

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP DNA VÒM TY THỂ (MITO-OVLAMP) XÁC ĐỊNH GEN ĐÍCH *NAD1* PHÁT HIỆN SÁN LÁ GAN NHỎ GÂY UNG THƯ Ở NGƯỜI *OPISTHORCHIS VIVERRINI* POIRIER, 1886

Lê Thanh Hòa¹, Nguyễn Thị Bích Nga¹,
Đỗ Thị Roan¹ và Nguyễn Văn Đề²

TÓM TẮT

Phương pháp DNA vòm ty thể (mitochondrial loop-mediated isothermal amplification, mito-LAMP) đối với sán lá gan nhỏ *Opisthorchis viverrini* (mito-OvLAMP), được xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự gen *nad1* của 24 chủng, 6 chủng của Việt Nam (các tỉnh: Bình Định, Phú Yên, Đắc Lắc, Quảng Nam, Huế), 13 chủng của Thái Lan (Khon Kaen, Bangkok và 5 địa danh khác), 5 chủng của Lào (Vientiane, Savannakhet) và một số chủng ngoại loài, nhằm có kit chẩn đoán đơn giản, dễ làm, nhanh và nhạy. Bốn chuỗi mồi LAMP đặc hiệu *nad1*, gồm F3, FIP(F1c+F2), BIP(B1c+B2) và B3, bám vào 6 vùng gen của khuôn DNA, sản phẩm mito-OvLAMP phát hiện bằng điện di trên thạch agarose; quan sát độ đục kết tủa (muối Mg-pyrophosphate) của sản phẩm trước và sau khi cho chất phát quang SYBER Green I bằng mắt thường; và dưới tia cực tím. Kết quả cho thấy, phản ứng mito-OvLAMP hoàn toàn chính xác; có thời gian thực hiện nhanh (ở 63°C trong 1 giờ); có tính đặc hiệu rất cao (chỉ phát hiện *O. viverrini*). Sau khi phát triển thành Kit, mito-OvLAMP có khả năng sử dụng để phát hiện *O. viverrini* với thao tác dễ làm, giá thành rẻ, linh hoạt và chính xác.

Từ khóa: DNA vòm; *nad1*; LAMP; mito-OvLAMP; *Opisthorchis viverrini*; metacercariae; độ nhạy; độ đặc hiệu.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF MITO-LAMP TARGETING *NAD1* FOR DETECTION OF THE SMALL LIVER FLUKE (*OPISTHORCHIS VIVERRINI* POIRIER, 1886)

Mitochondrial loop-mediated isothermal

amplification, MITO-LAMP for rapid detection of the common helminths, based on alignment of *nad1* of 24 strains, was developed. Consensus *nad1* sequence was inferred from 6 Vietnamese (Binh Dinh, Phu Yen, Dac Lac, Quang Nam, Hue), 13 Thai, 5 Laotian strains of *Opisthorchis viverrini* and other heterologous strains (*O. felineus*; *Clonorchis sinensis*; *Fasciola hepatica*; *F. gigantica*; *Haplorchis pumilio*; *H. taichui*), and used for design of a set of LAMP-promers *nad1*-specific for *O. viverrini*, including F3, FIP(F1c+F2), BIP(B1c+B2) and B3, binding to six regions of DNA template to form DNA-loop products (namely as mito-OvLAMP). The mito-OvLAMP products were visualized by eletrophoresis for detection of bands on agarose 2%; for turbidity of by-product Mg-pyrophosphate before adding SYBER Green I by sunlight; and after adding SYBER Green I under UV light. The products by LAMP with different genomic DNA template (homologous: *O. viverrini*; and heterologous: other trematode species) indicated that it is highly accurate, rapid (at 63°C in 1 hour); and highly specific (could only be performed with DNA template extracted from *O. viverrini*). Developed as a diagnostic kit, mito-OvLAMP can be used for rapid, early, sensitive and specific detection of *O. viverrini* with easy performance, cost-effectiveness, flexibility and accuracy.

Keywords: loop-DNA; *nad1*; LAMP; mito-OvLAMP; *Opisthorchis viverrini*; metacercariae; specificity; sensitivity.

¹Viện Công nghệ sinh học; ²Trường Đại học Y Hà Nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

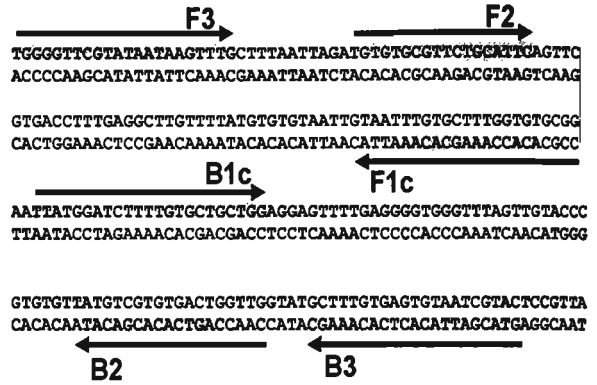
Opisthorchis viverrini Poirier, 1886 (sán lá gan nhỏ Đông Nam Á, Southeast Asian liver fluke), động vật lây sang người gây nhiễm hàng chục triệu người các nước châu Á (Sripa et al., 2010), tập trung phần bố gây bệnh tại Thái Lan, Lào, Cambodia và Nam Việt Nam (De et al., 2003; Le et al., 2006; Sripa et al., 2010). Ở những vùng có tập quán ăn gỏi cá sống hoặc lấu cá chưa chín mang ấu trùng gây nhiễm của *O. viverrini*, người bị nhiễm với tỷ lệ rất cao và tiến triển thành ung thư biểu mô túi mật (cholangiocarcinoma) rất phổ biến ở Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan, Lào, Cambodia và Việt Nam (Sithiathaworn et al., 2007). Tại Việt Nam, chủ yếu tại các tỉnh Bình Định, Phú Yên, Đắk Lắk, Quảng Nam, Thừa Thiên - Huế và Quảng Trị (Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hoà, 2006).

Gần đây, một loại kỹ thuật mới để làm, chính xác, nhanh, nhạy thực hiện ở 63°C gọi là kỹ thuật “DNA vòng” (LAMP) đã được phát triển và ứng dụng (Notomi et al., 2000; Mori, Notomi, 2009). Chúng tôi áp dụng thực hiện LAMP sử dụng nguồn khuôn là gen ty thể (gọi tắt là mito-LAMP) do hệ gen ty thể có nhiều bản sao, có thể đến hàng ngàn trong một tế bào, cung cấp nguồn khuôn cho độ nhạy cao. Hơn nữa, hệ gen ty thể là DNA vòng khép kín, chứa nhiều đơn gen để thực hiện bằng PCR hoặc LAMP (Lê Thanh Hòa, 2011).

Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu phát triển phương pháp mito-LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *O. viverrini* dựa trên chuỗi gen *nad1* ty thể, đánh giá phản ứng, với mục đích cung cấp phương pháp mới phát hiện loại ký sinh trùng này.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thiết kế bộ mồi cho mito-LAMP



Hình 1. Trình bày bố trí các chuỗi mồi tham gia phản ứng mito-OvLAMP; trong đó phân bôi đậm là trình tự nucleotide, mũi tên chỉ chiều chạy của mồi (tên mồi ghi ở phía trên/dưới mũi tên). Theo nguyên lý LAMP, mồi F3 bám vào sợi bên dưới; mồi B3 bám vào sợi bên trên; mồi FIP (F1c+F2) và BIP (B1c+B2) bám vào cả sợi trên và dưới theo cơ chế đối chiều.

Bộ mồi gồm 4 mồi chính [F3, FIP (F1c+F2), BIP (B1c+B2) và B3], trình bày ở Hình 1 và liệt kê ở Bảng 1, trên phân tích đồng nhất nucleotide chuỗi *nad1* của 27 chủng trong đó có 24 chủng *O. viverrini*, 2 chủng *Clonorchis sinensis* và *O. felineus*; và bằng chương trình PrimerExplorer V4 software (có tại: <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>). Cặp mồi F3-B3 còn được dùng để thực hiện PCR đặc hiệu, cho sản phẩm kích thước 221 bp, là vùng gen hoạt động của mito-OvLAMP, để đánh giá khuôn DNA của *O. viverrini* chuẩn bị cho các thử nghiệm kiểm tra phản ứng.

Bảng 1. Danh sách chuỗi mồi tham gia phản ứng mito-OvLAMP

Tên mồi	Chuỗi nucleotide (5'--->3')
F3	TGGGGTTCGTATAATAAGTTTG
B3	GTACGATTACACTCACAAAGC
FIP(F1c+F	CCGCACACCAAAGCACAAATTA/TTTTGTGTGCGTTCTGCATTC
BIP(B1c+B	TTATGGATCTTTTGTGCTGCTGG/TTTCAACCAGTCACACGACAT

Ghi chú: Mồi F3, forward outer primer; Mồi FIP, forward inner primer (bao gồm chuỗi F1c và F2 với chuỗi nối -TTTT- ở giữa); Mồi BIP, backward inner primer (bao gồm chuỗi B1c và B2 với chuỗi nối -TTTT- ở giữa); Mồi B3, backward outer primer.

2.2. Các mẫu ký sinh trùng và tách chiết DNA tổng số

Các mẫu *O. viverrini* (thu từ các tỉnh Quảng Nam, Huế, Bình Định, Phú Yên, Đắk Lắk) và trao đổi với đối tác Thái Lan để nhận các chủng thu thập từ Thái Lan và Lào. Một số chủng sán lá khác được thu từ Việt Nam và quốc tế. DNA tổng số được tách bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA extraction kit (Qiagen Inc.) mô tả trước đây (Le et al., 2006). Khuôn DNA tổng số được cung cấp 1 ul với hàm lượng 100ng/ul trong một phản ứng có dung tích 25 ul.

2.3. Thực hiện PCR đặc hiệu kiểm tra khuôn DNA của *O. viverrini*

Để khẳng định khuôn DNA và tính đặc hiệu của mồi, phản ứng PCR thông thường được thực hiện sử dụng cặp mồi F3 – B3 (cho sản phẩm 221 bp) từ các mẫu *O. viverrini* và các mẫu sán lá khác. Phản ứng PCR trong dung tích 25 ul, thực hiện với chu trình nhiệt là 1 chu kỳ ở 94°C/3', 25 chu kỳ [94°C/3', 50°C/30", 72°C/1'] và chu kỳ cuối ở 72°C trong 3'. Kiểm tra sản phẩm trên thạch agarose 1%, dưới tia UV trong máy soi gel Dolphin (Wealtec, USA).

2.4. Thực hiện phản ứng mito-LAMP

LAMP được thực hiện với hỗn hợp dung tích 25 ul chứa 2X LAMP buffer, 1 ul (8 đơn vị) enzyme Bsm DNA polymerase large fragment (Fermentas Inc.), 1 ul of Primer Mix, 1 ul DNA

tổng số và 9.5 ul nước cất 2 lần, ở 63°C trong 1 giờ, ở tủ ẩm nước, sau đó vô hoạt ở 80°C trong 5 phút. Đối với phản ứng đối chứng âm thì không cho DNA tổng số. Sản phẩm LAMP được đánh giá để xác định dương tính bằng các phương pháp đã mô tả.

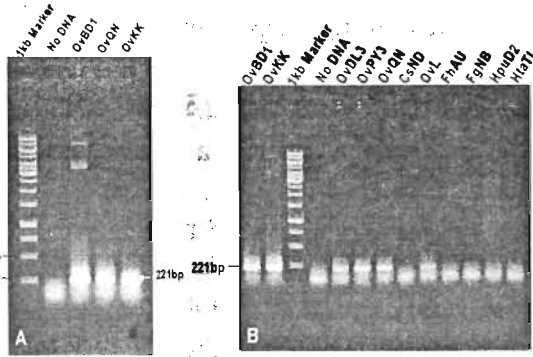
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả kiểm tra khuôn và mồi bằng PCR đặc hiệu

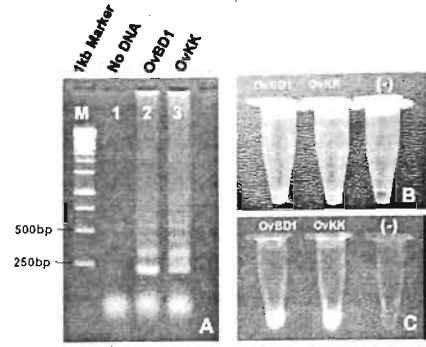
Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi F3-B3 với khuôn *O. viverrini* bao gồm OvBD1 (mẫu Bình Định); OvQN (Quảng Nam); OvKK (Khon Kaen); OvDL3 (Đắk Lắk); OvPY3 (Phú Yên); OvL (mẫu Lào) và các mẫu sán lá khác gồm CsND (*Clonorchis sinensis*); FhAU (*Fasciola hepatica*); FgNB (*F. gigantica*); HpuD2 (*Haplorchis pumilio*); HtaTL (*H. taichui*). Đối chứng âm chỉ cho nước, không có DNA khuôn. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%, trình bày ở Hình 2. Hình 2 cho thấy, tất cả các mẫu khuôn từ *O. viverrini* đều cho sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 221 bp, trong khi đó PCR với khuôn không phải là *O. viverrini* hoàn toàn không cho sản phẩm, giống đối chứng âm. Điều này chứng tỏ, khuôn DNA *O. viverrini* đảm bảo chắc chắn thuộc loài *O. viverrini*; và cặp mồi F3-B3 đã cho sản phẩm 221 bp là một phần gen *nad1* ty thể của *O. viverrini* (Hình 2).

3.2. Kết quả thực hiện phản ứng mito-OvLAMP

Phản ứng mito-OvLAMP được cho kết quả trình bày ở Hình 3. Với khuôn *O. viverrini* sản phẩm LAMP hiển thị bằng các đoạn DNA hình bậc thang đặc trưng của phản ứng LAMP (Hình 3A); sau khi cho SYBR Green I quan sát thấy phát màu xanh lá cây rất rõ (Hình 3B); và sau khi kiểm tra dưới tia cực tím thấy hiển thị độ đục rất cao của muối Mg-pirophosphate (Hình 3C); trong khi đó đối chứng âm không thấy bất kỳ có biểu hiện nào. Như vậy, phản ứng mito-OvLAMP đã được xây dựng và thực hiện thành công với khuôn DNA của *O. viverrini*.



Hình 2. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR đặc hiệu sử dụng cặp môi F3-B3 với khuôn *O. viverrini* (A) và cùng với một số sản lá khác (B). Ghi chú: Marker là thang DNA 1 kb (Fermentas); Các mẫu *O. viverrini*: OvBD1 (mẫu Bình Định); OvQN (Quảng Nam); OvKK (Khon Kaen); OvDL3 (Đắc Lắc); OvPY3 (Phú Yên); OvL (mẫu Lào); Các mẫu sản lá khác: CsND (*Clonorchis sinensis*); FhAU (*Fasciola hepatica*); FgNB (*F. gigantica*); HpuD2 (*Haplorchis pumilio*); HtaTL (*H. taichui*).



Hình 3. Kiểm tra sản phẩm mito-OvLAMP bằng điện di trên thạch agarose 2% (A), sau khi cho SYBR Green I quan sát bằng mắt thường (B) và dưới tia cực tím (C). M: Thang DNA chỉ thị phân tử 1 kb ladder; OvBD1, OvKK: các mẫu *O. viverrini*; (-): âm tính, khuôn là nước.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng và thử nghiệm thành công phương pháp mito-OvLAMP chẩn đoán sản lá gan nhỏ *O. viverrini*, dễ làm, có độ nhạy và tính đặc hiệu rất cao, chỉ phát hiện duy nhất *O. viverrini*, không cho kết quả chéo với các loài sản lá thường gặp khác, có thể ứng dụng trong thực tế, tiết kiệm thời gian và có tính kinh tế cao.

LỜI CẢM ƠN: Chúng tôi cảm ơn Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ kinh phí cho đề tài do PGS.TS Lê Thanh Hòa chủ nhiệm, để thực hiện công trình này. Cảm ơn Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen tại Viện Công nghệ sinh học hỗ trợ trang thiết bị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- De NV, Murrell KD, Cong LD, Cam PD, Chau LV, Toan ND, Dalsgaard A (2003). The Food-borne Trematode zoonoses of Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34 Suppl 1, 12-34.

2. **Le TH, De NV, Blair D, Sithithaworn P, McManus DP (2006).** *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of amitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. *Exp. Parasitol.* 112, 109–114.
3. **Lê Thanh Hòa (chủ biên) (2011).** Sách tham khảo: “*Y-sinh học phân tử*” (Quyển II). Nhà xuất bản Y học, Hà Nội (255 trang).
4. **Mori Y, Notomi T (2009).** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 15(2):62-9. Review.
5. **Nguyễn Văn Đê, Lê Thanh Hoà (2006).** Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ *Opisthorchis viverrini* trên người tại Thừa Thiên –Huế, Quảng Nam, Bình Định và Đắk Lắk, Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 320(3): 32-37.
6. **Shekhovtsov SV, Katokhin AV, Kolechanov NA, Mordvinov VA (2010).** The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitol Int.* 59(1):100-3.
7. **Sithithaworn P, Yongvanit P, Tesana S, Pairojkul C (2007).** Liver flukes. In: Murrell KD, Fried B (eds) *World class parasites*, Vol 11. Food-borne parasitic zoonoses: fish and plant-borne parasites. Springer, New York, pp 3–52.
8. **Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, Mulvenna J, Laha T, Hotez PJ, Brindley PJ (2010).** Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop* (in press).

HIỆU QUẢ CỦA BỘT FLAVON SOY ĐỐI VỚI TÌNH TRẠNG RỐI LOẠN LIPID VÀ TRẠNG THÁI CHỐNG OXY HÓA MÁU Ở NGƯỜI

Nguyễn Thị Diệp Anh¹, Phạm Thiện Ngọc², Vũ Thị Thu Hiền¹,
Lê Thị Hợp¹, Lê Bạch Mai¹, Trương Hương Lan³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá tác dụng hạn chế rối loạn lipid máu (RLLPM) và làm tăng trạng thái chống oxy hoá máu của bột Flavon soy trên người từ 45-65 tuổi. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu can thiệp có đối chứng được tiến hành ở 70 người khỏe mạnh có RLLPM. Nhóm can thiệp (35 người) được uống Flavon soy (chế phẩm từ đậu tương này mầm và cà rốt) liều 20g/ngày trong 9 tuần. Cả hai nhóm được hướng dẫn kiểm soát chế độ ăn. Hiệu quả can thiệp được đánh giá qua các chỉ số: Triglycerid, Cholesterol toàn phần, LDL-

C, HDL-C, Malondialdehyde (MDA), Total antioxidant status (TAS) huyết tương tại thời điểm trước và sau can thiệp. **Kết quả:** nhóm can thiệp giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ cholesterol toàn phần; LDL-cholesterol; MDA huyết tương tương ứng là 7,8%; 11,5%; 17,2% và tăng có ý nghĩa ($p < 0,05$) nồng độ TAS huyết tương (5%) so với nhóm chứng. **Kết luận:** Bột Flavon soy có tác dụng hạn chế RLLPM và làm tăng trạng thái chống oxy hóa máu ở người 45-65 tuổi.

Từ khóa: Rối loạn lipid máu, trạng thái chống oxy hóa, malondialdehyde, người trưởng thành

¹Viện Dinh dưỡng, ²Trường Đại học Y Hà nội, ³Viện Công nghiệp thực phẩm