

**PHÁT HIỆN ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG *Cucumber mosaic virus* (CMV)
GÂY HẠI TRÊN DƯA LEO TRÊN ĐỊA BÀN
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH, TIỀN GIANG, LÂM ĐỒNG**

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETECTION OF *Cucumber mosaic virus*
(CMV) IN CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) IN HO CHI MINH CITY, TIEN GIANG
AND LAM DONG PROVINCES**

Nguyễn Thị Xuân Ngọc¹, Chế Nguyên Kha¹, Huỳnh Văn Biết², Bùi Cách Tuyến³

¹*Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

²*Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM*

³*Khoa Môi trường và Tài Nguyên, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

ABSTRACT

Cucumber mosaic virus (CMV) is the major agent causing of mosaic on Cucumber (*Cucumis sativus* L.). 45 Cucumber mosaic virus symptomatic cucumber leaves were collected from Ho Chi Minh city, Tien Giang and Lam Dong provinces. The DAS-ELISA and RT-PCR techniques, sequencing is performed to diagnose CMV positive sample. Plasmids containing genes of CMV were cloned and used as a positive control for the detection of CMV by RT-PCR, while serving for quantitative studies using real-time PCR techniques.

In a total of 45 CMV symptomatic leaf samples collected is diagnosed by DAS-ELISA technique, 10 samples were positive results. Percentage of cucumber with CMV infection in Tien Giang province is higher than in Ho Chi Minh City and Lam Dong province.

Assess the ability to detect false positives in DAS-ELISA technique, 10 CMV-positive samples detected by DAS-ELISA technique, were conducted with RT-PCR technique. The results showed that 100 % amplified product have size of 540 bp on gel electrophoresis, true to desired size gene region of CMV. Besides, in order to assess the sensitivity detection of DAS-ELISA and RT-PCR techniques, 10 samples of cucumber negative for CMV by DAS-ELISA technique, which has OD value closest to the threshold value positive findings, were conducted by RT-PCR diagnostics. The result is 1 CMV-positive sample detected. Thus, there is a difference between the detection sensitivity between DAS-ELISA and RT-PCR techniques. The standard sample from DNA plasmids with CMV gene were established for quantitative analysis by Real-time PCR. The calibration curve with high reliability was established. The equation of calibration curve was $y = -3,7639x + 47,3113$, the reliability index $R^2 = 0,99796$.

Keywords: CMV; Cucumber; ELISA; RT – PCR, cloning, Real time PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa leo (*Cucumis sativus* L.) là một trong số những loại cây trồng nông nghiệp, được trồng rất phổ biến tại Việt Nam và một số nước trên thế giới. Tại Việt Nam, dưa leo đã được trồng từ rất lâu, không chỉ để giải quyết vấn đề thực phẩm trong bữa ăn hằng ngày mà còn mang tính thương mại quan trọng. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển của cây trồng, các loại bệnh hại cũng không ngừng tăng, gây thiệt hại hết sức nặng nề, đặc biệt là bệnh do vi rút gây nên. Hiện nay, người ta đã biết khoảng 2.000 loài vi rút gây bệnh cho các sinh vật, trong đó có

1/2 (hơn 1.000 loài) là các vi rút hại thực vật, chưa kể đến các chủng loại của chúng (Vũ Triệu Mân, 2007). Trong đó, *Cucumber mosaic virus* (CMV) có phạm vi kí chủ rất rộng khoảng 365 chi và ít nhất 85 họ (Palukaitis *et al.*, 1992), là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại lớn nhất, gây giảm năng suất cũng như chất lượng của dưa leo (Jacquemond, 2012). CMV có thể gây bệnh từ giai đoạn cây con cho đến khi cây ra hoa và hình thành quả và thường lây lan mạnh trong vụ Đông Xuân (Vũ Triệu Mân, 2007). Một khi bệnh đã phát triển thành dịch sẽ rất khó không chế và có thể phải tiêu hủy toàn bộ diện tích đất đã trồng.

Do đó, chẩn đoán sớm nhiễm CMV để đánh giá chính xác tình trạng của bệnh là rất cần thiết. Đã có những công trình nghiên cứu chẩn đoán nhiễm vi rút CMV và một số vi rút khác trên họ bầu bí và cà như điện di, phương pháp lai, ELISA, PCR đều cho kết quả khả quan (Lin và ctv, 2004; Lee và ctv, 2011; Choi và ctv, 2011). Đặc biệt, cùng với sự phát triển của sinh học phân tử, việc phát triển và sử dụng kỹ thuật PCR định lượng CMV hữu hiệu, nhanh, chính xác, phát hiện bệnh một cách sớm nhất, làm giảm thiệt hại do vi rút gây ra và góp phần làm ổn định nguồn thu nhập từ dưa leo của người nông dân là vấn đề cần đặt ra. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá tình hình nhiễm vi rút CMV trên dưa leo được canh tác tại thành phố Hồ Chí Minh, tỉnh Lâm Đồng và Tiền Giang trong thời gian gần đây. Khảo sát phương pháp xét nghiệm sinh học phân tử và với việc tạo mẫu chuẩn DNA plasmid mang gen của CMV nhằm xây dựng phương pháp định lượng vi rút CMV bằng kỹ thuật Real time PCR đơn giản, ít tốn kém và có khả năng ứng dụng cao vào tình hình thực tế hiện nay.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu thực vật

45 mẫu lá dưa leo được thu thập tại các xã An Nhơn Tây, Trung Lập Thượng, Tân Thông Hội thuộc huyện Củ Chi thành phố Hồ Chí Minh và xã An Cư, xã Hòa Khánh thuộc huyện Cái Bè, xã Thanh Bình thuộc huyện Chợ Gạo tỉnh Tiền Giang, và tại xã Ka Đô, thị trấn Liên Nghĩa, tỉnh Lâm Đồng.

Bảng 1. Điểm địa và kí hiệu mẫu lá dưa leo được thu thập

Nơi thu mẫu			Số hộ	Số mẫu thu thập	Kí hiệu mẫu thu thập
Tỉnh	Huyện	Xã			
Thành phố Hồ Chí Minh	Hóc Môn	Xuân Thới Sơn	3	8	XTS – 1A, XTS – 2A, XTS – 3A, XTS – 4A, XTS – 5A, XTS – 6A, XTS – 7A, XTS – 8A
		Xuân Thới Thượng	3	7	XTT – 1A, XTT – 2A, XTT – 3A, XTT – 4A, XTT – 5A, XTT – 6A, XTT – 7A
Tiền Giang	Chợ Gạo	Thanh Bình	3	8	TB – 1A, TB – 2A, TB – 3A, TB – 4A, TB – 5A, TB – 6A, TB – 7A, TB – 8A
	Cái Bè	Hòa Khánh	3	7	HK – 1A, HK – 2A, HK – 3A, HK – 4A, HK – 5A, HK – 6A, HK – 7A.
Lâm Đồng	Đơn Dương	Ka Đô	3	8	KD – 1A, KD – 2A, KD – 3A, KD – 4A, KD – 5A, KD – 6A, KD – 7A, KD – 8A
	TT Liên Nghĩa	TT Liên Nghĩa	3	7	LN – 1A, LN – 2A, LN – 3A, LN – 4A, LN – 5A, LN – 6A, LN – 7A

Phương pháp ELISA

Quy trình ly trích mẫu được thực hiện theo phương pháp của Clark và ctv (1997). Mẫu được cắt thành những mảnh nhỏ khoảng 0,5 g, sau đó được nghiền với dịch ly trích mẫu cho đến khi mẫu mịn và tan đều trong dịch trích. Cho tất cả dịch thu được vào Eppendorf 1,5 ml sạch, đem ly tâm 8.000 vòng/phút trong 3 phút ở 4⁰C. Sau đó hút phần dịch nổi ở trên, bỏ phần cặn, cho vào Eppendorf 1,5 ml sạch khác và giữ lạnh ở nhiệt độ 4⁰C. Thực hiện DAS - ELISA bằng kit CMV DAS – ELISA (DSMZ, Đức) theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Giá trị OD của mẫu được xác định ở bước sóng 405 nm, sau 1 giờ ủ.

Ly trích RNA

Mẫu lá dưa leo được nghiền trong nitơ lỏng cho đến khi mẫu nát mịn thì cho vào ống Eppendorf. Nếu lưu giữ mẫu phải để ở tủ đông -80⁰C.

RNA tổng số của dưa leo và vi rút được ly trích bằng kit Qiagen theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Quy trình onestep RT-PCR để phát hiện vi rút CMV

Quy trình RT PCR một bước để phát hiện vi rút CMV được thực hiện trong máy luân nhiệt (GeneAmp, PCR system 9700). Chu trình luân nhiệt: 50⁰C trong 15 phút; 94⁰C trong 5 phút; 40 chu kỳ lặp lại của 3 giai đoạn: 94⁰C trong 40 giây, 60⁰C trong 40 giây, 72⁰C trong 40 giây; cuối cùng 72⁰C trong 5 phút. Sản phẩm được giữ ở 4⁰C. Thành phần phản ứng mỗi xuôi (5'-GCG CAA AAC AAG CTT CTT ATC-3') (10 μ M), mỗi ngược (5'-GTA GAC ATC TGT GAC GCG A-3') (10 μ M), Master mix 1x, 50 ng RNA ly trích làm khuôn mẫu, H₂O. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên agarose gel 1,5%, với hiệu điện thế tại 80V trong 30 phút.

Tạo dòng và giải trình tự

Sản phẩm RT-PCR dương tính với CMV được dùng làm khuôn DNA để chèn vào vector pGEM T-easy (Promega) với thành phần phản ứng và thao tác thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Vector tái tổ hợp biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α tiến hành theo nghiên cứu của Sambrook và cộng sự (1989) có chỉnh sửa. Sau khi thực hiện phản ứng PCR chọn lọc được những dòng khuẩn lạc mang gen CMV, tiến hành ly trích plasmid mang gen của CMV bằng bộ kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). Plasmid sau khi được ly trích được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và đo OD để xác định hàm lượng. Sau đó dòng plasmid được khẳng định lại một lần nữa có mang gen CMV hay không bằng cách giải trình tự với cặp mồi SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') và M13_forward (5'-GTAAAACGACGGCCAGT- 3') có vị trí bắt cặp nằm trên plasmid pGEM T-easy. Tiến hành so sánh trình tự DNA được chèn trên plasmid với các trình tự gen CMV trên ngân hàng gen NCBI để khẳng định chính xác đoạn DNA thu được sau tạo dòng.

Xây dựng đường chuẩn định lượng gen CMV bằng kỹ thuật Real time PCR

Phản ứng Real time PCR sử dụng tín hiệu huỳnh quang SYBR Green được thực hiện với tổng thể tích là 25 μ l bao gồm SYBR Green PCR Master mix 1x, nồng độ cặp mồi là 0,5 μ M, 2 μ l mẫu DNA plasmid (hoặc cDNA mẫu). Phản ứng Real time PCR được thực hiện trên máy Applied Biosystems® 7500 Real time PCR Systems với chu trình nhiệt 94⁰C trong 10 phút; tiếp theo 40 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95⁰C thời gian 15 giây, bắt cặp ở 60⁰C thời gian 1 phút; cuối cùng thực hiện 1 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính sản phẩm ở 95⁰C thời gian 10 phút, 60⁰C thời gian 45 giây, sau cùng ở 72⁰C thời gian 15 giây.

Ứng dụng quy trình real-time PCR trong việc phát hiện CMV

Lấy một mẫu lá dưa leo nghi ngờ nhiễm CMV để kiểm tra lại quy trình real-time. Mẫu lá được ly trích bằng bộ kit ly trích RNA của hãng QIAGEN. Sau khi ly trích mẫu RNA được đo OD cho kết quả 87,3 mg/ μ l. Mẫu RNA sau khi ly trích dùng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại cDNA và dùng sản phẩm thu được để làm vật liệu cho phản ứng real-time định lượng CMV.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phát hiện CMV trên cây dưa leo bằng kỹ thuật ELISA

Địa bàn hai xã Xuân Thới Sơn và Xuân Thới Thượng, thuộc huyện Hóc Môn, thành phố Hồ Chí Minh có tỷ lệ mẫu dưa leo dương tính CMV vào khoảng 26,7%. Trong khi đó tỷ lệ mẫu dưa leo có kết quả dương tính từ địa bàn xã Thanh Bình, huyện Chợ Gạo và xã Hòa Khánh, huyện Cái Bè thuộc tỉnh Tiền Giang là 33,3% trên dưa leo, và ở tỉnh Lâm Đồng là 20,0% (Bảng 2). Như vậy, sự chênh lệch về tỷ lệ mẫu cho kết quả dương tính giữa dưa leo ở TP. Hồ Chí Minh, Tiền Giang và Lâm Đồng là không cao. Ở xã Xuân Thới Sơn – Hóc Môn và xã Thanh Bình – Chợ Gạo có tỷ lệ dưa leo nhiễm CMV cao nhất là 37,5%, xã Xuân Thới Thượng – Hóc Môn và thị trấn Liên Nghĩa – Lâm Đồng, có tỷ lệ dương tính thấp nhất là 14,3% (Bảng 2). Theo Huỳnh Vĩnh Khang (2006), tỷ lệ nhiễm CMV trên cây ớt được chẩn đoán bằng kỹ thuật ELISA là 88,90%; và theo Văn Ngọc Dung (2006), tỷ lệ nhiễm CMV trên cây thuốc lá ở 2 huyện Tân Biên và Tân Cầu thuộc tỉnh Tây Ninh đạt 50%, cao hơn so với tỷ lệ nhiễm CMV trên cây dưa leo trong nghiên cứu này. Sự so sánh khác biệt tỷ lệ nhiễm CMV với các nghiên cứu kể trên chỉ mang tính tương đối, vì trên các đối tượng cây ký chủ, thời điểm nghiên cứu khác nhau. Rất ít kết quả nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm CMV trên đối tượng dưa leo được báo cáo.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu dưa leo có kết quả dương tính CMV theo địa bàn điều tra

Thành phố / Tỉnh	Huyện	Xã	Số mẫu điều tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ mẫu dương tính (%)
Thành phố Hồ Chí Minh	Hóc Môn	Xuân Thới Sơn	8	3	37,5
		Xuân Thới Thượng	7	1	14,3
		Tổng	15	4	26,7
Tiền Giang	Chợ Gạo	Thanh Bình	8	3	37,5
		Cái Bè	7	2	28,6
		Tổng	15	5	33,3
Lâm Đồng	Đơn Dương	Ka Đô	8	2	25
			TT Liên	7	1
		Tổng	15	3	20,0

Việc dựa vào triệu chứng để thu thập mẫu không cho hiệu quả cao, trong 45 mẫu thu thập ít nhiều đều có triệu chứng nhiễm CMV, tuy nhiên, chỉ có 12 mẫu cho kết quả dương tính với ELISA. Một số nguyên nhân gây nên sự nhầm lẫn trong việc xác định triệu chứng cây nhiễm CMV có thể do ảnh hưởng của các yếu tố môi trường, do điều kiện canh tác của người dân như chế độ bón phân, phun thuốc trừ sâu đến hình thái, màu sắc của cây. Ngoài ra, một trong những nguyên nhân rất có khả năng xảy ra là một số bệnh có triệu chứng tương tự nhau, rất dễ gây nhầm lẫn. Nguyên nhân này phù hợp với điều kiện thu thập mẫu hiện tại,

ngoài các triệu chứng nhiễm CMV còn có một số triệu chứng khác của các bệnh sương mai phấn trắng, bệnh xoắn lá,...

Ngoài ra, mối tương quan giữa tỷ lệ mẫu bệnh và thời gian sinh trưởng của cây đã được khảo sát. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

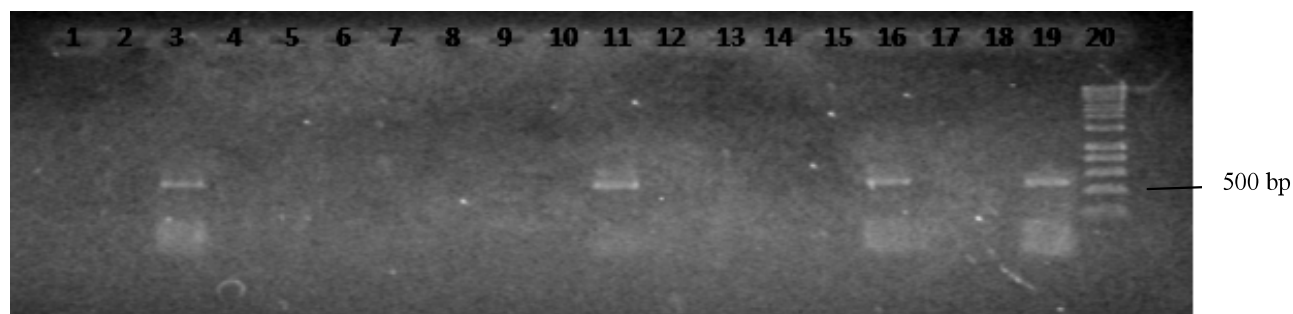
Bảng 3. Tỷ lệ mẫu dưa leo cho kết quả dương tính theo tuổi cây

Tuổi cây (ngày)	Số mẫu điều tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ mẫu dương tính (%)
15 – 30	15	6	40,00
30 – 45	20	5	25,00
45 – 60	10	1	10,00
Tổng	45	12	26,67

Tỷ lệ mẫu cho kết quả dương tính ở giai đoạn 15 – 30 ngày (giai đoạn đang phát triển) là khá cao: 40%. Tỷ lệ mẫu dương tính ở giai đoạn 30 – 45 ngày và 45 – 60 ngày giảm dần. Kết quả tỷ lệ nhiễm bệnh này có thể được lý giải là do ở giai đoạn đang phát triển, cây con có khả năng phòng bệnh còn yếu nên dễ mắc bệnh hơn so với các cây đã trưởng thành. Hơn nữa, có thể cây bị nhiễm bệnh nặng đã được phá bỏ, hoặc chết nên tỷ lệ nhiễm CMV trên mẫu dưa leo ở giai đoạn sau 30 ngày thấp hơn. Kết quả trên cũng cho thấy rằng cây dưa leo có thể bị nhiễm CMV ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng phát triển.

Phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT – PCR

Sau khi có kết quả chẩn đoán ELISA, những mẫu cho kết quả dương tính và các mẫu âm tính có giá trị OD gần với ngưỡng phát hiện dương tính CMV được chọn lọc để tiếp tục kiểm tra, chẩn đoán bằng kỹ thuật RT – PCR. Đoạn DNA mong muốn có kích thước 540 bp. Kết quả điện di các sản phẩm cDNA khuếch đại từ RT-PCR được trình bày ở các hình 1.



Hình 1. Sản phẩm PCR CMV dưa leo trên gel agarose 1,5% được điện di với hiệu điện thế 80V, thời gian 30 phút;

Giếng 1: đối chứng âm, Giếng 2-18: sản phẩm PCR của các mẫu dưa leo có biểu hiện bệnh, Giếng 19: đối chứng dương, Giếng 20: thang chuẩn 1 kb

Nhận thấy băng sản phẩm PCR ở các mẫu sáng, băng xuất hiện gần vạch 500 bp, vào khoảng 540 bp, gần đúng với kích thước theo lý thuyết.

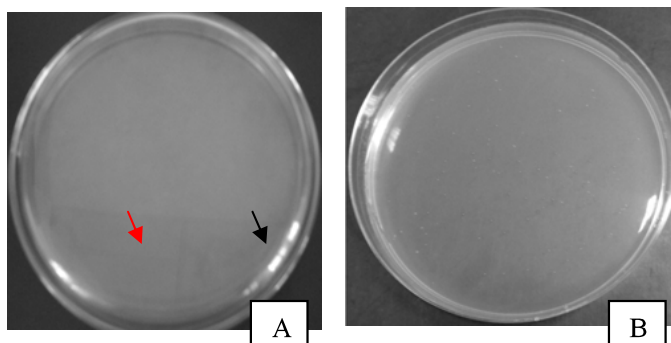
So sánh độ nhạy của 2 kỹ thuật ELISA và RT – PCR.

Từ 12 mẫu cho kết quả dương tính ở thí nghiệm ELISA sau khi chạy RT PCR, 100% mẫu tạo band 540 bp trên gel điện di. Trong 10 mẫu âm tính (4 mẫu của Tiền Giang, 3 mẫu

của Thành phố Hồ Chí Minh và 3 mẫu của Lâm Đồng) có giá trị OD gần nhất với giá trị ngưỡng phát hiện dương tính trong thí nghiệm chẩn đoán bằng phương pháp ELISA được tiến hành chạy RT PCR để so sánh độ nhạy của hai kỹ thuật RT PCR và ELISA. Kết quả cho thấy có 1 mẫu dưa leo của Tiền Giang dương tính (có tỷ lệ nhiễm 40%). Như vậy, trong thí nghiệm này, chúng tôi ghi nhận rằng kỹ thuật ELISA và RT PCR có độ nhạy khác biệt. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Niimi và ctv (2003) đã xây dựng quy trình phát hiện Cucumber mosaic virus (CMV), lily symptomless virus (LSV) and lily mottle virus (LMoV) gây bệnh trên cây hoa Lili bằng kỹ thuật RT-PCR. Dùng môi thoái hóa, RT-PCR cho những band đặc hiệu với từng loại virus. Kết quả 18 trong số 22 cây trồng thử nghiệm với ít nhất một loại vi rút đã được phát hiện bởi RT-PCR, đạt 81,8%. Trong khi đó với phương pháp ELISA chỉ phát hiện 4 cây, đạt 18,2% .

Tạo dòng và giải trình tự

Biến nạp plasmid pGEM – T đã chèn đoạn DNA của CMV vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α khả nạp. Tế bào vi khuẩn sau khi được biến nạp tổ hợp plasmid có chứa đoạn gen CMV được nuôi cấy qua đêm trên đĩa môi trường LB dạng thạch có Carbenicillin/IPTG/X – gal xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh và trắng tách rời. Các khuẩn lạc màu trắng mọc rời rạc, mật độ không quá dày rất phù hợp để thu nhận khuẩn lạc kiểm tra khả năng thành công của thí nghiệm tạo dòng gen bằng phản ứng PCR và nuôi cấy tăng sinh cho li trích.



Hình 2. Các khuẩn lạc vi khuẩn nuôi cấy trên đĩa thạch môi trường LB chứa Carbenicillin, X-gal, IPTG.

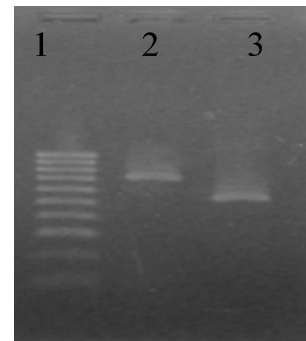
(a) vi khuẩn sau khi thực hiện biến nạp plasmid mang trình tự CMV, (b) đĩa đối chứng âm vi khuẩn không được biến nạp plasmid; khuẩn lạc màu xanh \rightarrow , khuẩn lạc màu trắng \rightarrow

Kiểm tra sự hiện diện của gen CMV trên DNA plasmid bằng PCR

Để kiểm tra kết quả ly trích DNA plasmid có mang gen CMV hay không, mẫu DNA plasmid sau ly trích được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi M13, SP6. Sản phẩm PCR mẫu DNA plasmid thu nhận được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%. Hình kết quả điện di với các băng sản phẩm DNA plasmid rõ nét, cho thấy DNA plasmid được trích ly tốt, và đoạn gen CMV đã được gắn trên plasmid này.

Hình 3. Kết quả điện di plasmid ly trích trên gel agarose

1,5%. Giếng 1: ladder 100 bp, Giếng 2: plasmid được ly trích từ dòng khuẩn lạc, Giếng 3: sản phẩm PCR mẫu DNA



Giải trình tự plasmid

Kích thước trình tự của đoạn gen đích xác định bởi cặp mồi M13, SP6 thu nhận được có kích thước khoảng 740 bp. Kết quả giải trình tự 2 chiều bằng phần mềm Bioedit để tổng hợp nên mạch trình tự chính xác nhất.

```
TATTTATGTTGTACGACGGCCAGTGAATTGTCGAACGACTACTATAGGGCGAATT
GGGCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGTG
ACGCGATGTTGTGTTGAGAAGGGATCACATCTGGTTTTAGCAAACCCACATCATT
AGCTTTGAGGTTCAATTCCTCTTGCTCCCTGATGGGCTCCTTTGCTTTTTTCATGGAT
GCTTCTCCACGAGATTGCGTTTCGTCTACTTATCGTTTGAGTGTAGTGCTGTGTTTT
CTCTTTCGTGTTGTAGATTTGAGTCGAGTCGAGTCATGGGCAAATCTGAATCAAC
CAGTGCTGGTCGCATCCGTCGACGTCGTCGCGTCGTGGTTCGCTCCGCTTCCT
CCTCTGCGGATGCTACCTTTAGAGTCCTGTCGCAACAGCTTTCGCGACTTAATAAG
ACGTTAGCAGCTGGTCGTCCTACTATTAACCACCAACCTTTGTGGGTAGTGAGC
GTTGTAAACCTGGATACACGTTACATCTATCACCTGAAGCCACCGAAAATAGA
CCGTGGGTCTTATTATGGTAAAAGTTGTTGCTTCCTGATTCAGTCACTGAGTTCG
ATAAGAAGCTTGTTCGCGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGA
CCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT
CACCTTAAATAT.
```

Sau khi thực hiện so sánh độ tương đồng bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy từ vị trí nucleotide thứ 101 đến nucleotide 630 của trình tự sản phẩm PCR với 2 cặp mồi M13 và SP6 có sự tương đồng 94% so với các trình tự của CMV đã công bố với mã số truy cập là KM272275.1, KM272276.1, JX025999.1, JX025989.1. Những kết quả thu được đã khẳng định dòng plasmid tái tổ hợp mang trình tự CMV đã được tạo dòng thành công. Kết quả đo OD dòng plasmid này có nồng độ 20 ng/ μ l và tương ứng với $5,21 \times 10^9$ bản sao/ μ l. Dòng plasmid này sẽ được sử dụng làm đối chứng dương trong quy trình phát hiện CMV bằng phương pháp RT-PCR một bước đã được cải tiến trong nghiên cứu này. Hơn thế nữa, dòng plasmid này có thể sử dụng như chuẩn plasmid trong nghiên cứu định lượng CMV bằng phương pháp Real time RT-PCR một bước sử dụng chất phát huỳnh quang SYBR Green.

Kết quả Real-time PCR

Xây dựng đường chuẩn định lượng từ plasmid pGEM-Teasy mang trình tự CMV

Plasmid sau khi ly trích được đo OD để xác định số bản copy, kết quả đo OD cho thấy hàm lượng plasmid thu được là 20 ng/ μ l tương ứng với $5,21 \times 10^9$ copy plasmid. Kết quả Real time PCR với các mẫu DNA plasmid được dùng làm mẫu chuẩn cho thấy đường cong khuếch đại cho tín hiệu đẹp không bị nhiễu và giá trị chu kỳ ngưỡng Ct cao. Đường nền (base line) cắt các đường cong của tín hiệu huỳnh quang tại các giá trị chu kỳ tương đối đều nhau và giá trị Ct sắp xếp theo thứ tự từ thấp đến cao tương ứng với mẫu chuẩn có độ pha loãng từ cao tới

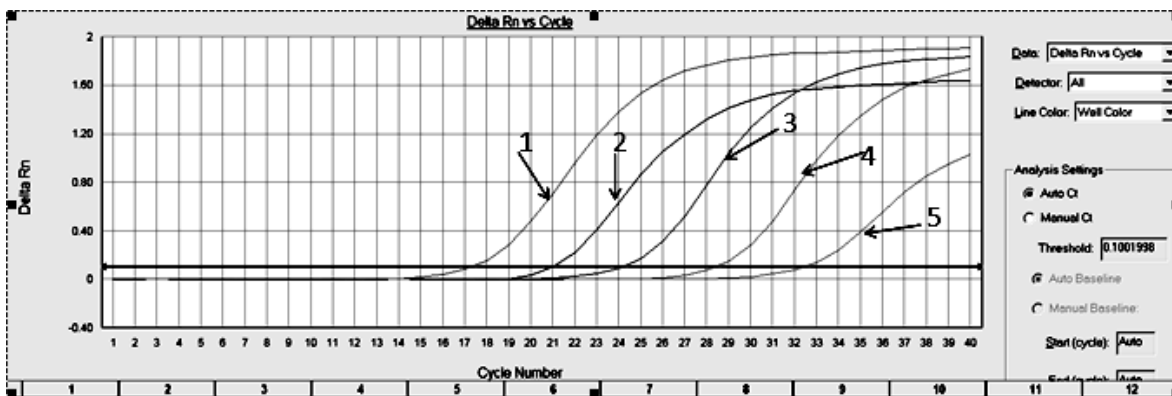
thấp từ giá trị 10^8 copy, 10^7 copy, 10^6 copy, 10^5 copy, 10^4 copy. Điều này cho thấy các mẫu DNA plasmid được pha loãng tốt, các mẫu DNA plasmid có mang gen CMV với số lượng bản copy khác nhau.

Độ nhạy và kết quả định lượng chính xác còn được khẳng định thông qua đường chuẩn (standard curve) đó là đường thẳng tuyến tính biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng Ct với lượng bản sao đích ban đầu trong từng mẫu chuẩn.

Từ kết quả số liệu của Ct và số bản copy CMV cũng là số copy DNA plasmid thu nhận được từ phản ứng Real-time PCR (Bảng 4, hình 4), một đường chuẩn được xây dựng có phương trình: $y = -3,7639x + 47,3113$ với y là giá trị Ct, x là Log (số bản copy gen CMV) có giá trị hệ số tương quan tương đối cao là $R^2 = 0,99796$.

Bảng 4. Số bản copy trong các mẫu DNA plasmid sử dụng cho phản ứng Real time PCR

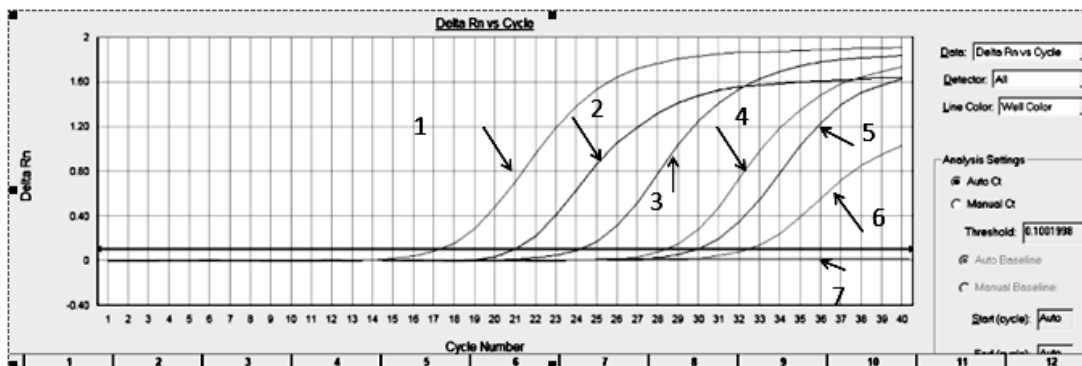
Ký hiệu mẫu	Tỷ lệ pha loãng mẫu DNA	Số bản copy CMV	Ct (Chu kỳ)
DNA plasmid 1	1:10 ¹	5,21 x 10 ⁸	17,32
DNA plasmid 2	1:10 ²	5,21 x 10 ⁷	21,00
DNA plasmid 3	1:10 ³	5,21 x 10 ⁶	24,17
DNA plasmid 4	1:10 ⁴	5,21 x 10 ⁵	28,37
DNA plasmid 5	1:10 ⁵	5,21 x 10 ⁴	30,19



Hình 4. Kết quả phản ứng Real-time PCR với các mẫu DNA plasmid dùng làm mẫu chuẩn
(1) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^8$ copies; (2) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^7$ copies; (3) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^6$ copies; (4) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^5$ copies; (5) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^4$ copies.

Ứng dụng quy trình real-time PCR trong việc phát hiện CMV

Với đường chuẩn xây dựng được, mẫu cDNA được chọn để định lượng CMV, kết quả thể hiện trên hình 5.



Hình 5. Kết quả phản ứng Real time PCR định lượng cDNA từ mẫu dưa leo thực tế cần khảo sát

(1) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^8$ copies; (2) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^7$ copies; (3) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^6$ copies; (4) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^5$ copies; (5) Mẫu thực tế cần khảo sát (6) Mẫu DNA plasmid có $5,21 \times 10^4$ copies; (7) Mẫu âm.

Kết quả thực hiện phản ứng Real time PCR trên mẫu cDNA của CMV được và 5 mẫu chuẩn cho thấy có sự có mặt của CMV trong mẫu kiểm tra (hình 5). Kết quả sau khi thực hiện real-time khuếch đại được copy DNA của CMV. Mẫu đối chứng âm không có tín hiệu huỳnh quang chứng tỏ phản ứng Real time PCR không bị tạp nhiễm. Dựa vào phương trình hồi quy của đường chuẩn, mẫu thực tế cần khảo sát có khoảng $6,09 \times 10^5$ copies.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Trong nghiên cứu này có sự khác biệt về độ nhạy phát hiện trên đối tượng vi rút CMV gây hại trên cây dưa leo giữa kỹ thuật ELISA và RT – PCR. Tỷ lệ nhiễm CMV trên dưa leo được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR cho thấy rằng tỉnh Tiền Giang có tỷ lệ dưa leo nhiễm CVM là 40% cao hơn so với Thành phố Hồ Chí Minh (26,7%) và Lâm Đồng (20%). Tạo dòng thành công plasmid mang gen của CMV. Sản phẩm tạo dòng DNA plasmid trong nghiên cứu này đã được ứng dụng để tạo đường chuẩn cho định lượng CMV bằng phương pháp Real time PCR. Xây dựng được đường chuẩn cho định lượng CMV trên dưa leo bằng phương pháp Real-time PCR có phương trình hồi quy $y = -3,7639x + 47,3113$ với độ tin cậy cao ($R^2 = 0,99796$). Đã ứng dụng đường chuẩn cho việc phát hiện mẫu dưa leo thực nhiễm CMV với số lượng là $6,09 \times 10^5$ copies cDNA.

Đề nghị

Ứng dụng quy trình định lượng đã được xây dựng trong nghiên cứu này để khảo sát mối tương quan giữa lượng vi rút trong các mẫu cây bệnh với biểu hiện bệnh CMV trên một số cây họ bầu bí, cà chua. Nghiên cứu, đánh giá mức độ đa dạng di truyền của vi rút CMV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bhat A.I., and S.Siju. 2007. Development of a single – tube multiplex RT – PCR for the simultaneous detection of *Cucumber mosaic virus* and *Piper yellow mottle virus* associated with stunt disease of black pepper. *Current science* 93: 973 – 976.
- Choi Gug-Seoun. 2011. Occurrence of Two Tobamovirus Diseases in Cucurbits and Control Measures in Korea. *Plant Pathol. J.* 17(5) : 243-248.

- Clark M.F., and Adam. 1997. Characteristics of the microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology* 34: 475 – 484.
- Huỳnh Vĩnh Khang. 2006. Nghiên cứu một số virus (TMV, CMV) gây bệnh trên cây Ớt tại huyện Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh bằng kỹ thuật ELISA và xây dựng quy trình phát hiện CMV bằng kỹ thuật RT – PCR. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
- Lee JS, Cho WK, Lee SH, Choi HS, Kim K-H. 2011. *Development of RT-PCR based method for detecting five non-reported quarantine plant viruses infecting the family Cucurbitaceae or Solanaceae*. *Plant Pathol J.* 27:93–97.
- Lin, Luis Rubio, Ashleigh Smythe, Manuel Jiminez and Bryce W. Falk. 2004. *Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber Mosaic Virus*. *J Virol* 78(12):6666-75.
- Jacquemond M. 2012. *Cucumber Mosaic Virus*. *Advances in Virus Research*, Volume 84. ISSN 0065-3527, DOI: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0.
- Niimi Y., Dong-Sheng Han, Shiro Mori, Hitoshi Kobayashi. 2003. *Detection of Cucumber Mosaic Virus, Lily Symptomless Virus And Lily Mottle Virus in Lilium species by RT-PCR technique*, *Scientia Horticulturae*, Volume 97, Issue 1, 3 January 2003, Pages 57–63.
- Palukaitis P and Garica-Arenal F. 2003. *Cucumoviruses*. *Adv Virus*, 62:241–323
- Văn Ngọc Dung. 2006. Đánh giá tình trạng nhiễm cucumber mosaic virus, tobacco mosaic virus, tomato stotted will virus trên cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và cây đậu phộng (*Arachis hypogaea*) tại tỉnh Tây Ninh và chẩn đoán tobacco mosaic virus bằng kỹ thuật RT - PCR. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
- Vũ Triệu Mân. 2007. *Giáo trình bệnh cây đại cương*. Hà Nội.