và PS. Khoảng nồng độ từ 140 ng/25 $\mu$ L đến 160 ng/25 $\mu$ L thể tích phản ứng cho thấy sự xuất hiện của các băng. Ở khoảng nồng độ từ 180 ng/25  $\mu$ L đến 240 ng/25  $\mu$ L thể tích phản ứng, các băng gen PKS và PS lại không được phát hiện.

Như vậy, qua kết quả thăm dò ở các mức nồng độ DNA khác nhau, chúng tôi thu được nồng độ DNA khuôn mẫu thích hợp nhất cho phản ứng khuếch đại gen PKS và PS trong mẫu tự nhiên nằm trong khoảng từ 140 đến 160 ng DNA/25  $\mu$ L thể tích phản ứng. Chúng tôi đã sử dụng nồng độ DNA này cho phản ứng PCR với các địa điểm nghiên cứu.

Qua đó, chúng tôi nhận thấy nồng độ DNA khuôn mẫu dùng cho phản ứng PCR là một yếu tố quan trọng khi tiến hành khuếch đại gen. Khi thăm dò yếu tố này, chúng tôi đã chọn những mẫu tại các địa điểm có sự nở hoa VKL và có sự xuất hiện của nhóm loài gây độc với mật độ cao. So sánh với nồng độ DNA khuôn mẫu của mẫu nuôi đã được chúng tôi nghiên cứu trước đó (80–100 ng DNA/25  $\mu$ L) thì nồng độ DNA của mẫu tự nhiên sử dụng trong phản ứng là cao hơn.

### Thời gian bắt mồi trong phản ứng PCR

Căn cứ vào quy trình PCR chuẩn đối với mẫu nuôi của Schembri và cs. [9] và các kết quả của các nghiên cứu trước, chúng tôi tiến hành thay đổi thời gian bắt mồi trong khoảng từ 10 giây đến 40 giây cho một phản ứng PCR đối với mẫu tự nhiên. Các mẫu sử dụng cho nghiên cứu này đã được chúng tôi khuếch đại theo quy trình áp dụng cho mẫu nuôi. Kết quả điện di khuếch đại gen PKS và PS ở các mức thời gian bắt mồi khác nhau và hình ảnh được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 2.** Kết quả khuếch đại gen PKS và PS ở các mức nồng độ DNA khuôn mẫu khác nhau

Nồng độ DNA (ng/25 $\mu$ L)	80	100	120	140	160	180	200	220	240
PKS	–	–	–	+	+	–	–	–	–
PS	–	–	–	+	+	–	–	–	–

Ghi chú: (–) Không thấy sự xuất hiện; (+) Có sự xuất hiện

**Bảng 3.** Kết quả khuếch đại gen PKS và PS ở các mức thời gian bắt mồi khác nhau

Thời gian bắt mồi (giây)	10	15	20	25	30	35	40
Gen PKS	–	–	+	–	–	–	–
Gen PS	–	–	+	–	–	–	–

Ghi chú: (–) Không thấy sự xuất hiện; (+) Có sự xuất hiện

Chúng tôi nhận thấy ở mức thời gian là 10 giây và 15 giây cho quá trình bắt mồi thì không có sự xuất hiện của băng gen PKS và PS. Tại mức thời gian bắt mồi là 20 giây, các băng đã xuất hiện. Tuy nhiên, ở khoảng thời gian từ 25 đến 40 giây các băng gen PKS và PS lại biến mất.

Với kết quả thăm dò thời gian bắt mồi chúng tôi nhận thấy tại mức thời gian 20 giây, sự xuất hiện băng là tốt nhất. Kết quả này được chúng tôi sử dụng cho phản ứng PCR với các địa điểm nghiên cứu.

#### *Nhiệt độ bắt mồi trong phản ứng PCR*

Căn cứ vào nhiệt độ nóng chảy của mồi, nhiệt độ của quá trình ủ và hàm lượng GC của mồi, chúng tôi thay đổi nhiệt độ bắt mồi của phản ứng PCR với mẫu tự nhiên trong khoảng từ 50 °C đến 60 °C. Kết quả điện di khuếch đại gen PKS và PS ở các mức nhiệt độ bắt mồi khác nhau được trình bày trong Bảng 4.

Theo kết quả nghiên cứu trong khoảng nhiệt độ từ 50 °C đến 54 °C và 56 °C đến 60 °C không thấy sự xuất hiện của băng gen PKS và PS. Tại mức nhiệt độ 55 °C sự xuất hiện của băng là rõ nhất. Kết quả này được chúng tôi sử dụng cho phần nghiên cứu PCR về sau.

Qua thăm dò 3 yếu tố trong phản ứng khuếch đại gen PKS và PS, chúng tôi đã thu được kết quả về sự xuất hiện của băng là tốt nhất ở mức nồng độ DNA khuôn mẫu trong khoảng 140 ng/25 µL đến 160 ng/25 µL, thời gian bắt mồi ở 20 giây và nhiệt độ bắt mồi ở mức 55 °C.

Như vậy, trong 3 yếu tố tiến hành thăm dò chúng tôi nhận thấy nồng độ DNA khuôn mẫu dùng cho phản ứng DNA là rất quan trọng. Do trong mẫu sinh khối tự nhiên, mật độ tế bào tảo độc không xác định, nên kết quả sẽ ít nhiều còn phụ thuộc vào yếu tố này. Tỷ lệ hàm lượng gen sinh độc tố có trong DNA tổng số của mẫu tự nhiên là thấp hơn mẫu nuôi nên cần sử dụng với nồng độ cao đồng thời mẫu thuộc điểm nở hoa với mật độ VKL cao thì khả năng khuếch đại thành công là lớn. Điều này cũng phù hợp với kết quả của Bittencourt-Oliveira và cs. [8] trong việc khuếch đại các mẫu tự nhiên thuộc các điểm có sự nở hoa VKL.

Kết quả thăm dò cũng cho thấy các yếu tố trong quy trình PCR phù hợp đối với mẫu nuôi theo nghiên cứu của Schembri và cs. [9] có thể áp dụng được. Vì vậy, ở các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi áp dụng các điều kiện PCR này đối với mẫu nuôi cho mẫu tự nhiên để phân tích sự xuất hiện của gen PKS và PS.

**Bảng 4.** Kết quả khuếch đại gen PKS và PS ở các nhiệt độ bắt mồi khác nhau

Nhiệt độ bắt mồi (°C)	50	52	54	55	56	58	60
Gen PKS	-	-	-	+	-	-	-
Gen PS	-	-	-	+	-	-	-

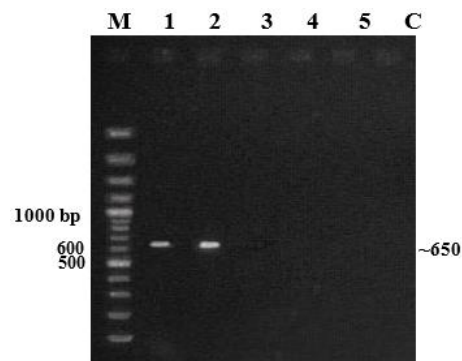
### 3.2 Kết quả phân tích sự xuất hiện của gen có liên quan đến sự sinh tổng hợp CYN

Phân tích PCR với 23 mẫu DNA tổng số tách được từ các mẫu tự nhiên của 23 trong số 23 địa điểm, sử dụng cặp mồi đặc hiệu M4/M5 (PKS) và M13/M14 (PS).

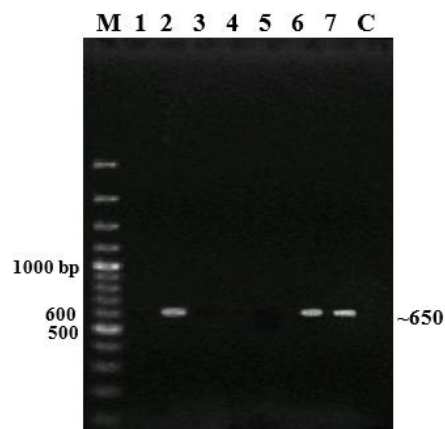
#### Đối với phân đoạn gen PKS

Trong 23 mẫu tiến hành khuếch đại, ở 18 mẫu không có sự xuất hiện của gen PKS; ở 5 mẫu có sự xuất hiện của gen PKS gồm điểm hồ Hoàn Kiếm (Hà Nội), điểm hồ Trường Thi (Thanh Hoá), điểm hồ Goong (Nghệ An), điểm Đập Đá và sông Như Ý (Thừa Thiên Huế). Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại gen PKS được trình bày ở các Hình 1–4.

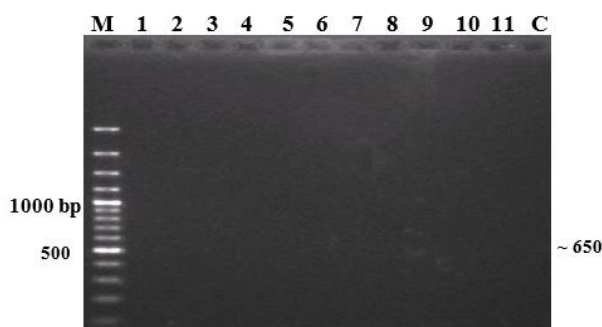
Kết quả cho thấy trong 5 địa điểm có sự xuất hiện của gen PKS chúng tôi phân tích thấy kích thước của các băng nằm trong khoảng 650 bp, phù hợp với kích thước của phân đoạn gen PKS. Tại 5 địa điểm này, qua phân tích định tính thành phần loài có sự xuất hiện của loài *Cylindrospermopsis raciborskii* hoặc sự xuất hiện của nhóm các loài có tiềm năng sinh độc tố hoặc cả hai với mật độ khá cao.



**Hình 1.** Kết quả khuếch đại gen PKS tại các điểm ở Hà Nội và Thanh Hoá với cặp mồi đặc hiệu M4/M5  
M. Marker; 1. HHK; 2. TTT; 3. TTQ; 4. TĐV; 5. THT; C. Control



**Hình 2.** Kết quả khuếch đại gen PKS các điểm ở Nghệ An, Quảng Bình và Huế với cặp mồi đặc hiệu M4/M5  
M. Marker; 1. NCN; 2. NG; 3. QbLT; 4. QbR; 5. QbD; 6. THĐĐ; 7. THNY; C. Control



**Hình 3.** Kết quả khuếch đại gen PKS tại Đà Nẵng, Quảng Ngãi, Bình Định với cặp mồi đặc hiệu M4/M5  
M. Marker; 1. ĐHT; 2. ĐCV; 3. ĐHN; 4. QnND; 5. QNTN; 6. QNNC; 7. QNBC; 8. QNBTT; 9. BAL; 10. BTĐB; 11. BHL;  
C. Control



**Hình 4.** Kết quả khuếch đại gen PKS trong mẫu của 23 địa điểm với cặp mồi đặc hiệu M4/M5  
M. Marker; C. Control; 1. HHK; 2. TTT; 3. TTQ; 4. TĐV; 5. THT; 6. NG; 7. NCN; 8. QbLT; 9. QbĐ; 10. QbR; 11. THĐĐ;  
12. THNY; 13. ĐHT; 14. ĐCV; 15. ĐHN; 16. QnND; 17. QNTN; 18. QNNC; 19. QNBC; 20. QNBTT; 21. BAL; 22. BTĐB;  
23. BHL

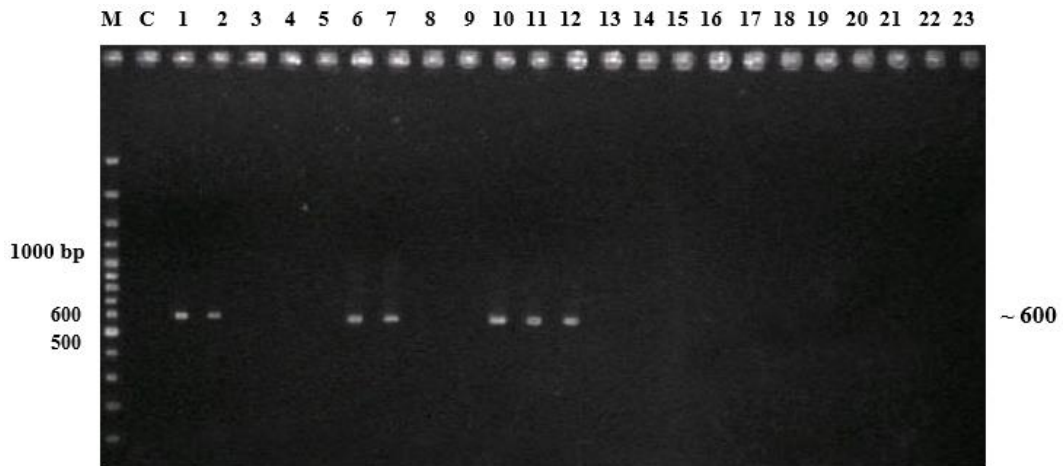
#### Đối với phân đoạn gen PS

Qua nghiên cứu chúng tôi phát hiện được trong 23 địa điểm tiến hành khuếch đại, tại 7 địa điểm có sự xuất hiện của gen PS gồm hồ Hoàn Kiếm (Hà Nội), hồ Trường Thi (Thanh Hoá), hồ Goong, hồ Cửa Nam (Nghệ An), hồ Rào (Quảng Bình), Đập Đá và sông Như Ý (Thừa Thiên Huế). Tại 16 địa điểm còn lại không có sự xuất hiện của gen PS. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại gen PS được trình bày ở Hình 5.

Trong 7 địa điểm có sự xuất hiện của gen PS, chúng tôi cũng phân tích được kích thước của các băng nằm trong khoảng 600 bp, phù hợp với kích thước của phân đoạn gen PS. Tại 7 địa điểm này, qua phân tích định tính thành phần loài có sự xuất hiện của loài *Cylindrospermopsis raciborskii* hoặc sự xuất hiện của nhóm các loài có tiềm năng sinh độc tố hoặc cả hai với mật độ khá cao.

Như vậy, qua phân tích PCR, chúng tôi nhận thấy phân đoạn gen PKS xuất hiện ở 5/23 địa điểm tiến hành khuếch đại; phân đoạn gen PS xuất hiện ở 7/23 địa điểm. Trong đó tại 5 địa điểm có sự xuất hiện của cả 2 gen PKS và PS là hồ Hoàn Kiếm, hồ Trường Thi, hồ Goong, Đập Đá, sông Như Ý (Bảng 5).





**Hình 5.** Kết quả khuếch đại gen PS trong mẫu của 23 địa điểm với cặp mồi đặc hiệu M13/M14  
M. Marker; C. Control; 1. HHK; 2. TTT; 3. TTQ; 4. TĐV; 5. THT; 6. NG; 7. NCN; 8. QbLT; 9. QbĐ; 10. QbR; 11. THĐĐ; 12. THNY; 13. ĐHT; 14. ĐCV; 15. ĐHN; 16. QnND; 17. QNTN; 18. QNNC; 19. QNBC; 20. QNBTT; 21. BAL; 22. BTĐB; 23. BHL

**Bảng 5.** So sánh sự xuất hiện của gen PKS/PS và loài *Cylindrospermopsis raciborskii* với hàm lượng CYN tại các điểm nghiên cứu

STT	Địa điểm	PKS/PS	<i>C. raciborskii</i>	Hàm lượng CYN (ng/mL)
1	Hồ Hoàn Kiếm	+/+	+	0,273
2	Hồ Thành	-/-	-	0
3	Hồ Thanh Quảng	-/-	+	0,945
4	Hồ Đông Vệ	-/-	+	0,273
5	Hồ Trường Thi	+/+	-	0
6	Hồ Cửa Nam	-/+	+	0,309
7	Hồ Goong	+/+	+	0,109
8	Hồ Luỹ Thầy	-/-	-	nd
9	Hồ Rào	-/+	-	nd
10	Hồ Đài	-/-	-	nd
11	Đập Đá	+/+	+	0,600
12	Sông Như Ý	+/+	+	0,455
13	Hồ Tây	-/-	-	0,182
14	Hồ Hàm Nghi	-/-	+	0,273
15	Hồ Công viên 29/3	-/-	-	1,036
16	Hồ Nguyễn Du	-/-	-	0,345
17	Đập Thạch Nham	-/-	-	0,218
18	Hồ Nghĩa Chánh	-/-	-	0,127
19	Hồ Bàu Cá	-/-	-	0

STT	Địa điểm	PKS/PS	<i>C. raciborskii</i>	Hàm lượng CYN (ng/mL)
20	Bến Tam Thương	-/-	-	nd
21	Hồ Hưng Long	-/-	+	0,236
22	Hồ An Lão	-/-	-	0,164
23	Hồ Thiết Đính Bắc	-/-	-	0

Ghi chú: (-) Không xuất hiện; (+) Có xuất hiện; (nd) Không phân tích

So sánh sự xuất hiện của gen PKS và PS với kết quả thăm dò độc tố trong các mẫu tự nhiên

Mối tương quan giữa hàm lượng độc tố và gen quy định sự tổng hợp độc tố trong các mẫu tự nhiên nghiên cứu được trình bày ở Bảng 5.

Khi phân tích sự xuất hiện của gen trong mẫu sinh khối ở 23 địa điểm thì tại 5 địa điểm xuất hiện đồng thời cả 2 gen, tại 2 địa điểm chỉ xuất hiện gen PS mà không xuất hiện gen PKS, một địa điểm có gen và không phân tích độc tố, 16 địa điểm còn lại không xuất hiện gen. Trong 5 địa điểm xuất hiện cả hai gen PKS và PS, chúng tôi nhận thấy nồng độ CYN ở hồ Hoàn Kiếm là 0,273 ng/mL và có sự xuất hiện của loài *Cylindrospermopsis raciborskii*. Đặc biệt tại hồ Goong có sự nở hoa của loài *C. raciborskii* và hàm lượng CYN cũng được phát hiện ở mức 0,109 ng/mL. Tại Đập Đá và sông Như Ý đều có sự xuất hiện của loài *C. raciborskii* và hàm lượng độc tố CYN cũng được ghi nhận lần lượt là 0,60 ng/mL và 0,455 ng/mL. Điều này hoàn toàn phù hợp giữa phân tích độc tố, sự xuất hiện của gen và loài sinh độc tố. Riêng tại hồ Trường Thi, độc tố CYN không được phát hiện và cũng không có sự xuất hiện của loài *C. raciborskii*, nhưng có sự nở hoa của loài *Aphanizomenon* sp. với mật độ khá cao, loài đã được biết đến là loài có tiềm năng sinh CYN [8]. Trường hợp này có thể là do gen đã bị bất hoạt do một yếu tố nào đó nên không biểu hiện thành độc tố và cặp môi sử dụng không khuếch đại đặc hiệu được đối với loài tiềm năng xuất hiện trong mẫu.

Tại hồ Cửa Nam và hồ Rào chỉ có sự xuất hiện của một phân đoạn gen PKS. Trong đó tại hồ Cửa Nam có sự xuất hiện của loài *C. raciborskii* và độc tố CYN được phát hiện ở nồng độ 0,309 ng/mL. Ở hồ Rào có sự nở hoa của chi *Anabaena* là nhóm loài có tiềm năng sinh CYN khá cao.

Đối với các mẫu ở Thanh Quảng, Đông Vệ, Hồ Tây, Hàm Nghi, Công viên 29/3, Nguyễn Du, Thạch Nham, Nghĩa Chánh, Hưng Long, An Lão mặc dù có sự xuất hiện của độc tố CYN trong các mẫu nước, nhưng chúng tôi không khuếch đại được cả 2 gen. Các điểm này đều có hay không có mặt loài *C. raciborskii* nhưng lại có sự xuất hiện các loài VKL tiềm năng sinh độc tố CYN khác như *Aphanizomenon* sp., *Anabaena* sp., *Raphidiopsis curvata*, *Lyngbya* sp., *Planktolyngbya* sp. Tuy nhiên, mật độ của chúng là thấp. Có thể đây là nguyên nhân làm cho việc khuếch đại các gen PKS và PS không thành công.

Như vậy, khi khuếch đại gen PKS và PS trong mẫu của 23 địa điểm, tại 7 địa điểm có gen thì 5 địa điểm có kết quả xuất hiện gen phù hợp với phân tích độc tố và phân tích thành phần loài, 1 địa điểm có gen và ghi nhận có loài tiềm năng sinh độc nhưng không phát hiện độc tố, 1 địa điểm có gen nhưng không phân tích độc tố. Điều này cho thấy cần nghiên cứu sâu hơn để có thể sử dụng phương pháp PCR làm công cụ phát hiện các loài tảo độc hại ở Việt Nam.

## 4 Kết luận

Các gen PKS và PS trong mẫu tự nhiên có thể được khuếch đại ở điều kiện: nồng độ DNA khuôn mẫu từ 140 đến 160 ng DNA/25  $\mu$ L thể tích phản ứng; thời gian bắt mồi là 20 giây; nhiệt độ bắt mồi 55 °C. Trong số 23 mẫu nghiên cứu, gen PS được phát hiện trong 7 mẫu; gen PKS được phát hiện trong 5 mẫu, trong đó có 5 mẫu thuộc 5 địa điểm phát hiện cả hai gen PS và PKS. Việc so sánh với kết quả phân tích sự xuất hiện của loài gây độc *Cylindrospermopsis raciborskii* và hàm lượng độc tố CYN trong nước cho thấy trong 7 mẫu có gen thì trong 5 mẫu xuất hiện gen phù hợp với phân tích độc tố và phân tích thành phần loài, 1 địa điểm có gen và ghi nhận có loài tiềm năng sinh độc nhưng không phát hiện độc tố, một địa điểm có gen nhưng không phân tích độc tố. Kết quả cho thấy tiềm năng của việc sử dụng phương pháp PCR trong việc phát hiện các loài tảo độc trong các mẫu tự nhiên.

### Lời cảm ơn

Đây là kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học, mã số: 106.06.73.09 do Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia tài trợ.

### Tài liệu tham khảo

1. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*. 1992;114(20):7941-2.
2. Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon*. 2003;42(3):313-21.
3. Runnegar MT, Kong S-M, Zhong Y-Z, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 1995;49(2):219-25.
4. Banker R, Carmeli S, Werman M, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2001;62(4):281-8.
5. Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, et al. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*. 2001;39(7):973-80.
6. Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, et al. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*. 2001;39(7):973-80.
7. Yilmaz M, Philips EJ, Tillett D. Improved methods for the isolation of cyanobacterial DNA from environmental samples. *Journal of Phycology*. 2009;45(2):517-21.
8. Bittencourt-Oliveira MDC, Piccin V, Kujbida P, Moura A. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. *Journal of Water Resource and Protection*. 2011;336044:349-55.

9. Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*. 2001;16(5):413-21.
10. Stüken A, Campbell RJ, Quesada A, Sukenik A, Dadheech PK, Wiedner C. Genetic and morphologic characterization of four putative cylindrospermopsin producing species of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *Journal of Plankton Research*. 2009;31(5):465-80.
11. Doyle JJ. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987;19:11-5.