

Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong định danh loài bọ xít hút máu ở miền Trung Việt Nam

Hồ Viết Hiếu^{1,2*}, Nguyễn Thị Hà³, Lê Thành Đô^{2*}, Đoàn Đức Hùng⁴, Nguyễn Thị Mai¹,
Tạ Phương Mai¹, Phạm Anh Tuấn¹, Phạm Thị Khoa¹, Ngô Giang Liên⁵

¹Trung tâm Nghiên cứu kỹ sinh trùng - côn trùng, Viện Y - Sinh - Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

²Viện Sáng kiến sức khỏe toàn cầu, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

³Trung tâm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và phát triển công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

⁴Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn

⁵Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 31/1/2020; ngày chuyển phản biện 3/2/2020; ngày nhận phản biện 26/2/2020; ngày chấp nhận đăng 28/2/2020

Tóm tắt:

Phương pháp phân loại hình thái là phương pháp truyền thống và thông dụng trong định danh loài. Tuy nhiên, phương pháp này thể hiện những hạn chế rõ rệt trong việc phân biệt các loài đồng hình và dưới loài. Khi đó, các kỹ thuật sinh học phân tử đóng một vai trò thiết yếu, giúp định danh loài và phân loại một cách chính xác. Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày phương pháp định danh loài bọ xít hút máu (BXHM) ở khu vực miền Trung Việt Nam sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả phân loại sinh học phân tử và hình thái đã cho thấy, loài BXHM ở khu vực miền Trung Việt Nam là *Triatoma rubrofasciata*.

Từ khóa: bọ xít hút máu, định danh sinh học phân tử, *Triatoma rubrofasciata*.

Chỉ số phân loại: 3.1

Tổng quan

Vào đầu thập niên 90 của thế kỷ trước, sinh học phân tử đã có bước phát triển vượt bậc nhờ sự phát hiện và biểu hiện thành công ADN Polymerase chịu nhiệt trong phòng thí nghiệm từ loài *Thermus aquaticus* sống trong các suối nước nóng [1]. Việc khuếch đại và giải trình tự các đoạn gen mong muốn đã cung cấp một lượng thông tin di truyền khổng lồ của nhiều loài khác nhau. Bên cạnh đó, các trình tự gen còn được sử dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau như nghiên cứu chức năng của gen, nghiên cứu cơ chế phân tử của các bệnh di truyền, sinh tổng hợp các sản phẩm thiết yếu, định loài và xây dựng cây phân loại... Trong quá trình giải trình tự, nghiên cứu thông tin di truyền của các loài, các nhà nghiên cứu đã phát hiện nhiều trình tự có tính ổn định rất cao giữa các cá thể trong loài nhưng lại có sự khác biệt giữa các loài với nhau, và chúng có liên quan đến nguồn gốc phát sinh, tính gần gũi giữa các loài [2, 3]. Đó là những trình tự đặc trưng loài. Ở những trình tự đó, người ta thấy rằng hai loài có gốc chung càng cổ xưa bao nhiêu thì sự khác biệt càng lớn bấy nhiêu, và ngược lại [2, 3]. Ví dụ, những trình

tự đặc trưng ở loài người chúng ta giống với trình tự đó ở các loài linh trưởng hơn là ở các loài chó hay mèo. Sử dụng những trình tự này (trong kỹ thuật ADN barcoding), các nhà khoa học có thể khẳng định chắc chắn một cá thể bất kỳ nào đó thuộc loài nào nếu như trình tự của loài đó đã được công bố, và đồng thời phát hiện ra nhiều loài được định danh theo hình thái trước đây thực ra bao gồm các loài (đồng hình) khác nhau [4-6]. Như vậy, các trình tự đặc trưng loài cho phép xác định và phân loại cá thể một cách chính xác.

Thông thường, trong phân loại học sẽ sử dụng nhiều hơn một trình tự đặc trưng loài để làm tăng độ chính xác về mức độ gần gũi giữa các loài. Một vài trình tự đặc trưng loài thường được dùng trong phân loại sinh học phân tử bao gồm các ITS (Internal transcribed spacer, ADN nhân) hay COII (Cytochrome c oxidase subunit 2, ADN ty thể) và Cyto-B (Cytochrome oxidase b, ADN ty thể). Cyto-B là một gen ty thể mã hóa cho protein tham gia vào quá trình phosphoryl hóa oxy hóa trong ty thể [7]. Gen Cyto-B khá lớn (với khoảng 1.140 nucleotide) sẽ khó khăn khi nhân toàn bộ trình tự gen này và có thể tạo ra sai sót [7]. Trong trường

*Tác giả liên hệ: Email: hoviethieu@duytan.edu.vn; lethanhdo1@duytan.edu.vn

Application of molecular biology techniques in identification of kissing bugs species in Central Vietnam

Viet Hieu Ho^{1,2*}, Thi Ha Nguyen³, Thanh Do Le^{2*},
Duc Hung Doan⁴, Thi Mai Nguyen¹, Phuong Mai Ta¹,
Anh Tuan Pham¹, Thi Khoa Pham¹, Giang Lien Ngo⁵

¹Department of Medical Microbiology and Parasitology,

Faculty of Medicine, Duy Tan University, Da Nang

²Institute for Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang

³Institute for Research and Development, Duy Tan University, Da Nang

⁴Institute of Malariology Parasitology and Entomology Quy Nhon

⁵Department of Cell Biology, University of Science,

Vietnam National University, Hanoi

Received 31 January 2020; accepted 28 February 2020

Abstract:

The morphological taxonomy method is a traditional and very popular method in species identification. However, this method shows obvious limitations in distinguishing homomorphic species. In those cases, molecular biology techniques play an essential role in helping to identify species and then classify them precisely. In this study, the authors presented a method to identify kissing bugs species in Central region of Vietnam using molecular biology techniques. The molecular and morphological taxonomy results have both showed that kissing bugs species in Central region of Vietnam was *Triatoma rubrofasciata*.

Keywords: kissing bugs, molecular biology identification, *Triatoma rubrofasciata*.

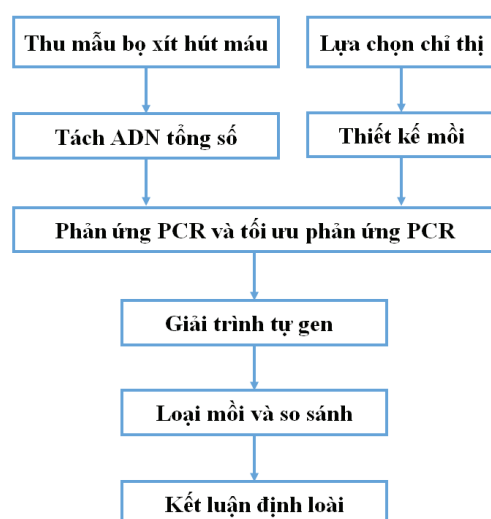
Classification number: 3.1

hợp này, các nhà khoa học có thể sử dụng các cặp mồi khác nhau nhân lên những đoạn được coi là đặc trưng loài có độ dài khác nhau (thông thường có kích thước khoảng 400-600 nucleotide). Những đoạn này sau đó được giải trình tự và so sánh với các dữ liệu trình tự trong các công bố trước đó. COII là một gen ty thể khác, mã hóa cho một protein của phức hệ Cytochrome oxidase trong ty thể. Trình tự của gen này chứa khoảng 680 nucleotide. Các đoạn có độ dài khác nhau trong trình tự của nó cũng đã được sử dụng cho định loài và xây dựng cây phân loại [8-10].

Với độ nhạy và tính đặc hiệu cao, cùng với giá thành hợp lý và thao tác đơn giản, kỹ thuật sinh học phân tử đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong phân loại và tiến hoá của các loài, trong đó có BXHM. Schuh và cs (1995), Monteiro và cs (2001) [11, 12] - những nhà nghiên cứu tiên phong trong phân loại BXHM sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử - đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 4 giống BXHM quan trọng trong truyền bệnh Chagas và Trypanosomiasis, bao gồm: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Dipetalogaster* và *Psammolestes* với 17 loài bọ xít đã được giải trình tự gen. Trong nghiên cứu của mình, Lyman và cs (1999) [13] cũng mô tả chi tiết chủng loại phát sinh của 3 giống *Triatoma*, *Panstrongylus* và *Rhodnius* dựa trên trình tự gen Cyto-B. Sau đó, Liu và cs (2017) [14] cũng đã giải trình tự gen này ở loài *T. rubrofasciata* thu thập được ở Quảng Châu, Trung Quốc. Ở Việt Nam, Trương Xuân Lam [15] đã giải trình tự một phần gen COII và gen Cyto-B để định danh và phân loại 7 mẫu BXHM thu được quanh khu vực Hà Nội. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày phương pháp khuếch đại và giải trình tự hai gen ty thể, Cyto-B và COII, trong định loại đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp sinh học phân tử trong phân loại BXHM

Các bước phân tích định danh loài sử dụng phương pháp sinh học phân tử được tóm lược và sơ đồ hóa như hình 1. Một cách giản lược, quy trình sử dụng các trình tự đặc trưng loài để định danh, phân loại và xây dựng cây phân loại bao gồm 4 bước [7]. Bước 1: lựa chọn những đoạn ADN giống nhau nhất ở nhóm loài nghi ngờ mẫu thuộc vào để thiết kế mồi. Bước 2: tách chiết ADN từ mẫu thu thập và thực hiện phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR). Bước 3: giải trình tự và loại bỏ trình tự của các mồi để có được đoạn trình tự đem so sánh. Bước 4: so sánh trình tự thu được với các trình tự khác lấy về từ ngân hàng trình tự đã được công bố trước đây để định danh cá thể mẫu thuộc loài nào và xây dựng cây phân loại.



Hình 1. Quy trình định loài BXHM bằng phương pháp sinh học phân tử.

Tách ADN tổng số

ADN của bộ xét được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit Anapure Tissue ADN mini Kit (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội). Mẫu mô từ các bộ phận khác nhau: chân trước cùng mô ngực đi kèm, phần đầu bộ xét, và chân sau cùng mô bụng đi kèm được sử dụng để phân lập ADN. Các mẫu mô được cho vào các ống eppendorf 2 ml chứa bi sắt đã được làm lạnh trước. Cho 100 μ l đệm phân hủy mô vào ống chứa mẫu và đưa lên giá phá mẫu của hệ thống Tissue Lysis LT (QIAGEN, Mỹ). Mẫu được phá ở tần số 30 Hz trong 40 giây. Sau khi phá, các mẫu được cân bằng với đệm phân hủy mô và ly tâm ở 3.000 v/ph trong 2 phút, dịch nổi được chuyển sang một ống eppendorf mới. Để tiếp tục thủy phân các tế bào, 200 μ l đệm phân hủy mô và 40 μ l proteinase K được thêm vào dịch nổi, trộn đều và ủ ở 60°C trong 2h. Mẫu sau khi ủ được ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút và loại bỏ cạn. Thêm 600 μ l đệm bám cột và 200 μ l Isopropanol vào dịch mẫu và trộn đều bằng cách đảo ống xuôi - ngược 10 lần. Chuyển dung dịch mẫu lên cột tách ADN và ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút. Sau khi loại dịch qua cột, 600 μ l đệm rửa 1 vào cột, ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút và loại dịch qua cột. ADN trên cột được rửa thêm một lần với 600 μ l đệm rửa 2, ly tâm 8.000 v/ph trong 1 phút. Sau khi loại đệm rửa 2, cột tiếp tục được ly tâm 11.000 v/ph trong 1 phút để loại bỏ hoàn toàn dịch trên màng. Cột được chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml vô trùng mới; 50 μ l đệm rửa giải ADN (đã được làm ấm trước ở 45°C) vào chính giữa màng của cột, để cột đứng yên 3 phút ở nhiệt độ phòng trước khi ly tâm 11.000 v/ph trong 1 phút. Dịch qua cột chứa ADN trong ống eppendorf được thu lại và sử dụng trong các bước tiếp theo.

Sau khi phân tách, nồng độ của ADN được xác định bằng cách sử dụng hệ thống Nano Drop 2000 (Thermo scientific, Mỹ). ADN tổng số cũng đồng thời được điện di kiểm tra trên gel agarose để hiển thị nồng độ tương đối và độ toàn vẹn của ADN hệ gen thu được.

Thiết kế mồi

Hai gen Cyto-B và COII, mang các trình tự bảo thủ đặc trưng loài, được lựa chọn theo các công bố trước đây để định danh mẫu nghiên cứu bằng phương pháp sinh học phân tử. Hai cặp mồi phổ quát trong bảng 1 được lựa chọn và sử dụng để nhân những đoạn ADN có mang những khác biệt giữa các loài trong phân họ BXHM theo một số nghiên cứu trước [16-18]. Cụ thể, cặp mồi được dùng để khuếch đại gen Cyto-B được tham khảo từ nghiên cứu của Justi và cs [18]. Trong nghiên cứu đó, tác giả đã ghép cặp một mồi xuôi trong một nghiên cứu của Monteiro và cs [16] với mồi ngược trong một nghiên cứu khác, tạo nên cặp mồi để nhân lên đoạn Cyto-B và sử dụng trình tự được nhân lên để xây dựng cây phân loại cho phân họ BXHM. Cặp mồi cho COII được tham khảo từ công bố của Patterson và Gaunt năm 2010 [17], cũng là cặp mồi đã được Justi và cs [18] sử dụng cho việc xây dựng cây phân loại của phân họ BXHM.

Bảng 1. Trình tự mồi Cyto-B và COII.

Tên mồi	Trình tự
Cyto-B F	5'-GGACGATGGATATTATTATGGATC-3'
Cyto-B R	5'-ATTACTCCTCCTAGYTTATTAGGAATT-3'
COII F	5'-ATGATTTTAAGCTTCATTATATAAAGAT-3'
COII R	5'-GTCTGAATATCATATCTTCAATATCA-3'

Tối ưu hóa phản ứng chuỗi trùng hợp

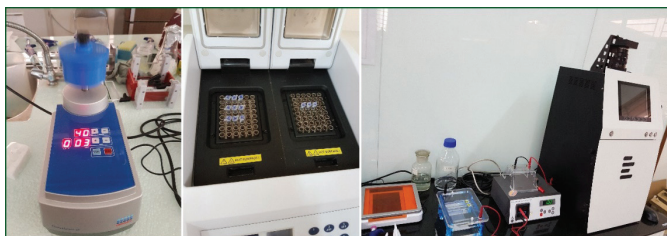
PCR nhằm khuếch đại một trình tự ADN nhất định cần được tối ưu để thu được 1 băng đặc hiệu (thể hiện trên kết quả điện di sản phẩm PCR). Quá trình tối ưu hóa được chú trọng vào nồng độ đầu vào của ADN khuôn, nồng độ mồi, nhiệt độ gắn mồi, và số chu kỳ của phản ứng. Nhiệt độ gắn mồi được tối ưu bằng cách sử dụng dải nhiệt độ gắn mồi trong khoảng từ T_m-8 đến T_m-3 (T_m : nhiệt độ nóng chảy của mồi), với mỗi bước nhiệt độ là $\pm 1^\circ\text{C}$. Nhiệt độ gắn mồi mà ở đó sản phẩm PCR được tạo ra đặc hiệu và hiệu quả nhất sẽ được lựa chọn. Giữ nguyên nhiệt độ gắn mồi đã chọn, tiếp tục tối ưu lượng ADN khuôn đầu vào bằng cách thực hiện phản ứng PCR với 3 nồng độ DNA tương ứng 125 ng, 250 ng và 375 ng. Tương tự, điều kiện phản ứng nào cho lượng sản phẩm lớn nhất (băng rõ nhất) với tính đặc hiệu cao nhất (một băng duy nhất) sẽ được lựa chọn. Tiếp theo, dựa vào mức độ đậm nhạt của băng sản phẩm thu được để tăng hoặc giảm số chu kỳ để thu được lượng sản phẩm phù hợp với yêu cầu cho những thử nghiệm tiếp theo. Số lượng

chu kỳ thường dao động từ 30 đến 40 chu kỳ, tùy tính hiệu quả và đặc hiệu của phản ứng PCR.

Các điều kiện đã tối ưu được đưa ra trong phần kết quả cùng với trình tự đoạn gen và kết quả phân tích so sánh.

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Sau khi kết thúc phản ứng PCR, 3 μ l hỗn hợp sau phản ứng được trộn với 0,6 μ l đệm tra mẫu 6X (6X loading dye, Thermo scientific, Mỹ) có bổ sung thuốc nhuộm ADN redsafe (Intron, Hàn Quốc) và tra lên gel agarose 1,2%. Thang chuẩn ADN 100 bp (DNA marker, 100 bp, BM301) cũng đồng thời được tra lên 1 giếng riêng biệt để xác định kích thước tương đối của sản phẩm sau khi điện di. Các mẫu và thang chuẩn trên gel được phân tách trong đệm TBE 1X, dưới điện trường 100 vôn, trong 30 phút. Sau khi chạy điện di, các băng ADN được hiện dưới kích thích của ánh sáng UV và chụp hình sử dụng hệ thống Gel doc E-box (hình 2). Trong trường hợp phân tách ADN tổng số, các điều kiện điện di tương tự được áp dụng, ngoại trừ thang chuẩn 1 kb (DNA marker, 1 kb, M3084) được sử dụng thay cho thang 100 bp.



Hình 2. Kiểm tra sản phẩm PCR và ADN tổng số. Bên trái: phá mẫu trên máy Tissue Lysis LT; ở giữa: phản ứng PCR; bên phải: điện di và chụp sản phẩm PCR trên máy E-box.

Giải trình tự và loại bỏ trình tự môi

Sau khi thực hiện khuếch đại trình tự DNA đích, sản phẩm của phản ứng PCR được tinh sạch để loại bỏ môi, các nucleotide còn dư và giải trình tự (Công ty Phù Sa, TP Cần Thơ). Trình tự cặp môi được tìm kiếm và loại bỏ khỏi trình tự trong tệp TEXT của mỗi đoạn gen.

So sánh trình tự nhận được với các trình tự đã được công bố

Sau khi loại bỏ trình tự môi, các trình tự được so sánh với các trình tự đã công bố trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng cách sử dụng công cụ thuật toán cơ bản của NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Kết quả so sánh cho biết thông tin về đoạn gen, về loài mang đoạn gen được nhân lên thông qua các trình tự có mức độ tương đồng lớn nhất được lưu trên ngân hàng dữ liệu.

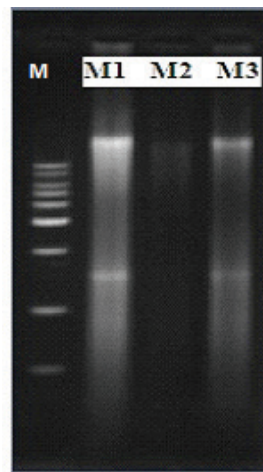
Để phân tích sâu hơn, các trình tự Cyto-B của các mẫu *T. rubrofasciata* đã được công bố trước đây và lưu trên ngân hàng dữ liệu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), bao gồm trình tự Cyto-B của mẫu Hà Nội 1 (mã số: KR632555.1), của mẫu Hà Nội 2 (mã số: KR632556.1) và của mẫu từ Đài Loan (mã số: KP899111.1) được tải về và sử dụng để phân tích so sánh với trình tự thu được trong nghiên cứu này. Việc phân tích được thực hiện trên server CLUSTAL O (1.2.4) so sánh đa trình tự, miễn phí (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Kết quả và thảo luận

Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu ADN

Kết quả ADN thu được từ các bộ phận khác nhau của bộ xít tương ứng là 136,6 ng/ μ l, 15 ng/ μ l và 100,3 ng/ μ l (hình 3) với chỉ số A260/A280 tương ứng là 2,0, 1,6 và 1,9. Mẫu M1 và M3 có tỷ lệ A260/A280 nằm trong khoảng tối ưu (1,8-2,0) trong khi tỷ lệ này ở mẫu M2 là 1,6, chứng tỏ ADN của mẫu M1 và M3 là tinh khiết, trong khi mẫu ADN M2 bị nhiễm protein.

So sánh về nồng độ và chất lượng ADN cùng với sự thuận tiện trong thao tác cho thấy, mẫu chân trước kèm mô ngực dễ dàng thao tác, cho nồng độ ADN tổng số cao, đảm bảo cho các thí nghiệm tiếp theo. Các mẫu ADN sau đó đã được phân lập từ chân trước kèm mô ngực của bộ xít để sử dụng cho việc nhân lên đoạn gen đặc trưng loài sử dụng PCR.

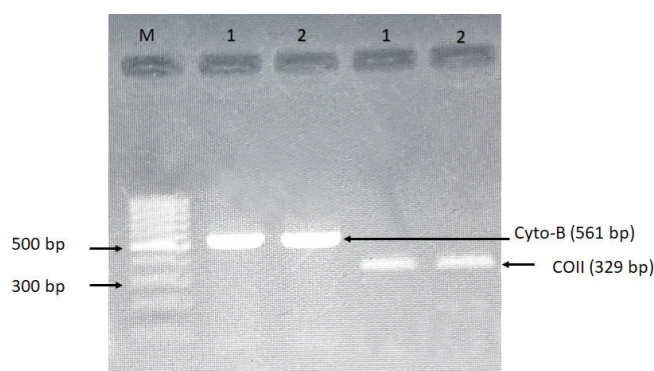


Hình 3. ADN tổng số được phân lập từ các phần khác nhau của bộ xít *T. rubrofasciata*. M: thang ADN chuẩn 1 kb; M1: tách từ chân và mô ngực bộ xít đi kèm; M2: tách từ đầu bộ xít; M3: tách từ chân sau và mô bụng bộ xít đi kèm.

Quy trình phản ứng PCR đã được tối ưu hóa theo thiết kế nêu trong phần phương pháp, mỗi phản ứng bao gồm 250 ng ADN tổng số, nồng độ mỗi môi 10 pmol/ μ l. Chu trình nhiệt của phản ứng sau khi tối ưu gồm các bước: 95°C trong

5 phút; 35 chu kỳ lặp lại 95°C - 1 phút, 55°C - 30 giây, 72°C - 45 giây và 72°C - 10 phút.

Chu trình PCR tối ưu như trên đã nhân lên các sản phẩm đặc hiệu (1 băng sản phẩm duy nhất có kích thước như dự kiến) với nồng độ cao (hình 4). Sản phẩm PCR được giải trình tự và so sánh với ngân hàng dữ liệu quốc tế về gen ở côn trùng.



Hình 4. Sản phẩm PCR với cặp mồi Cyto-B và COII. M: thang chuẩn ADN 100 bp; số 1 và 2 là sản phẩm PCR nhân lên từ ADN của 2 cá thể (số 1 và số 2) với hai cặp mồi tương ứng.

Trình tự Cyto-B của BXHM ở miền Trung Việt Nam

Trình tự đoạn gen cytochrome B của BXHM *T. rubrofasciata* tại miền Trung Việt Nam chứa 507 nucleotide được trình bày trong bảng 2, được gửi lưu trên genbank với số hiệu MN215889 (online ngày 15/3/2020). Trình tự này được so sánh với các trình tự của gen này ở các quần thể lân cận đã được công bố trước đây sử dụng server miễn phí CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Bảng 2. Trình tự 507 bp của gen Cyto-B từ *T. rubrofasciata* tại miền Trung Việt Nam.

```
CATTGGGGTGATTTTATTATTCATAATTATAGGAACTGCATTTT
TAGGGTATGTCTTACCCTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGC
AACAGTTATTACTAACTTGTATCTGCTATCCCGTACTTAGGAAA
TGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGGATTCTCAGTAGATA
ACGCTACTTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCA
TTCATTATTGCAGCATTAGTATTAATCCATTACTCTTCTCCATC
AAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAATAGAAATTTTGA
TAAATCCCATTTCACCCATATTTCTCTATTAAGACCTTATAGGA
GTATCAATAACCCCTTATTTCTTATCCTACTAAACCTTTGAGAAC
CTCGATTATTTGGGAGACCCCTGAAAACCTTATCCCAGCCAACCC
ATTAGTTACCCCGTTTCATATCCAACAGAATGGTATTTCTATT
TGCATACGCAATTCTACGATC
```

Kết quả so sánh đa trình tự cho thấy, trình tự đoạn gen Cyto-B ở quần thể *T. rubrofasciata* tại miền Trung Việt Nam hoàn toàn trùng khớp với các trình tự từ các cá thể đã thu thập được ở Hà Nội (Việt Nam) và Đài Loan (hình 5).

KP899111.1: Taiwan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=KP899111.1>
 KR632555.1: Clone 1 Hanoi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=KR632555.1%3A>
 KR632556.1: Clone 2; Hanoi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=KR632556.1>

Central.VN	CATTGGGGTGATTTTATTATTCATAATTATAGGAACTGCATTTT	60
KP899111.1	CATTGGGGTGATTTTATTATTCATAATTATAGGAACTGCATTTT	60
KR632555.1	-----TTCATAATTATAGGAACTGCATTTT	41
KR632556.1	-----TTCATAATTATAGGAACTGCATTTT	41
Central.VN	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTA	120
KP899111.1	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTA	120
KR632555.1	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTA	101
KR632556.1	CTGAGGACAAATATCCTTATGAGGAGCAACAGTTATTACTA	101
Central.VN	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCT	180
KP899111.1	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCT	180
KR632555.1	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCT	161
KR632556.1	GTACTTAGGAAATGACTTAGTCATATGATTATGAGGGGATTCT	161
Central.VN	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTCA	240
KP899111.1	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTCA	240
KR632555.1	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTCA	221
KR632556.1	TTTAACTCGATTCTTTGCCCTACATTTCTTTTACCATTCA	221
Central.VN	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATT	300
KP899111.1	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATT	300
KR632555.1	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATT	281
KR632556.1	AATCCATTACTCTTTTCCATCAACAGGATCTAATAATCCATT	281
Central.VN	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGAC	360
KP899111.1	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGAC	360
KR632555.1	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGAC	341
KR632556.1	TTTTGATAAAATCCCATTTTACCCATATTTCTCTATTAAGAC	341
Central.VN	AACCCCTTATATCTTTATCTACTAAACCTTTGAGAACCTCG	420
KP899111.1	AACCCCTTATATCTTTATCTACTAAACCTTTGAGAACCTCG	420
KR632555.1	AACCCCTTATATCTTTATCTACTAAACCTTTGAGAACCTCG	401
KR632556.1	AACCCCTTATATCTTTATCTACTAAACCTTTGAGAACCTCG	401
Central.VN	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCCA	480
KP899111.1	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCCA	480
KR632555.1	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCCA	461
KR632556.1	AAACTTTATCCAGCCAACCCATTAGTTACCCGGTTCATATCCA	461
Central.VN	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATC-----	507
KP899111.1	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATCTATTCTTAATAA	540
KR632555.1	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATCTATTCTTAATAA	521
KR632556.1	TCTATTTCATACGCAATTCTACGATCTATTCTTAATAA	521

Hình 5. So sánh trình tự Cyto-B của *T. rubrofasciata* ở miền Trung Việt Nam với các trình tự của các quần thể loài này ở Hà Nội, Việt Nam (KR632555.1 và KR632556.1) và Đài Loan (KP899111.1).

Trình tự đoạn gen COII của BXHM ở miền Trung Việt Nam

Sau khi đã loại bỏ mồi, đoạn trình tự của COII được nhân lên có chiều dài 276 nucleotide, được trình bày trong bảng 3, được gửi lưu trên genbank với số hiệu MN215890 (online ngày 15/3/2020).

Bảng 3. Trình tự 276 bp của gen COII từ *T. rubrofasciata* tại miền Trung.

```
GCTAACTCCCCATTAATAGAACAACTTACATTTTCCATGACCACA
CCCTTATAATCTTAACAATAATCACTATTCTAGTAAGATATATAATA
GAACAATCTTCTTAAACAATAATCACTGAAATCTCTAGAAAGG
ACAAACTATTGAACATAATTTGAACATTCTACAGCCCTCACTCTA
ATCTTTATCGTCTCTCCAAAGATTACAAATTCTATACTTAATAGATGA
ATTAAACAACCATTAATAACAATTAATCTATTGGCCATCAA
```

Kết quả so sánh, tìm kiếm các trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI cho thấy, đoạn trình tự này hoàn toàn giống với một đoạn trong hệ gen ty thể của *T. rubrofasciata* được Dong và cs [19] công bố và đăng ký với mã số MH934953.1 vào tháng 9/2018 (hình 6).

Triatoma rubrofasciata mitochondrion, complete genome
Sequence ID: MH934953.1 Length: 17150 Number of Matches: 1

Range 1: 3030 to 3305		GenBank	Graphics	Next Match	Prev
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
510 bits(276)	8e-141	276/276(100%)	0/276(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCTAACTCCCCATTAATAGAACAACTTACATTTTCCATGACCACCCCTTATAATCTTA	60			
Sbjct 3030		3089			
Query 61	ACAATAATCACTATTCTAGTAAAGATATATAAAGAACAACTTCTTTAAACAAATTAACC	120			
Sbjct 3090		3149			
Query 121	AATCGAAATCTTCTAGAAAGGACAACTATTGAACATAATTTGAACATTCTACAGCCCTC	180			
Sbjct 3150		3209			
Query 181	ACTCTAATCTTTATCGCTCTCCCAAGATTACAAATCTATACTTAATAGATGAATTAAC	240			
Sbjct 3210		3269			
Query 241	AAACCATTAAATAACAATTAAATCTATTGGCCATCAA	276			
Sbjct 3270		3305			

Hình 6. Lai đoạn trình tự COII của *T. rubrofasciata* ở miền Trung với các trình tự trên ngân hàng gen.

Quy trình PCR trong nghiên cứu này đã được tối ưu cho hai đoạn gen đặc trưng loài với sản phẩm PCR có thể giải trình tự trực tiếp. Đặc biệt, quy trình đã được tối ưu trong điều kiện sử dụng tối đa các nguyên vật liệu và dịch vụ của Việt Nam. Các kết quả sinh học phân tử đã khẳng định mẫu nghiên cứu của chúng tôi chính xác là loài BXHM *T. rubrofasciata*, đồng thời cung cấp dẫn liệu về gen ty thể của *T. rubrofasciata* ở Việt Nam. Đặc biệt, trình tự COII trong nghiên cứu cũng là đoạn trình tự đầu tiên của gen này được công bố cho loài *T. rubrofasciata* ở Việt Nam.

Kết luận

Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử cho kết quả chính xác với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giúp định danh chính xác các loài, đặc biệt là các loài gần, loài đồng hình, có ý nghĩa lớn trong phân loại học hiện nay. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, phương pháp định danh sinh học phân tử hoàn toàn có thể triển khai trong điều kiện phòng thí nghiệm đơn giản, sử dụng các hóa chất và dịch vụ nội địa phục vụ nghiên cứu định danh và phân loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.A. Innis, K.B. Myambo, D.H. Gelfand, M.A. Brow (1988), "DNA sequencing with thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**(24), pp.9436-9440.
- [2] B. Rannala, Z. Yang (2003), "Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci", *Genetics*, **164**, pp.1645-1656.
- [3] Z. Yang, B. Rannala (2010), "Bayesian species delimitation using multilocus sequence data", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, pp.9264-9269, DOI: 10.1073/pnas.0913022107.
- [4] M. Sutou, T. Kato, M. Ito (2011), "Recent discoveries of armyworms in Japan and their species identification using DNA barcoding", *Mol. Ecol. Resour.*, **11**, pp.992-1001, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03040.x.
- [5] K. Candek, M. Kuntner (2015), "DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales",

Mol. Ecol. Resour., **15**, pp.268-277, DOI: 10.1111/1755-0998.12304.

[6] S. Hassold, et al. (2016), "DNA barcoding of Malagasy rosewoods: towards a molecular identification of CITES-listed *Dalbergia* species", *PLOS ONE*, **11**, DOI: 10.1371/journal.pone.0157881.

[7] A. Linacre, James Chun-I Lee (2005), "Species determination: the role and use of the cytochrome b gene", *Methods in Molecular Biology*, **297**, DOI: 10.1007/978-1-4939-3597-0_20.

[8] A. Chan, et al. (2014), "DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore", *Parasite Vector*, **7**, DOI: 10.1186/s13071-014-0569-4.

[9] J. Li, et al. (2015), "DNA barcoding of Murinae (Rodentia: Muridae) and Arvicolinae (Rodentia: Cricetidae) distributed in China", *Mol. Ecol. Resour.*, **15**, pp.153-167, DOI: 10.1111/1755-0998.12279.

[10] O. Hawlitschek, et al. (2016), "Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany", *Mol. Ecol. Resour.*, **16**, pp.242-253, DOI: 10.1111/1755-0998.12416.

[11] R.T. Schuh, J.A. Slater (1995), *True Bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)*, Classification and Natural History, NCROL.

[12] F.A. Monteiro, A.A. Escalante, C.B. Beard (2001), "Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective", *Trends in Parasitology*, **17**(7), pp.344-347, DOI: 10.1590/S0001-37652005000300007.

[13] D.F. Lyman, F.A. Monteiro, A.A. Escalante, C. Cordon-Rosales, D.M. Wesson, J.P. Dujardin, C.B. Beard (1999), "Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, pp.377-386.

[14] Q. Liu, Y.H. Guo, Y. Zhang, Z.B. Zhou, L.L. Zhang, D. Zhu, X.N. Zhou (2017), "First records of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Reduviidae) in Foshan, Guangdong Province, Southern China", *Infect. Dis. Poverty*, **6**, DOI: 10.1186/s40249-017-0342-y.

[15] Trương Xuân Lam (2017), *Bọ xít hút máu tại Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.

[16] F.A. Monteiro, T.V. Barrett, S. Fitzpatrick, C. Cordon-Rosales, D. Feliciangeli, C.B. Beard (2003), "Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*", *Mol. Ecol.*, **12**, pp.997-1006, DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01802.x.

[17] P.S. Patterson, M.W. Gaunt (2010), "Phylogenetic multilocus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America", *Mol. Phyl. Evol.*, **56**, pp.608-621, DOI: 10.1016/j.ympev.2010.04.038.

[18] S.A. Justi, C.A. Russo, J.R. Mallet, M.T. Obara, C. Galvão (2014), "Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)", *Parasites & Vectors*, **7**, pp.145-149.

[19] L. Dong, X. Ma, M. Wang, D. Zhu, Y. Feng, Y. Zhang, J. Wang (2018), "Complete mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma rubrofasciata*", *The Korean Journal of Parasitology*, **56**(5), DOI: 10.3347/kjp.2018.56.5.515.