

Phân tích đa hình gen ty thể *cox1* của sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* thu thập tại 2 tỉnh Ninh Bình và Phú Thọ

Genetic diversity of *cox1* mitochondrial gene among *Clonorchis sinensis* populations isolated in Ninh Binh and Phu Tho provinces, Vietnam

Nguyễn Văn Tuấn*, Nguyễn Thị Như Quỳnh*,
Nguyễn Văn Thoại**, Nguyễn Đức Tân**,
Hoàng Thị Hòa***, Đỗ Thị Thùy Dung***,
Đỗ Ngọc Ánh*

*Học viện Quân y,
**Phân Viện thú y Miền Trung,
***Đại học Điều dưỡng Nam Định

Tóm tắt

Mục tiêu: Phân tích đặc điểm đa hình gen ty thể *cox1* của sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* phân lập ở 2 tỉnh Ninh Bình và Phú Thọ, Việt Nam. **Đối tượng và phương pháp:** 8 cá thể sán lá gan nhỏ được thu thập từ người ở Ninh Bình (3 cá thể) và Phú Thọ (5 cá thể) được giải trình tự gen *cox1* hệ gen ty thể. Các trình tự sau đó được so sánh với nhau và với trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen để xác định loài và phân tích đặc điểm đa hình. **Kết quả:** So sánh với trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen, trình tự gen *cox1* của sán *C. sinensis* tại Ninh Bình và Phú Thọ có 13 điểm đa hình khác nhau. Trình tự gen *cox1* của các cá thể sán lá gan nhỏ ở Ninh Bình có 11 vị trí khác biệt so với sán lá gan nhỏ ở Phú Thọ, trong đó chủ yếu ở vị trí 9 nucleotid số 66, 114, 243, 381, 933, 954, 1137, 1244, 1380. **Kết luận:** Trình tự gen *cox1* của sán *C. sinensis* tại Ninh Bình và Phú Thọ cung cấp các thông tin quan trọng có thể sử dụng xác định sự đa dạng di truyền của sán lá gan nhỏ ở các khu vực địa lý khác nhau tại Việt Nam.

Từ khóa: *C. sinensis*, đa hình, gen *cox1*.

Summary

Objective: This study was performed to analyze the genetic diversity of the mitochondrial *cox1* gene among *Clonorchis sinensis* populations isolated in Ninh Binh and Phu Tho provinces, Vietnam. **Subject and method:** *cox1* gene of 8 small liver flukes collected from humans in Ninh Binh (3 individuals) and Phu Tho (5 individuals) were sequenced then compared with each other and reference sequences on the GenBank for species identification and analyzing of nucleotide variations. **Result:** The comparison between *C. sinensis* isolated in Ninh Binh, Phu Tho and reference sequences on the GenBank indicated 13 nucleotide variations in the *cox1* gene. There are 11 variations between Ninh Binh and Phu Tho isolations, of which mainly at 9 variable sites no. 66, 114, 243, 381, 933, 954, 1137, 1244, 1380. **Conclusion:** *Cox1* gene sequencing of *C. sinensis* flukes in Ninh Binh and Phu Tho provides important information that can be used to determine the genetic diversity of small liver fluke in different geographical regions in Vietnam.

Keywords: *C. sinensis*, genetic diversity, *cox1* gene.

Ngày nhận bài: 21/1/2022, ngày chấp nhận đăng: 22/4/2022

Người phản hồi: Đỗ Ngọc Ánh, Email: dranh61@gmail.com - Học viện Quân y

1. Đặt vấn đề

Sán lá gan nhỏ (SLGN) gồm 3 loài *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* và *Opisthorchis viverrini* ký sinh ở gan và đường dẫn mật, lây truyền qua đường tiêu hóa do người ăn phải nang ấu trùng còn sống có trong cá [6], [7]. Cho đến nay, bệnh do SLGN vẫn được coi là một vấn đề sức khỏe cộng đồng ở nhiều nơi trên thế giới trong đó có Việt Nam [6]. Ước tính, trên toàn thế giới có khoảng 45 triệu người nhiễm SLGN. Tại Việt Nam, ít nhất 21 tỉnh được xác định có lưu hành bệnh do *C. sinensis*, tập trung chủ yếu ở các tỉnh miền Bắc, đặc biệt là khu vực Đồng bằng châu thổ sông Hồng, 11 tỉnh thành có lưu hành bệnh do *O. viverrini* tập trung chủ yếu ở các tỉnh miền Nam [2].

Để xác định loài SLGN có thể dựa vào đặc điểm hình thái của sán trưởng thành. Tuy nhiên, phương pháp này gặp một số khó khăn do sự giống nhau về hình thái giữa các loài SLGN và giữa SLGN với sán lá ruột nhỏ [3]. Do vậy, để có kết quả xác định loài SLGN chính xác, trong nhiều trường hợp sử dụng công cụ sinh học phân tử là rất cần thiết. Các chỉ thị gen có thể được sử dụng trong các kỹ thuật sinh học phân tử bao gồm: Các chỉ thị gen nhân (ITS1, ITS2) hoặc các chỉ thị gen ty thể (*cox1*, *nad1*, *nad3*...) [8].

Gen ty thể với đặc trưng di truyền theo dòng mẹ và có tỷ lệ biến đổi cao đã được ứng dụng rộng rãi trong xác định cấu trúc di truyền quần thể ở nhiều loài động vật trong đó có các loài sán lá. Gen *cytochrome C oxidase subunit I (cox1)* - hệ gen ty thể - là gen thường được sử dụng để xác định mức độ đa hình di truyền của các chủng sán ở các khu vực địa lý khác nhau [8]. Tuy nhiên, ở Việt Nam, dữ liệu về tính đa hình của các chỉ thị phân tử ở SLGN còn rất hạn chế. Nghiên cứu này thực hiện nhằm mục tiêu: *Phân tích đặc điểm đa hình gen ty thể cox1 của sán lá gan nhỏ Clonorchis sinensis phân lập ở 2 tỉnh Ninh Bình và Phú Thọ, Việt Nam.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Tổng số 8 cá thể SLGN trưởng thành được thu thập từ bệnh nhân được xác định nhiễm sán. Trong đó, 3 cá thể thu tại Ninh Bình và 5 cá thể thu tại Phú Thọ.

Các cá thể sán trưởng thành được thu thập bằng phương pháp tẩy bằng thuốc và xổ bằng thuốc nhuận tràng. Các cá thể sán sau khi thu thập được bảo quản trong các ống riêng biệt bằng cồn 70 độ ở -20°C cho tới khi làm thí nghiệm.

2.2. Phương pháp

Tách chiết DNA ty thể sán lá gan nhỏ

Mỗi cá thể sán lấy ra khoảng 25mg để tách chiết DNA. Phần cơ thể sán được nghiền nát sau đó tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit G-spin Total DNA Extraction Kit (Cat.no 17046) của hãng Intron (Hàn Quốc). DNA sau tách chiết được bảo quản ở -20°C cho tới khi tiến hành phản ứng PCR.

Khuếch đại đoạn gen *cox1* hệ gen ty thể

Đoạn gen ty thể kích thước 1719bp chứa gen *cox1* (kích thước 1560bp) được khuếch đại bằng cặp mồi Cox1-F1 và Cox1-R1 (Integrated DNA Technologies, USA). Thành phần mỗi phản ứng PCR bao gồm: 10μl Mastermix 2X (Promega, USA), 1μl mỗi mồi loại (10μM), 2μl dung dịch DNA, nước khử ion vừa đủ 20μl. Phản ứng PCR được thực hiện trên thiết bị luân nhiệt Thermo Mastercycler Gradient (Thermo Fisher Scientific, USA) theo chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: 94°C/1 phút, 61°C/1 phút và 72°C/1 phút 30 giây, cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C trong 15 phút. Kết thúc phản ứng PCR, lấy 5μl sản phẩm PCR điện di kiểm tra kết quả trên gel agarose 1,5% trong môi trường đệm TBE 0,5X. Sản phẩm PCR còn lại được bảo quản ở 4°C cho tới khi gửi đi tinh sạch và giải trình tự.

Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR của các mẫu sán được gửi tới hãng First BASE Laboratories Sdn Bhd service (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự. Mỗi mẫu đều được giải trình tự với 5 mồi Cox1-F1, Cox1-R1, Cox1-F2, Cox1-F3 và Cox1-R2 (Integrated DNA Technologies, USA) để thu được trình tự đầy đủ của đoạn gen kích thước 1719bp. Thông tin các mồi giải trình tự ở trong Bảng 1.

Bảng 1. Danh sách mỗi khuếch đại và giải trình tự gen *cox1*

Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Mục đích	Nguồn gốc
Cox1-F1	CGG TGT TCG GCC TTC TGT TA	PCR, Giải trình tự	Nghiên cứu này
Cox1-R1	GCA GCT TTA CAA GAA CCG CA	PCR, Giải trình tự	Nghiên cứu này
Cox1-F2	TTT CGC TTC ATT TGG CTG GG	Giải trình tự	Nghiên cứu này
Cox1-F3	TCA TGT GGT GGA TAA TCG GG	Giải trình tự	Nghiên cứu này
Cox1-R2	ACA TAC ACC TCA GGA TGA CC	Giải trình tự	Nghiên cứu này

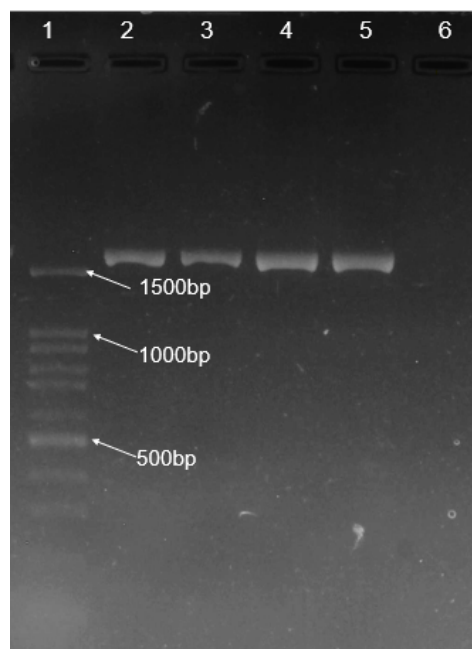
2.3. Xử lý số liệu

Kết quả giải trình tự gen *cox1* của các mẫu SLGN được phân tích, chỉnh sửa bằng các phần mềm tin sinh học Mega X, Bioedit 7.2.5 và so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Các trình tự gen *cox1* của SLGN *C. sinensis* sử dụng để tham chiếu gồm: SLGN ở Đà Nẵng (từ KJ204612.1 đến KJ204624.1), Thái Bình (từ KJ204599.1 đến KJ204611.1), Nam Định (MF287785.1), Nga (FJ381664.2, MN116479.1,

MN116473.1), Hàn Quốc (JF729304.1) và Trung Quốc (JF729303.1). Trình tự gen *cox1* của SLGN *O. felineus* ở Nga (mã số NC011127.2, EU921260.2) và *O. viverrini* ở Trung Quốc (mã số JF739555.1) cũng được đưa vào nghiên cứu để so sánh và xác định mối quan hệ ngoại loài. Các trình tự sau đó được sử dụng để xây dựng cây phả hệ bằng thuật toán NJ (Neighbor-joining) trên phần mềm Mega X, với hệ số bootstrap là 1.000 lần lặp lại, tham chiếu ngoại loài với chủng *O. felineus* ở Nga (mã số NC011127.2).

3. Kết quả

3.1. Kết quả xác định loài sán lá gan nhỏ bằng gen ty thể *cox1*



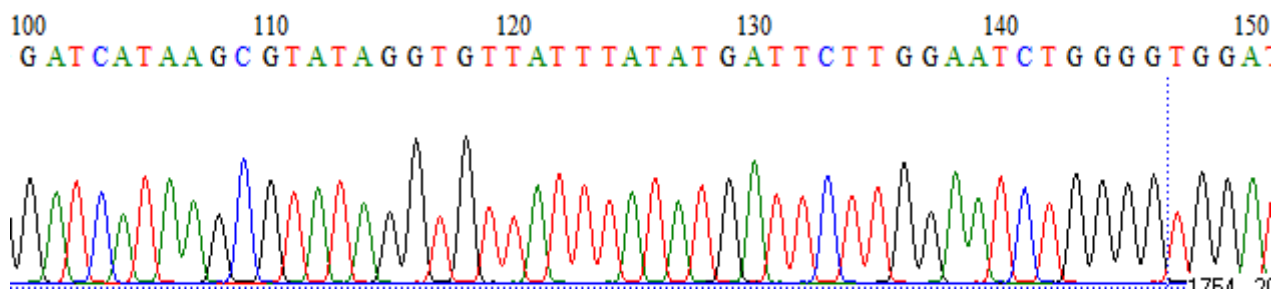
Hình 1. Kết quả điện di trên thạch agarose của các mẫu trong nghiên cứu.

Chú thích: 1- Thang DNA chuẩn; 2- PT2; 3- PT3; 4- PT4; 5- PT5; 6- Chứng âm.

Bằng cặp mỗi Cox1-F1 và Cox1-R1, sản phẩm PCR thu được khi điện di trên gel agarose 1,5% có kích thước xấp xỉ 1700 bp, phù hợp với kích thước lý thuyết khi thiết kế mỗi.

Sản phẩm PCR với cặp mỗi Cox1-F1 và Cox1-R1 của toàn bộ 8 mẫu đều được giải trình tự với 5' mỗi như ở

Bảng 1. Kết quả cho thấy, các trình tự thu được đều cho tín hiệu tốt. Hình 2 minh họa một đoạn trình tự của mẫu SLGN ký hiệu NB1 khi được giải trình tự bằng mỗi Cox1-F1. Các trình tự này được ghép cặp, chỉnh sửa, đăng ký và được cấp mã số trên ngân hàng gen từ OM810324 đến OM810331 (Bảng 3).



Hình 2. Kết quả giải trình tự gen cox1 của mẫu NB1 bằng mỗi Cox1-F1.

Kết quả so sánh sự tương đồng gen cox1 giữa SLGN trong nghiên cứu này với trình tự gen cox1 của sán *C. sinensis* ở Nga (mã số FJ381664.2) tham chiếu trên ngân hàng gen cho thấy tỷ lệ tương đồng đều ≥

99,5%; so sánh với trình tự gen cox1 của SLGN *O. felineus* ở Nga (mã số NC011127.2, EU921260.2) và *O. viverrini* ở Trung Quốc (mã số JF739555.1) tỷ lệ tương đồng từ 82,3 - 84,0%.

Kết quả phân tích tính đa hình gen ty thể cox1 của sán lá gan nhỏ

Bảng 1. Tỷ lệ tương đồng nucleotid đoạn gen cox1 trong nghiên cứu với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen

TT	Mẫu/Trình tự	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	FJ381664.2 (Russia)	100	99,6	99,7	99,4	99,4	99,8	99,9	99,7	99,8	99,6	99,6	99,6	99,5	99,5	99,5	99,6	99,5
2	MN116479.1 (Russia)	99,6	100	99,4	99,2	99,2	99,5	99,6	99,4	99,6	99,3	99,3	99,3	99,6	99,6	99,6	99,7	99,6
3	MN116473.1 (Russia)	99,7	99,4	100	99,2	99,2	99,6	99,7	99,5	99,6	99,5	99,5	99,5	99,3	99,3	99,3	99,4	99,3
4	JF729304.1 (Korea)	99,4	99,2	99,2	100	100	99,3	99,4	99,2	99,4	99,1	99,1	99,1	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2
5	JF729303.1 (China)	99,4	99,2	99,2	100	100	99,3	99,4	99,2	99,4	99,1	99,1	99,1	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2
6	KJ204612.1 (Đà Nẵng)	99,8	99,5	99,6	99,3	99,3	100	99,8	99,6	99,8	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	99,4	99,5	99,4
7	KJ204624.1 (Đà Nẵng)	99,9	99,6	99,7	99,4	99,4	99,8	100	99,8	99,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6
8	KJ204599.1 (Thái Bình)	99,7	99,4	99,5	99,2	99,2	99,6	99,8	100	99,7	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
9	KJ204611.1 (Thái Bình)	99,8	99,6	99,6	99,4	99,4	99,8	99,9	99,7	100	99,6	99,6	99,6	99,5	99,5	99,5	99,6	99,5
10	NB1 (OM810324)	99,6	99,3	99,5	99,1	99,1	99,5	99,6	99,4	99,6	100	100	100	99,2	99,4	99,2	99,3	99,2

Bảng 2. Tỷ lệ tương đồng nucleotid đoạn gen *cox1* trong nghiên cứu với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen (Tiếp theo)

TT	Mẫu/Trình tự	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
11	NB11 (OM810325)	99,6	99,3	99,5	99,1	99,1	99,5	99,6	99,4	99,6	100	100	100	99,2	99,4	99,2	99,3	99,2
12	NB12 (OM810326)	99,6	99,3	99,5	99,1	99,1	99,5	99,6	99,4	99,6	100	100	100	99,2	99,4	99,2	99,3	99,2
13	PT1 (OM810327)	99,5	99,6	99,3	99,2	99,2	99,4	99,6	99,4	99,5	99,2	99,2	99,2	100	99,8	99,8	99,9	99,8
14	PT2 (OM810328)	99,5	99,6	99,3	99,2	99,2	99,4	99,6	99,4	99,5	99,4	99,4	99,4	99,8	100	99,8	99,9	99,8
15	PT3 (OM810329)	99,5	99,6	99,3	99,2	99,2	99,4	99,6	99,4	99,5	99,2	99,2	99,2	99,8	99,8	100	99,9	99,8
16	PT4 (OM810330)	99,6	99,7	99,4	99,2	99,2	99,5	99,6	99,4	99,6	99,3	99,3	99,3	99,9	99,9	99,9	100	99,9
17	PT5 (OM810331)	99,5	99,6	99,3	99,2	99,2	99,4	99,6	99,4	99,5	99,2	99,2	99,2	99,8	99,8	99,8	99,9	100

Đoạn gen *cox1* ở các mẫu được giải trình tự có kích thước 1560bp, so sánh giữa trình tự của các mẫu trong nghiên cứu với nhau và giữa các mẫu trong nghiên cứu với các trình tự của SLGN *C. sinensis* trên ngân hàng gen cho thấy tỷ lệ tương đồng đều $\geq 99,1\%$. So với trình tự gen *cox1* của SLGN *O. felineus* và *O. viverrini*, tỷ lệ tương đồng đều $< 85\%$.

Bảng 3. Vị trí có sai khác về nucleotid giữa trình tự của các mẫu trong nghiên cứu với các trình tự trên thế giới

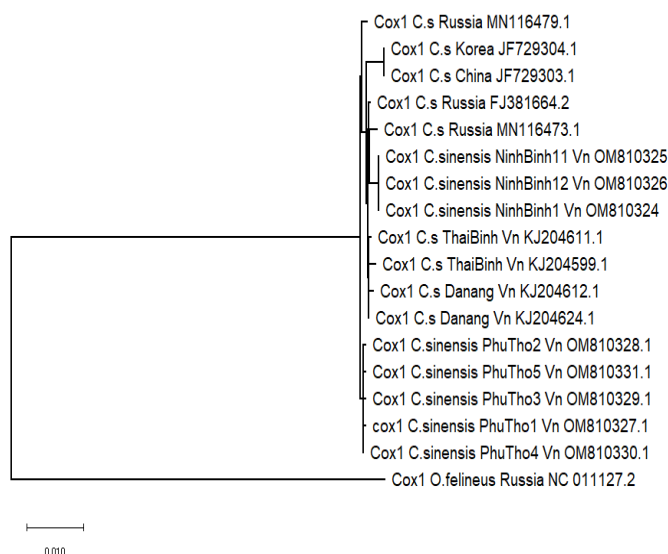
Chủng/Mã số	Quốc gia	Vị trí biến đổi nucleotid trên gen <i>cox1</i>												
		66	114	241	243	381	501	933	954	1135	1137	1244	1380	1449
FJ381664.2	Nga	T	G	C	A	T	C	G	A	C	A	C	T	C
MN116479.1	Nga	G	G	C	G	T	C	G	A	C	G	C	C	C
MN116473.1	Nga	A	G	C	A	T	C	G	A	C	A	C	T	C
JF729304.1	Hàn Quốc	G	G	C	G	T	C	G	A	C	A	C	T	C
JF729303.1	Trung Quốc	G	G	C	G	T	C	G	A	C	A	C	T	C
KJ204612.1	Đà Nẵng	G	G	C	A	T	C	G	A	C	A	C	T	C
KJ204624.1	Đà Nẵng	G	G	C	A	T	C	G	A	C	A	C	T	C
KJ204599.1	Thái Bình	G	G	C	A	T	C	G	A	C	A	C	T	C
KJ204611.1	Thái Bình	G	G	C	A	T	C	G	A	C	A	C	T	C
NB1 (OM810324)	Ninh Bình	A	A	C	A	C	C	G	A	T	A	T	T	C
NB11 (OM810325)	Ninh Bình	A	A	C	A	C	C	G	A	T	A	T	T	C
NB12 (OM810326)	Ninh Bình	A	A	C	A	C	C	G	A	T	A	T	T	C
PT1 (OM810327)	Phú Thọ	G	G	C	G	T	T	A	G	C	G	C	C	C
PT2 (OM810328)	Phú Thọ	G	G	C	G	T	C	A	G	T	G	C	C	C
PT3 (OM810329)	Phú Thọ	G	G	T	G	T	C	A	G	C	G	C	C	G
PT4 (OM810330)	Phú Thọ	G	G	C	G	T	C	A	G	C	G	C	C	C
PT5 (OM810331)	Phú Thọ	G	G	T	G	T	C	A	G	C	G	C	C	C

Kết quả so sánh cho thấy, trình tự của 3 cá thể SLGN ở Ninh Bình hoàn toàn tương đồng nhau, trong khi giữa 5 cá thể sán ở Phú Thọ có sự khác biệt không nhiều (1 - 2 vị trí). Giữa các chủng ở Ninh Bình và các chủng ở Phú Thọ có từ 9 đến 11 vị trí sai khác, chủ yếu ở các vị trí nucleotid số 66, 114, 243, 381, 933, 954, 1137, 1244, 1380. Ngoài ra, so sánh các trình tự gen *cox1* trong nghiên cứu này với 27 trình tự gen *cox1* ở Đà Nẵng (từ KJ204612.1 đến KJ204624.1), Thái Bình (từ KJ204599.1 đến KJ204611.1) và ở Nam Định (MF287785.1) công bố trước đó trên ngân hàng gen thấy có 40 vị trí xuất hiện sai khác nucleotid.

Bảng 4. Thành phần các nucleotid ở các mẫu trong nghiên cứu này so với các mẫu trên thế giới

TT	Chủng/Mã số	Quốc gia	Nucleotide A		Nucleotide C		Nucleotide G		Nucleotide T		A + T		G + C	
			SL	%	SL	%	SL	%	SL	%	SL	%	SL	%
1	FJ381664.2	Nga	264	16,92	210	13,46	426	27,31	660	42,31	924	59,23	636	40,77
2	MN116479.1	Nga	264	16,92	211	13,53	427	27,37	658	42,18	922	59,10	638	40,90
3	MN116473.1	Nga	266	17,05	211	13,53	425	27,24	658	42,18	924	59,23	636	40,77
4	JF729304.1	Hàn Quốc	261	16,73	211	13,53	430	27,56	658	42,18	919	58,91	641	41,09
5	JF729303.1	Trung Quốc	261	16,53	211	13,53	430	27,56	658	42,18	919	58,91	641	41,09
6	KJ204612.1	Đà Nẵng	264	16,92	212	13,59	427	27,37	657	42,12	921	59,04	639	40,96
7	KJ204624.1	Đà Nẵng	264	16,92	210	13,46	427	27,37	659	42,24	923	59,17	637	40,83
8	KJ204599.1	Thái Bình	264	16,92	211	15,53	427	27,37	658	42,18	922	59,10	638	40,90
9	KJ204611.1	Thái Bình	263	16,86	210	13,46	428	27,44	659	42,24	922	59,10	638	40,90
10	NB1 (OM810324)	Ninh Bình	266	17,05	209	13,40	425	27,24	660	42,31	926	59,36	634	40,64
11	NB11 (OM810325)	Ninh Bình	266	17,05	209	13,40	425	27,24	660	42,31	926	59,36	634	40,64
12	NB12 (OM810326)	Ninh Bình	266	17,05	209	13,40	425	27,24	660	42,31	926	59,36	634	40,64
13	PT1 (OM810327)	Phú Thọ	262	16,79	210	13,46	429	27,50	659	42,24	921	59,04	639	40,96
14	PT2 (OM810328)	Phú Thọ	262	16,79	210	13,46	429	27,50	659	42,24	921	59,04	639	40,96
15	PT3 (OM810329)	Phú Thọ	262	16,79	210	13,46	430	27,56	658	42,18	920	58,97	640	41,03
16	PT4 (OM810330)	Phú Thọ	262	16,79	211	13,53	429	27,50	658	42,18	920	58,97	640	41,03
17	PT5 (OM810331)	Phú Thọ	262	16,79	210	13,46	429	27,50	659	42,24	921	59,04	639	40,96

Tỷ lệ các nucleotid trên gen *cox1* của các cá thể SLGN trong nghiên cứu này lần lượt là: Nucleotid A (16,79 - 17,05%), nucleotid C (13,40 - 13,53%), nucleotid G (27,24 - 27,56%), nucleotid T (42,18 - 42,31%), nucleotid A+T (58,97 - 59,36%), nucleotid G+C (40,64 - 41,03%).



Hình 3. Sơ đồ cây phả hệ giữa các chủng trong nghiên cứu và một số chủng tham khảo trên thế giới và trong nước.

Kết quả phân tích cây phả hệ trong Hình 3 cho thấy các cá thể SLGN ở Ninh Bình, Phú Thọ trong nghiên cứu này có quan hệ họ hàng với SLGN ở Đà Nẵng, Thái Bình, Nga, Hàn Quốc và Trung Quốc, có quan hệ xa với loài SLGN *O. felinus* và *O. viverrini*.

4. Bàn luận

Qua phân tích trình tự đoạn gen *cox1* hệ gen ty thể của 8 cá thể SLGN thu thập tại Ninh Bình và Phú Thọ cho thấy, tất cả đều có kích thước 1560bp. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đó của Chelomina và cộng sự (2014) trên những mẫu SLGN *C. sinensis* ở Nga và Việt Nam [1] cũng như nghiên cứu của Shekhovtsov và cộng sự (2010) trên những mẫu SLGN *C. sinensis* thu thập ở Nga [9]. Kết quả so sánh giữa trình tự gen *cox1* các mẫu trong nghiên cứu này với các trình tự trên ngân hàng gen xác định các mẫu SLGN trong nghiên cứu này phù hợp với loài *C. sinensis* (tỷ lệ tương đồng > 99%) (Bảng 2).

Kết quả giữa các cá thể SLGN ở Ninh Bình và Phú Thọ cho thấy, trình tự gen *cox1* có từ 9 đến 11 vị trí sai khác, trong đó 9 vị trí khác biệt cố định nằm ở vị trí các nucleotid số 66, 114, 243, 381, 933, 954, 1137, 1244, 1380. Kết quả này gợi ý rằng, các vị trí này có thể sử dụng làm chỉ thị để xác định, phân biệt SLGN *C. sinensis* ở 2 địa phương trên. Tuy nhiên đây mới chỉ là nhận định từ việc phân tích trình tự của 8 cá thể, cần có

thêm phân tích từ nhiều trình tự hơn để củng cố nhận định trên. Ngoài ra, có thêm 3 vị trí đa hình khác được ghi nhận giữa những cá thể SLGN ở 2 địa phương này là nucleotide ở các vị trí số 241, 501 và 1135. Phân tích sự khác biệt giữa những trình tự trong nghiên cứu này với các trình tự SLGN *C. sinensis* ở trong nước (27 chủng ở Đà Nẵng, Thái Bình và Nam Định) đã công bố trước đó trên ngân hàng gen cho thấy có 40 vị trí sai khác, tuy nhiên khi so sánh từng cặp trình tự thì số nucleotid sai khác luôn ≤ 13 nucleotid, tỷ lệ tương đồng > 99%. Trong khi đó, so với trình tự gen *cox1* của *O. felinus* và *O. viverrini* tỷ lệ tương đồng $\leq 84\%$. Điều này cho thấy, giữa các cá thể cùng loài, tỷ lệ thay đổi nucleotide trên gen *cox1* tương đối thấp, nhưng so với các cá thể ngoại loài tỷ lệ thay đổi nucleotide của gen *cox1* khá cao. Điều đó chứng tỏ, gen *cox1* rất có giá trị trong giám định loài. Kết quả này phù hợp với nhận định trước đó của Lê Thanh Hòa và cộng sự (2002) về đặc điểm của hệ gen ty thể sán lá [4].

Về tỷ lệ các nucleotid, kết quả phân tích cho thấy các mẫu trong nghiên cứu đều có tỷ lệ nucleotid A+T cao (58,97 - 59,36%) cao hơn tỷ lệ nucleotid G+C (40,64 - 41,03%). Kết quả này phù hợp với công bố trước đó của Lee và cộng sự (2004), theo đó tỷ lệ G+C của các mẫu sán *C. sinensis* trong nghiên cứu dao động từ 41 - 42% [5]. Nghiên cứu của Tatonova và cộng sự (2013) trên một phần gen *cox1* dài 324bp của SLGN *C. sinensis*

thu được ở Nga kết hợp phân tích các trình tự đã được đăng ký trên ngân hàng gen cũng cho thấy tỷ lệ AT/GC cao, dao động từ 1,34 - 1,36, tương ứng tỷ lệ A+T là 57,22 - 57,68%, tỷ lệ G+C là 42,32 - 42,78% [10]. Về tỷ lệ từng loại nucleotid, cao nhất là nucleotid T (42%), sau đó đến nucleotid G (27%), nucleotid A (16 - 17%) và thấp nhất là nucleotid C (13%), kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Chelomina và cộng sự (2014) [1] và nghiên cứu của Tatonova và cộng sự (2013) [10].

Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy các cá thể SLGN ở Ninh Bình và Phú Thọ có quan hệ họ hàng gần với SLGN *C. sinensis* ở Đà Nẵng, Thái Bình, Nga, Hàn Quốc và Trung Quốc, có quan hệ xa với loài SLGN *O. felineus* và *O. viverrini* (Hình 3). Kết quả này cho thấy, SLGN ở Ninh Bình và Phú Thọ được xác định là loài *C. sinensis*. Trên cơ sở so sánh trình tự gen *cox1* giữa các cá thể *C. sinensis* với nhau có thể thấy SLGN ở Phú Thọ có quan hệ họ hàng xa với SLGN ở Ninh Bình, Đà Nẵng, Thái Bình, Nga, Hàn Quốc và Trung Quốc. Điều này chỉ ra rằng, quan hệ họ hàng của SLGN *C. sinensis* không tương đồng với khoảng cách địa lý và cho thấy gen *cox1* của *C. sinensis* có tính đa hình nucleotide cao.

5. Kết luận

Phân tích trình tự gen *cox1* của 8 cá thể SLGN thu thập tại Ninh Bình và Phú Thọ cho thấy, tổng số có 13 điểm đa hình, chủ yếu ở vị trí 9 nucleotid số 66, 114, 243, 381, 933, 954, 1137, 1244, 1380.

Tài liệu tham khảo

- Chelomina GN et al (2014) *Genetic diversity of the Chinese liver fluke Clonorchis sinensis from Russia and Vietnam*. Int J Parasitol 44(11): 795-810.
- De Nguyen Van et al (2003) *The food-borne trematode zoonoses of Vietnam*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 34(1): 12-34.
- Infection with liver flukes (Opisthorchis viverrini, Opisthorchis felinus and Clonorchis sinensis)* (1994). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61: 121-175.
- Lê Thanh Hòa, Nguyễn Văn Đễ, and Nguyễn Bích Nga và cộng sự (2002) *Giám định loài sán lá gan bé Clonorchis sinensis ở Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử hệ gen ty thể*. Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng, số 4.
- Lee Soo-Ung and Sun Huh (2004) *Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korean and Chinese isolates of Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol 42(3): 145-148.
- Phyo Myint E et al (2020) *Discovery of carcinogenic liver fluke metacercariae in second intermediate hosts and surveillance on fish-borne trematode metacercariae infections in mekong region of myanmar*. International journal of environmental research and public health 17(11): 4108.
- Rim HJ (2005) *Clonorchiasis: An update*. Journal of Helminthology 79(3): 269-281.
- Saijuntha W et al (2008) *Mitochondrial DNA sequence variation among geographical isolates of Opisthorchis viverrini in Thailand and Lao PDR, and phylogenetic relationships with other trematodes*. Parasitology 135(12): 1479-1486.
- Shekhovtsov SV et al (2010) *The complete mitochondrial genomes of the liver flukes Opisthorchis felinus and Clonorchis sinensis (Trematoda)*. Parasitol Int 59(1): 100-103.
- Tatonova YV, Chelomina GN and Besprozvannykh VV (2013) *Genetic diversity of Clonorchis sinensis (Trematoda: Opisthorchiidae) in the Russian southern Far East based on mtDNA cox1 sequence variation*. Folia Parasitol (Praha) 60(2): 155-162.