

RPA - KỸ THUẬT MỚI TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH HẠI CÂY TRỒNG

Chu Đức Hà¹, Đoàn Thị Nhung², Trần Thị Hoa Mỹ^{1,2},
Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Lê Tiến Dũng¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Các bệnh trên cây trồng thường lây lan nhanh và khó phát hiện ở giai đoạn sớm, không chỉ gây khó khăn cho công tác sản xuất mà còn ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng nông sản. Vì vậy, thực tiễn sản xuất luôn đòi hỏi những công cụ chẩn đoán và phát hiện bệnh chính xác, nhanh nhạy. Gần đây, nhiều công cụ hiện đại nhằm xác định và chẩn đoán bệnh hại trên cây trồng đã ra đời và được ứng dụng vào thực tiễn, trong đó kỹ thuật RPA (recombinase polymerase amplification) khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt được đánh giá là có tiềm năng lớn trong chẩn đoán bệnh virus. Bài viết giới thiệu những thành tựu của kỹ thuật này và đánh giá tiềm năng ứng dụng trong quản lý dịch bệnh trên cây trồng tại Việt Nam.

Bệnh hại cây trồng là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây sụt giảm năng suất và chất lượng nông sản, đe dọa an ninh lương thực và việc xuất nhập khẩu mặt hàng này. Phần lớn bệnh hại cây trồng được xác định chủ yếu do một số tác nhân vi sinh vật, có thể kể đến như vi khuẩn, nấm, tuyến trùng và đặc biệt là virus. Thông thường, các bệnh trên cây trồng thường lây lan nhanh, rất khó phát hiện ở giai đoạn sớm. Điều này gây khó khăn trong công tác sản xuất cũng như cản trở quá trình xuất, nhập khẩu. Vì vậy, thực tế sản xuất luôn đòi hỏi sự chính xác và nhanh nhạy của các công cụ chẩn đoán và phát hiện bệnh.

Cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, nhiều công cụ hiện đại nhằm xác định và chẩn đoán bệnh được ra đời và ứng dụng vào thực tiễn. Trong số đó, nổi bật hơn cả là ELISA, PCR truyền thống,

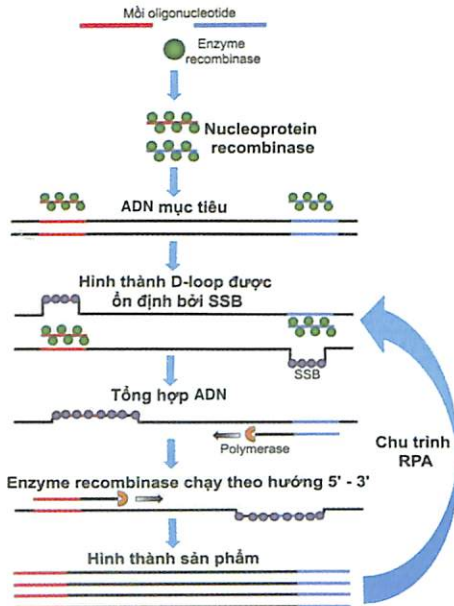
LAMP - những công cụ chẩn đoán phân tử phổ biến để phát hiện tác nhân gây bệnh ở thực vật. Gần đây, kỹ thuật RPA - bản chất là khuếch đại acid nucleic (bao gồm cả ADN và ARN) mục tiêu dựa vào hoạt tính của enzyme recombinase và polymerase đã được ứng dụng và đánh giá là có tiềm năng lớn trong nghiên cứu chẩn đoán bệnh virus [1]. Trong thực tế, RPA tỏ ra rất ưu việt so với các kỹ thuật truyền thống nên đã được áp dụng rất rộng rãi trong chẩn đoán bệnh trên người [2-4], động vật [5, 6] và gần đây là trong nông nghiệp. Tuy nhiên, các ứng dụng của RPA trong nông nghiệp vẫn chưa thực sự nổi bật. Song song với đó, nỗ lực của các nhà khoa học trong việc tối ưu hóa quá trình tách chiết acid nucleic cũng được ghi nhận [7]. Dưới đây, chúng tôi cung cấp những nguyên tắc căn bản của kỹ thuật RPA và kỹ thuật tách chiết acid nucleic dựa trên cellulose, từ đó tóm lược một số thành tựu bước

đầu của RPA trong chẩn đoán bệnh trên cây trồng.

Nguyên lý và ưu điểm của kỹ thuật RPA

Để trở thành một phương pháp được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, được ghi nhận trong hàng trăm công trình khoa học quốc tế uy tín trên PubMed (gần 60 kết quả được công bố trong năm 2015 và 2016), kỹ thuật RPA đã phát huy tối đa những ưu thế về tính đơn giản, tiết kiệm chi phí và thời gian phản ứng rất ngắn. Để xác định trình tự mục tiêu, RPA yêu cầu 2 mỗi oligonucleotide được thiết kế đơn giản (có thể cần thêm 1 probe) để phản ứng bắt cặp xảy ra. Đầu tiên, enzyme recombinase được sử dụng để liên kết với mỗi tạo thành phức hợp nucleoprotein recombinase. Phức hợp nucleoprotein này sẽ trượt và tìm kiếm trình tự tương đồng trên phân tử ADN mạch kép để hình thành cấu trúc D-loop. Trong khi đó, một phân tử protein bám sợi đơn ADN (single-

stranded ADN-binding protein, SSB) sẽ bám và ổn định mạch bổ sung. Cuối cùng, enzyme polymerase bắt đầu tổng hợp sản phẩm theo hướng từ vị trí mỗi bắt cặp đến đích (hình 1) [8].



Hình 1. Các bước cơ bản của chu trình RPA.

Hầu hết các kit thương mại hiện nay đều sử dụng enzyme recombinase RecA từ *Escherichia coli* và enzyme *Sau* DNA polymerase từ *Staphylococcus aureus*. Bên cạnh đó, protein T_4 UvsY hỗ trợ sự hình thành phức hợp nucleoprotein, polyethylene glycol là dung môi nhằm tăng cường khả năng tương tác giữa các thành phần phản ứng với phân tử ADN. Enzyme creatine kinase xúc tác quá trình tạo ATP từ phosphocreatine để cung cấp năng lượng cho hoạt động của các enzyme khác. Đến nay, một số hợp chất cần thiết cũng được bổ sung vào kit nhằm tối ưu hóa tính đặc hiệu và khả năng nhân đoạn trình tự mục tiêu của phản ứng RPA. Ví dụ, RecA có thể được thay thế bằng protein T_4 UvsX, T_4 gp32 dùng thay cho SSB, trong khi enzyme *Bsu* polymerase và Carbowax20M được lần lượt bổ sung thay cho *Sau* polymerase và

Bảng 1. So sánh kỹ thuật RPA với PCR thông thường và phương pháp LAMP.

Đặc tính	Kỹ thuật		
	PCR	LAMP	RPA
Số lượng mồi	2	4-6	2
Nhiệt độ phản ứng	Chu trình nhiệt	60-65°C	20-45 °C
Thời gian phản ứng	20-180 phút	<60 phút	<10 phút
Khả năng multiplex	Có	Khó	Có

polyethylene glycol [8].

Điểm mấu chốt quan trọng trong kỹ thuật RPA là việc sử dụng enzyme recombinase và phân tử SSB để thay thế cho bước biến tính trong PCR truyền thống. Chính vì vậy, đặc điểm nổi bật nhất của kỹ thuật RPA là cho phép khuếch đại đẳng nhiệt ở nhiệt độ thấp (37÷42°C). Thời gian phản ứng để xác định mẫu chỉ 5÷20 phút, rất ngắn so với PCR truyền thống (20÷180 phút), RT-PCR (3÷4 giờ) và LAMP (45~60 phút), tùy thuộc vào kích thước đoạn gen mục tiêu. Bên cạnh đó, độ nhạy (sensitivity) và độ đặc hiệu (specificity) của kỹ thuật RPA cũng rất đáng chú ý [8]. RPA có thể phát hiện được 1 bản copy của mẫu ADN mục tiêu (hoặc <10 bản copy của mẫu ARN) trong mẫu mà không cần đòi hỏi quá cao về độ tinh sạch của mẫu. Một số thử nghiệm cho thấy, RPA có thể xác định và nhân bản được đoạn acid nucleic mục tiêu trong mẫu chứa rất nhiều vật chất di truyền của các loài động vật khác nhau [9]. Trong y tế, kỹ thuật này có thể được áp dụng một cách linh hoạt nhằm phát hiện trực tiếp và nhanh chóng một số bệnh từ các mẫu bệnh phẩm như máu, dịch tiết, chất thải và tổ chức mô, trong khi hầu hết các phương pháp chẩn đoán hiện nay đều yêu cầu xử lý mẫu với kiểm yếu để giải phóng vật chất di truyền [10, 11].

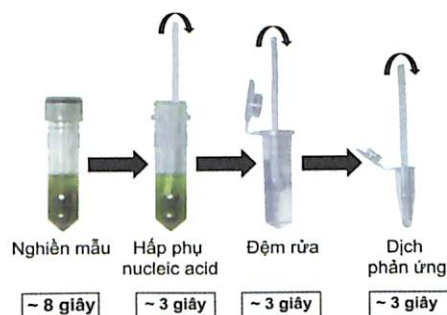
So với các phương pháp hiện nay, phương pháp PCR mặc dù nhạy và có độ đặc hiệu cao nhưng bị giới hạn bởi yêu cầu về chu kỳ gia nhiệt, chất lượng mẫu xét nghiệm và các chất ức

chế ADN polymerase trong mẫu xét nghiệm. Ngoài ra, việc áp dụng PCR để phát hiện tác nhân gây bệnh nói chung cũng đòi hỏi phải thiết kế một mồi để bắt đầu sao chép ADN, do đó có thể hạn chế khả năng ứng dụng thực tế của kỹ thuật này để lấy mẫu thực địa. RT-PCR có thể tiết kiệm đáng kể thời gian phát hiện nhưng lại đòi hỏi thiết bị tốn kém và thao tác thực hiện phức tạp. Gần đây, kỹ thuật LAMP cũng được ghi nhận với một số ưu điểm chính, như cho kết quả chẩn đoán nhanh, khuếch đại đẳng nhiệt, không cần điện di, độ nhạy lớn hơn nhiều so với PCR. Tuy nhiên, việc thiết kế mồi phức tạp và ít nhạy hơn đối với các mẫu phức tạp là những trở ngại chính để phổ biến LAMP [12]. Chính vì vậy, kỹ thuật RPA với việc có thể khắc phục một cách cơ bản nhược điểm của những kỹ thuật này đã trở thành một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến nhất hiện nay trong chẩn đoán và xác định bệnh trên nhiều đối tượng (bảng 1).

Tối ưu hóa RPA nhờ kỹ thuật tách chiết acid nucleic dùng "giấy" làm chất mang

Các phương pháp chẩn đoán dựa vào acid nucleic có nhiều lợi thế hơn các kỹ thuật truyền thống. Tuy nhiên, một điểm cần lưu ý là kỹ thuật chẩn đoán phân tử luôn đòi hỏi trang thiết bị phòng thí nghiệm hiện đại, yêu cầu nghiêm ngặt về quy trình tinh sạch acid nucleic từ mẫu cũng như thao tác thực hiện phức tạp với nhiều hóa chất yêu cầu độ sạch cao. Vì vậy, vấn đề đặt ra là yêu cầu một phương

pháp tinh sạch acid nucleic đơn giản, nhanh và hiệu quả. Gần đây, một kỹ thuật tinh sạch acid nucleic từ nhiều nguồn mẫu đã được ghi nhận với bước tiến vượt bậc về thời gian thực hiện [7]. Nguyên lý của kỹ thuật này dựa vào việc bổ sung các hóa chất, như chitosan và polyethylenimine để liên kết chặt với các phân tử acid nucleic trên mảnh giấy lọc Whatman (GE Healthcare, Hoa Kỳ). Việc sử dụng giấy lọc Whatman đã được chứng minh là có hiệu quả do sợi cellulose có thể giữ được các phân tử acid nucleic, đồng thời giải phóng các chất ức chế phản ứng khuếch đại [7]. Đến nay, các nhà khoa học đã phát triển kỹ thuật tinh sạch acid nucleic thành bộ kit gồm que giấy lọc Whatman với bề mặt cellulose được phủ lớp sáp paraplax và các dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ thường để thuận tiện cho thao tác ngoài thực địa (hình 2).



Hình 2. Thao tác của kỹ thuật tách nhanh dựa trên giấy lọc Whatman có cellulose từ mẫu lá.

Rất nhiều nguồn mẫu đã được thử nghiệm với kỹ thuật mới này nhằm đánh giá hiệu quả của quá trình tách chiết. Cụ thể là mẫu lá từ cây mô hình *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* và một số cây trồng nông nghiệp quan trọng như lúa mì (*Triticum aestivum*), lúa mạch (*Hordeum vulgare*), lúa gạo (*Oryza sativa*), đậu tương (*Glycine max*), cà chua (*Solanum lycopersicum*) và mía (*Saccharum officinarum*) [7]. Đáng chú ý, kỹ thuật này cũng đã được áp dụng thành công trên mẫu lá

trưởng thành của một số cây có múi, điển hình như cam mandarin (*Citrus reticulata*) và chanh (*C. limon*), vốn chứa hàm lượng lignin, phenolic và polysaccharide cao. Vật chất di truyền của một số tác nhân gây bệnh cho cây trồng (vi khuẩn đốm nâu *Pseudomonas syringae*), động vật (vi khuẩn gây viêm màng phổi *Actinobacillus pleuropneumoniae*) cũng có thể được tinh sạch nhanh thành công. Ngoài ra, mẫu máu ở động vật và người cũng được tinh sạch ADN theo phương pháp này và cho kết quả thành công trong chẩn đoán HIV, viêm gan [7].

Một ưu điểm khác của kỹ thuật tinh sạch mới này là thời gian. Toàn bộ thao tác chỉ mất khoảng 30 giây, trong khi tách chiết và tinh sạch bằng hạt từ với bộ kit thông dụng hiện nay (AMPure, NEB) thường mất khoảng 15 phút. Bên cạnh đó, chi phí cũng là một điểm đáng lưu ý, giá thành kit tinh sạch dựa trên giấy lọc cellulose Whatman chỉ bằng 1/4 so với kit AMPure và cũng không yêu cầu đầu tư thiết bị chuyên dụng bắn hạt từ (với giá thành 685-876 USD) [7]. Như vậy, kỹ thuật tách chiết mới dựa trên cellulose đã mang lại rất nhiều lợi thế về thời gian, mức độ tiện dụng và tính khả thi khi có thể tiến hành ngay tại địa điểm lấy mẫu mà không cần bất

kỳ trang thiết bị phức tạp nào.

Tiềm năng ứng dụng của kỹ thuật RPA trong chẩn đoán bệnh cây trồng và một số định hướng ở Việt Nam

Gần đây, kỹ thuật RPA đã bắt đầu được áp dụng và mang lại thành công trong việc xác định bệnh hại trên một số đối tượng cây trồng [13]. Như đã biết, tác nhân gây bệnh, đặc biệt là virus, là một trong những nguyên nhân chính gây sụt giảm năng suất và chất lượng nông sản trên toàn thế giới. Vì vậy, chẩn đoán và phát hiện bệnh chính xác là một bước rất quan trọng trong việc quản lý bệnh hại cây trồng. Trước đây, kỹ thuật RPA đã được triển khai rất nhiều trong xét nghiệm [10, 11, 14, 15], tuy nhiên kỹ thuật này cũng chỉ mới được quan tâm trong lĩnh vực nông nghiệp (bảng 2). Một điểm đáng chú ý là trong khi chẩn đoán dựa trên nền tảng PCR/RT-PCR luôn đòi hỏi kỹ thuật tách chiết ADN (hoặc ARN) một cách hiệu quả (điều này cũng đi đôi với sự tổn kém trong chi phí dịch vụ), thì hầu hết các kỹ thuật RPA thực hiện trên virus thực vật thường chỉ sử dụng mẫu mô trực tiếp được xử lý với hóa chất rất thông dụng và rẻ tiền (như NaOH và GEB) (bảng 2) [13].

Với những thành tựu trên thế giới

Bảng 2. Tóm lược một số kết quả chẩn đoán bệnh virus trên cây trồng bằng kỹ thuật PCR và RPA [13].

Virus	Nguồn mô	Độ nhạy		Nguồn mẫu	Độ nhạy	
		PCR/RT-PCR	RPA		PCR/RT-PCR	RPA
Tomato yellow leaf curl virus trên cà chua		10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	-	-	10 ⁻³
Tomato yellow leaf curl virus trên cây họ đậu	Lá	10 ⁻⁹	10 ⁻³	Nhựa lá xử lý với 0,5N NaOH	-	10 ⁻²
Bean golden yellow mosaic virus		-	-	-	-	10 ⁻³
Tomato mottle virus		-	-	-	-	10 ⁻³
Banana bunchy top virus		100 fg/μl	1 pg/μl	-	-	10 ⁻⁴
Little cherry virus 2	Lá, chồi, thân	0,001 ng	0,1 ng	Nhựa lá xử lý với GEB	10 ⁻²	10 ⁻²
Plum pox virus	Lá	-	16 fg/μl	-	-	10 ⁻⁴

hiện nay, rõ ràng việc triển khai ứng dụng kỹ thuật RPA trong nông nghiệp là rất tiềm năng. Đặc biệt, với nhiều ưu điểm về độ chính xác, tính đơn giản, chi phí, thời gian, để triển khai kỹ thuật RPA trong nông nghiệp nói chung nên chú ý một số xu hướng sau:

Xu hướng thương mại hóa kit chẩn đoán nhanh: trong lĩnh vực y tế công cộng, kỹ thuật RPA đã được ứng dụng rất rộng rãi, phát triển để thương mại hóa thành kit chẩn đoán hoặc panel (bộ mẫu) kiểm tra ngưỡng phát hiện tác nhân gây bệnh trong mẫu xét nghiệm [14]. Một số vi sinh vật gây bệnh trên người và động vật, điển hình như *Listeria monocytogenes* gây bệnh Listeriosis, *Salmonella enterica* gây bệnh thương hàn, *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh tả và một số loài động vật nguyên sinh (protozoa) đã được kiểm định bằng kỹ thuật RPA trong các mẫu thực phẩm [10, 11]. Gần đây, panel phát hiện một số vi khuẩn đường ruột bao gồm *E. coli*, phế trực khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, trực khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa* và *Enterococcus faecalis* đã được phát triển thành công với độ đặc hiệu xấp xỉ 100%, độ nhạy đạt khoảng 89%, giảm bớt thời gian xét nghiệm từ 48 đến 72 giờ xuống còn khoảng 12 phút [15]. Trong nông nghiệp, tiềm năng ứng dụng của RPA trong xác định virus gây bệnh ở cây trồng cũng rất sáng sủa. Một số thành tựu trong phát hiện virus thực vật đã được ghi nhận gần đây, bao gồm một số virus mang ADN như *Banana bunchy top virus*, *Bean golden yellow mosaic virus*, *Tomato mottle virus*, *Tomato yellow leaf curl virus* và virus mang ARN như *Littell cherry virus 2*, *Plum pox virus*, *Rose rosette virus* [13].

Phát hiện nhanh cây trồng biến đổi gen (GMO): các nhà khoa học Trung

Quốc đã ứng dụng kỹ thuật RPA để nhận biết vùng promoter CaMV-35S và gen T-nos ở *Agrobacterium tumefaciens* có mặt trong 4 mẫu thực vật GMO chính (ngô, lúa gạo, đậu tương và bông) [16]. Cụ thể, với 6 mỗi nhận biết cho CaMV-35S và T-nos, kỹ thuật RPA cho phép xác định GMO trong khoảng 15-25 phút. Kết quả này hứa hẹn mở ra một tiềm năng ứng dụng mới của kỹ thuật RPA, nhất là ở Việt Nam khi GMO đã được cho phép đưa vào canh tác.

Cuối cùng, một điểm cần lưu ý trong chẩn đoán bệnh nói chung, trong y tế và nông nghiệp nói riêng là luôn yêu cầu tính chính xác, thời gian và khả năng áp dụng trên thực địa (point-of-care). Hiện nay, chưa có kỹ thuật chẩn đoán nào có thể đáp ứng một cách tối đa 3 yếu tố này. Kỹ thuật RPA, với thao tác đơn giản, nhanh và chính xác, kết hợp với biện pháp tách nhanh acid nucleic nêu trên có thể trở thành một trong những phương pháp chẩn đoán hiệu quả nhất trong thời gian tới, nhất là trong lĩnh vực nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M.A. Londono, et al. (2016), "Evaluation of recombinase polymerase amplification for detection of begomoviruses by plant diagnostic clinics", *Virologia*, **13**(48), doi: doi.org/10.1186/s12985-016-0504-8.

[2] O. Faye, et al. (2015), "Development and deployment of a rapid recombinase polymerase amplification Ebola virus detection assay in Guinea in 2015", *Euro Surveill.*, **20**(44), p.30053, doi: 10.2807/1560-7917.

[3] B.T. Teoh, et al. (2015), "Early detection of dengue virus by use of reverse transcription-recombinase polymerase amplification", *J. Clin. Microbiol.*, **53**(3), pp.830-837.

[4] A. Abd El Wahed, et al. (2015), "Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection", *PLOS ONE*, **10**(6), p.e0129682.

[5] N. Yehia, et al. (2015), "Development of reverse transcription recombinase

polymerase amplification assay for avian influenza H5N1 HA gene detection", *J. Virol. Methods*, **223**, pp.45-49.

[6] A. Abd El Wahed, et al. (2013), "A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus", *PLOS ONE*, **8**(8), p.e71642.

[7] Y. Zou, et al. (2017), "Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds", *PLOS Biol.*, **15**(11), doi: 10.1371/journal.pbio.2003916.

[8] R.K. Daher, et al. (2016), "Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications", *Clin. Chem.*, **62**(7), pp.947-958.

[9] J. Wang, et al. (2017), "Recombinase polymerase amplification assay - a simple, fast and cost-effective alternative to real time PCR for specific detection of feline herpesvirus-1", *PLOS ONE*, **12**(1), p.e0166903.

[10] G. Choi, et al. (2016), "A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria", *Lab on a Chip*, **16**(12), pp.2309-2316.

[11] Z. Crannell, et al. (2016), "Multiplexed recombinase polymerase amplification assay to detect intestinal protozoa", *Anal. Chem.*, **88**(3), pp.1610-1616.

[12] D.T. Le, N.T. Vu (2017), "Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **60**(2), pp.1-12.

[13] B. Babu, et al. (2018), "Recombinase polymerase amplification applied to plant virus detection and potential implications", *Anal. Biochem.*, **546**, pp.72-77.

[14] S. Santiago-Felipe, et al. (2014), "Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis", *Anal. Chim. Acta.*, **811**, pp.81-87.

[15] B. Raja, et al. (2017), "Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of common bacterial urinary tract infection pathogens", *J. Appl. Microbiol.*, **123**(2), pp.544-555.

[16] C. Xu, et al. (2014), "Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid