

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ MẠT DỊ NGUYÊN *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* CỦA VIỆT NAM VÀ GIÁM ĐỊNH PHÂN LOẠI BẰNG CHỈ THỊ GEN TY THỂ 12S

PHẠM QUANG HOÀI,
Học viện Quân y

TÓM TẮT

Từ lô mạt nuôi mạt làm dị nguyên (ký hiệu DpT5), đoạn gen 12S (395 bp) của hệ gen ty thể được thu nhận bằng phương pháp PCR, giải trình tự và phân tích đặc tính sinh học phân tử. Chuỗi gen 12S của mạt thu ở lô DpT5 được đưa vào phân tích đồng nhất và phả hệ trên cơ sở so sánh với các chủng *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart 1897, *D. farinae* Hughes, *Aleuroglyphus ovatus* (Troupeau) (Acarina: Acaridae), *Blomia tropicalis* và *Glycyphagus privatus* Oudemans, 1903. Kết quả cho thấy, trình tự gen 12S thu nhận từ dòng mạt DpT5-VN của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất rất cao (98 - 99%) với các chủng thuộc loài *D. pteronyssinus* của Mỹ, trong khi đó, chỉ có 84 - 85% với *D. farinae* và 68-69% với một số chủng của loài mạt *B. tropicalis*. Trên cơ sở phân tích và so sánh với chỉ thị phân tử 12S từ các mẫu quốc tế, loài mạt nuôi tại Việt Nam (lô DpT5-VN) đang sử dụng để chế kháng nguyên dị ứng được giám định chính xác là *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart 1897, có vị trí phân loại thuộc nhóm *D. pteronyssinus* trong hệ thống: Animalia, Arthropoda, Arachnida, Acarina, Acariformes, Pyroglyphidae, *Dermatophagoides*, *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart, 1897).

Từ khoá: dị nguyên, 12S, hệ gen ty thể, đồng nhất, chỉ thị phân tử, giám định, phả hệ, phân loại.

SUMMARY

Molecular analysis of the Vietnamese house mite *Dermatophagoides pteronyssinus* and taxonomic identification using the mitochondrial 12S genetic marker

From a culture of the allergen producing house dust mite in Vietnam (designated as DpT5-VN), a portion of mitochondrial 12S gene (395 bp) was obtained by PCR, cloned and sequenced for molecular analysis. This DpT5-VN 12S sequence was used for analysis of identity and phylogeny based on data compared with the isolates of *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart, 1897, *Dermatophagoides farinae* Hughes, *Aleuroglyphus ovatus* (Troupeau) (Acarina: Acaridae), *Blomia tropicalis* and *Glycyphagus privatus* Oudemans, 1903. Results revealed that, nucleotide sequence of 12S from the DpT5-VN high rate of identity (98 - 99%) with those of *D. pteronyssinus* isolates (USA), whilst only 84 - 85% with *D. farinae* and 68 - 69% with a number of isolates belonging to the *B. tropicalis* group. Based on the analysis data and comparison with 12S of the global isolates, the house dust mite cultured (batch: DpT5-VN) for production of allergens

in Vietnam was molecularly identified as *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart 1897, taxonomically clustered in the group *D. pteronyssinus*, in the taxonomic system: Animalia, Arthropoda, Arachnida, Acarina, Acariformes, Pyroglyphidae, *Dermatophagoides*, *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart, 1897).

Key words: allergen, 12S, mitochondrial genome, identity, genetic markers, molecular identification, phylogeny, taxonomy.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Mạt bụi nhà (house dust mite) là thủ phạm gây dị ứng (hen phế quản, viêm mũi dị ứng), có vai trò quan trọng đối với sức khoẻ cộng đồng trên toàn thế giới, trong đó đặc biệt là hai loài *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart 1897 (Dp) và *Dermatophagoides farinae* Hughes (Df), thuộc họ Pyroglyphidae, hiện nay được phân loại thuộc bộ Acariformes, lớp Arachnida (Suarez-Martinez và cs, 2005; Edrees, 2009). Giám định phân loại loài mạt nhà, chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái học và phát triển của ấu trùng (Teplitsky và cs, 2008). Nếu phân loại không chính xác nhiều khi nhầm lẫn với nhau và với các loài khác, nhưng vẫn nuôi cấy làm dị nguyên thì chất lượng dị nguyên sản xuất ảnh hưởng đến hiệu quả liệu pháp miễn dịch điều trị hen và viêm mũi dị ứng (Suarez-Martinez và cs, 2005). Phương pháp sinh học phân tử sử dụng gen 12S của hệ gen ty thể được ứng dụng rộng rãi trong giám định phân loại, xác định quan hệ phả hệ của nhiều loài vi chân đốt thuộc lớp Arachnida, trong đó có các loài thuộc chi *Dermatophagoides* (Suarez-Martinez và cs, 2005). Trong một công trình công bố gần đây, chuỗi gen 12S và *cox1* của các loài mạt chuẩn sinh học nhận được từ hãng Biopol (Mỹ) đã được giải trình tự và phân tích, làm cơ sở là chuỗi so sánh trong giám định gen một số lô mạt (lô DpT4) sản xuất dị nguyên tại Việt Nam (Lê Thanh Hòa và cs, 2009b). Phương pháp giám định gen bằng giải trình tự và phân tích chuỗi gen 12S là công cụ cần thiết trong xác định acarien đối với các lô giống sản xuất dị nguyên tại Việt Nam.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả giám định phân loại một lô (lô DpT5) của mạt nuôi tại Việt Nam đang sử dụng làm nguồn sản xuất dị nguyên điều trị dị ứng. Kết quả thu được dựa trên phân tích thành phần gen 12S của lô DpT5 với các lô DpT4 của Việt Nam đã công bố trước đây và với các chủng *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart 1897, *D. farinae* Hughes, *Aleuroglyphus ovatus* (Troupeau) (Acarina: Acaridae), *Blomia tropicalis* và *Glycyphagus privatus* Oudemans, 1903 của thế giới.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu mật nuôi

Viện Tai-Mũi-Họng trung ương cung cấp lô mật ký hiệu DpT5-VN, đã được sơ bộ giám định hình thái học. Mẫu cung cấp là một tập hợp nhiều con mật có đặc tính hình thái đồng nhất. Chúng tôi chỉ lấy ra một cá thể đơn lẻ để tách chiết ADN tổng số, sử dụng cho phân tích sinh học phân tử.

2. Tách chiết ADN tổng số và thu nhận chuỗi gen 12S

Từng con mật được cho riêng vào từng ống Eppendorf và cho dung môi vào, rồi ủ và tách chiết theo qui trình của nhà sản xuất, sử dụng bộ sinh phẩm QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Mỹ). ADN tổng số của mỗi cá thể được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Lô mật thu nhận từng cá thể sinh học này được ký hiệu là DpT5.

Phản ứng PCR được tiến hành với mỗi Dp12F: 5'AAACTAGGATTAGATACCCTAG3'; và Dp12R: 5'TACTATGTTACGACTTATCTATC3' được thiết kế để thu nhận đoạn gen 12S có độ dài 395 bp của mật thuộc chi *Dermatophagoides* (Lê Thanh Hòa và cs, 2009a). Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR bao gồm 1 chu kỳ ở 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ lặp lại ở 95°C trong 1 phút, 50°C trong 10 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; cuối cùng 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút. ADN của sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên thạch agarose 1%. Sản phẩm PCR tinh sạch được dòng hóa vào vector pCR2.1TOPO (TA-cloning kit, hãng Invitrogen). Sau khi tách dòng, ADN plasmid tái tổ hợp được giải trình tự để thu chuỗi gen 12S.

3. Xử lý số liệu và phân tích tương đồng, phá hệ của các chủng/loài mật

Chuỗi nucleotide của gen 12S được xử lý bằng chương trình SeqEdv1.03, sau đó so sánh sử dụng chương trình AsemblyLIGNv1.9c và MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh, so sánh và xác

định tương đồng bằng chương trình GENEDOC2.5 trên máy tính PC (Nicholas và Nicholas, 1999). Phân tích phá hệ bằng chương trình MEGA4.1 trên cơ sở so sánh đối chiếu với chuỗi gen tương ứng của cùng loài mật *D. pteronyssinus*, *D. farinae* thuộc họ Pyroglyphidae và loài mật *Blomia tropicalis* thuộc họ Echimyopodidae (Suarez-Martinez và cs, 2005) (Bảng 1), xây dựng cây phá hệ bằng phương pháp Neighbor-Joining, trên cơ sở kiểm chứng 1000 bootstrap (Tamura và cs, 2007).

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả thu nhận chuỗi gen 12S của các mẫu mật Việt Nam và so sánh với các chủng của thế giới

Đoạn gen 12S sử dụng cặp mồi Dp12F-Dp12R, từ ADN tổng số của dòng mật thuộc lô DpT5 (Việt Nam) được thu nhận có độ dài 395 bp. Chuỗi gen 12S của các chủng mật thế giới được thu thập và so sánh (Bảng 1).

Gen 12S của 23 chủng của các loài mật có nguồn gốc khác nhau, trong đó có lô mật của nghiên cứu hiện tại của chúng tôi (lô DpT5-VN) và hai lô trước đây (DpT4-VN117 và DpT4-VN118) của Việt Nam và các chủng khác có nguồn gốc tại Mỹ (cung cấp tại Bảng 1) được sử dụng để so sánh đối chiếu trình tự nucleotide và phân tích phá hệ. Kết quả trình bày ở Hình 1 Hình 1 cho thấy, giữa các chủng thuộc nhóm *Dermatophagoides*, *Aleuroglyphus*; *Blomia* và *Glyciphagus* có ít nhất 5 vị trí có sự sai khác đặc biệt, trong đó có 4 vị trí có sự biến đổi nucleotide theo kiểu *thêm* vào (insertion) hoặc *bớt đi* (deletion) 1-5 nucleotide, gọi là đột biến *indel*, trong đó đặc biệt nổi bật là tại 1 vị trí có 5 nucleotide sai khác (Hình 1, đóng khung dọc). Lô mật DpT5-VN, cũng như các chủng DpT4-VN117 và DpT4-VN118 từ loài mật của Việt Nam trước đây, một lần nữa được xác định chính xác thuộc loài *D. pteronyssinus*.

Bảng 1. Danh sách các chuỗi gen 12S của Việt Nam và thu thập từ Ngân hàng gen sử dụng phân tích giám định phân loại loài mật sản xuất dị nguyên tại Việt Nam

STT	Tên mẫu/loài	Nguồn gốc	Ký hiệu	Độ dài (bp)	Tài liệu/ Ngân hàng gen
1	<i>D. pteronyssinus</i>	Việt Nam	DpT5-VN	395	Nghiên cứu này
2	<i>D. pteronyssinus</i>	Việt Nam	DpT4-VN117	395	Lê Thanh Hòa và cs, 2009a
3	<i>D. pteronyssinus</i>	Việt Nam	DpT4-VN118	395	Lê Thanh Hòa và cs, 2009a
4	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	Dp	395	EU884425
5	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	DpA(601)US	395	Lê Thanh Hoà và cs, 2009b
6	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	DpA(613)US	395	Lê Thanh Hoà và cs, 2009b
7	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	Dp(strA)US	395	AF529911 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
8	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	Dp(strB)US	395	AF529912 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
9	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	Dp(strC)US	395	AF529913 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
10	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	Dp(strD)US	395	AF529914 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
11	<i>D. pteronyssinus</i>	Mỹ	Dp(strE)US	395	AF529915 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
12	<i>D. pteronyssinus</i>	Không rõ	Dp(2)US	395	DQ402424 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
13	<i>D. farinae</i>	Mỹ	DfUS	393	GQ465336 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
14	<i>D. farinae</i>	Mỹ	DfA-US2	391	Lê Thanh Hoà và cs, 2009b
15	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	Mỹ	Aov(1)	395	AF529909 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
16	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	Mỹ	Aov(2)	396	AF529910 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
17	<i>Blomia tropicalis</i>	Mỹ	Btro(1)US	391	AF529916 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
18	<i>Blomia tropicalis</i>	Mỹ	Btro(2)US	391	AF529917 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
19	<i>Blomia tropicalis</i>	Mỹ	Btro(3)US	391	AF529918 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
20	<i>Blomia tropicalis</i>	Mỹ	Btro(4)US	391	AF529916 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
21	<i>Blomia tropicalis</i>	Mỹ	Btro(5)US	391	AF529917 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
22	<i>Blomia tropicalis</i>	Mỹ	Btro(6)US	391	AF529918 (Suarez-Martinez và cs, 2005)
23	<i>Glyciphagus privatus</i>	Mỹ	GprivUS	391	AF529908 (Suarez-Martinez và cs, 2005)

2. Kết quả phân tích mức độ đồng nhất nucleotide giữa các chủng mật

Bảng 2 trình bày tỷ lệ (%) đồng nhất của chuỗi gen 12S giữa các chủng mật bụi nhà *D. pteronyssinus* nguồn gốc Việt Nam với các chủng *D. pteronyssinus* của Mỹ, với *D. farinae*, *A. ovatus*, *B. tropicalis* và *G. privatus*. Thành phần nucleotide của gen 12S của chủng DpT5-VN, cũng như các chủng DpT4-VN117 và DpT4-VN118 mẫu *D. pteronyssinus* của Việt Nam có mức độ đồng nhất rất cao, đạt đến 98 - 99% so với gen 12S của các mẫu mật *D. pteronyssinus* có nguồn gốc từ Mỹ. Các mẫu của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất đạt 99-100%, một lần nữa khẳng định các lô mật nuôi cấy sản xuất dị nguyên được kiểm nghiệm xác định chính xác là *D. pteronyssinus*. Trong khi đó, mức độ đồng nhất với *D. farinae* chỉ đạt 84 - 85% và với các chủng của loài mật khác là *B. tropicalis* hay *G. privatus*, chỉ đạt 68-69% (Bảng 2, đóng khung).

Bảng 2 cũng cho thấy, tỷ lệ đồng nhất (%) của mật Việt Nam với các chủng của thế giới, được chia làm 3 nhóm: đồng nhất rất cao với nhóm các chủng thuộc *D. pteronyssinus* (98 - 99%), đồng nhất thấp hơn với các chủng của *D. farinae* (84 - 85%); và đồng nhất rất thấp với các chủng của *B. tropicalis* và *G. privatus* (68% - 69%), chứng tỏ giữa *D. pteronyssinus* và *D. farinae* gần gũi nhau hơn về loài, so với *B. tropicalis* (Bảng 2). Một điều đặc biệt ở đây là, các chủng *D. pteronyssinus* và *A. ovatus* có tỷ lệ đồng nhất rất cao với nhau (98 - 100%) giống như giữa các chủng *D. pteronyssinus* với nhau. Chúng tôi cho rằng, có thể *A. ovatus* trong Ngân hàng gen chưa được xác định loài một cách chính xác, rất có thể đó là mật *D. pteronyssinus*. Tuy nhiên, điều quan trọng ở đây là, lô mật DpT5-VN hoàn toàn được xác định chính xác là loài *D. pteronyssinus*.

Bảng 2. Tỷ lệ đồng nhất (%) về thành phần nucleotide của các trình tự gen 12S của các chủng/loài mật Việt Nam và thế giới

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1		100	99	98	98	99	99	98	98	98	98	98	84	85	99	98	69	69	69	69	68	68	69
2			99	98	98	99	99	98	98	98	98	98	84	85	99	98	69	69	69	69	68	68	69
3				98	99	99	99	99	99	99	99	99	85	85	99	99	68	68	68	68	68	68	68
4					98	98	99	98	98	98	98	98	85	84	99	98	68	68	68	68	67	67	68
5						99	99	98	99	99	98	98	84	85	99	98	68	68	68	68	68	68	68
6							99	99	99	98	99	99	84	85	99	99	68	69	68	68	68	68	68
7								99	99	99	99	99	85	85	100	99	68	69	68	68	68	68	68
8									99	99	99	99	85	85	99	99	68	69	68	68	68	68	68
9										99	99	99	85	84	99	99	68	69	68	68	68	68	68
10											99	99	85	84	99	99	68	68	68	68	68	68	68
11												99	85	84	99	99	68	69	68	68	68	68	68
12													85	84	99	99	68	68	68	68	68	68	68
13														97	85	85	66	66	66	66	66	66	66
14															85	84	66	66	66	66	66	66	66
15																99	68	69	68	68	68	68	68
16																	68	68	68	68	68	68	68
17																		97	99	99	99	99	100
18																			97	97	97	97	97
19																				99	99	99	99
20																					99	99	99
21																						99	99
22																							99
23																							

Ghi chú: Ký hiệu: 1-3: *D. pteronyssinus* các lô mật của Việt Nam; 4-12: *D. pteronyssinus* các chủng mật của Mỹ; 13-14: *D. farinae* của Mỹ; 15-16: *Aleuroglyphus ovatus* của Mỹ; 17-22: *Blomia tropicalis* của Mỹ; *Glycyphagus privates* của Mỹ. Tên loài, ký hiệu chuỗi gen 12S, nguồn gốc và tài liệu liên quan đến các loài/chủng mật sử dụng để so sánh tỷ lệ đồng nhất được cung cấp tại Bảng 1.

3. Vị trí phân loại của mật *D. pteronyssinus* Việt Nam trên cơ sở phân tích phá hệ xác định mối quan hệ về loài

Trên cơ sở phân tích thành phần nucleotide đoạn gen 12S của 23 chủng mật thuộc các chi *Dermatophagoides*, *Aleuroglyphus*, *Blomia* và *Glycyphagus*, sử dụng chương trình MEGA4.1, chúng tôi xây dựng cây phá hệ để xem xét mối quan hệ về loài của các chủng đang nghiên cứu (Hình 2). Hình 2 cho thấy, có 3 nhóm được hình thành một cách rõ rệt, nhóm thứ nhất có chủng mật *D. pteronyssinus* Việt Nam (Lô DpT5-VN) được tập hợp cùng với các chủng của *D. pteronyssinus* của Mỹ; nhóm thứ hai gồm các chủng mật

D. farinae; nhóm thứ ba gồm các chủng *B. tropicalis* và *G. privatus*.

Như vậy, phân tích phá hệ một lần nữa xác định mối quan hệ về loài của mật nuôi tại Việt Nam, hoàn toàn cho thấy vị trí phân loại chính xác thuộc nhóm *D. pteronyssinus*. Kết quả phân loại cũng được hỗ trợ bởi mức độ đồng nhất rất cao (98-99%) với các chủng của loài *D. pteronyssinus* (Bảng 2). Rõ ràng, với mức độ đồng nhất rất cao về nucleotide với *D. pteronyssinus*, với sự khác biệt có giá trị so sánh với các loài mật khác (*D. farinae*, *G. privatus* và *B. tropicalis*), với quan hệ phá hệ rất gần gũi với các chủng *D. pteronyssinus*, loài mật nhà đang nuôi để sản xuất dị nguyên tại Việt Nam

(lô DpT5) được giám định phân loại chính xác là *Dermatophagoides pteronyssinus* (European house dust mite) thuộc hệ thống phân loại: Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Acari; Acariformes; Sarcoptiformes; Astigmata; Psoroptida; Analgoidea; Pyroglyphidae; Dermatophagoidinae; Dermatophagoides.

KẾT LUẬN

Trình tự gen 12S của lô mạt Việt Nam (DpT5-VN) có tỷ lệ đồng nhất đến 98 - 99% với các chủng của loài mạt *D. pteronyssinus*, 84 - 85% với *D. farinae* và 64 - 65% với *B. tropicalis*. Phân tích phả hệ cho thấy các chủng loài mạt nuôi tại Việt Nam tập hợp cùng nhóm với tất cả các chủng của loài mạt *D. pteronyssinus*, xác định vị trí phân loại của chủng mạt Việt Nam (lô DpT5-VN) thuộc hệ thống phân loại: Eukaryota; Arthropoda; Arachnida; Acariformes; Pyroglyphidae; Dermatophagoides; *Dermatophagoides pteronyssinus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Edrees NO (2009). Distribution dynamics of dust mite in two locations of patient homes with respect to the allergical kind. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 6(6): 680-688.
2. Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Hoàng Văn Mạnh, Hoàng Thị Minh Châu, Nguyễn Thị Hoài An và Vũ Thị Minh Thục (2009a). Giám định gen

loài mạt dị nguyên của Việt Nam chính xác là *Dermatophagoides pteronyssinus* sử dụng chỉ thị phân tử 12S ty thể và so sánh với các chủng của thế giới. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 356(1):36-43.

3. Lê Thanh Hoà, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Bích Nga, Hoàng Thị Minh Châu, Vũ Đức Anh và Vũ Thị Minh Thục (2009b). Xác định gen 12S và *cox1* hệ gen ty thể của loài mạt *Dermatophagoides pteronyssinus* và *D. farinae* nguồn gốc Mỹ làm chỉ thị phân tử chẩn đoán gen dị nguyên acariden của Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 352(1):33-39.

4. Nicholas KB and Nicholas HB (1999). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by author.

5. Suarez-Martinez EB, Montealegre F, Sierra-Montes JM and Herrera RJ (2005). Molecular identification of pathogenic house dust mites using 12S rRNA sequences. *Electrophoresis*, 26(15):2927-2934.

6. Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.

7. Teplitsky V, Mumcuoglu KY, Babai I, Dalal I, Cohen R and Tanay A (2008). House dust mites on skin, clothes, and bedding of atopic dermatitis patients. *Int J Dermatol* 47(8):790-795.