

CẢI TIẾN PHƯƠNG PHÁP ĐA HÌNH CHIỀU DÀI CẮT GIỚI HẠN ĐÍCH VÀ GIẢI MÃ TRÌNH TỰ GENE 16S rRNA SỬ DỤNG ĐỂ XÁC ĐỊNH CÁC CHỦNG VI KHUẨN TRÊN LỚP NHẦY VẢY CÁ

THE METHOD DEVELOPMENT OF BACTERIAL COMMUNITY IDENTIFICATION BASED ON TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP) AND SEQUENCING 16S rRNA ALIGNMENT ON OUTER FISH MUCUS LAYER

Nguyễn Thành Luân¹, Phạm Văn Lộc¹, Katarina Mikac²

¹Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Tp.HCM, Việt Nam; Email: luannt@cntp.edu.vn

²Đại học Wollongong, Tiểu bang New South Wales, 2522, Úc; Email: kmikac@uow.edu.vn

Tóm tắt - Việc đánh bắt cá bất hợp pháp gia tăng nhanh chóng từ các hoạt động đánh bắt không được kiểm soát gây ra mối lo ngại về sự tồn tại các loài cá. Nghiên cứu này hướng đến việc phân lập và định danh các chủng vi khuẩn tương tác với lớp nhầy vảy cá và xác định các sự khác biệt của các tiêu phân trong cấu trúc quần thể vi khuẩn tồn tại ở các khu vực khảo sát. Nghiên cứu khuếch đại và tối ưu hóa PCR, biểu hiện kỹ thuật t-RFLP được thực hiện. Cây phát sinh loài nhằm phân tích các mối quan hệ của 19 loài phân lập được với các cơ sở dữ liệu gen được xây dựng. Qua phân tích trình tự, các kết quả cho thấy sự nổi trội của loài *Vibrio* sp. Trong quần thể vi khuẩn trên 4 khu vực khảo sát quanh vùng Illawarra, Úc, việc sử dụng t-RFLP và RFLP dựa trên PCR được đề xuất cũng như xây dựng các các đoạn mồi nhanh, an toàn, tiết kiệm và đặc hiệu hơn cho việc phát hiện và bảo vệ các loài thủy hải sản sau này.

Từ khóa - lớp nhầy vảy cá; *Vibrio* sp.; t-RFLP; kỹ thuật đa hình; giải mã trình tự DNA; PCR; rRNA 16S.

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, hoạt động đánh bắt cá đang gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến nguồn tài nguyên thủy sản, đặc biệt là các loài cá ở các khu vực bảo tồn sinh thái (Waldman và cộng sự, 2008). Xuất phát từ nguyên nhân thiếu các công cụ di truyền cũng như các kỹ thuật cơ bản trong việc quản lý môi trường đánh bắt cá và các nguồn hải sản tự nhiên (Gruenthal & Burton, 2005), cùng với hoạt động khai thác phi pháp là nguyên nhân hàng đầu của tình trạng biến mất nhiều loài cá. (Quigley & Harper, 2006). Có trên 60% thị trường cá và hải sản toàn cầu đang trong tình trạng khai thác quá mức (Ogden, 2008). Bên cạnh đó, mỗi năm có khoảng 10-23 tỷ USD bị thất thoát bởi hoạt động đánh bắt cá phi pháp, không minh bạch hoặc quá mức. Điều này gây ra mối hiểm họa cho việc duy trì sự bền vững của ngành công nghiệp cá & hải sản (Ogden, 2011). Do đó, việc kiểm soát hoạt động đánh bắt được quan tâm bởi các lực lượng chuyên trách trên toàn thế giới về tuần tra biển.

Nước Úc có đường bờ biển dài, thuận lợi trong việc duy trì sinh thái biển và môi trường sống cho các loài cá. Điều này đảm bảo hiệu quả mật độ tự nhiên và ngay cả các loài cá có nguy cơ tuyệt chủng. Với một bờ biển trải dài, diện tích mặt nước rộng lớn nhưng dân cư thưa thớt nên việc quản lý vô cùng khó khăn. Vì vậy, nhu cầu đặt ra là cần có một phương pháp hiệu quả giúp xác định các loài cá ở khu vực được bảo vệ một cách nhanh chóng và chính xác. (Withler và cộng sự, 2004). Theo Smith và cộng sự (2009)

Abstract - Illegal fishing is the leading loss of fish & fish habitat globally. The pressure of pressing profit for annual fishing market has grown rapidly from illegal, unreported & unregulated fishing has been reported in an extreme threat for regional, local fisheries management & the sustainability of marine fisheries. This study aims to isolate & characterise bacterial communities associated with the outer mucus layer of fish and determine whether a spatial pattern of difference in bacterial community composition exists among sites where bacteria were collected. PCR procedure for amplification and optimisation and t-RFLP performance were proceeded. The phylogenetic tree was built to analyse the relationship of nineteen species in biological databases. By performing DNA sequencing, the results had shown the dominance of *Vibrio* sp. In the presence of bacterial community in four observed creeks surround Illawarra region. It is recommended that a need for the improvement of better profiling techniques in building some quicker, safer, cheaper & more specific markers, primers to protecting marine species afterwards could be developed.

Key words - fish mucus layer; *Vibrio* sp.; t-RFLP; polymorphism; DNA sequencing; PCR; rRNA 16S.

thì các kỹ thuật sinh học phân tử có thể được sử dụng giúp phát hiện các sai phạm trong hoạt động đánh bắt cá.

Bên cạnh đó, kỹ thuật DNA và phản ứng PCR dựa trên phương pháp đa hình chiều dài cắt giới hạn đích (t-RFLP) với các nhóm vi khuẩn trên lớp nhầy vảy cá trắng (*Merlangius merlangus*) xác định được khu vực thu nhận các mẫu cá đặc thù ở các vùng biển Ireland (Smith và cộng sự, 2009). Smith cũng chỉ ra rằng vi khuẩn ký sinh là một chỉ thị phù hợp để xác định các loài cá và hải sản đặc hữu. Hơn nữa, t-RFLP là phương pháp có thể hỗ trợ rất nhiều phương pháp hiện tại trong việc xác định khối lượng và kích cỡ các loài cá. Điều này giúp giới hạn việc đánh bắt các loài cá nhỏ. Do đó nó được xem là cách hiệu quả để hạn chế việc tận thu nguồn tài nguyên. Theo Dunbar và cộng sự (2000), kỹ thuật t-RFLP là một kỹ thuật nhanh và đơn giản trong so sánh mối quan hệ giữa các loài vi khuẩn của quần thể so với các phương pháp dựa trên kỹ thuật tạo dòng rDNA 16S, khám phá sự hiện diện của *Thermus thermophilus* (Székely và cộng sự, 2004) trong nông nghiệp, nhóm vi khuẩn hiếu khí *Epulopiscium* spp. hiện diện trên cá (Clements và cộng sự, 2007). Vì thế, t-RFLP được xem là một phương pháp đầy triển vọng từ các sản phẩm PCR được khuếch đại để phân loại các loài vi khuẩn đặc hiệu.

Hơn nữa, DNA được xem là vật liệu thuận lợi và chính xác trong việc xác định các loài. Do DNA là thành phần của tế bào, cung cấp nguồn cơ sở dữ liệu rất phong phú ở

các dạng mã hóa vật chất di truyền và cả các vùng không mã hóa gen (Teletchea, 2009). Các phương pháp định danh dựa trên các marker phân tử sẽ được ứng dụng không chỉ cho việc lĩnh vực hình sự hay tư pháp mà còn trong các lĩnh vực xác định các giai đoạn phát triển của các sinh vật (Smith và cộng sự, 2007). Trên cơ sở đó, mục tiêu của nghiên cứu này sẽ hướng đến việc định danh các nhóm vi khuẩn sống trên lớp nhày vảy cá và xác định các tiêu phân khác nhau trong tổ hợp quần thể vi khuẩn giữa các khu vực chọn lọc vi khuẩn, hướng đến xây dựng sơ đồ phân bố vi khuẩn đặc thù theo các khu vực chọn lọc mẫu.

2. Phương pháp & vật liệu nghiên cứu

2.1. Thu nhận mẫu

Lớp nhày vảy cá đối chưa trưởng thành (*Mugil cephalus* L.) được bắt bởi những người câu cá thuộc tổ chức Nghề cá ở khu vực Illawarra và chọn lọc các mẫu vảy cá cho từng loại ở 4 nhánh sông giáp biển ở Lawrence Hargrave (1 mẫu), Stanwell Park (6 mẫu), Hewitts (6 mẫu) và Para – Fairy Meadow (7 mẫu) được quy định ký hiệu theo địa điểm chọn lọc với TH cho sông Hewitts (Thirroul), LH cho sông Lawrence Hargrave, SPW cho sông ở Stanwell Park và FM cho sông Para (Fairy Meadow) (Hình 1.) 20 mẫu lớp nhày vảy cá được lưu giữ trong hộp chọn lọc mẫu bảo quản ở điều kiện -20°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm.



Hình 1. Sơ đồ vị trí các khu vực thu nhận mẫu lớp nhày vảy cá ở các khu vực sông nhỏ và đặc điểm từng nhóm mẫu cho từng khu vực khảo sát ở vùng Illawarra, New South Wales, Úc

2.2. Nuôi cấy tăng sinh và tách chiết DNA

Các lớp nhày vảy cá tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường LB (Luria-Bertani) agar và trong 36-48h ở 37°C. Vi khuẩn được phân lập sau quá trình nuôi cấy trên các đĩa petri và tiến hành tách chiết DNA với bộ kit QuickExtract™ Bacterial DNA Extraction Kit của hãng Epicentre.

2.3. Khuếch đại DNA bằng phản ứng PCR và tối ưu hóa phản ứng

Quá trình tối ưu hóa phản ứng PCR được thực hiện bằng việc sử dụng bộ kit Failsafe PCR Premix của hãng Epicentre và sử dụng GoTaq của công ty Promega. Quá trình tối ưu hóa được thực hiện tuần tự theo 12 phản ứng khác nhau sử dụng các Premix của bộ Failsafe với nồng độ DNA chuẩn ban đầu và dung dịch DNA pha loãng theo tỷ lệ 1:10 ở điều kiện kết hợp mỗi ở 55°C với các nhóm môi không đánh dấu nồng độ 0,4μM. Quá trình tối ưu hóa được thực hiện tiếp tục tương tự nhưng với nhóm môi được đánh dấu (Smith và

cộng sự, 2005) với quy trình PCR được thực hiện trong 29 chu kỳ. Các nhóm Master Mix GoTaq được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bên cạnh đó, các đoạn môi được đánh dấu huỳnh quang cho mỗi xuôi (F63-D4: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') sử dụng FAM-dye của hãng Applied Biosystems và đoạn môi ngược không đánh dấu huỳnh quang (R1389: 5'-AGCGGCGGTGTGTA CAAG-3') của hãng Geneworks ở nồng độ chuẩn là 0,4μM. DNA sau quá trình PCR được phát hiện bằng điện di với gel agarose 1% trong 60 phút ở 80V.

2.4. Giải mã trình tự đoạn DNA và xây dựng quan hệ loài vi khuẩn

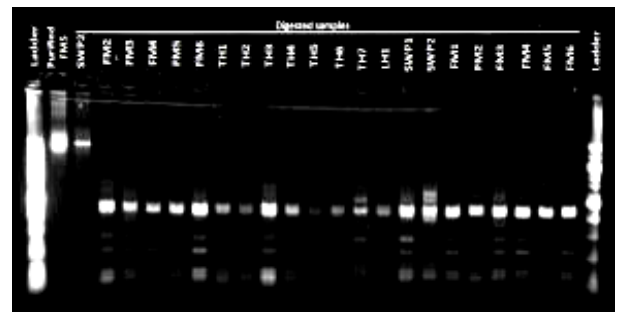
DNA được giải mã trình tự tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử trường Đại học Wollongong, Úc theo phương pháp Sanger với bộ kit được cung cấp từ công ty Macrogen Inc. (Hàn Quốc). Kết quả giải mã trình tự DNA của 16 mẫu vi khuẩn được sắp xếp và phân tích bởi phần mềm BioEdit và MEGA v4.0. Các trình tự sau đó lại được kết hợp và so sánh trên ngân hàng gen bằng BLAST của NCBI. Các trình tự này được biểu diễn và khảo sát nhằm làm sáng tỏ mối quan hệ loài của các loài vi khuẩn phân lập được với các loài vi khuẩn tương đồng trên ngân hàng gen của NCBI.

3. Kết quả & bàn luận

3.1. Chọn lọc mẫu

Sau thời gian nuôi cấy, 20 chủng vi khuẩn được phân lập ở 4 khu vực sông với các hình dạng khuẩn lạc và hình thái tế bào khác nhau được đánh giá có thể ảnh hưởng đến loài cá hoặc chu kỳ đời sống của cá.

3.2. Khuếch đại DNA bằng phản ứng PCR và tối ưu hóa phản ứng



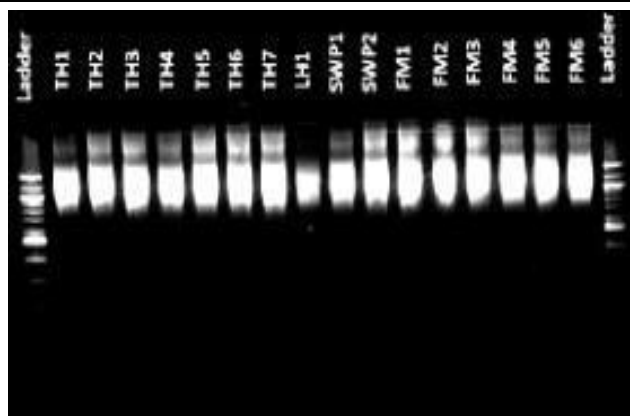
Hình 2. Kết quả điện di các mẫu DNA sử dụng enzyme cắt hạn chế *MspI*. Phương pháp nhằm so sánh với mẫu với kết quả trong thang chuẩn của bộ đôi chứng âm các mẫu vi sinh vật trên cá sử dụng gel agarose 1% với mẫu không sử dụng enzyme cắt hạn chế (FM5 và SPW2)

DNA ở các nồng độ khác nhau và premix A trong phản ứng tối ưu hóa nồng độ DNA và nhóm dung dịch Premix từ bộ Failsafe được chứng minh với việc premix A có phản ứng tốt nhất với các đoạn môi đánh dấu huỳnh quang và được chọn tiếp tục trong việc sử dụng cho các phản ứng PCR tiếp theo. Bên cạnh đó, việc kết hợp các nhóm premix A, DNA tỷ lệ pha loãng 1:10 và các nhóm môi xuôi phát sáng huỳnh quang mang lại kết quả trên 80% thành công cho các phản ứng qua việc kiểm tra kết quả điện di. Trong quá trình tinh sạch DNA, bộ kit JETQUICK spin columns và enzyme cắt hạn chế *MspI*

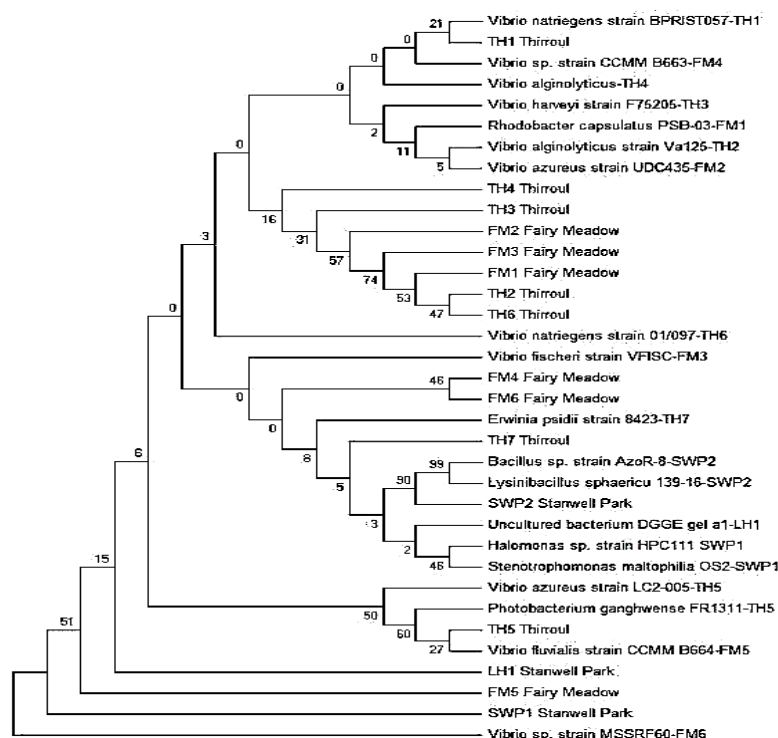
cho phản ứng tốt và nhanh đối với tất cả các mẫu DNA của vi khuẩn phân lập được (Hình 2.). Kết quả đã chọn được 16 mẫu DNA có nồng độ đủ và hiệu quả để tiếp tục thực hiện các phản ứng PCR tiếp theo.

3.3. Giải mã trình tự đoạn DNA và xây dựng quan hệ loài vi khuẩn

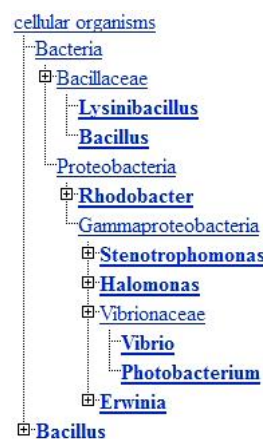
Tuy nhiên, trong quá trình xác định kiểu gen và giải mã trình tự sử dụng GeneMapper v3.7, Failsafe Premix A hoạt động không hiệu quả đối với tất cả 16 mẫu được chọn lọc qua quá trình tối ưu hóa. Do đó, việc thay thế và chọn lọc một Master Mix được xem xét và chọn lọc bộ GoTaq Colourless Master Mix với nồng độ DNA ở tỷ lệ 1:10. Bên cạnh đó, các môi xuôi và ngược cũng được thay đổi với nhóm không đánh dấu huỳnh quang. Kết quả được biểu hiện ở Hình 3 được đánh giá thành công cho việc tối ưu hóa phản ứng cho giải mã trình tự gen và sẵn sàng cho việc xây dựng cây phân hóa loài nhằm tìm hiểu rõ về các mối quan hệ các loài vi khuẩn về độ tương đồng các trình tự nucleotide.



Hình 3. Quá trình khuếch đại các đoạn DNA sử dụng GoTaq Colourless Master Mix thay thế nhóm FailSafe Master Premix A. Các trình tự sau khi khuếch đại qua PCR cho kết quả thành công với các vạch ở các mẫu chọn lọc trong 16 mẫu chọn lọc sau quá trình tối ưu hóa



Hình 4. Sơ đồ phân ly cây phát sinh loài dựa trên số lần lặp lại mẫu (bootstrap) của 16 đoạn trình tự liên quan đến 19 nhóm trình tự vi khuẩn sử dụng phần mềm MEGA ver 4.0. Với việc sắp xếp trên theo phương pháp Parsimony với việc chọn lọc và phân tích các nhóm loài giải mã trình tự và so sánh với loài *Vibrio* sp. MSSRF60 là nhóm ngoài (outgroup). Chỉ số bootstrap ở mỗi nhánh chỉ ra được phương pháp đo lường mức độ tin cậy của mỗi mối quan hệ loài trên cây phát sinh loài



Hình 5. Phương pháp xây dựng cây phân loại loài chung (Common Tree) trên NCBI bằng phương pháp Taxonomy. Bằng phương pháp này, có thể so sánh và đối chiếu trình tự so sánh của loài liên quan với 16 mẫu khảo sát qua ngân hàng Genbank để mô tả mối quan hệ giữa các loài khảo sát ở mức độ tổng thể

Tất cả 16 trình tự DNA được chọn lọc và sắp xếp thẳng hàng, việc sử dụng phần mềm xây dựng cây phát sinh loài có thể làm sáng tỏ mối quan hệ giữa 16 loài với các trình tự loài được tìm thấy tương đồng nhất trên Genbank của NCBI. Kết hợp với việc sử dụng thống kê với 100 lần khảo sát (bootstrap neighbor joining) đã đưa ra một số kết quả ngoài mong đợi. Chủng *Vibrio natriegens* BPRIST057 có trình tự tương đồng khá nhiều với trình tự TH1 của mẫu so sánh biểu hiện mức độ tin cậy qua điểm nhánh như 59,62,

60, 14... Kết quả ngạc nhiên khác ở mẫu SWP2 và FM5 với sự chọn lọc mẫu cách nhau khoảng 13.3km chỉ ra có mối quan hệ loài tương đương nhau 59% mức độ tin cậy bởi số lần lặp lại. Hơn nữa, chủng LH1 và TH2, SPW1 và TH4 và TH7 (cách nhau 22.6km về khoảng cách mẫu chọn lọc) cho thấy mối quan hệ loài gần nhau với mức độ tin cậy về số lần lặp lại lên đến lần lượt là 59 & 62. Các kết quả này chỉ ra rằng các tiêu bản DNA có khả năng lây nhiễm bởi một số nguyên nhân khách quan do yếu tố xã hội hoặc

địa lý. Tuy nhiên, các chủng TH và FM lại cho thấy kết quả là một nhóm quan hệ phức tạp trên cây sơ đồ tiến hóa. Nó đánh giá được sự phân chia trình tự của mỗi loài là giống nhau, với các loài khác trong cây tiến hóa chỉ ra được sự liên kết nào đó trong quá trình hình thành và phát triển hai vùng sông nói trên. (Hình 4.). Các chủng FM1, FM2, FM3 được biểu hiện có quan hệ gần với các loài *Vibrio* spp. như *V.algionolyticus*, *V.harveyi* hay *Vibrio* sp. CCMM B663. Chủng TH5 có thể có mối quan hệ gần với *V.fluvialis* CCMM B664 trong khi LH1, SPW1 và FM5 lại cho thấy một kết quả thú vị với một nguồn gốc chung từ loài *Vibrio* sp. MSSRF60.

Từ kết quả phân tích cây tiến hóa loài, một mối quan hệ tiến hóa loài được tìm thấy giữa *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Rhodobacter*, *Stenotrophomonas* and *Halomonas*, *Vibrio* and *Photobacterium* and *Erwinia* (Hình 5.). Ở mức độ loài, điều này chỉ ra được mối quan hệ gần gũi giữa *Lysinibacillus* và *Bacillus* có nguồn gốc từ Bacillaceae, các loài *Vibrio*, *Photobacterium* và *Erwinia* có nguồn gốc từ Vibrionaceae. So sánh với cây phân hóa loài, điều này chỉ ra rằng có một chứng cứ quan trọng giữa mối quan hệ loài và sự ước lượng về tiến hóa lại thông qua DNA. Vì vậy, có thể kết luận rằng hầu hết các loài được phân lập và chọn lọc thuộc họ Proteobacteria.

4. Kết luận

Kỹ thuật t-RFLP được sử dụng với các enzyme *MspI* cho tất cả 16 mẫu được chọn lọc trên 4 khu vực chọn lọc mẫu. Sự thất bại trong việc sử dụng kết hợp kỹ thuật t-RFLP và môi đánh dấu huỳnh quang trong *MspI* được nhận định xuất phát từ điều kiện khác nhau trong phản ứng PCR hoặc cấu trúc khác nhau của các enzyme cắt hạn chế. Tuy nhiên, vẫn có những kết quả khả quan và đáng tin cậy về quá trình tối ưu hóa các phản ứng khuếch đại DNA bằng PCR với enzyme cắt hạn chế đặc hiệu. Hơn nữa, khảo sát cho thấy *Vibrio* sp. được biểu hiện nổi trội trên tất cả các quần thể vi khuẩn ở các khu vực khảo sát. Điều này mở ra tiềm năng khảo sát các yếu tố vi sinh vật khác trên các đối tượng khác nhau (Torrás và cộng sự., 2000). Vì vậy, đây có thể được xem là tiềm năng cho việc khảo sát các nhóm *Vibrio* sp. tương tác với các loài thủy sản. Bên cạnh đó, việc cần thiết về việc cải tiến các kỹ thuật biểu hiện đa hình tốt hơn cho việc thực hiện các pháp lý chế tài liên quan đến DNA sử dụng t-RFLP hoặc RFLP dựa trên nền tảng PCR nên được chú trọng. Hơn

nữa, việc cần thiết xây dựng các đoạn mồi nhanh, nhạy, đặc hiệu và giá cả hợp lý hơn cũng nên được quan tâm phát triển nhằm hỗ trợ việc phát hiện và bảo vệ các loài thủy sản ngày một hiệu quả hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Clements, K. D., Pasch, I. B. Y., Moran, D. & Turner, S. J. (2007). Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. *Mar Biol* **150**: 1431-1440.
- [2] Dunbar, J., Ticknor, L. O. and Kuske, C. R. (2000). Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Applied and environmental Microbiology* **66**(7): 2943-2950.
- [3] Ogden, R. (2008). Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries* **9**(4): 462-472.
- [4] Ogden, R. O. B. (2011). Unlocking the potential of genomic technologies for wildlife forensics. *Molecular Ecology Resources* **11**: 109-116.
- [5] Quigley, J. T. & Harper, D. J. (2008). Compliance with Canada's Fisheries Act: A Field Audit of Habitat Compensation Projects. *Environmental Management* **37**(3): 336-350.
- [6] Smith, C. J., Danilowicz, B. S. and Meijer, W. G. (2007). Characterization of the bacteria community associated with the surface and mucus layer of whiting (*Merlangius merlangus*). *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 90-97.
- [7] Smith, C. J., Danilowicz, B. S. and Meijer, W. G. (2009). Bacteria associated with the mucus layer of *Merlangius merlangus* (whiting) as biological tags to determine harvest location. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* **66**: 713-716.
- [8] Smith, C. J., Danilowicz, B. S., và cộng sự (2005). T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiology Ecology* **54**: 375-380.
- [9] Székely, A. J., Sipos, R., Berta, B. và cộng sự (2009). DGGE and T-RFLP Analysis of Bacterial Succession during Mushroom Compost Production and Sequence-aided T-RFLP Profile of Mature Compost. *Microb Ecol* **57**: 522-533.
- [10] Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **19**(3): 265-293.
- [11] Torrás, X., Cardona, L. & Gisbert, E. (2000). Cascading effects of the flathead grey mullet *Mugil cephalus* in freshwater eutrophic microcosmos. *Hydrobiologia* **429**: 49-57.
- [12] Waldman, J. R., Doukakis, P. và cộng sự. (2008). Molecular analysis as a conservation tool for monitoring the trade of North American sturgeons and paddlefish. *Journal of Applied Ichthyology* **24**: 20-28.
- [13] Withler, R., Candy, J. và cộng sự. (2004). Forensic DNA Analysis of Pacific Salmonid Samples for Species and Stock Identification. *Environmental Biology of Fishes* **69**(1): 275-285.

(BBT nhận bài: 29/03/2014, phản biện xong: 23/04/2014)