Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên
Tập 129, Số 1A, 115–123, 2020

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

XÁC ĐỊNH SỰ CÓ MẶT CỦA CÁC GEN ĐỘC TỐ Ở CÁC CHỦNG *Vibrio* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG TẠI THỪA THIÊN HUẾ

Hoàng Tấn Quảng[1], Trần Thúy Lan[1], Phạm Thị Diễm Thi[1], Lê Thị Tuyết Nhân[1], Lê Mỹ Tiểu Ngọc[1], Nguyễn Duy Quỳnh Trâm[2], Nguyễn Thị Thu Liên[1*]

[1] Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam
[2] Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Thu Liên <nttliencnsh@hueuni.edu.vn>

(*Ngày nhận bài: 17-12-2019; Ngày chấp nhận đăng: 08-04-2020*)

Tóm tắt. Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* – AHPND) là một bệnh do vi khuẩn gây ra. Bệnh này dẫn đến tỷ lệ chết lên đến 100% trong quần thể tôm thẻ chân trắng, tôm sú và gây những tổn thất kinh tế đáng kể cho ngành nuôi tôm ở nhiều nước châu Á. Các nghiên cứu trước đây cho thấy không phải chủng *Vibrio* nào cũng có khả năng gây bệnh do chúng mang các gen độc tố khác nhau. Chúng tôi đã đánh giá sự có mặt của các gen độc tố trên các chủng *Vibrio* phân lập tại Thừa Thiên Huế đồng thời phân tích trình tự các gen này. Kết quả cho thấy trong 14 chủng *Vibrio* mang gen $pirAB^{vp}$ nghiên cứu, gen *tlh* xuất hiện ở tất cả các chủng, gen *toxR* xuất hiện ở 7/14 chủng trong khi đó các gen *trh* và *tdh* không xuất hiện trong các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập được. Giải trình tự đoạn chỉ thị các gen độc tố cho thấy các gen này đều có độ tương đồng khá cao (98–100%) so với các gen đã công bố trên ngân hàng gen, trong đó 2 gen $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$ ít sai khác còn các gen *tlh* và *toxR* có sự sai khác nhiều hơn. Đây là cơ sở để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo trong việc sản xuất các chế phẩm phòng và trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm.

Từ khóa: AHPND, gen độc tố, hoại tử gan tụy cấp, tôm, Vibrio

Screening and analysing toxic genes from *Vibrio* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in white-leg shrimp at Thua Thien Hue

Hoang Tan Quang[1], Tran Thuy Lan[1], Pham Thi Diem Thi[1], Le Thi Tuyet Nhan[1], Le My Tieu Ngoc[1], Nguyen Duy Quynh Tram[2], Nguyen Thi Thu Lien[1*]

[1] Institute of Biotechnology, Hue University, Road No. 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam
[2] University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Thu Lien <nttliencnsh@hueuni.edu.vn>

(*Received: 17 December 2019; Accepted: 08 April 2020*)

Abstract. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is a disease caused by bacteria, with the death ratio up to 100% in the population of *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon*, and causes great

economic losses to many shrimp-producing countries in Asia. Previous studies have shown that not all strains of *Vibrio* can cause AHPND because they contain different toxin genes, such as $pirA^{vp}$, $pirB^{vb}$, *tlh*, *trh*, and *tdh*. In this study, we evaluate the presence of several toxic genes on *Vibrio* isolates from Thua Thien Hue province and analyze the sequence of these genes. The results show that in 14 *Vibrio* strains carrying $pirAB^{vp}$ gene, the *tlh* and *toxR* genes occur in 14/14 and 7/14 strains, respectively, while none of them have the two genes of *trh* and *tdh*. Analyzing the sequence of four DNA fragments shows that these genes have high similarity (98–100%) compared with the genes announced on the Genbank. Genes $pirA^{vp}$ and $pirB^{vp}$ are less different, while *tlh* and *toxR* genes are more different. The results could be used for further studies in the production of bioproducts for the prevention and treatment of acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp.

Keywords: AHPND, acute hepatopancreatic necrosis disease, shrimp, toxic encoding gene, Vibrio

1 Đặt vấn đề

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* – AHPND) là một bệnh do vi khuẩn gây ra. Bệnh thường cảm nhiễm ở giai đoạn tôm nuôi dưới 35 ngày tuổi. Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính đe dọa nghiêm trọng ngành công nghiệp nuôi tôm ở châu Á (bao gồm Trung Quốc, Việt Nam, Malaysia, Thái Lan và Philippine) và một số nước khác trên thế giới. Bệnh này dẫn đến tỷ lệ chết lên đến 100% trong quần thể tôm thẻ chân trắng, tôm sú và đã gây nên những tổn thất kinh tế đáng kể cho ngành nuôi tôm [1].

Ở Việt Nam, bệnh AHPND cũng đã được công bố là ảnh hưởng nghiêm trọng đến ao nuôi tôm ở nhiều địa phương như các tỉnh Hải Phòng, Quảng Ninh, Nghệ An, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế và vùng đồng bằng Sông Cửu Long, ảnh hưởng lên cả tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) với cùng biểu hiện bệnh tích lên cơ quan gan tụy. Mặc dù loài *Vibrio parahaemolyticus* được cho là tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tuỵ ở tôm, nhưng một số nghiên cứu gần đây cũng đã cho thấy một số loài *Vibrio* khác như *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae* và *V. alginolyticus* có liên quan đến sự xuất hiện của bệnh này [2, 3].

Độc tố $PirAB^{vp}$, tương đồng với độc tố tiêu diệt côn trùng (*Pir*) của *Photorhabdus*, được chứng minh là yếu tố độc lực chính gây nên hội chứng gan tụy cấp ở tôm [4-6]. Các gen tương ứng của chúng (được đặt tên là $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$) nằm trên một plasmid có kích thước lớn (69–70 kb) ở các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp [4, 7]. Trên plasmid, gen $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$ nằm trên vùng nucleotide với kích thước khoảng 3,5 kb với hai lần lặp đảo ngược của chuỗi mã hóa transposase (1 kb). Dựa trên phân tích proteomic, gen $pirA^{vp}$ (336 bp) và $pirB^{vp}$ (1.317 bp) mã hoá cho protein có kích thước khoảng 13 và 50 kDa [4].

Các nghiên cứu trước đây cho thấy không phải chủng *Vibrio* nào cũng có khả năng gây bệnh do chúng mang các gen độc tố khác nhau. Trong số đó, hemolysin là loại độc tố phổ biến nhất ở các loài *Vibrio* gây bệnh. Đây là ngoại độc tố làm phân giải tế bào hồng cầu và giải phóng hemoglobin. Ở loài *V. parahaemolyticus*, tồn tại ba gen độc tố hemolysin chính bao gồm *tdh* và *trh* mã hóa các hemolysin bền nhiệt và *tlh* mã hóa hemolysin không bền nhiệt. Cả hai gen *tdh* và *trh* đều nằm trên operon độc tố *Vp-toxRS*, được điều hòa bởi gen *toxR* có trình tự bảo tồn cao trong loài [8].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả bước đầu về sự có mặt của các gen độc tố trên các loài *Vibrio* gây bệnh trên tôm được phân lập ở Thừa Thiên Huế.

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu nghiên cứu là các loài *Vibrio* phân lập từ mẫu tôm bị bệnh hoại tử gan tụy cấp tại tỉnh Thừa Thiên Huế do Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp. Đây là các chủng đã được định danh và mang các gen độc tố $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$.

2.2 Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

Các chủng vi khuẩn *Vibrio* được nuôi trong môi trường peptone muối kiềm (ASPW) với 2% peptone và 2% NaCl, pH 8,6, lắc trong 18 giờ ở 30 °C với tốc độ 180 vòng/phút. Dịch nuôi cấy được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút ở 4 °C để thu tế bào. DNA tổng số được tách chiết bằng AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Cat. 732-6340, Bio-rad) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sau đó bảo quản ở 4 °C. Chất lượng DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

Xác định sự có mặt của gen mã hóa độc tố của vi khuẩn

Sự có mặt của độc tố của các chủng gây bệnh gan tụy cấp trên tôm được xác định thông qua sự có mặt của các gen mã hóa protein độc tính ($pirA^{vp}$, $pirB^{vp}$, *tox*R và *tlh*) dựa trên các cặp mồi đặc hiệu cho đoạn chỉ thị của các gen này. Trình tự cụ thể các mồi được trình bày ở Bảng 1.

Thành phần PCR bao gồm: 50 ng DNA tổng số, 10 pmol primer mỗi loại, 6 µL 2× GoTaq® Green Master Mix (Promega, Mỹ), bổ sung nước cất vô trùng vừa đủ 12 µL. Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt MJ Mini™ Thermal Cycler (Biorad, Mỹ) theo chu trình: 95 °C/10 phút; 30 chu kỳ: 95 °C/30 giây, 53 °C/30 giây, và 72 °C/1 phút; cuối cùng 72 °C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% và nhuộm bằng 6× GelRedTM loading buffer with tricolor (ABT, Việt Nam). Hình ảnh điện di được thu nhận trên bàn đọc UV.

Sản phẩm PCR được tạo dòng vào vector pGEM T-easy (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó các vector tái tổ hợp được chuyển vào vi khuẩn *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Thể tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung 50 µg/mL ampicillin, X-Gal/IPTG. Khuẩn lạc màu trắng được chọn ngẫu nhiên từ các đĩa và tiến hành PCR với cặp mồi M13F (5′-GTAAACGACGGCCAG-3′) và M13R (5′-CAGGAAACAGCTATG AC-3′). Chu trình nhiệt của phản ứng khuếch đại với mồi M13 được thực hiện giống như phần trên. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và được gửi đi phân tích trình tự tự bằng phương pháp Sanger.

Trình tự nucleotide của các gen được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit, sau đó so sánh với các trình tự đã được công bố trên ngân hàng gen thông qua công cụ BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Bảng 1. Trình tự các mồi sử dụng

Gen	Tên mồi	Trình tự nucleotide	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
$pirA^{vp}$	VpPirA-284	5′-TGACTATTCTCACGATTGGACTG-3′ 5′-CACGACTAGCGCCATTGTTA-3′	284	[4]
$pirB^{vp}$	VpPirB-392	5′-TGATGAAGTGATGGGTGCTC-3′ 5′-TGTAAGCGCCGTTTAACTCA-3′	392	[4]
tlh	tl	5′-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3′ 5′-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3′	450	[9]
*tox*R	tR	5′-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3′	367	[10]

Gen	Tên mồi	Trình tự nucleotide	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
		5′-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3′		
trh	L-trh	5′-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3′	410	[11]
	R-trh	5′-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3′		
tdh	L-tdh	5′-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3′	245	[11]
	R-tdh	5′-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3′		

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Sự có mặt của các gen độc tố trên các chủng *Vibrio* gây bệnh

Dựa trên các chủng *Vibrio* được cung cấp, chúng tôi đã nuôi cấy tăng sinh trên môi trường ASPW, tách chiết DNA tổng số sau đó xác định sự có mặt của các gen độc tố. Từ 14 chủng mang gen gây bệnh là $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$, chúng tôi tiến hành khảo sát sự có mặt của các gen độc tố khác là *tlh*, *toxR*, *trh* và *tdh*.

Kết quả khảo sát sự có mặt của gen *tlh* cho thấy 100% chủng mang gen này, đây là tỷ lệ phù hợp với các công bố trước đây. Đối với gen *toxR*, chúng tôi ghi nhận 7/14 mẫu chứa gen này, trong đó toàn bộ thuộc về loài *V. parahaemolyticus* (Bảng 2). Theo Han và cs., gen *tlh* và *toxR* xuất hiện ở 100% các loài *V. parahaemolyticus* nghiên cứu [4]; điều này tương đồng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Trong khi đó, Gutierrez West và cs. nghiên cứu trên các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ vùng cửa sông ở Mỹ nhận thấy 79% số chủng mang gen *tlh* [11]. Ở Việt Nam, sự có mặt của 2 gen *tlh* và *toxR* trên các chủng *Vibrio* gây bệnh cũng đã được công bố. Nguyễn Văn Duy và Nguyễn Thị Cẩm Ly đã phân lập được 5 chủng *V. parahaemolyticus* trong mẫu hải sản tươi sống ở Nha Trang và cả 5 chủng này đều mang cả 2 gen *tlh* và *toxR* [12]. Tương tự, nghiên cứu của Han và cs. cho thấy 9/9 chủng *V. parahaemolyticus* ở Việt Nam mang cả 2 gen *tlh* và *toxR* [13].

Trong nghiên cứu của mình, chúng tôi cũng nhận thấy 2 gen *trh* và *tdh* không xuất hiện ở các mẫu nghiên cứu. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Nguyễn Văn Duy và Nguyễn Thị Cẩm Ly trên loài *V. parahaemolyticus* trong mẫu hải sản tươi sống ở Nha Trang. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự tương đồng nhất định giữa các chủng *Vibrio* gây bệnh ở Việt Nam. Các chủng thu được ở Thừa Thiên Huế có sự có mặt của các gen độc tố tương tự như các chủng thu được tại Nha Trang [12]. Các công bố trước đây cho thấy không phải chủng *Vibrio* nào cũng mang tất cả các gen độc tố, chẳng hạn, Mahmud và cs. nhận thấy chỉ có 18/6000 chủng *V. parahaemolyticus* ở Nhật Bản chứa gen *tdh* [9].

Bảng 2. Sự có mặt của các gen độc tố trong các chủng *Vibrio* gây bệnh

TT	Loài	*tlh*	*toxR*	*trh*	*tdh*
1	*V. parahaemolyticus* TX07-3/3	x	x	–	–
2	*V. shilonii* TX05-3/3	x	–	–	–
3	*V. shilonii* TX03-3/3	x	–	–	–
4	*V. shilonii* TX02-3/3	x	–	–	–
5	*V. shilonii* TX01-3/3	x	–	–	–
6	*V. shilonii* TV02-3/3	x	–	–	–
7	*V. parahaemolyticus* K31-X-13/6/2019	x	x	–	–
8	*V. parahaemolyticus* K39-X-13/6	x	x	–	–
9	*V. communis* R-PD-K4-V-13/6	x	–	–	–
10	*V. parahaemolyticus* R-PD-K3-10/6	x	x	–	–

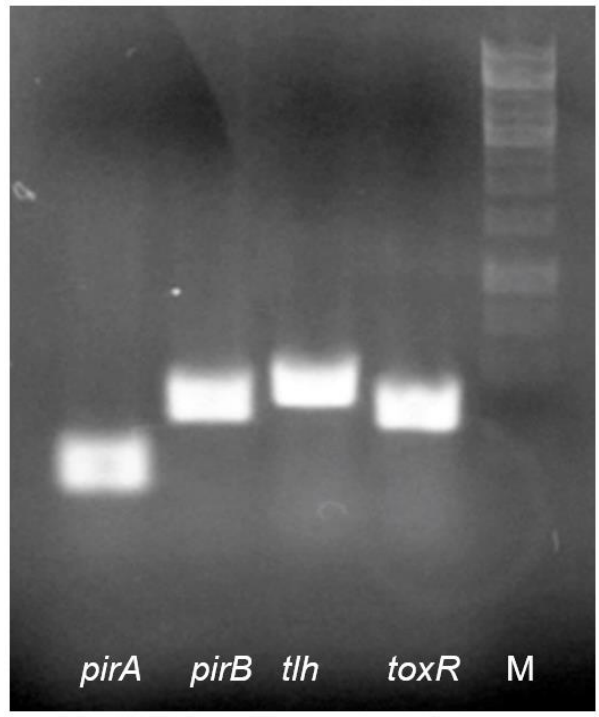
pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

TT	Loài	*tlh*	*toxR*	*trh*	*tdh*
11	*V. parahaemolyticus* R-PD-K3-10/6	x	x	–	–
12	*V. furnissii* R-K39-13/6	x	–	–	–
13	*V. parahaemolyticus* VX01	x	x	–	–
14	*V. parahaemolyticus* K5	x	x	–	–

3.2 Xác định trình tự của các gen độc tố

Sau khi xác định được các chủng mang gen gây bệnh, chúng tôi chọn các gen từ chủng VX01 để phân tích trình tự các gen độc tố. Đây là chủng đầu tiên được phân lập trong các chủng mang gen *pirAB*^{vr} (Hình 1). Kết quả phân tích trình tự cho thấy cả 4 gen nghiên cứu đều có trình tự tương đồng 100% với các gen tương ứng của loài *V. parahaemolyticus* đã được công bố trên ngân hàng gen.

Đối với gen *pirA*^{vp}, kết quả phân tích trình tự sản phẩm PCR cho thấy trình tự nucleotide của nó dài 284 bp (Hình 2), đúng bằng kích thước lý thuyết đã công bố và tương đồng 100% với trình tự gen *pirA* của chủng *V. parahaemolyticus* CMCR003, mã số MH700243. Kết quả so sánh cũng cho thấy có ít sự sai khác giữa các gen *pirA* đã công bố từ các chủng *Vibrio* trên ngân hàng gen. Hai mươi chín trình tự đã công bố tương đồng 100% với trình tự chúng tôi thu được.



Hình 1. Sản phẩm PCR các gen độc tố từ chủng *V. parahaemolyticus* VX01
M: DNA ladder 1 Kb marker

```
PirAvp    1   CACGACTAGCGCCATTGTTAATTACAACAATACGCTGATGATAGAATGCATTATCAGGGC  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH700243  1   CACGACTAGCGCCATTGTTAATTACAACAATACGCTGATGATAGAATGCATTATCAGGGC  60

PirAvp   61   GTTGTAAATGGTAAGTTTCATCACGTTGTACCACATGTGATTTAGCCACTTTCCAGCCGC  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH700243 61   GTTGTAAATGGTAAGTTTCATCACGTTGTACCACATGTGATTTAGCCACTTTCCAGCCGC  120

PirAvp   121  CAGCCATAAATGGCGCACCCCATTGGTATTGAATGGTAAGCTCCCCACGTCCCGTATTCT  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH700243 121  CAGCCATAAATGGCGCACCCCATTGGTATTGAATGGTAAGCTCCCCACGTCCCGTATTCT  180

PirAvp   181  CAATGTCTACACTACGACCGACTTCCGGGATGATAGGTGTATGTTTGCTGTCTACTTCTG  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH700243 181  CAATGTCTACACTACGACCGACTTCCGGGATGATAGGTGTATGTTTGCTGTCTACTTCTG  240

PirAvp   241  TGACGCCTCCGTTTGGTTCGACAGTCCAATCGTGAGAATAGTCA  284
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH700243 241  TGACGCCTCCGTTTGGTTCGACAGTCCAATCGTGAGAATAGTCA  284
```

Hình 2. Trình tự nucleotide đoạn chỉ thị gen *pirA*^{vp} và trình tự đã công bố (MH700243)

Đối với gen *pirB*, kết quả phân tích trình tự sản phẩm PCR cho thấy trình tự nucleotide của nó dài 392 bp (Hình 3) đúng như lý thuyết đã công bố và tương đồng 100% với trình tự gen *pirB* của chủng *V. parahaemolyticus* RECR004, mã số MH714301. Tương tự gen $pirA^{vp}$, 27 trình tự gen *pirB* từ các chủng *Vibrio* đã công bố tương đồng 100% với trình tự của chúng tôi.

Đối với gen *tlh*, kết quả phân tích trình tự sản phẩm PCR cho thấy trình tự nucleotide của nó dài 450 bp (Hình 4) giống như lý thuyết, tương đồng 100% với trình tự gen *tlh* của chủng *V. parahaemolyticus* ATCC 33846 (mã số GU971655). Tuy nhiên, khi so sánh trình tự thu được với gen *tlh* của chủng *V. parahaemolyticus* TS-9-11-1 (mã số JX262963), mức độ tương đồng là 99,78% (sai khác 1 nucleotide ở vị trí 347). So sánh với gen *tlh* của chủng *V. parahaemolyticus* HA2 (mã số CP023709), mức độ tương đồng là 99,56% (sai khác 2 nucleotide ở vị trí 6 và 259). Kết quả so sánh với 100 trình tự tương đồng cao nhất trên NCBI cho thấy mức độ tương đồng của gen *tlh* với các gen đã công bố thấp hơn so với gen $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$, trong đó chỉ có 5 trình tự tương đồng 100%. Điều này chứng tỏ gen *tlh* là gen có mức độ đột biến cao và không ổn định như gen *pirA* và *pirB*. So sánh với gen *tlh* từ chủng *V. parahaemolyticus* strain C1 phân lập ở Nha Trang (mã số JQ929914) [12], gen *tlh* của chúng tôi có mức độ tương đồng 99,56% (sai khác 2 nucleotide ở vị trí 255 và 426). Như vậy, có thể thấy gen *tlh* ở Việt Nam có sự khác nhau giữa các vùng.

```
PirBvp    1    TGTAAGCGCCGTTTAACTCAATAGATTGGTAATGCTCGTCATATTTATGAGCCTTGCCTA  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  1    TGTAAGCGCCGTTTAACTCAATAGATTGGTAATGCTCGTCATATTTATGAGCCTTGCCTA  60

PirBvp    61   GTTCTACCACTTCCCCATTTTCATAAGTTAGTTTAAGTCGACCTACGCGATTGTAATAAT  120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  61   GTTCTACCACTTCCCCATTTTCATAAGTTAGTTTAAGTCGACCTACGCGATTGTAATAAT  120

PirBvp    121  GTATTTCAATACTGTTCCATGATTCAATTTTTACAATACGATTTCGACGTTCCCCAAACA  180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  121  GTATTTCAATACTGTTCCATGATTCAATTTTTACAATACGATTTCGACGTTCCCCAAACA  180

PirBvp    181  TATTTGGTTTTAATGGTTGAGGTATTTCATCTTCCGTACCTGTAGCAATATAGTTGAAAT  240
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  181  TATTTGGTTTTAATGGTTGAGGTATTTCATCTTCCGTACCTGTAGCAATATAGTTGAAAT  240

PirBvp    241  TACCACTAGGAAAACCAACAGCAGGTGAATATGAAATTAAATTACTGTGAACAAACACAT  300
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  241  TACCACTAGGAAAACCAACAGCAGGTGAATATGAAATTAAATTACTGTGAACAAACACAT  300

PirBvp    301  CAACTTTTTTCAACTCTTTGATTTTTTGCCAAATAAGCATATGTTCAAAGCCGTGAACCG  360
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  301  CAACTTTTTTCAACTCTTTGATTTTTTGCCAAATAAGCATATGTTCAAAGCCGTGAACCG  360

PirBvp    361  TACACCAACTACGAGCACCCATCACTTCATCA  392
               ||||||||||||||||||||||||||||||
MH714301  361  TACACCAACTACGAGCACCCATCACTTCATCA  392
```

Hình 3. Trình tự nucleotide đoạn chỉ thị gen $pirB^{vp}$ và trình tự đã công bố (MH714301)

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

```
tlh       1    AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTGATTCGTTTGACGGACGCAGGTGCGAAGAACTTCATG  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  1    AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTGATTCGTTTGACGGACGCAGGTGCGAAGAACTTCATG  60

tlh       61   TTGATGACACTGCCAGACGCGACGAAAGCGCCTCAGTTTAAGTACTCAACACAAGAAGAG  120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  61   TTGATGACACTGCCAGACGCGACGAAAGCGCCTCAGTTTAAGTACTCAACACAAGAAGAG  120

tlh       121  ATCGACAAAATTCGTGCGAAAGTGCTTGAGATGAACGAGTTCATCAAGGCACAAGCGATG  180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  121  ATCGACAAAATTCGTGCGAAAGTGCTTGAGATGAACGAGTTCATCAAGGCACAAGCGATG  180

tlh       181  TACTACAAAGCGCAAGGTTACAACATCACGTTGTTTGATACTCACGCCTTGTTCGAGACG  240
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  181  TACTACAAAGCGCAAGGTTACAACATCACGTTGTTTGATACTCACGCCTTGTTCGAGACG  240

tlh       241  CTAACTTCTGCGCCCGAAGAGCACGGTTTCGTGAACGCGAGTGATCCTTGTTTGGACATC  300
               |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  241  CTAACTTCTGCGCCAGAAGAGCACGGTTTCGTGAACGCGAGTGATCCTTGTTTGGACATC  300

tlh       301  AACCGCTCATCGTCTGTCGATTACATGTACACCCACGCATTGCGCTCTGAGTGTGCGGCG  360
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  301  AACCGCTCATCGTCTGTCGATTACATGTACACCCACGCATTGCGCTCTGAGTGTGCGGCG  360

tlh       361  TCTGGTGCTGAGAAGTTTGTGTTCTGGGATGTCACGCACCCAACAACAGCAACTCACCGC  420
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
JQ929914  361  TCTGGTGCTGAGAAGTTTGTGTTCTGGGATGTCACGCACCCAACAACAGCAACTCACCGC  420

tlh       421  TATGTTGCAGAGAAAATGCTAGAAAGTAGC  450
               ||||| |||||||||||||||||||||||||
JQ929914  421  TATGTCGCAGAGAAAATGCTAGAAAGTAGC  450
```

Hình 4. Trình tự nucleotide đoạn chỉ thị gen *tlh* và trình tự đã công bố (JQ929914)

Đối với gen *toxR*, kết quả phân tích cho thấy trình tự nucleotide của sản phẩm PCR dài 367 bp (Hình 5) và tương đồng 100% với trình tự gen *toxR* của chủng *V. parahaemolyticus* 20130629002S01 (mã số CP020034). So sánh với gen *toxR* từ chủng *V. parahaemolyticus* strain C1 phân lập ở Nha Trang (mã số JQ929913), gen *toxR* của chúng tôi có mức độ tương đồng 100% [12]. Như vậy có thể thấy gen *toxR* ở Việt Nam không có sự sai khác giữa các vùng.

Tuy nhiên, khi so sánh trình tự thu được với gen *toxR* của chủng *V. parahaemolyticus* NSTH10 (mã số KF993361), mức độ tương đồng là 99,73% (sai khác 1 nucleotide ở vị trí 76). So sánh với gen *toxR* của chủng *V. parahaemolyticus* D3112 (mã số CP034565), mức độ tương đồng là 99,45% (sai khác 2 nucleotide ở vị trí 286 và 301). Khi so sánh trình tự của chúng tôi với 100 gen *toxR* của các chủng *Vibrio* khác có mức độ tương đồng cao nhất đã công bố trên ngân hàng gen, chỉ có 7 trình tự có độ tương đồng 100%. Tương tự như gen *tlh*, gen *toxR* là một gen có mức độ đột biến cao và không ổn định như gen *pirA* và *pirB*.

```
toxR      3        CTTCTGACGCAATCGTTGAACCAGAAGCGCCAGTAGTACCTGAAAAAGCACCTGTGGCTT  62
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CP034565  2352164  CTTCTGACGCAATCGTTGAACCAGAAGCGCCAGTAGTACCTGAAAAAGCACCTGTGGCTT  2352223

toxR      63       CTGCTGTGAATCCATGGATTCCACGCGTTATTTTATTTTTGGCACTATTACTACCGATTT  122
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CP034565  2352224  CTGCTGTGAATCCATGGATTCCACGCGTTATTTTATTTTTGGCACTATTACTACCGATTT  2352283

toxR      123      GCGTACTGCTGTTTACAAACCCTGCGGAATCTCAGTTCCGTCAGATTGGTGAGTATCAGA  182
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CP034565  2352284  GCGTACTGCTGTTTACAAACCCTGCGGAATCTCAGTTCCGTCAGATTGGTGAGTATCAGA  2352343

toxR      183      ACGTACCAGTGATGACACCTGTAAATCACCCGCAAATCAACAACTGGTTGCCTTCTATTG  242
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CP034565  2352344  ACGTACCAGTGATGACACCTGTAAATCACCCGCAAATCAACAACTGGTTGCCTTCTATTG  2352403

toxR      243      AGCAGTGCATTGAACGCTACGTTAAGCACCATGCAGAAGACTCCTTACCAGTGGAAGTGA  302
                   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||| |
CP034565  2352404  AGCAGTGCATTGAACGCTACGTTAAGCACCATGCAGAAGACTCGTTACCAGTGGAAGTAA  2352463

toxR      303      TTGCCACTGGCGGACAAAATAACCAGCTGATTTTGAACTACATTCATGACAGCAACCACT  362
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CP034565  2352464  TTGCCACTGGCGGACAAAATAACCAGCTGATTTTGAACTACATTCATGACAGCAACCACT  2352523

toxR      363      CGTAT  367
                   |||||
CP034565  2352524  CGTAT  2352528
```

Hình 5. Trình tự nucleotide đoạn chỉ thị gen *toxR* và trình tự đã công bố (CP034565)

4 Kết luận

Từ 14 chủng *Vibrio* mang gen $pirAB^{vp}$ nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy gen *tlh* xuất hiện ở tất cả các chủng; gen *toxR* xuất hiện ở 7/14 chủng trong khi các gen *trh* và *tdh* không xuất hiện trong các chủng nghiên cứu. Giải trình tự đoạn chỉ thị các gen độc tố cho thấy các gen này đều có độ tương đồng khá cao (98–100%) so với các gen đã công bố trên ngân hàng gen, trong đó 2 gen $pirA^{vp}$ và $pirB^{vp}$ ít sai khác còn các gen *tlh* và *toxR* có sự sai khác nhiều hơn.

Thông tin tài trợ: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của các đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2018–2020, mã số CT-2018-DHH-01 và CT-2018-DHH-02.

Tài liệu tham khảo

1. de la Pena LD, Cabillon NA, Catedral DD, Amar EC, Usero RC, Monotilla WD, et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. Dis Aquat Organ. 2015;116(3):251-254.
2. Giang NTT, Toàn PV, Hùng PQ. Hội chứng hoại tử gan tụy ở tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi thương phẩm tại Ninh Thuận. Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản. 2016; 1:32-40.
3. Lụa ĐT, Khuê NV, Vân PT. Non-*Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 2016;14(5):690-698.
4. Han JE, Tang KFJ, Tran LH, Lightner DV. Photorhabdus insect-related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 2015;113(1):33-40.
5. Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(34):10798.
6. Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, Chi TD, Mavichak R, Proespraiwong P, et al. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp. PLOS ONE. 2015;10(5): e0126987.

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

7. Yang YT, Chen IT, Lee CT, Chen CY, Lin SS, Hor LI, et al. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in shrimp in China and Thailand. Genome Announc. 2014;2(5):e00816-14.

8. Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect Immun. 1995;63(6):2093-2099.

9. Mahmud HZ, Kassu A, Mohammad A, Yamato M, Bhuiyan NA, Balakrish Nair G, et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. Microbiological Research. 2006;161(1):25-37.

10. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37(4):1173-1177.

11. Gutierrez West CK, Klein SL, Lovell CR. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. Applied and Environmental Microbiology. 2013;79(7):2247-2252.

12. Duy NV, Ly NTC. Phân lập và xác định gen độc tố của *Vibrio parahaemolyticus* trong hải sản tươi sống ở Nha Trang. Tạp chí Khoa học-Công nghệ thủy sản. 2012;2:42-47.

13. Han JE, Mohney LL, Tang KFJ, Pantoja CR, Lightner DV. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. Aquaculture Reports. 2015;2:17-21.