

**MỘT SỐ ENZYME GIỚI HẠN SỬ DỤNG TRONG PHÂN TÁCH CÁC LOÀI
ĐỒNG HÌNH THUỘC PHỨC HỢP MUỖI *Anopheles maculatus*
Ở XÃ PHƯỚC CHIẾN, HUYỆN THUẬN BẮC, TỈNH NINH THUẬN**

BÙI MINH HỒNG, TRẦN THỊ THU TRANG
Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

ĐỖ MẠNH CƯỜNG
Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội

Ninh Thuận là một tỉnh duyên hải miền Trung, tình hình sốt rét vẫn trong chiều hướng không ổn định, mỗi năm số người mắc bệnh và tử vong do sốt rét vẫn còn cao. Xã Phước Chiến, huyện Thuận Bắc là một trong các điểm nóng sốt rét của tỉnh, do cộng đồng dân cư chủ yếu là người Raglai có tập quán làm và ngủ tại nương rẫy, nơi có rừng thứ sinh tiếp giáp với rừng nguyên sinh ít bị tác động, tạo môi trường sống lý tưởng của loài *Anopheles maculatus*. Vì vậy việc đi sâu nghiên cứu một cách đầy đủ khu hệ muỗi *A. maculatus* tại đây là một vấn đề rất đáng quan tâm hiện nay [1].

Việc kết hợp giữa các phương pháp truyền thống với sử dụng kỹ thuật phân tử là rất cần thiết để phân loại quần thể muỗi truyền bệnh. Vì nhiều loài muỗi lúc đầu được xác định như 1 loài đơn, nhưng khi nghiên cứu sâu về vai trò dịch tễ, đặc tính sinh học và sử dụng các kỹ thuật mới để nhận biết về di truyền, hóa sinh... đã xác định chúng là những nhóm đồng hình, và chúng có thể đóng những vai trò truyền bệnh khác nhau [2,3]. Loài *Anopheles maculatus* được Theobald phát hiện ở Hồng Kông, Trung Quốc vào năm 1901. Đây là loài muỗi phân bố rộng rãi, cho đến nay, phức hợp *A. maculatus* gồm ít nhất 12 loài thành viên. Nhiều thành viên trong nhóm này đã được xác định có vai trò truyền bệnh ở Malaysia, Thái Lan, Nepal, Trung Quốc, Singapore.

Ở Việt Nam trước đây, muỗi *A. maculatus* được xác định là một loài đơn, phân bố rộng rãi ở vùng rừng núi trên toàn quốc, nhưng nghiên cứu gần đây cho thấy phức hợp loài này gồm ít nhất 8 loài đã được định tên (*A. maculatus*, *A. pseudowillmori*, *A. notanandai*, *A. sawadwongporni*, *A. willmori*, *A. dradivicus*, *A. dispar* và *A. greeni*) và một số dạng chưa xác định rõ vị trí phân loại. Đến nay loài *A. maculatus* vẫn được coi là vector truyền bệnh sốt rét ở nước ta, nhưng lại là vector chính truyền bệnh sốt rét tại miền Bắc Thái Lan [4]. Bài báo này cung cấp một số dữ liệu về Enzyme giới hạn để phân tách DNA của các thành viên thuộc phức hợp *A. maculatus* tại xã Phước Chiến, huyện Thuận Bắc, Ninh Thuận.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu thập và xử lý mẫu

Muỗi *Anopheles* được thu thập tại địa điểm nghiên cứu bằng bẫy đèn CDC (Control Disease Center) của Tổ chức Y tế Thế giới WHO tại xã Phước Chiến, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận.

Bẫy đèn được đặt xung quanh chuồng gia súc và gần nhà dân, hoạt động liên tục từ 18 giờ ngày hôm trước đến 6 giờ sáng ngày hôm sau. Muỗi sau khi thu thập và định loại bằng hình thái được lưu trữ trong tuýp đựng mẫu, có hạt silicagel và chuyển về phòng thí nghiệm. Thu thập được tiến hành qua 2 đợt: từ ngày 20/6/2012 đến ngày 30/6/2012 và từ ngày 15/11/2012 đến ngày 22/11/2012.

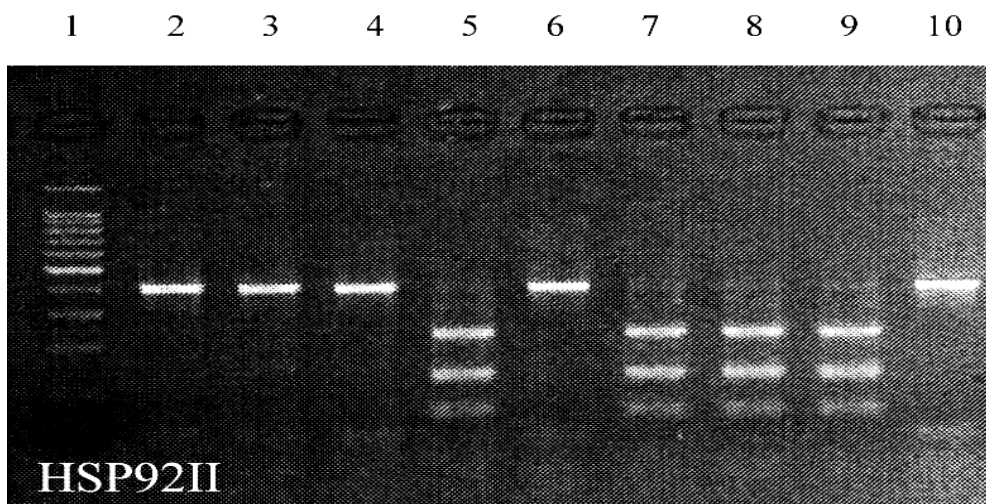
2. Phân tích ADN

Tách DNA tổng số từ mẫu muỗi, nhân bản ADN của đoạn chèn ITS2 bằng Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) và cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme giới hạn để phân tích genome

type. PCR tiến hành tại Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội, sản phẩm PCR được gửi sang Viện nghiên cứu Sốt rét lục quân Australia để giải trình tự.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

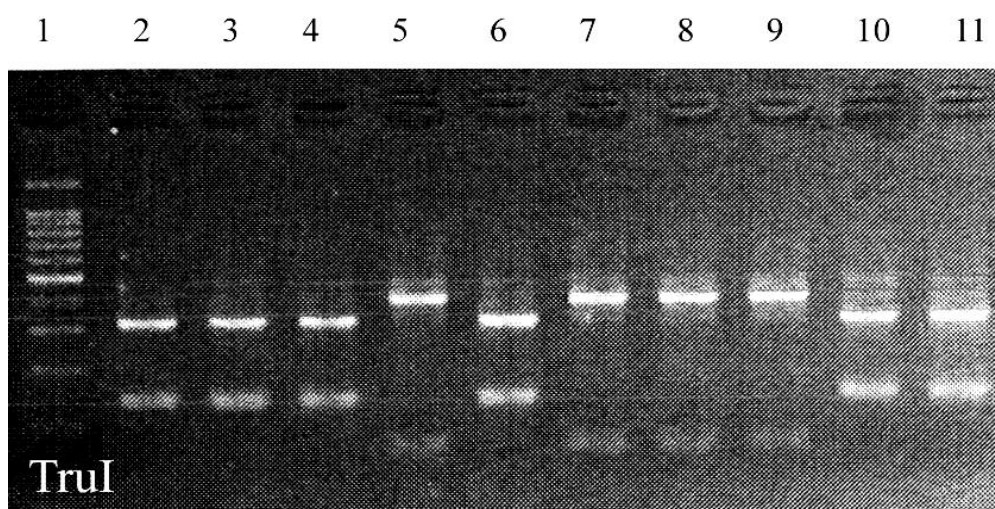
1. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme HSP92II



Hình 1: Điện di sản phẩm PCR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn HSP92II

Giếng số 1 là thang ADN, vạch đậm nhất tương ứng với kích thước 500bp. Giếng số 2, 3, 4, 6 và 10 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. Maculatus*, giếng số 5, 7, 8, 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. sawadwongporni*. Sản phẩm điện di cho thấy loài *A. sawadwongporni* bị phân cắt thành 2 đoạn có kích thước tương ứng 150 bp và 250 bp trong khi loài *A. maculatus* gần như không bị phân cắt và thể hiện bởi 1 đoạn có kích thước lớn hơn (khoảng 400 bp).

2. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme TruI

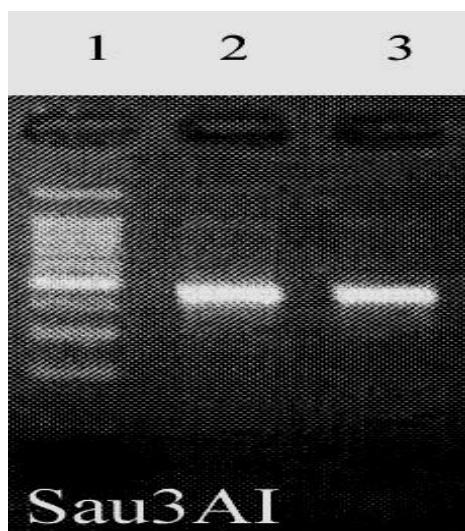


Hình 2: Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn TruI

Từ hình 2 cho thấy giếng số 2, 3, 4, 6, 10 và 11 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. Maculatus*, giếng số 5, 7, 8, 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. sawadwongporni*. Sản phẩm điện di cho thấy loài *A. sawadwongporni* bị phân cắt ít, biểu hiện bởi đoạn có kích thước khoảng 400 bp trong khi loài *A. maculatus* bị phân cắt nhiều hơn và biểu hiện bởi đoạn có kích thước khoảng 300 bp.

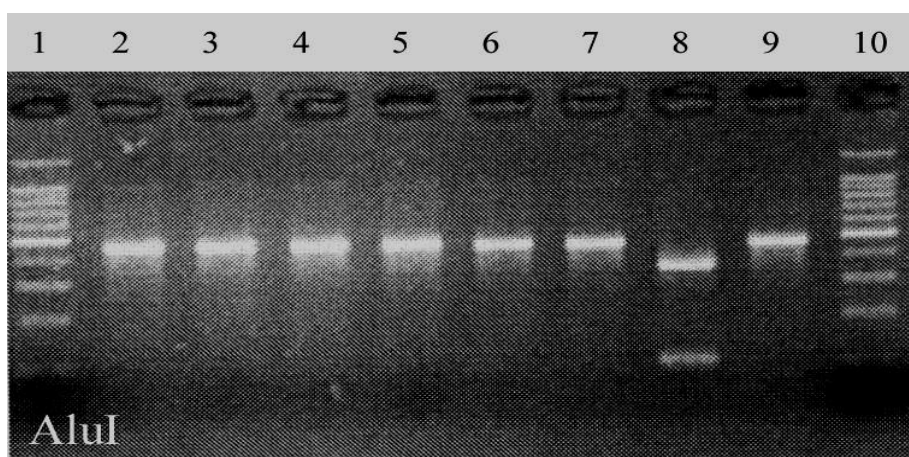
3. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme Sau3AI

Hình 3 cho thấy giếng số 2 và số 3 gồm các đoạn ADN có kích thước giống nhau và không bị phân cắt, nên không thể tách biệt loài *A. sawadwongporni* và *A. maculatus* bằng enzyme Sau3AI.



Hình 3: Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn Sau3AI

4. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme AluI

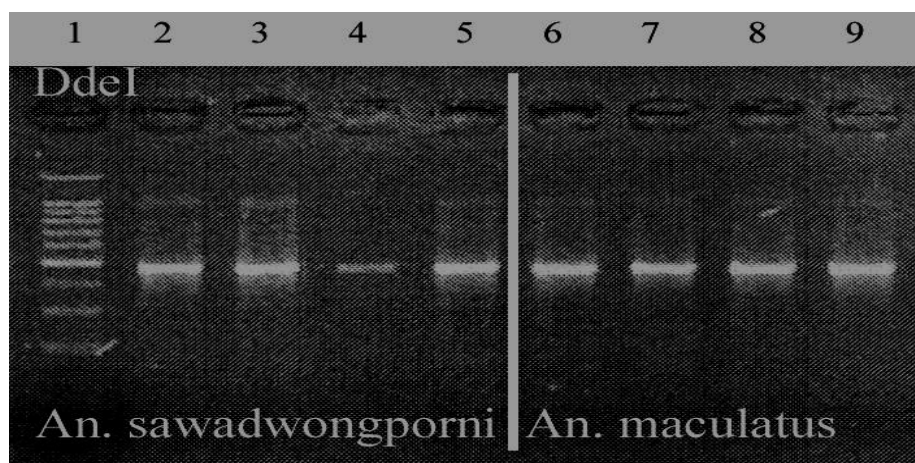


Hình 4: Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn AluI

Giếng số 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. Maculatus*, giếng số 8 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. Sawadwongporni*. Hai loài *A. maculatus* và *A. sawadwongporni* có thể phân biệt bằng enzyme giới hạn AluI, với băng có kích

thước nhỏ (400 bp) cho loài *A. Sawadwongporni*, trong khi loài *A. maculatus* đặc trưng bởi băng DNA có kích thước 500 bp.

5. Kết quả phân cắt sản phẩm PCR bằng Enzyme DdeI



Hình 5: Sản phẩm điện di của PCR sau khi cắt bằng enzyme giới hạn DdeI

Giếng số 6, 7, 8, 9 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. maculatus* giếng số 2, 3, 4, 5 là kết quả phân cắt sản phẩm PCR của muỗi *A. sawadwongporni*.

Enzyme DdeI không thể dùng để phân tách 2 loài *A. maculatus* và *A. sawadwongporni*, vì enzyme đều không cắt sản phẩm PCR.

6. Kết quả phân tích đoạn chèn ITS2 so sánh với trình tự tương đồng trên ngân hàng trình tự ADN

Kết quả cho thấy tại Phước Chiến có 2 loài *A. maculatus* và *A. sawadwongporni*. Trong đó có 305 mẫu thuộc loài *A. sawadwongporni* và 225 mẫu thuộc loài *A. Maculatus*, trong tổng số 530 mẫu muỗi thu được tại địa điểm nghiên cứu. Kết quả phân tích gene tương ứng với phân bố của 2 loài: *A. sawadwongporni* chỉ ghi nhận ở 2 điểm là thôn Đầu Suối và thôn Tập Lá, nơi ở gần rừng. Loài *A. maculatus* chỉ có ở thôn Ma Trai và Đồng Thông, nơi xa rừng hơn. Như vậy 2 loài đã có sự phân tách theo điều kiện sinh thái.

III. KẾT LUẬN

Đã xác định được trong khu vực xã Phước Chiến, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận có 2 loài muỗi thuộc phức hệ *Anopheles maculatus* sl. đó là *A. sawadwongporni* và *A. maculatus*.

Enzyme giới hạn HSP92II, TruI, AluI cắt được sản phẩm PCR đoạn chèn ITS2 của 2 loài *A. sawadwongporni* và *A. maculatus*, nên tạo ra được chỉ thị phân tử ADN để phân tách hai loài này, nhưng 2 enzyme Sau3AI và DdeI không có sự phân cắt đoạn chèn này và không thể dùng để nhận biết chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Erhart, A, N. D. Thang, N. Q. Hung, L. V. Toi, L. X. Hung, T. Q. Tuy, L. D. Cong, N. Speybroeck, M. Coosemans, U. D'alessandro, 2004. Forest malaria in Vietnam: a challenge for control. Am J Trop Med Hyg, 70:110-118.

2. **Lê Khánh Thuận**, 2000. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của *Anopheles minimus* và *Anopheles dirus* các yếu tố thời tiết, nhiệt độ, độ ẩm, lượng mưa liên quan đến lan truyền sốt rét ở điểm nghiên cứu Vân Canh, Bình Định và Lakor, Chư Sê, Gia Lai. *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học 1996 – 2000*, Bộ Y tế, Viện Sốt rét, Ký sinh trùng, Côn trùng Trung Ương, tr. 422-433.
3. **Do Manh Cuong, Nguyen Thi Hong Van, Le Quang Tao, Tran Lien Chau, Le Ngoc Anh, Nguyen Xuan Thanh, R. D. Cooper**, 2008. Identification of *Anopheles minimus* complex and related species in Vietnam. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 39(5):827-31.
4. **Do Manh Cuong, N. W. Beebe, Nguyen Thi Hong Van, Le Quang Tao, Tran Lien Chau, Dung Nguyen Van, Nguyen Xuan Thanh, Anh Le Nguyen, R. D. Cooper**, 2010. Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in North-central Vietnam. *Malaria J.* 9: 259.

STUDY ON SOME RESTRICTED ENZYMES USING IDENTIFICATION OF SIBLING SPECIES *Anopheles maculatus* PHUOC CHIEN COMMUNE, THUAN BAC DISTRICT, NINH THUAN PROVINCE

BUI MINH HONG, TRAN THI THU TRANG, DO MẠNH CUONG

SUMMARY

In Vietnam, *A. maculatus* was identified as a single species, which distributed in forest areas across the country. Recent studies on morphology and cellular complexes indicated that at least 8 species occurred in the country (*A. maculatus*, *A. pseudowillmori*, *A. notanandai*, *A. sawadwongporni*, *A. willmori*, *A. dradivicus*, *A. dispar* and *A. greeni*) and several unidentified species.

Restricted enzymes have been used as an indicator to separate sibling species of the *Anopheles maculatus* species group.

Restricted enzymes: HSP92II, TruI, AluI, Sau3AI and DdeI were used for cutting ITS2 gene of *A. maculatus* sl. The result showed that HSP92II, TruI, AluI can be used for separating two species *Anopheles sawadwongporni* and *Anopheles maculatus*. But Sau3AI and DdeI cannot use for identification of two members that found from Phuoc Chien District, Ninh Thuan Province.