

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đỗ Ngọc Quý (1980), *Trồng chè*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Nguyễn Văn Tạo (1998), *Các phương pháp quan trắc thí nghiệm đồng ruộng chè (Phần nông học)*, Tuyển tập các công trình nghiên cứu về chè (1988 - 1997), NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Nguyễn Văn Hùng, Nguyễn Văn Tạo- *Quản lý cây chè tổng hợp*, NXBNông nghiệp, 2006.
4. Quy trình kỹ thuật trồng, chăm sóc và thu hoạch chè, 10 TCN-446-2001, Hà Nội.
5. Barua. D. N. (1989), *Science and Practice in Tea Culture*, Calcutta - Jorhat, India, First Published.

Ngày nhận bài: 5/3/2012

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Ván ,

ngày 7/3/2012

Ngày duyệt đăng: 20/3/2012

**BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ ADN  
CỦA MỘT SỐ CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH TẦM BỤNG Ở VIỆT NAM**

Nguyễn Thúy Hạnh, Liujiaping

**SUMMARY**

**The study preliminary determined ADN's order of some virus strains cause for *Bombyx mori* nuclear polyhedron diseases**

The current study introduces methods of collection, separation, and determination of ADN structure of NPV virus (Nuclear Polyhedrosis Virus) and ArNPV virus (Attacus ricini Nuclear Polyhedrosis Virus) in sericulture. Virus samples collected from Quang Dong in China, Lam Dong and Ha Noi in Vietnam. Results from PCR analysis and structure analysis (using a software) showed the difference of nucleic acid concentration in ADN of virus. Based on these results, producers can determine source of virus as well as have a better plan for prevention and treatment to silkworm virus diseases.

**Keywords:** Silkworm (*Bombyx mori*), *Attacus ricini*, BmNPV, Gene *polh*.

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Bệnh tầm bụng còn gọi là bệnh virus nhân đa diện (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) là 1 loại bệnh thường gặp trong quá trình nuôi tằm. Đây là 1 loại bệnh truyền nhiễm. Nguyên nhân là do virus NPV (nuclear polyhedrosis virus) gây nên, virus này ký sinh ở tế bào máu và các tổ chức nhân tế bào và có hình thành đa giác thể (nên gọi là virus đa giác thể). Đây là loại bệnh truyền nhiễm cấp tính, ở những nơi có điều kiện nuôi tằm không tốt, bệnh tầm bụng bùng phát mạnh

gây tổn thất rất nghiêm trọng đối với các hộ nuôi tằm.

Trên thế giới đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu truyền thống và phương pháp ứng dụng công nghệ sinh học để tách chiết phân lập virus, đã tìm ra nguyên nhân, nguồn gốc, phân lập các chủng loại virus gây bệnh và từ đó đã có được những biện pháp, định hướng phòng trừ bệnh tầm bụng để hạn chế tổn thất. Ở Việt Nam, công tác nghiên cứu bệnh hại tằm nói chung và bệnh tầm bụng nói riêng còn rất ít, hiện nay mới bắt đầu. Nhận

thấy ý nghĩa quan trọng của nghiên cứu bệnh tằm, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: “*Bước đầu xác định trình tự ADN của 1 số chủng virus gây bệnh tằm bùng ở Việt Nam*”. Đề tài này được thực hiện tại trường Đại học Nông nghiệp Hoa Nam, tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu của đề tài là cơ sở dữ liệu cho việc xác định nguồn gốc của các chủng virus hại tằm, thông qua việc xác định nguồn gốc có thể thăm dò tìm ra định hướng và giải pháp phòng trừ bệnh bùng hại tằm hạn chế tổn thất.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

- Virus đa giác thể gây bệnh hại tằm dâu (gọi tắt là BmNPV) được thu thập tại Quảng Đông, Hà Nội, Lâm Đồng (ký hiệu lần lượt là BmNPV-Gđ; BmNPV-Hn; BmNPV-Lđ) và virus đa giác thể gây hại trên tằm thâu dầu (gọi tắt là ArNPV) thu thập tại Hà Nội (kí hiệu là ArNPV-Hn).

- Giống tằm tứ nguyên: 932. Phù Dung  $\times$  7532. Tương Huy do Trung tâm chuyên giao giống tằm Quảng Đông cung cấp.

Thiết bị và hóa chất chủ yếu: Agarose, EDTA, Marker 2000 bp, Protein K (PK), Loading Buffer, *Taq* DNA Polymerase, dNTPs, phenol, chloroform (do công ty trách nhiệm hữu hạn Tiangen sản xuất), nước cất, cồn, máy PCR PE Applied Biosystem 9700 do Mỹ sản xuất, hệ thống chụp ảnh UVP (sản xuất tại Anh).

### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Nuôi cấy virus đa giác thể

Mỗi chủng virus, lấy 25 ml dung dịch huyền phù BmNPV, nồng độ pha loãng là

$10^6$  tế bào/ml cho vào cốc thủy tinh. Cắt lá dâu thành những miếng nhỏ có kích thước là  $2 \times 2$  cm, sau đó tiến hành ngâm lá dâu đã cắt vào dung dịch huyền phù BmNPV (thấm đều 2 mặt của lá dâu). Dùng đũa đảo đều cho lá dâu thấm đều dung dịch huyền phù BmNPV, sau đó tiến hành cho tằm tuổi 4 ăn. Sau 6 giờ, tiến hành quan sát cách ăn dâu. Mỗi ngày theo dõi quan sát tình hình phát sinh của bệnh.

#### 2.2. Thu thập và phân lập virus BmNPV

Thu thập tằm bệnh theo từng chủng virus. Dùng dao cắt chân đuôi để cho dung dịch máu có màu trắng sữa chảy vào trong bình tam giác nhỏ. Bịt kín miệng bình tam giác, bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$ .

Lấy 13ml dung dịch màu trắng sữa cho vào ống li tâm 1,5 ml, điều chỉnh cân bằng và tiến hành ly tâm 2500-3000 vòng/1 phút, ly tâm 20 phút. Đổ bỏ phần nước ở phía trên. Phần kết tủa cho thêm nước đến 13ml, lắc đều và tiếp tục ly tâm 2-3 lần. Đổ bỏ phần nước ở phía trên, có thể quan sát thấy kết tủa phân thành 3 tầng, tầng trên cùng có màu vàng nhạt, tầng giữa có màu trắng sữa, tầng cuối cùng có màu đen. Thêm 2-3ml nước vô trùng, nhẹ nhàng đổ bỏ phần dịch màu vàng nhạt. Tiếp tục thêm 2-3ml nước vô trùng, cẩn thận hút lấy 10ml phần dịch có màu trắng sữa chuyển sang ống li tâm 1.5ml mới, bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3. Phương pháp chiết tách ADN tổng số của virus đa giác thể BmNPV và ArNPV

Sau khi pha loãng, tiến hành ly tâm 5000 vòng/1 phút, ly tâm 10 phút. Đổ bỏ phần nước phía trên, thêm 1ml dung dịch

đệm (bao gồm: 10 nmol/l Tris - Cl, 1 mol/l EDTA, 0,5% SDS), dùng pipét nhẹ nhàng khuấy đều, thêm 400-500 µg/ml protein K, lắc nhẹ. Sau đó cho vào nồi nước 50°C từ 2-5 giờ. Sau đó, tiếp tục thêm 500ml Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25: 24: 1) vào lắc đều, ly tâm 12000 vòng/1 phút, ly tâm 10 phút. Dùng pipet nhẹ nhàng hút chuyển phần nước ở trên sang 1 ống li tâm mới, tiếp tục thêm 500ml Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25: 24: 1) vào, ly tâm 12000 vòng/1 phút, ly tâm 10 phút. Lại dùng pipet hút lấy phần nước ở trên sang ống li tâm mới. Thêm ethanol đến thể tích 1.5ml, bảo quản ở -20°C trong 2 giờ để hình thành kết tủa. Tiếp tục ly tâm 12000 vòng/1 phút, ly tâm 5 phút, đổ bỏ phần nước ở phía trên, phần kết tủa ở phía dưới là ADN. Dùng 1ml cồn 70° để rửa kết tủa. Sau đó hong khô để cồn bay hơi hoàn toàn. Cho 20 µL TE (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA) pH 8 vào hòa tan kết tủa và bảo quản ở -20°C.

#### **2.4. Chạy PCR kiểm tra các đoạn ADN**

Sử dụng cặp mồi Phy35/Phy36 có nguồn gốc từ gen *polh* của virus BmNPV.

Phy 35: 5'-  
ACYTAYGTGTACGACAACAAATAYT  
ACAAA-3'(30bp)

Phy 36: 5'-  
GGYGCGTCKGGYGCAAAYTCYTTWA  
CYTTRAA-3'(32bp)

Tm=50 °C

(Chú ý: Y là T hoặc C; R là A hoặc G; K là T hoặc G; W là A hoặc T; S là G hoặc C; M là A hoặc C)

Cặp mồi này do Công ty Trách nhiệm hữu hạn Kỹ thuật sinh vật Anh Xuân-

Thượng Hải thiết kế, được dùng trong chu trình PCR khuếch đại gen của ADN virus đa giác thể hại tằm.

Điều kiện để phản ứng PCR xảy ra như sau:

10×PCR Buffer	5µl
dNTP Mixture	4µl
Mồi trên	1µl
Mồi dưới	1µl
DNA	1,5µl
Enzim Taq (2.5 U/µl)	0,25µl
ddH <sub>2</sub> O	37,25 µl

Bước 1: khởi đầu 94°C 5 min; bước 2: biến tính 94°C 45s; bước 3: Gắn mồi 50°C 45s; bước 4: kéo dài 72°C 1 min (các bước từ 2-4 được lặp lại 42 vòng tuần hoàn); bước 5: Kéo dài ở 72°C trong 10 phút; bước 6: giữ hỗn hợp ở 4°C.

#### **2.5. Xác định trình tự đoạn ADN đặc hiệu của các chủng virus**

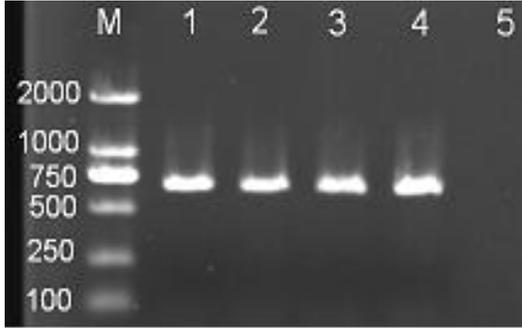
Sử dụng NCBI BLAST để xác định trình tự đoạn ADN đặc hiệu đã thu được của các chủng virus.

### **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **1. Kết quả chiết tách ADN tổng số của các chủng BmNPV.**

Sau khi phân lập và xác định các chủng NPV theo phương pháp phân tích vi sinh vật đơn giản, từ kết quả tách chiết và thu nhận ADN tổng số tiến hành kiểm tra kết quả bằng việc khuếch đại gel dựa trên ADN tổng số của các chủng virus. Sản phẩm ADN tổng số của 4 mẫu virus được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,2%, đệm TAE 1x và nhuộm Goldview. Kết quả cho thấy 4 mẫu bệnh

tầm khi điện di đều thu được hình ảnh ADN tổng số. Trên ảnh điện di, hình ảnh ADN của các chủng virus đều có kích thước khoảng 600-700bp.



M. Macker phân tử lượng 2000 bp; 1-3. Sản phẩm ADN virus đa giác thể hại tầm dâu có nguồn gốc từ Quảng Đông, Hà Nội, Lâm Đồng. 4. Là sản phẩm ADN virus đa giác thể hại tầm thâu dầu có nguồn gốc từ Hà Nội; 5. Đối chứng

Hình 1: Sản phẩm PCR môi Phy35/Phy36 của virus đa giác thể của các vùng địa lý

Kết quả phân tích PCR 4 mẫu ADN của 4 loại virus hại tầm dâu và tầm thâu dầu ở địa điểm khác nhau thể hiện ở hình 1.

**2. Kết quả phân tích hàm lượng acid Nucleic của các chủng BmNPV**

Kết quả phân tích PCR của 4 mẫu virus với cặp môi Phy35/Phy36 cho thấy 4 mẫu ADN của 4 loại virus đều xuất hiện băng phản ứng PCR được nhân lên. Các băng có kích thước tương tự nhau, kích thước khoảng 500-750bp. 4 mẫu ADN của các chủng virus đã được tiến hành phân tích xác định trình tự (Kết quả thể hiện ở bảng 1). Bảng 1 còn cho thấy hàm lượng nucleotid trong đoạn ADN của 4 loại virus được nhân lên. Nhìn vào đó ta có thể thấy đoạn ADN các chủng virus khác nhau về cấu trúc và hàm lượng A, T, G, C. Trong đó, 2 loài virus có nguồn gốc từ Hà Nội và Lâm Đồng giống nhau về kích thước và hàm lượng các acid nucleotid trong đoạn gen đã được nhân lên.

Bảng 1. Hàm lượng acid nucleotid của các loại virus thí nghiệm

Tên Virus	A (%)	C (%)	G (%)	T (%)	A+T (%)	G+C (%)	Kích thước (bp)
BmNPV-Gđ	30,67	25,00	22,70	21,63	52,30	47,70	652
BmNPV-Hn	30,51	24,96	23,11	21,42	51,93	48,07	649
BmNPV-Lđ	30,51	24,96	23,11	21,42	51,93	48,07	649
ArNPV-Hn	30,69	23,66	23,05	22,60	53,28	46,72	655

Nhìn vào bảng 1 có thể thấy đoạn ADN các chủng virus khác nhau về cấu trúc và hàm lượng A, T, G, C. Trong đó, 2 loài virus có nguồn gốc từ Hà Nội và Lâm Đồng giống nhau về kích thước và hàm lượng các acid nucleotid trong đoạn gen đã được nhân lên. Hàm lượng A+T từ 51,93%-53,28%, hàm lượng G+C chỉ có 46,72%-48,07%. Từ hàm lượng 4 loại acid

nucleotid cho thấy Adenin có hàm lượng cao nhất, chiếm khoảng 30%. Timin có hàm lượng thấp nhất từ 21,40%-22,60% Guanin và Cytosin có hàm lượng tương đương khoảng 23-24%. Kết quả kiểm tra còn cho thấy đoạn ADN của virus đa giác thể hại tầm dâu và virus đa giác thể hại tầm thâu dầu khác nhau rõ rệt về hàm lượng A, T, G, C.

**3. Kết quả xác định trình tự ADN của các chủng BmNPV**

**3.1 Trình tự đoạn ADN đặc hiệu của chủng virus BmNPV có nguồn gốc từ Quảng Đông**

ACTTTGGGGGCTGTCTTATCAAAAACGCCAAGCGCAAGAAGCACCTAGTCGAACATGA  
ACAAGAGGAGAAGCAATGGGATCTTCTAGACAACACTACATGGTTGCCGAAGATCCCTTT  
TTAGGACCGGGCAAAAACCAAAAACCTTACCCTTTTTAAAGAAATTCGCAGTGTGAAAC  
CCGATACCATGAAGTTAATCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTTTGCCTGAAACTTG  
GACCCGTTTTGTTGAGGACAGCTTCCCCATTGTAAACGACCAAGAGGTGATGGACGTG  
TACCTCGTCGCCAACCTCAAACCCACACGCCCCAACAGGTGCTACAAGTTCCTCGCTC  
AACACGCTCTTAGGTGGGAAGAAGACTACGTGCCCCACGAAGTAATCAGAATTGTGG  
AGCCATCCTACGTGGGCATGAACAACGAATACAGAATTAGTCTGGCTAAAAAGGGCG  
GCGGCTGCCAATCATGAACATCCACAGCGAGTACACCAACTCGTTCGAGTCGTTTTGT  
GAACCGGTCATATGGGAGAAGTTCTACAAACCCATCGTTTACATCGGCACAGACTCT  
GCCGAAGAAGAGGAAATCCTAATTGAGGTTTCTCTCGTTTTCAAAGTAAAAGAATTTG  
CACCAGACGCACCACT

**3.2 Trình tự đoạn ADN đặc hiệu của chủng virus BmNPV có nguồn gốc từ Hà Nội và Lâm Đồng**

CTTGGGGGCTGTCTTATCAAACGCCAAGCGCAAGAAGCACCTAGTCGAACATGAACAA  
GAGGAGAAGCAATGGGATCTTCTAGACAACACTACATGGTTGCCGAAGATCCCTTTTTAG  
GACCGGGCAAAAACCAAAAACCTTACCCTTTTTAAAGAAATTCGCAGTGTGAAACCCGA  
TACCATGAAGTTAATCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTTTGCCTGAAACTTGGACC  
CGTTTTGTTGAGGACAGCTTCCCCATTGTAAACGACCAAGAGGTGATGGACGTGTACC  
TCGTCGCCAACCTCAAACCCACACGCCCCAACAGGTGCTACAAGTTCCTCGCTCAACA  
CGCTCTTAGGTGGGAAGAAGACTACGTGCCCCACGAAGTAATCAGAATTGTGGAGCCA  
TCCTACGTGGGCATGAACAACGAATACAGAATTAGTCTGGCTAAAAAGGGCGGCGGC  
TGCCCAATCATGAACATCCACAGCGAGTACACCAACTCGTTCGAGTCGTTTGTGAACC  
GCGTCATATGGGAGAAGTTCTACAAACCCATCGTTTACATCGGCACAGACTCTGCCGA  
AGAAGAGGAAATCCTAATTGAGGTTTCTCTCGTTTTCAAAGTAAAAGAATTTGCACAG  
GGACGCCACCAA

**3.3 Trình tự đoạn ADN đặc hiệu của chủng virus ArNPV có nguồn gốc từ Hà Nội**

GGATTTGTTCTGGCGGTATCACGACTTTCGCGACGCAGACCACAGCCACTAGTCGAAC  
ATGAACAAGAGGAGAAGCAATGGGATCTTCTAGACAACACTACATGGTTGCCGAAGATC  
CCTTTTTAGGACCGGGCAAAAACCAAAAACCTTACCCTTTTTAAAGAAATTCGCAGTGT  
GAAACCCGATACCATGAAGTTAATCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTTTGCCTGAA  
ACTTGGACCCGTTTTGTTGAGGACAGCTTCCCCATTGTAAACGACCAAGAGGTGATGG  
ACGTGTACCTCGTCGCCAACCTCAAACCCACACGCCCCAACAGGTGCTACAAGTTCCT  
CGCTCAACACGCTCTTAGGTGGGAAGAAGACTACGTGCCCCACGAAGTAATCAGAATT  
GTGGAGCCATCCTACGTGGGCATGAACAACGAATACAGAATTAGTCTGGCTAAAAAG  
GGCGGCGGCTGCCAATCATGAACATCCACAGCGAGTACACCAACTCGTTCGAGTCGTT  
TTGTGAACCGGTCATATGGGAGAAGTTCTACAAACCCATCGTTTACATCGGCACAGA  
CTCTGCCGAAGAAGAGGAAATCCTAATTGAGGTTTCTCTCGTTTTCAAAGTAAAAGAA  
TTTGCACCGAACGCCACCA

Từ kết quả xác định trình tự ADN của 4 chủng virus cho thấy virus gây bệnh bùng tằm dâu (BmNPV) và tằm thâu dầu (ArNPV) có trình tự ADN khác nhau. Ngoài ra còn thấy 2 chủng BmNPV có nguồn gốc từ Hà Nội và Lâm Đồng giống nhau về trình tự ADN và khác chủng BmNPV có nguồn gốc Quảng Đông.

#### IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả tách chiết ADN sau khi thu thập các mẫu tằm bùng tại 1 số địa phương, thông qua phương pháp xác định trình tự đã xác định được trình tự các đoạn ADN của các chủng virus hại tằm. Kết quả còn cho thấy virus gây bệnh bùng tằm dâu và tằm thâu dầu có trình tự ADN khác nhau, đồng

nghĩa với việc 2 chủng virus này có nguồn gốc khởi thủy khác nhau.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Huy Trí, 2004. *Nghiên cứu bệnh truyền nhiễm ở tằm dâu Bombyx Mori Line và biện pháp phòng chống chúng ở vùng đồng bằng sông Hồng*. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp, trang 250-254, 68.39.43
2. Nguyễn Huy Trí, 1998. *Bệnh và ký sinh trùng tằm dâu*. Nhà xuất bản Giáo dục, trang 37-53

Ngày nhận bài: 20/2/2012

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Viêt,  
ngày 25/2/2012

Ngày duyệt đăng: 20/3/2012