

## PHÁT TRIỂN CHỈ THỊ PHÂN TỬ SCAR NHẬN DIỆN LOÀI *Vibrio vulnificus* GÂY BỆNH LỞ LOÉT TRÊN CÁ NUÔI TẠI TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Hoàng Tấn Quang<sup>1</sup>, Phạm Thị Diễm Thi<sup>1</sup>, Trần Thúy Lan<sup>1</sup>, Phạm Thị Hải Yến<sup>2</sup>,  
Trần Quang Khánh Vân<sup>2</sup>, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm<sup>2\*</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 Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Nguyễn Duy Quỳnh Trâm <ndqtram@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-04-2020; Ngày chấp nhận đăng: 28-05-2020)

**Tóm tắt.** Vi khuẩn *Vibrio vulnificus* xuất hiện khá phổ biến trên cá nuôi bị bệnh xuất huyết ở tỉnh Thừa Thiên Huế và là một mầm bệnh cơ hội trên người, có thể gây nhiễm trùng máu nguyên phát, nhiễm trùng vết thương và viêm dạ dày, ruột. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu nhằm phát triển một chỉ thị phân tử dựa trên kỹ thuật đa hình các đoạn khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) để xác định nhanh chóng *V. vulnificus*. Hai mươi mốt ngẫu nhiên đã được sử dụng cho phản ứng PCR-RAPD để phát hiện đa hình DNA giữa các loài *Vibrio*. Trong đó, mồi OPA-09 tạo ra một sản phẩm khuếch đại đặc hiệu cho loài *V. vulnificus* với chiều dài 1356 bp. Trình tự này được thiết kế mồi đặc hiệu và chuyển thành chỉ thị SCAR với chiều dài 938 bp (A9-938). Cặp mồi đặc hiệu (Vvul-1F/Vvul-938R) khuếch đại một băng duy nhất ở tất cả các chủng *V. vulnificus* nhưng không xuất hiện ở các loài *Vibrio* khác. Đây là chỉ thị có độ đặc hiệu cao và có thể sử dụng để nhận diện *V. vulnificus* trong các mẫu hải sản.

**Từ khóa:** bệnh xuất huyết, cá, RAPD, SCAR, *Vibrio vulnificus*

## Development of a diagnostic SCAR marker for *Vibrio vulnificus* causing ulcerative disease in marine fishes in Thua Thien Hue

Hoang Tan Quang<sup>1</sup>, Pham Thi Diem Thi<sup>1</sup>, Tran Thuy Lan<sup>1</sup>, Pham Thi Hai Yen<sup>2</sup>,  
Tran Quang Khanh Van<sup>2</sup>, Nguyen Duy Quynh Tram<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Hue University, Road No. 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

<sup>2</sup> University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

\* Correspondence to Nguyen Duy Quynh Tram <ndqtram@hueuni.edu.vn>

(Received: 18 April 2020; Accepted: 28 May 2020)

**Abstract.** *Vibrio vulnificus* is widespread on cultured fish with the ulcerative disease in the Thua Thien Hue province, Vietnam, and it is a potential human pathogen that can cause primary septicemia, wound infection, and gastroenteritis in susceptible individuals. Thus, this study is conducted to develop a molecular marker generated from random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the rapid detection of *V. vulnificus*. Twenty random primers were tested by using the RAPD method to detect DNA polymorphisms among *Vibrio* species. The random primer OPA-09 generates a 1356-bp DNA fragment

specific for *V. vulnificus*. This sequence was designed for a specific primer, and it was transferred to a sequence-characterized amplified region (SCAR) marker with a length of 938 bp (A9-938). Specific primers (Vvul-1F/Vvul-938R) amplifies a unique DNA fragment in all isolates of *V. vulnificus* but not in other tested *Vibrio* species. This marker is highly specific and can be used to identify the presence of *V. vulnificus* in seafood.

**Keywords:** fish, RAPD, SCAR, *Vibrio vulnificus*, ulcerative disease

## 1 Đặt vấn đề

Nhóm vi khuẩn *Vibrio* được xác định là tác nhân gây bệnh phổ biến ở các loài cá biển trên thế giới và tỷ lệ cá chết trong một đợt dịch do *Vibrio* có thể trên 50%. Cá có dấu hiệu hôn mê; màu sắc cơ thể biến đổi và xuất hiện vùng hoại tử. Khi cá bị bệnh nặng, nội quan có thể xuất huyết hoặc bên trong chứa đầy dịch lỏng [1]. Trong các loài *Vibrio* gây bệnh trên cá, *Vibrio vulnificus* là loài khá phổ biến. Loài này gây bệnh trên cá chim vây vàng (*Trachinotus ovatus*) [2], cá bớp (*Rachyteron canadum*) [1]... Đây là vi khuẩn gram âm, hình que, là tác nhân gây bệnh trên người và là nguyên nhân gây tử vong liên quan đến hải sản trên toàn thế giới [3]. *V. vulnificus* là một mầm bệnh cơ hội ở người, có thể gây nhiễm trùng máu nguyên phát, nhiễm trùng vết thương và viêm dạ dày, ruột ở những người nhạy cảm [4].

Trước đây, việc định danh các loài *Vibrio* spp. được thực hiện thông qua các bước bao gồm phân lập trên môi trường thạch máu, tiếp theo là xét nghiệm sinh hóa và huyết thanh học. Tuy nhiên, ngày nay PCR là phương pháp nhanh chóng và linh hoạt để định danh *Vibrio* spp. [5, 6]. Đa hình các đoạn khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) là một kỹ thuật dựa trên PCR, đó là sự khuếch đại các đoạn DNA bằng các mồi ngẫu nhiên. Ưu điểm chính của RAPD là nhanh và dễ dàng thực hiện, không cần dữ liệu trình tự để thiết kế mồi, phân bố ngẫu nhiên trong hệ gen và là chỉ thị trội. Tuy nhiên, chỉ thị RAPD không phù hợp để định danh loài vì độ lặp lại thấp và không phải là chỉ thị đồng trội. Chỉ thị RAPD có thể được chuyển thành chỉ thị đồng trội là chỉ thị SCAR (sequence-characterized amplified region) để sử dụng trong xác định loài

[7]. Ví dụ, sử dụng chỉ thị SCAR để xác định các đối tượng gây bệnh trên vật nuôi như xác định được loài *Actinobacillus pleuropneumoniae* [8], *Pseudomonas syringae* [9], *Pseudofabreaa citricarpa* [10], *Bipolaris sorokiniana* [11]... Tuy nhiên, sử dụng chỉ thị SCAR để xác định các loài *Vibrio* chưa được công bố trước đây.

Tại Thừa Thiên Huế, sáu chủng *Vibrio vulnificus* đã được tìm thấy trên cá chẽm và cá hồng mỹ bị bệnh lở loét [12]. Do đó, nghiên cứu này nhằm phát triển một chỉ thị phân có thể chẩn đoán sự có mặt của *V. vulnificus* có trong các mẫu cá, cung cấp dữ liệu khoa học làm cơ sở cho việc nghiên cứu và sản xuất các kit chẩn đoán nhanh *Vibrio* trong tương lai.

## 2 Đối tượng và phương pháp

### 2.1 Các chủng *Vibrio*

Các chủng *Vibrio* được phân lập từ các loài cá nuôi trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế (Bảng 1). Đây là các chủng đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rDNA với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'). Đặc điểm của các chủng này đã được mô tả trong công bố trước đây [12].

### 2.2 Tách chiết DNA tổng số

Khuẩn lạc *Vibrio* được nuôi trong môi trường ASPW (alkaline saline peptone water) có 2% peptone và 2% NaCl, pH 8,6, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 18 giờ ở 30 °C. Sinh khối tế bào được thu bằng cách ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút ở 4 °C [13]. 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 được lưu trữ ở 4 °C. Nồng độ DNA tổng số được xác định bằng máy quang phổ ở bước sóng 260/280 nm. DNA khuôn mẫu được pha loãng đến nồng độ 50 ng/μL cho các phản ứng khuếch đại PCR.

### 2.3 Phân tích RAPD

Hỗn hợp DNA tổng số của mỗi loài được sử dụng làm khuôn mẫu để phân tích PCR-RAPD (Bảng 1). Hai mươi mốt RAPD (Operon Technologies, Hoa Kỳ) đã được thử nghiệm để phát hiện loài *Vibrio vulnificus* (Bảng 2). Các băng đặc hiệu cho loài *V. vulnificus* (không xuất hiện ở các loài *Vibrio* khác) được khẳng định bằng các thí nghiệm lặp lại và sau đó sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Phản ứng PCR-RAPD được thực hiện theo Quang và cs. [12].

### 2.4 Tạo dòng và phân tích trình tự

Các đoạn khuếch đại đặc hiệu của loài *V. vulnificus* đã được thu hồi và tinh chế từ agarose gel bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Lithuania). Sản phẩm DNA sạch được

tạo dòng vào vector pGEM-T Easy (Promega, Hoa Kỳ) và biến nạp vào tế bào *Escherichia coli* TOP10 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuẩn lạc dương tính được xác định bằng PCR với mồi M13; plasmid được phân lập và đoạn đặc hiệu được giải trình tự tại công ty Firstbase sử dụng mồi M13 (Malaysia).

### 2.5 Phát triển chỉ thị SCAR

Các cặp mồi SCAR đã được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của đoạn đặc hiệu (Bảng 3). Để xác định tính đặc hiệu của chỉ thị SCAR, các cặp mồi này được sử dụng để đánh giá dựa trên DNA tổng số của các mẫu nghiên cứu, bao gồm sáu chủng *V. vulnificus* và các loài *Vibrio* gây bệnh khác. Phản ứng PCR được thiết kế với tổng thể tích phản ứng là 12 μL, bao gồm 50 ng DNA khuôn mẫu, 10 pmol mồi mỗi loại, 6 μL 2× GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) và nước cất vô trùng. Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt MJ Mini™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) với quy trình như sau: 95 °C trong 5 phút; theo sau là 30 chu kỳ bao gồm 95 °C trong 1 phút, 60 °C trong 1 phút và 72 °C trong 1 phút; chu kỳ cuối cùng là 72 °C trong 10 phút.

**Bảng 1.** Danh sách mẫu DNA tổng số của các chủng *Vibrio* [12]

| Ký hiệu DNA tổng số | Loài                           | Số lượng chủng | Ký hiệu mẫu  |
|---------------------|--------------------------------|----------------|--|
| V1                  | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 13             | VT19, VT34, VT41, VT44, VT59, VT62, VX01, K5, VT56, VC85, VC59, VC39, VC41 |
| V2                  | <i>Vibrio shilonii</i>         | 5              | VT23, VT26, VT27, VT29, VT33   |
| V3                  | <i>Vibrio vulnificus</i>       | 6              | VC15, VC17, VC21, VC28, VC37, VC67   |
| V4                  | <i>Vibrio harveyi</i>          | 3              | VC24, VC25, VC45   |
| V5                  | <i>Vibrio cholera</i>          | 3              | VC43, VC53, VC61   |
| V6                  | <i>Vibrio communis</i>         | 1              | VT47   |
| V7                  | <i>Vibrio furnissii</i>        | 1              | VT65   |
| V8                  | <i>Vibrio brasiliensis</i>     | 1              | VC52   |

**Bảng 2.** Trình tự các môi sử dụng cho loài *Vibrio vulnificus*

| Môi         | Trình tự nucleotide (5'-3') | Số lượng băng đặc hiệu | Độ sáng của các băng đặc hiệu |
|-------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| OPA-01      | CAGGCCCTTC                  | 3                      | Mờ                            |
| OPA-02      | TGCCGAGCTG                  | 1                      | Trung bình                    |
| OPA-03      | AGTCAGCCAC                  | 2                      | Mờ                            |
| OPA-09      | GGGTAACGCC                  | 2                      | Sáng và trung bình            |
| OPA-11      | CAATCGCCGT                  | 0                      | -                             |
| OPB-01      | GTTTCGCTCC                  | 0                      | -                             |
| OPB-04      | GGACTGGAGT                  | 0                      | -                             |
| OPB-18      | CCACAGCAGT                  | 1                      | Trung bình                    |
| OPC-13      | AAGCCTCGTC                  | 0                      | -                             |
| OPD-02      | GGACCCAACC                  | 0                      | -                             |
| OPD-07      | TTGGCACGGG                  | 0                      | -                             |
| OPD-11      | AGCGCCATTG                  | 0                      | -                             |
| OPF-04      | GGTGATCAGG                  | 1                      | Trung bình                    |
| OPF-08      | GGGATATCGG                  | 0                      | -                             |
| OPG-06      | GTGCCTAACC                  | 0                      | -                             |
| OPG-10      | AGGGCCGTCT                  | 0                      | -                             |
| OPG-17      | ACGACCGACA                  | 0                      | -                             |
| OPK-13      | GGTTGTACCC                  | 0                      | -                             |
| OPN-03      | GGTACTCCCC                  | 1                      | Trung bình                    |
| OPN-06      | GAGACGCACA                  | 0                      | -                             |
| <b>Tổng</b> |                             | <b>11</b>              |                               |

**Bảng 3.** Trình tự của các môi trong phát triển chỉ thị SCAR

| Môi   | Tên môi    | Trình tự nucleotide (5'-3') | Tm | Chiều dài (bp) |
|-------|------------|-----------------------------|----|----------------|
| Xuôi  | Vvul-1F    | GGGTAACGCCTATTCAAACAG       | 63 | 21             |
|       | Vvul-101F  | CGCTCTCCAACCAACCG           | 67 | 18             |
|       | Vvul-350F  | AAGCCGGGTGTGGCAATTA         | 68 | 19             |
|       | Vvul-549F  | TCACCGAACTGCTTTACAAAC       | 63 | 21             |
| Ngược | Vvul-368R  | TAATTGCCACACCCGGCTT         | 68 | 19             |
|       | Vvul-938R  | ATAACTGAATACGCTCAGTC        | 59 | 20             |
|       | Vvul-1356R | GGGTAACGCCACATACGAATG       | 66 | 21             |

### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Phân tích RAPD

Để làm giảm số lượng mẫu cần phân tích RAPD, chúng tôi sử dụng các mẫu DNA tổng

số thay cho các mẫu riêng lẻ để tìm kiếm các băng DNA đặc hiệu (băng chỉ xuất hiện ở mẫu quan tâm mà không xuất hiện ở các mẫu khác). DNA tổng số là hỗn hợp DNA của tất cả các chủng trong cùng một loài với tỷ lệ trộn bằng nhau. Trong nghiên

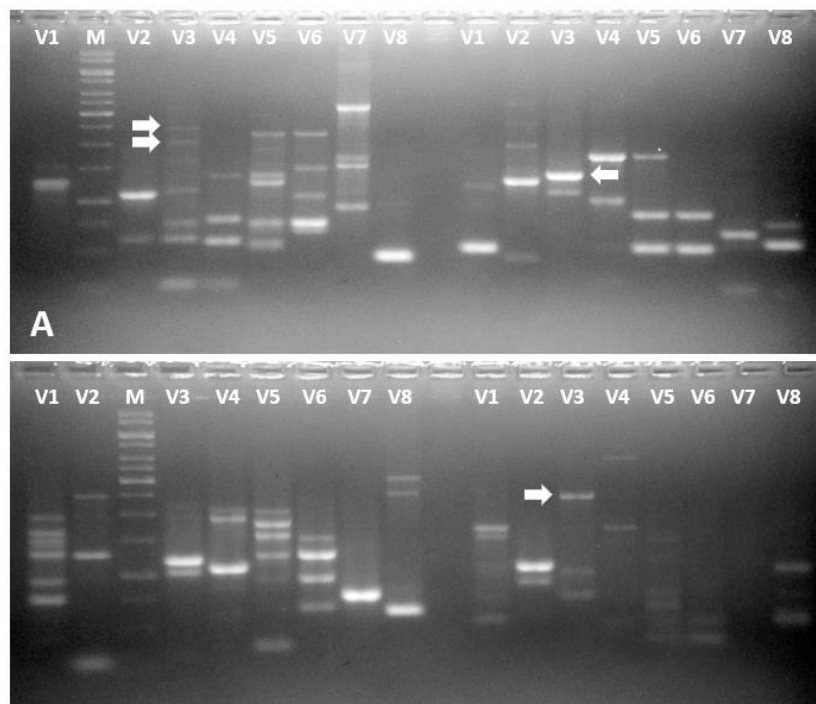
cứu này, chúng tôi có tám mẫu DNA tổng số cho tám loài là *V. parahaemolyticus*, *V. shilonii*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. cholera*, *V. communis*, *V. furnissii* và *V. brasiliensis* (Bảng 1).

Từ 20 môi RAPD sử dụng ban đầu, chúng tôi thu được 66 băng khuếch đại từ loài *Vibrio vulnificus* (0–10 DNA band/môi); phần lớn trong chúng là băng đa hình giữa các loài (Hình 1). Trong đó, có 11 băng đặc hiệu cho loài *V. vulnificus* thu được từ 7 môi ngẫu nhiên (Bảng 2). Tuy nhiên, trong 11 băng đặc hiệu thu được có rất ít băng có tín hiệu khuếch đại mạnh (băng sáng) và kích thước nhỏ. Phần lớn các băng thu được đều có tín hiệu khuếch đại vừa phải và kích thước khá lớn (hơn 2.000 bp) và không phù hợp để làm chỉ thị. Trong đó, chúng tôi chỉ chọn được một băng khuếch đại có kích thước khoảng 1.400 bp (ký hiệu là A09-1400 dựa theo tên môi và kích thước băng) để phát triển thành chỉ thị SCAR. Đây là đoạn có kích thước tương đối lớn, nhưng băng khuếch đại mạnh và có độ đặc hiệu cao. Các băng đặc hiệu có kích thước nhỏ hơn thường không phải là băng

được khuếch đại mạnh (Bảng 2).

### 3.2 Phát triển chỉ thị SCAR

Băng A09-1400 được lựa chọn để phát triển thành chỉ thị SCAR, sau đó được tạo dòng và phân tích trình tự. Trình tự nucleotide thu được có chiều dài 1356 bp; tỷ lệ GC là 42,70%. Kết quả so sánh trình tự thu được với các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen cho thấy chúng có sự tương đồng 98,73% với chủng *V. vulnificus* FORC\_016, trong đó có toàn bộ gen mã hóa enzyme cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (EC:2.1.1.79, mã số protein ANH62955). So với các loài *Vibrio* khác, trình tự này chỉ tương đồng khoảng hơn 70%; chẳng hạn, tương đồng 70,97% với loài *V. parahaemolyticus* FORC\_071, 70,64% với loài *V. alginolyticus* K09K1, 70,50% với loài *V. neocaledonicus* CGJ02-2, 70,62% với loài *V. diabolicus* LMG 3418, 70,55% với loài *V. harveyi* WXL538, 69,43% với loài *V. natrigens* NBRC 15636, và 72,57% với loài *V. azureus* LC2-005 (Hình 2, chỉ trình bày những đoạn có khác biệt lớn được sử dụng để thiết kế môi đặc hiệu).



**Hình 1.** Các băng đặc hiệu cho loài *V. vulnificus* thông qua khuếch đại hỗn hợp DNA với các môi ngẫu nhiên. Mũi tên chỉ các băng đặc hiệu; M: DNA molecular size marker (GeneRuler™ DNA 1 kb ladder, Thermo Fisher Scientific). A: môi OPA-03 và OPA-09; B: môi OPG-17 và OPN-03.

Từ những kết quả này, chúng tôi thiết kế các cặp mồi đặc hiệu dựa trên so sánh trình tự của chúng tôi với các chủng thu được ở trên. Các cặp mồi được thiết kế để thu được các đoạn đặc hiệu có kích thước khác nhau (Bảng 3). Các mồi này được sử dụng để khuếch đại DNA tổng số của sáu

chủng *V. vulnificus* và các chủng hiện có khác như *V. parahaemoliticus*, *V. harveyi*, *V. cholerae*... Mục tiêu là chọn ra được các đoạn đặc hiệu có kích thước vừa phải thỏa mãn điều kiện xuất hiện ở cả sáu chủng *V. vulnificus* mà không xuất hiện ở các chủng khác.

|          |     |   |     |
|----------|-----|---|-----|
| CP017919 | 1   | ACCTCTGCTCGATTAAAAACGTAAGTGCCATTTCGTTCA-GCGTCTTGGCGTAGTCCAAACC                | 60  |
| CP014134 |     | TCTTCAGCTTGATTAAATCTAGAGTGCCACTCGCTCA-AGGTTTTTCGCATAGTCCAGACC                 |     |
| CP045070 |     | -----ATTGATTAAAGCGGTGGTGCCATTTCGTTAA-GCGTCTTGGCGTAATCCAACCC                   |     |
| CP009977 |     | TCCTCAGCTTGATTAAACCGGCGATGCCATTTCATTGA-GTGTCTTTCGCATAATCGAGGCC                |     |
| CP018616 |     | CTTTGTGCCTGATTAAAAACGCTGATGCCACTCATTAA-GTGTCTTGGCATAATCCAACCC                 |     |
| CP023485 |     | TCGGAACACCAATTCAAACAGTAAAAGTGATGGTTGGAATCTACTGGCATGCGTTGAGGT                  |     |
| CP032213 |     | TCGTTACACCAATACAAACGGTAAAAGTAATGGTTGGTATTTATTGGCACGCATTAACAAAC                |     |
| Vvul     |     | <b><u>GGGTAACGCCTATTCAAACAG</u></b> TAAAAGTGTGGTAGGGATTTACTGGCATGCGTTCAAAC    |     |
|          |     | <b>Vvul-1F</b> → ** * * * * * * * *   |     |
| CP017919 | 61  | AATATCGAACAAAGTCTCGCGTCACTAAGTCACTGTATTTTGTGTGGCTTGGGTTAGTGA                  | 120 |
| CP014134 |     | AATATCAAATAAGTCTCTCACCACCAAGTCACTGTATTTGGTCGCAGCTTGAGTTAAAGA                  |     |
| CP045070 |     | AATATCAAACAAGTCTCGCGTCACTAAGTCACTGTATTTAGTTGTGCTTGGGTGAGTGA                   |     |
| CP009977 |     | GATATCGAACAGGTCTCGAACAAACAAGATCACTGTACTTTGTTCGCCGCTTGAGTCAGAGA                |     |
| CP018616 |     | AATATCAAACAGGTCTCTAACACAAAGTCACTGTACTTTGGTCGTCGCCTGAGTTAATGC                  |     |
| CP023485 |     | TATGGATTAAAGGTGCGCCGTTTTTATTTCCACCCTAAATATTGACGACCAATGAACGTC                  |     |
| CP032213 |     | TTTGGGTGAAAGGCGCACCTTTTTTATTTCTCATCTAAATATTGACGACCAATGAAGAAATAG               |     |
| Vvul     |     | TGTGGAAAAAAGGTGCACATTTTACTCGCATCCCAAATAC <b><u>-CGCTCTCCAACCAAC-C</u></b>     |     |
|          |     | * * * * * ** * <b>Vvul-101F</b> → *   |     |
| CP017919 | 121 | GGTTACCGACGGTAAAAAACCCCGGAAAAATGTACTTTTGGATAAAAGTCGACGTTGTT                   | 180 |
| CP014134 |     | TGTAACCGAAGGTAAGAACCACCTGGAAAGATGTATTTCTGAATAAAAGTCAACGTTGTT                  |     |
| CP045070 |     | CGTTACCGAAGGTAAAAAGCCGCGGGAAAAATGTACTTCTGAATGAAGTCGACATTGTT                   |     |
| CP009977 |     | AGTCACTGAAGGTAAAAATCCACCTGGAAATATGTACTTTTGAATAAAAATCGACGTTATT                 |     |
| CP018616 |     | GGTAATAGAAGGTAGGAAAACCACCTGGGAAAAATATATTTTGAATAAAAATCAACACTATT                |     |
| CP023485 |     | AA--GCCTCTAGCGACAAATAAGATAAGAAAA---AT-----AATAAGCACAAGGAGAAT                  |     |
| CP032213 |     | AA--GCCGATATTGAAAAACAGACAAAAAAA---AT-----AAAAAGCACAAGGAGAAT                   |     |
| Vvul     |     | <b><u>GG--ACT</u></b> GAGAGTAACAACCTAAACTGTGAAGA---AT-----AATAAAGTTAGGAGAGAAT |     |
|          |     | ** ** * * * * *   |     |
| CP017919 | 361 | TTTGAGTAGCGTGATTTTGTCTTCTAAGCCACGCTCTTTGATTTTTTGTCCGCGTACGC                   | 420 |
| CP014134 |     | TTTTAATAGAGTGATCTTGTTCGCCAAATTTTCGCTCTCTAATTTTTTGTTCAGCGTAAGC                 |     |
| CP045070 |     | TTTGAGCAAGGTAATTTTGTTCGGTCAAACCACGCTCATTTATCTTCTGTTCTGCGTAGGC                 |     |
| CP009977 |     | TTTAAGCAAGGTGATTTTATCCGACAAGCCTTTCTCTTCAATCTGTTGCTTGGCGTAGGC                  |     |
| CP018616 |     | TTTAAGCAACGTAATCTGATCCATTAAACCTCTTTGTTGATCAGTCTTCCGGTATAAAG                   |     |
| CP023485 |     | TTACTGCGCCAAACGGAGAATACAGTGCCAACCTGTCGTTGCGACCATTGAGGTTAAGC                   |     |
| CP032213 |     | TTAGTGCGCCAAATGGGAGTACAGTGGTCAACCTGTTGTCGCTACTATAGAGGTTAAAC                   |     |
| Vvul     |     | TTGTAGGGTCCACAATCAC <b><u>AAGCCGGGTGTGGCAATTA</u></b> CGGCAACAATAGAAGTCAAAC   |     |
|          |     | ** <b>Vvul-350F</b> → ← <b>Vvul-368R</b> *                                    |     |
| CP017919 | 541 | TCAAGTTGCTGACATAGACGATCCATTTTGTGATTGAGCCTGCTCTAGAGAGTCATCC                    | 600 |
| CP014134 |     | TCAAGTTGCTGGCACAAACGATCCATTTTGTGATTGCGCTTGTCCAAAGTATCGTTG                     |     |
| CP045070 |     | TCAAGTTGTTGACACAGGCGTTCATCTTATTGATTGCGCCTGCTCTAATGAGTCATCC                    |     |
| CP009977 |     | TCGATCTGTTGGCAAAGACGATCCATTTTATTGATTGCGCCTGCTCTAGTGACTCACTA                   |     |
| CP018616 |     | GCCAATTGTTGACATAGCCGCTCCATTTTATTGATTGAGCCTGTTCTAAGCTATCACTG                   |     |
| CP023485 |     | ATGCGGGCCCTTGATAAGCTTGAGGAGCAGGGTAGTTG-GCTTACCAAGTTACTTTATAA                  |     |

|          |      |  |
|----------|------|--|
| CP032213 |      | ATGCGTGCTTTAGATAAACTCGAAGAGCAAGGCAGTTG-GTTGACTAAAATACTGTACAA                 |
| Vvul     |      | CTGAATGCATTAGATGGATTAGAAAACCAAAGTAGCTG-GG <b><u>TCACCGAAGTCTTTACAA</u></b>   |
|          |      | * * * * *  |
|          |      | * * * * * <b>Vvul-549F</b> →   |
| CP017919 | 601  | GCATGATTGTAAAGCGCCGACGAATACAGCATATTGATATCAAGGAACGCTTCGTATAGG                 |
| CP014134 |      | TCTTGACATATAAAGGCCGATGAGTACAGCATGTTGTCGTCTAAAATGACTCGTACAAA                  |
| CP045070 |      | ACTTGGTTGTACAGGGCCGACGAGTACAGCATATTTCGTATCAAGAAATGCTTCATACAAA                |
| CP009977 |      | CCTTGCGGATAAAAGCGCAGATGAATAGAGCATATTACTGTCTAGAAATGACTCATAACAGC               |
| CP018616 |      | TCTTGAAGGTATAAAGCCGAGGAGTAGAGCATTCTTTCATCAAGAAACGCTCATAAAGC                  |
| CP023485 |      | GTTTAGCCATTGGACGAATCGAAACTCGCAAGAAAACCTCTCGGAAGAACATCCATGCTCA                |
| CP032213 |      | GTTTCAGTCATTGGTCAAAACAGAACTCTGAAGAGAACTCACGTAAAAATATCCATGCGCA                |
| Vvul     |      | <b><u>ACTCAGTCATTGGAGCAATCGAAATACGCAGGAAAACCTCGCGTAAAAATATTCATGCCCA</u></b>  |
|          |      | * * * * *  |
| CP017919 | 901  | GCCCTGCAAGATCCGTGAATAAAAGCCTGGATGTTTTACCTCTATAGTAGCGACAACAGG                 |
| CP014134 |      | ACCTTGCAAGATTCGCGAGTAAAAGCCAGGATGCTTTACCTCAATCGTCGCCACAACAGG                 |
| CP045070 |      | GCCCTGTAGAATTCGGGAGTAGAACCCCGGATGCTTAACTTCAATAGTTGCAGCAACGGG                 |
| CP009977 |      | ACCTCGTAAAATACGTGAGTACAAACCCGGATGTTTACCTCGATGGTCGCCGACACAGG                  |
| CP018616 |      | ACCTTGTAATAAATCCGCGAGTAAAATCCAGGGTGCCTGACCTCAATTTGTCGTGCAGCAAG               |
| CP023485 |      | ATTTTCGGAAGAGCAGTATGAGTATGCTCGACAGCAAATCGTACAACGAGGTTTAGCCGAT                |
| CP032213 |      | ATATCTGAAGAGCAACACGCGTACGCGGAGCAAAAATCATAGAGCGTGGCTTAGAAGAC                  |
| Vvul     |      | ATTTTCAGATGAGCAATATGACTACGCAAAACAACAGATTGCAGAAAGAGGTTT <b><u>GACTGAG</u></b> |
|          |      | * * * * *  |
| CP017919 | 961  | TTGACCACTGTACTCCCCATTTGGCGCACTAAAACGCTCGCTTCGCTCTGTCTGTTCCGT                 |
| CP014134 |      | CTGACCGCTGTATTACCGTTGGGCGCATTAAAGCGCTCGCTTCTTTCTTTCTGTTCCGT                  |
| CP045070 |      | TTCTCCGTTATGCTCACCATTGGGCGTCGAAAAACGCTCGCTACGCTCAGTCGTTTCTGT                 |
| CP009977 |      | CTCCTCGGATACATACCAGCCGGTGTGTAATCGTTTCGCTTCTTTCTGCTCCGCCGGA                   |
| CP018616 |      | GACACCATTGTGTTCAAGCATCTGGGTTGCGAATCGTTCACTCCGCTCTGTCTGCTGCCTGT               |
| CP023485 |      | CGAATTACTTTACTTAAAGAAGACTACCGTAATCTTACTGGGACGTACGATAAATTTGGTT                |
| CP032213 |      | AAAATCACTCTACTCAAAGAAGATTACCGAAACCTAACCGGAACCTTATGACAAGCTCGTT                |
| Vvul     |      | <b><u>CGTATTCAGTTAT</u></b> TGAAGAAAGATTATCGAGATTTAACTGGGCAGTTTGATAAATTTGGTT |
|          |      | * * * * *  |
|          |      | ← <b>Vvul-938R</b> * * * * *   |
| CP017919 | 1380 | TGCGTGCCAATAAATACCAACCATTACTTTTACCGTTTGTATTGGTGTA 1430                       |
| CP014134 |      | TGCGTGCCAATAAATACCAACCATTACTTTTACCGTCTGTATTGGCGTAA                           |
| CP045070 |      | TGCGTGCCAATAAATACCAACCATTACTTTTACCGTTTGAATCGGCGTAA                           |
| CP009977 |      | TGCGTGCCAGTAAATGCCAAACACCACTTTGACTGTTTGTATCGGTGTGA                           |
| CP018616 |      | TGCATGCCAATAGATACCAACCATCACTTTTACCGTTTGAATAGGAGTTA                           |
| CP023485 |      | GTACGAGGGTTTGGGTACGATGACCGGTTTGTCCGCATGTGGCGTTA---                           |
| CP032213 |      | GTGCGCTCGTTTGGCTACGACGACCGCTTTGTGCGTATGTGGCGCTACTA                           |
| Vvul     |      | GTA AAAAGACTAGGGTATGACGAGCGATT <b><u>CATTTCGTATGTGGCGTTACCC</u></b>          |
|          |      | * * * * *  |
|          |      | ← <b>Vvul-1356R</b>  |

**Hình 2.** So sánh trình tự nucleotide của đoạn A9-1400 với các trình tự khác trên ngân hàng gen (các vùng thiết kế mồi)

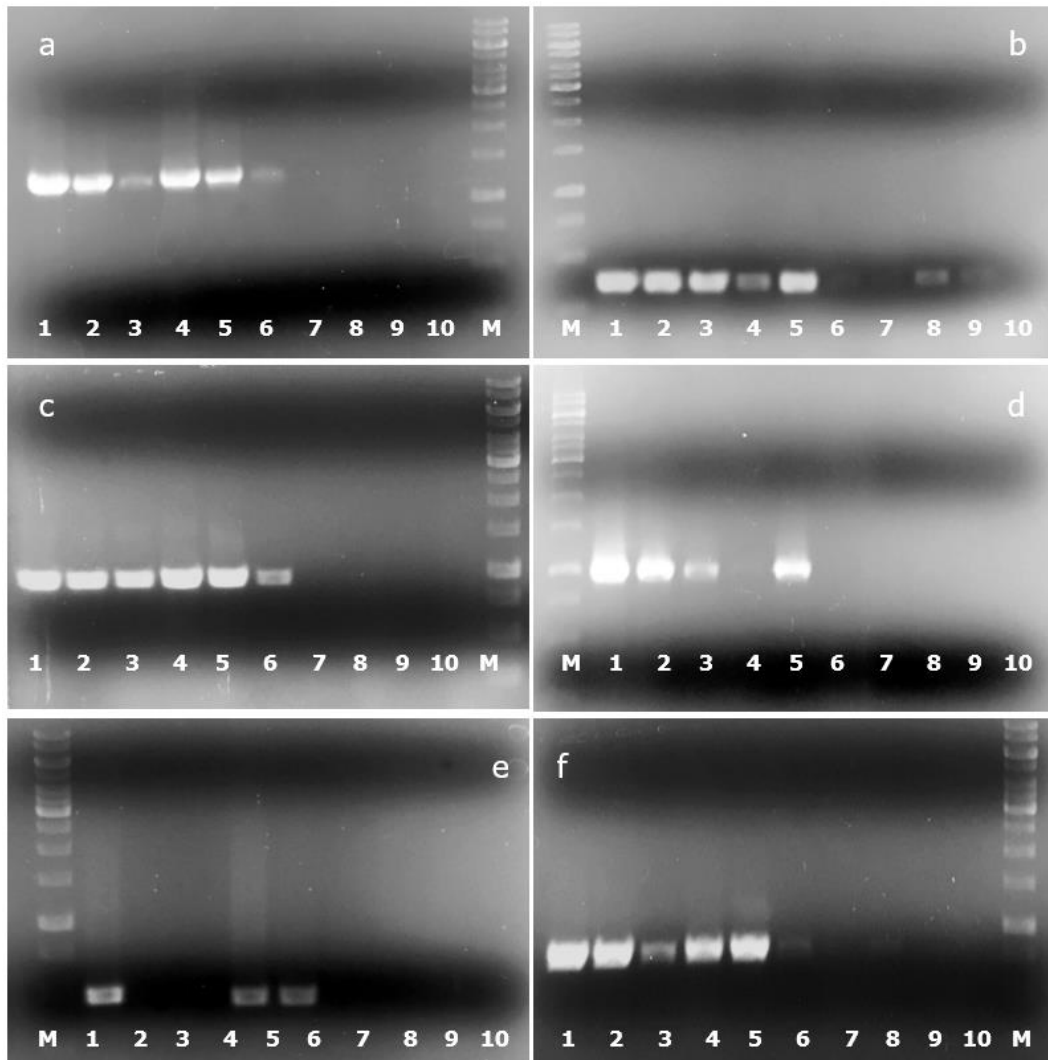
CP023485: *V. parahaemolyticus* FORC\_071; CP017919: *V. alginolyticus* K09K1; CP032213: *V. neocaledonicus* CGJ02-2; CP014134: *V. diabolicus* LMG 3418; CP045070: *V. harveyi* WXL538; CP009977: *V. natriegens* NBRC\_15636; CP018616: *V. azureus* LC2-005. Phần gạch chân là trình tự các mồi; tên mồi được thể hiện ngay bên dưới trình tự mồi.

Từ Bảng 3, chúng tôi có tổng cộng tám tổ hợp PCR để tuyển chọn chi thị SCAR cho loài *V. vulnificus*. Trong tám cặp mồi, chỉ có hai cặp mồi là Vvul-1F/Vvul-1356R (Hình 3a) và Vvul-1F/Vvul-938R (Hình 3c) là có sản phẩm khuếch đại ở cả sáu

mẫu *V. vulnificus* và không có sản phẩm khuếch đại ở các mẫu đại diện khác; đây là các cặp mồi có thể sử dụng để làm chi thị SCAR. Trong hai cặp mồi này, chúng tôi ưu tiên sử dụng cặp mồi Vvul-1F/Vvul-938R do có băng khuếch đại mạnh hơn và

kích thước ngắn hơn. Tất cả các cặp mồi còn lại đều không đạt tiêu chí làm chỉ thị cho loài *V. vulnificus*. Các cặp mồi này có sản phẩm khuếch đại tương tự ở loài *Vibrio* khác (ví dụ cặp mồi Vvul-1F/Vvul-368R, Hình 3b) hoặc không có sản phẩm khuếch đại trên cả sáu chủng *V. vulnificus* (đối với các cặp mồi còn lại, số liệu không được trình bày chi tiết). Sau đó, cặp mồi được kiểm tra trên tất cả các loài *Vibrio* hiện có. Kết quả cho thấy bằng đặc hiệu chỉ xuất hiện trên các mẫu thuộc loài *V. Vulnificus* mà không xuất hiện ở các loài *Vibrio* khác (Hình 4).

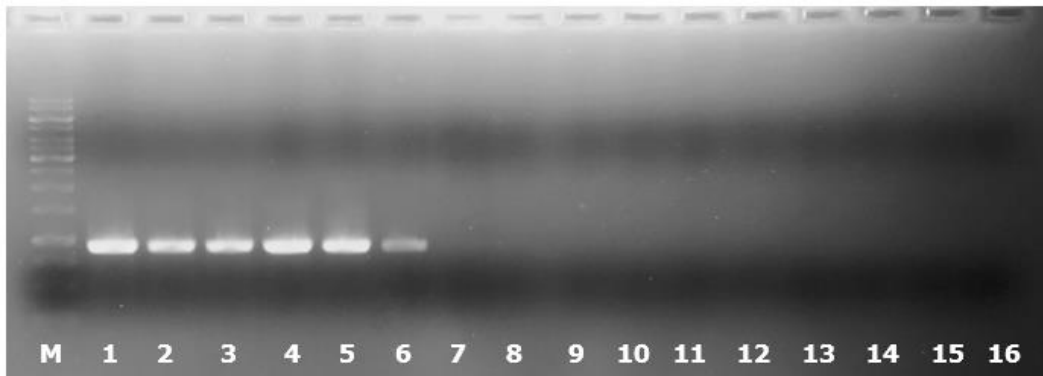
Hiện nay, các phương pháp định danh phân tử cho các loài *Vibrio* spp. đã được công bố, bao gồm xét nghiệm khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (loop-mediated isothermal amplification-LAMP) cho *V. parahaemolyticus* [14], multiplex PCR cho *Vibrio* spp. [15] hay *V. vulnificus* [16]... PCR các gen đặc hiệu cho *Vibrio* spp. cũng đã được công bố [17]... Tuy nhiên, chỉ thị SCAR cho các loài *Vibrio* spp. chưa được công bố ngoại trừ các nghiên cứu của nhóm chúng tôi.



**Hình 3.** Phản ứng PCR với các cặp mồi cho loài *V. Vulnificus*

a. Vvul-1F/Vvul-1356R; b. Vvul-1F/Vvul-368R; c. Vvul-1F/Vvul-938R; d. Vvul-350F/Vvul-1356R; e. Vvul-549F/Vvul-938R; f. Vvul-549F/Vvul-1356R; M: DNA molecular size marker (GeneRuler™ DNA 1 kb ladder, Thermo Fisher Scientific). 1. *V. vulnificus* VC15; 2. *V. vulnificus* VC17; 3. *V. vulnificus* VC21; 4. *V. vulnificus* VC28; 5. *V. vulnificus* VC37; 6. *V. vulnificus* VC67; 7. *V. parahaemolyticus*; 8. *V. harveyi*; 9. *V. cholerae*; 10. Đối chứng (-).





**Hình 4.** Phản ứng PCR với cặp mồi Vvul-1F/Vvul-938R. M: DNA molecular size marker (GeneRuler™ DNA 1 kb ladder, Thermo Fisher Scientific)

1. *V. vulnificus* VC15, 2. *V. vulnificus* VC17, 3. *V. vulnificus* VC21, 4. *V. vulnificus* VC28, 5. *V. vulnificus* VC37, 6. *V. vulnificus* VC67, 7. *V. cholerae*, 8. *V. harveyi*, 9. *V. brasiliensis*, 10. *V. paraheamolyticus*, 11. *V. shilonii*, 12. *V. communis*, 13. *V. furnissii*, 14. *V. fluviialis*, 15. *V. natriegens*, 16. Đối chứng (-).

Trong nghiên cứu này, chỉ thị SCAR để phát hiện *V. vulnificus* một cách nhanh chóng và đặc hiệu cao đã được phát triển và được đặt tên là A9-938. Có thể áp dụng các mồi SCAR đã được thiết kế để phát hiện trực tiếp các chủng *V. vulnificus* có trong mẫu. Độ đặc hiệu của nó được xác nhận bằng PCR với tám loài *Vibrio* khác nhau và chỉ thị A9-938 chỉ xuất hiện duy nhất ở loài *V. vulnificus* mà không xuất hiện ở các loài khác. Chỉ thị này sẽ giúp việc xác định sự có mặt của các chủng *V. vulnificus* nhanh chóng và chính xác hơn phương pháp vi sinh cổ điển. So với phương pháp định danh bằng phân tích trích tự gen 16S rDNA với vùng bảo tồn của gen hemolysin hoặc cytolysin, phương pháp dùng chỉ thị SCAR có thời gian tiến hành ngắn hơn và giá thành thấp hơn do không phải phân tích trình tự gen. Chỉ thị này cũng có thể được sử dụng trong cả nghiên cứu dịch tễ lẫn phát triển các chương trình nuôi trồng thủy sản sau này.

#### 4 Kết luận

Kết quả của nghiên cứu cho thấy mức độ đa hình cao khi phân tích RAPD các loài *Vibrio* khác nhau và một chỉ thị SCAR (A9-938) đã được phát triển dựa trên trình tự đặc hiệu 1356 bp cho loài *V. vulnificus*. Cặp mồi đặc hiệu (Vvul-1F/Vvul-938R) khuếch đại một đoạn DNA duy nhất trong tất cả

các chủng *V. vulnificus* mà không xuất hiện ở các loài *Vibrio* khác.

#### Thông tin tài trợ

Công trình được thực hiện với sự tài trợ của Bộ Giáo dục và Đào tạo (Việt Nam) năm 2018–2020 (Đề tài mã số CT-2018-DHH-01 và CT-2018-DHH-02).

#### Tài liệu tham khảo

1. An NTT, Hải TN, Dung TT. Phân lập vi khuẩn *Vibrio* trên cá bớp (*Rachycentron canadum*) bị lở loét. Báo cáo tại: Hội nghị khoa học trẻ thủy sản toàn quốc lần thứ IV; 2013; Hồ Chí Minh.
2. Li G, Zhao D, Huang L, Sun J, Gao D, Wang H, et al. Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture. *Aquaculture*. 2006;261(1):17-25.
3. Heng SP, Letchumanan V, Deng CY, Ab Mutalib NS, Khan TM, Chuah LH, et al. *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:997-.
4. Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*. 2000;2(2):177-88.
5. Ramazan-zadeh R, Rouhi S, Shakib P, Shahbazi B, Bidarpour F, Karimi M. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* Isolated from clinical samples in Kurdistan province, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(5):e18119-e.

6. Khanh NV, Linh NQ, Lan TT, Nhân LTT, Vân TQK, Co NTK, et al. Phân lập và sàng lọc các chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế bằng chi thị phân tử 16S rRNA. Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên. 2019;128(1E):47-58.
7. Sairkar PK, Sharma A, Shukla NP. SCAR marker for identification and discrimination of *Commiphora wightii* and *C. myrrha*. Mol Biol Int. 2016;2016:1-10.
8. Rossi CC, Pereira MF, Langford PR, Bazzolli DMS. A BOX-SCAR fragment for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. FEMS Microbiology Letters. 2014;352(1):32-7.
9. Kałużna M, Albuquerque P, Tavares F, Sobiczewski P, Puławska J. Development of SCAR markers for rapid and specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* races 1 and 2, using conventional and real-time PCR. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(8):3693-711.
10. Yang Y, Hu J, Chen F, Ding D, Zhou C. Development of a SCAR marker-based diagnostic method for the detection of the *Citrus* target spot pathogen *Pseudofabreaa citricarpa*. BioMed Research International. 2018;2018:1-5.
11. Aggarwal R, Gupta S, Banerjee S, Singh V. Development of a SCAR marker for detection of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of wheat. Canadian journal of microbiology. 2011;57:934-42.
12. Quang HT, Lan TT, Hai TTH, Yen PTH, Van TQK, Tung HT, et al. Genetic diversity and toxic genes analysis of *Vibrio* spp. isolated from white leg shrimp and marine fishes cultured in Tam Giang lagoon in Thua Thien Hue province, Vietnam. Indian Journal of Science & Technology. 2020;13(13):1412-22.
13. Quảng HT, Lan TT, Thi PTD, Nhân LTT, Ngọc LMT, Trâm NDQ, et al. Xác định sự hiện diện của các gen độc tố ở các chủng *Vibrio* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm tại Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học, Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên. 2020;129(1A):115-123.
14. Anupama KP, Chakraborty A, Karunasagar I, Maiti B. Loop-mediated isothermal amplification assay as a point-of-care diagnostic tool for *Vibrio parahaemolyticus*: recent developments and improvements. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2019;19(3):229-39.
15. Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, Kim ES, Kim HY. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. BMC Microbiology. 2015;15(1):239-50.
16. Tsai YH, Chen PH, Yu PA, Chen CL, Kuo LT, Huang KC. A multiplex PCR assay for detection of *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus agalactiae* from the isolates of patients with necrotizing fasciitis. International Journal of Infectious Diseases. 2019;81:73-80.
17. Alramahy SK. Molecular diagnostics for *Vibrio cholera* based on *recA* gene isolated from human in Diwanayah city. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2018;10:1125-7.