

CHẨN ĐOÁN BỆNH ĐỐM TRẮNG (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) CHO TÔM SÚ BẰNG CÁC KỸ THUẬT PCR

Nguyễn Đức Trọng¹, Trần Ngọc Tuyền¹, Nguyễn Thị Pha¹, Trần Vũ Phương¹,
Trần Nhân Dũng¹, Nguyễn Hữu Hiệp¹ và Trần Phước Đường¹

TÓM TẮT

Dùng các đoạn mồi TTD1 và TTD2, TTD3 và TTD4, TTD5 và TTD6, TTD7 và TTD8, TTD9 và TTD10, TTD9b và TTD10b, TTD11 và TTD12, TTD13 và TTD14, F1 và R1, F2 và R2 được thiết kế theo 2 phần mềm DNA Club và Primer Express để thử nghiệm các qui trình chẩn đoán bệnh đốm trắng trên tôm bằng phản ứng PCR (polymerase chain reaction). Các đoạn mồi F1 và R1, TTD9b và TTD10b được tiếp tục thử nghiệm trên phản ứng real-time PCR. Sau nhiều thử nghiệm, kết quả chọn được dung dịch sinh tan trích nhanh vi-rút trong tôm và 4 bộ kit (1) PCR cổ điển (2) PCR tổ (Nested PCR) (3) Bộ kit realtime PCR, sử dụng SYBR GREEN. (4) Bộ kit Real time PCR dùng đoạn dò TaqMan (TaqMan probe). Các bộ kit này có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh đốm trắng trên tôm.

Từ khóa: vi rút gây bệnh đốm trắng, mồi, kỹ thuật PCR, tôm sú

Title: Application of PCR techniques for the detection of white spot syndrome virus in shrimp (*Penaeus monodon*)

ABSTRACT

The primers such as TTD1 and TTD2, TTD3 and TTD4, TTD5 and TTD6, TTD7 and TTD8, TTD9 and TTD10, TTD9b and TTD10b, TTD11 and TTD12, TTD13 and TTD14, F1 and R1, F2 and R2 designed basing on DNA Club and Primer Express softwares were used in PCR reaction to test the detection process of white spot syndrome virus of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*.) Primers F1 and R1, TTD9b and TTD10b were then used to detect the pathogen with real time PCR reaction. A new lysis buffer for extraction of white spot syndrome virus and 4 kits named, (1) classic PCR kit, (2) Nested PCR kit, (3) PCR kit using SYBR and (4) PCR kit TaqMan probe were designed. These four kits can be used to detect the white spot syndrome virus in black tiger shrimp.

Key words: PCR technology, *Penaeus monodon*, White Spot Syndrome Virus, primers

1 GIỚI THIỆU

Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) là nơi có tiềm năng sản xuất tôm lớn nhất cả nước và phong trào nuôi tôm hiện đang phát triển rất nhanh. Tổng diện tích nuôi tôm năm 2003 khoảng 518.557 ha đạt sản lượng hơn 258.034 tấn so với tổng diện tích nuôi của cả nước là 580.464 ha và 340.719 tấn (<http://www.fistenet.gov.vn/>). Ngoài ra, theo nghị quyết 09/2000/NQ-CP ngày 15/6/2000 cho phép chuyển đổi cơ cấu sản xuất nông nghiệp ở những vùng canh tác lúa không hiệu quả sang nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên trong những năm gần đây, bệnh đốm trắng do vi-rút gây ra vẫn đang là một khó khăn lớn cho nghề nuôi tôm ở Việt Nam. Theo ước tính

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ

của Bộ Thủy sản (1996) thì bệnh tôm ở các tỉnh Đồng Bằng Sông Cửu Long trong các năm 1994-1995 đã ảnh hưởng tới 85.000 ha và gây thiệt hại 294 tỷ đồng. Đầu năm 2001, tôm sú đã chết hàng loạt, trên diện rộng ở ĐBSCL. Tại các vùng mới chuyển đổi, đã có 20.854 ha bị thiệt hại; một số vùng ở Cà Mau thiệt hại tới hơn 80% (<http://www.vnn.vn/kinhte/toancanh/2003/12/39177/>). Năm 2003, cả nước có 546.757 ha nuôi tôm nước lợ thương phẩm, trong đó diện tích có tôm nuôi bị bệnh và chết là 30.083 ha. Đến hết tháng 9/2003, số diện tích nhiễm bệnh ở Kiên Giang là hơn 8.000 ha, Cà Mau bị hơn 232 ha; nhất là miền Trung thất bại nặng nề khi Khánh Hoà, Phú Yên, Quảng Nam, Ninh Thuận có hàng nghìn ha tôm bị nhiễm bệnh. Riêng thiệt hại của Khánh Hoà ước tính 26,6 tỷ đồng, Bình Định 40 tỷ (<http://www.vnn.vn/kinhte/toancanh/2003/12/39177/>). Tính đến ngày 1/4/2004, tại các tỉnh Quảng Nam, Quảng Ngãi, Thừa Thiên Huế, đã có 380 ha ao nuôi tôm bị nhiễm bệnh đốm trắng với số lượng tôm chết từ 70–100%. Kể từ trung tuần tháng 3/2004, tại Long An, dịch bệnh trên tôm sú đã gây thiệt hại đến 10 tỷ đồng (<http://www.vietnamnet.vn/khoahoc/hoso/2004/04/57424/>). Bệnh do virus gây ra vẫn đang là nỗi lo của của người nuôi tôm và là một trở ngại lớn đối với việc phát triển bền vững và thâm canh nghề nuôi tôm biển ở nước ta.

White spot syndrome virus (WSSV) gây bệnh trên nhiều loài thuộc nhóm tôm he và các loài giáp xác khác trên thế giới (Lightner, 1996; Lo *et al.*, 1996). WSSV được phát hiện đầu tiên ở Châu Á khoảng năm 1992-1993 (Huang *et al.*, 1994 và Chen, 1995), và phát triển rất nhanh khoảng năm 1996 và gây bệnh ở các trang trại nuôi tôm ở Đông Nam Á (Flegel, 1995) và các quốc gia Đông Á như Đài Loan, Trung Quốc, Nhật bản và Hàn Quốc (Inouye *et al.*, 1994). Bệnh do WSSV làm tôm chết nhanh và nhiều kèm theo dấu hiệu xuất hiện những hình vòng trắng và đốm trên biểu bì, đôi khi đi chung với màu đỏ toàn thân. Bệnh làm tôm ngừng ăn, sau đó tôm yếu bơi lơ dờ gần mặt nước ven bờ.

Vi rút gây bệnh đốm trắng là vi rút hình que có bao chứa ADN kiến trúc sợi đôi (Wang *et al.*, 1995 và Wongteerasupaya *et al.*, 1995), có kích thước 70-150 nm x 275-380 nm, và có thể làm chết 100% tôm chỉ trong vòng 3-10 ngày (Lightner, 1996). Trước đây WSSV được xếp vào nhóm Baculovirus ngày nay được xếp vào họ mới Nimaviridae. Giống mới đã được chấp nhận Whispovirus (Van Hulten *et al.*, 2001).

Ở tôm mới bị bệnh đốm trắng, rất khó phát hiện sự hiện diện của virus gây bệnh bằng các phương pháp chẩn đoán thông thường. Trước đây, phương pháp xác định sớm sự hiện diện của vi rút chủ yếu dựa vào **kỹ thuật PCR** (polymerase chain reaction) cổ điển. Đây là kỹ thuật khuếch đại phân đoạn ADN (của vi-rút gây bệnh) dựa trên tiến trình các chu kỳ nhiệt liên tiếp (1) biến tính đối tượng ADN; (2) gắn môi (primer) và (3) kéo dài đoạn ADN khuếch đại. Tiến trình này khuếch đại lượng ADN tăng theo lũy thừa, sản phẩm chu kỳ trước làm khuôn của chu kỳ sau. Sản phẩm của tiến trình là những đoạn ADN nằm giữa 2 đoạn môi chuyên biệt (xác định đặc tính của đối tượng). Một phản ứng tiêu biểu cần 20-30 chu kỳ để có đủ sản phẩm cho việc phát hiện trên băng thạch có nhuộm ethidium bromide. Thành phần phản ứng bao gồm môi, dung dịch đệm, magnesium, dNTP (mononucleotide), enzym Taq ADN polymerase và khuôn ADN. Ngày nay, dựa trên kỹ thuật PCR cổ điển, người ta đã phát triển nhiều kỹ thuật chẩn đoán nhanh và chính xác hơn; đang được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới sử dụng, cụ thể:

(a) Kỹ thuật PCR tổ (nested PCR)

Kỹ thuật này sử dụng 2 cặp mồi thay vì 1 cặp mồi như kỹ thuật PCR cổ điển, trong đó cặp mồi thứ hai nằm giữa cặp mồi thứ nhất. Kỹ thuật này còn gọi là kỹ thuật PCR 2 bước. Kỹ thuật này sẽ có nhiều đoạn sản phẩm DNA hơn là kỹ thuật PCR cổ điển, số đoạn ADN được phát hiện sẽ nói lên tính định lượng tương đối của phản ứng. Kỹ thuật này được Lo *et al.* công bố vào năm 1996.

(b) Kỹ thuật real-time PCR

Kỹ thuật này không phân tích sản phẩm PCR trên bản thạch nên không cần sử dụng Ethidium bromide (là chất độc có thể gây đột biến). Kỹ thuật này làm giảm thời gian đổ băng thạch và thời gian chạy điện di. Thay vì dùng kỹ thuật điện di để phát hiện ADN người ta thiết kế một hệ thống quang học ngay trên máy PCR để đo cường độ ánh sáng sinh ra tương ứng với lượng sản phẩm PCR được khuếch đại. Có nhiều cách phát hiện lượng ánh sáng (màu) sinh ra:

(i) Sử dụng SYBR GREEN

Đặc tính của chất SYBR GREEN là phát huỳnh quang khi nằm chen vào sợi DNA đôi. Số lượng sản phẩm ADN sinh ra càng nhiều thì cường độ huỳnh quang càng cao. Tuy nhiên phương pháp dùng SYBR GREEN gặp trở ngại vì sau phản ứng có nhiều đoạn mồi bắt cặp với nhau thành những sợi ngắn ADN đôi dài 20-40 bp. Do đó khi thiết kế phản ứng chúng ta phải tính toán lượng ADN vừa đủ cho các đoạn mồi không tự bắt cặp với nhau.

(ii) Dùng đoạn dò TaqMan (TaqMan probe)

Đoạn dò TaqMan Probe là đoạn oligonucleotide có trình tự bổ xung với trình tự của một đoạn DNA trên mạch khuôn, giới hạn bởi 2 trình tự bổ sung với trình tự của hai 2 đoạn mồi, trong phản ứng PCR. Hai đầu của đoạn dò được gắn hai chất gọi là reporter và quencher, khi reporter và quencher ở gần nhau thì quencher làm mất màu của reporter, khi reporter và quencher ở xa nhau thì reporter phát huỳnh quang. Ở mỗi chu kỳ PCR, trước hết là sự gắn vào mạch khuôn của đoạn dò và hai đoạn mồi; sau đó, Taq DNA polymerase sẽ tổng hợp mạch DNA mới dựa trên khuôn và đoạn mồi, đồng thời nó cũng phân cắt đoạn dò ra khỏi mạch khuôn khi nó tiến đến vị trí của đoạn dò, trong quá trình này quencher sẽ tách ra khỏi reporter nên làm reporter phát quang. Do đó lượng phát quang sẽ tỉ lệ thuận với lượng ADN khuếch đại lên. Kỹ thuật Real time PCR dùng đoạn dò TaqMan cho kết quả chính xác và có thể phát hiện nhanh vi sinh vật gây bệnh (Kathy và Lightner, 1996).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các vấn đề nghiên cứu gồm 4 phần chính: phương pháp trích ADN vi rút; xây dựng bộ kit PCR tổ (nested PCR); xây dựng bộ kit PCR cổ điển (conventional PCR); phản ứng real time PCR – TaqManProbe; phản ứng real time PCR – SYBR GREEN.

2.1 Nghiên Cứu Trích ADN Vi Rút

2.1.1 Phương tiện chung

- Dụng cụ, thiết bị: Máy PCR Perkin-Elmer 9700, Máy real time PCR ABI Prism 7000, máy ly tâm 13.000 vòng/phút, pH kế, máy quang phổ Becman Coulter Du 640, lọ 100 ml, lọ 1000 ml, máy khuấy từ, kim khuấy từ, bộ điện di, máy chụp hình bằng thạch, micropipet, ống eppendorf 1,5 ml, 2 ml, kéo, kẹp, đĩa nghiền kim loại,...
- Hoá chất: Taq polymerase, dNTP's, Primer, PCR buffer Gibco, WSSV primer mix, 2 bộ kit của Đại học Putra (Mã Lai) và IQ2000 của Đài Loan.

2.1.2 Phương pháp

Dùng 4 qui trình trích khác nhau: (1) trích ADN bằng phương pháp CTAB; (2) trích ADN bằng phương pháp DTAB-CTAB của Đài Loan; (3) trích ADN bằng phương pháp trích nhanh dùng dung dịch sinh tan (lysis buffer) của Đại học PUTRA; và (4) trích ADN bằng phương pháp trích nhanh dùng dung dịch sinh tan (lysis buffer). Sau đó đo hàm lượng ADN bằng máy quang phổ, chạy gel agarose kiểm tra ADN rồi dùng 2 bộ kit của Đại học PUTRA và IQ2000 của Đài Loan chạy PCR kiểm tra bệnh đốm trắng.

2.2 Nghiên cứu phát triển bộ kit PCR tổ (Nested PCR)

Chọn bốn đoạn môi thiết kế theo trình tự của Van Hulten et al., để thiết lập phản ứng PCR, thành phần phản ứng, dung dịch đệm PCR (PCR buffer) và hàm lượng enzym Taq ADN polymerase tự sản xuất của Viện. Thay đổi thành phần phản ứng để có kết quả tin cậy và ổn định nhất.

2.3 Nghiên cứu phát triển bộ kit PCR cổ điển (Conventional PCR)

Dùng các đoạn môi tự thiết kế TTD1 và TTD2, TTD3 và TTD4, TTD5 và TTD6, TTD7 và TTD8, TTD9 và TTD10, TTD11 và TTD12, TTD13 và TTD14. Các đoạn môi này được thiết kế theo 2 phần mềm DNA Club và Primer Express. Sau khi thiết kế đã được kiểm tra trên ngân hàng gen (gene bank). Các đoạn này đều hiện diện ở các dòng vi rút có sẵn ở ngân hàng gen. Dùng phương pháp trích nhanh ADN của vi rút theo kết quả phần 1.

2.4 Nghiên cứu phản ứng real time PCR – Taqman probe

2.4.1 Nguyên tắc

Dựa trên trình tự ADN của vi rút đốm trắng trên ngân hàng gen, các chuyên gia tập đoàn Applied Bio-system phối hợp với các cán bộ nghiên cứu Viện thiết kế 2 đoạn môi và 1 đoạn dò huỳnh quang TaqManProbe sử dụng trong phản ứng PCR. Đoạn dò TaqManProbe gắn 2 màu FAM và TAMRA ở 2 đầu. 2 đoạn môi này được đặt tên là TTD9a và TTD9b. Thí nghiệm lặp lại nhiều lần xác định nồng độ phản ứng và kiểm tra kết quả số lượng các bản sao. Sau cùng lặp lại 2 lần cuối để khẳng định tính ổn định của qui trình

2.4.2 Phương pháp

Đường chuẩn được dựng dựa vào (i) nồng độ bản sao ADN (sản phẩm PCR), (ii) nồng độ tính số bản sao ADN đã được nhân lên bằng PCR (*copy amplicon*) và (iii)

pha loãng sản phẩm PCR thành các nồng độ: 10^{10} , 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^1 , để dựng đường chuẩn

Pha dung dịch cho phản ứng PCR trên máy Real-time PCR theo công thức của nhà sản xuất máy real time PCR Applied biosystem

2.5 Nghiên cứu phản ứng real time PCR – Sybr Green

2.5.1 Nguyên tắc

Phản ứng realtime-PCR SYBR GREEN sử dụng hai đoạn mồi F_1 R_1 được thiết kế dựa vào trình tự của WSSV từ genebank. SYBR GREEN được bổ sung sẽ phát tín hiệu huỳnh quang khi chen vào ADN sợi đôi.

2.5.2 Phương pháp

Đường chuẩn được dựng dựa vào (i) chọn 1 mẫu ADN sạch, đã biết nồng độ, dùng làm chuẩn để định lượng sản phẩm PCR trên gel agarose bằng chương trình Quantity one; (ii) sau khi tính xong hàm lượng ADN của mẫu PCR product tính số bản sao: 11×10^{10} ; và (iii) pha loãng sản phẩm PCR thành các nồng độ: 10^{10} , 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 để xây dựng đường chuẩn.

Pha master mix cho phản ứng Real time PCR

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nghiên cứu phương pháp trích ADN vi-rút

3.1.1 Quy trình trích ADN được chọn

- (a) Dùng 50-100 mg biểu bì dưới vỏ tôm (ức tôm) để trích ADN.
- (b) Nếu dùng hậu ấu trùng tôm (postlarvae 15) cần 25-50 mảnh cho mỗi mẫu; nếu dùng vùng đầu của mẫu tôm giống lấy khoảng 1.5 cm hoặc nhiều hơn không bao gồm phần mắt. Có thể tăng lượng mẫu bằng lấy nhiều đoạn từ nhiều cá thể.
- (c) Mẫu được cắt nhỏ ra với dao mổ (không bắt buộc với ấu trùng), nghiền, đảo ngược tuýp và ủ với 1 ml dung dịch đệm sinh tan trong thời gian 10 phút.
- (d) Mẫu sinh tan được ly tâm 14.000 vòng trong 1 phút và trong 5 phút, sau đó chuyển phần trong qua ống eppendorf mới, không chuyển các mảnh vụn tôm (có thể dùng que tre loại ra) và thêm 0,5 ml 95% ethanol để trầm hiện ADN. ADN trầm hiện được làm lắng xuống bằng cách ly tâm 12.000 vòng trong 1 phút và trong 5 phút. Đổ bỏ phần nổi trên mặt và rửa phần cặn ADN 2 lần với 1 ml cồn 95% (đảo ngược tube 5 lần để làm tan ADN). Ly tâm 12.000 vòng trong 1 phút và trong 2 phút. Gõ nhẹ miệng ống nghiệm trên giấy thấm sạch để loại cồn còn lại. Sấy khô ADN khoảng 2-3 phút.
- (e) Hòa tan ADN trích trong 100-150 μ l TE_{0.1}. Với những mẫu có thể thấy sợi ADN trắng trong, cần hòa tan trong 200 μ l TE_{0.1} ADN có thể tan tốt hơn ở 60 °C hoặc giữ dịch hoà tan ADN trong tủ ủ 37°C trong khoảng 30'.
- (f) Nếu ADN có màu đỏ (nhiễm sắc tố) nên rửa nhiều hơn 2-4 lần trong cồn 95% để loại tối đa chất cản trở phản ứng PCR.

Bảng Kết Quả Đo Hàm Lượng ADN Trích Theo Quy Trình và Dịch Sinh Tan Tìm Được

Kí hiệu mẫu	Hàm lượng ADN (ug/ml)	Hàm lượng ARN (ug/ml)	Tỉ lệ ADN/ARN 260.0nm/280.0nm
1	0,0697	0,0360	1,9621
2	0,0831	0,0430	1,9517
3	0,0748	0,0380	1,9685
4	0,0271	0,0684	1,8572
5	0,0918	0,0488	1,8812
6	0,0170	0,0986	1,7291
7	0,0244	0,0128	1,9079
8	0,0396	0,0229	1,7347
9	0,0790	0,0449	1,7580
10	0,0512	0,0766	1,9754
11	0,0480	0,0248	1,9312
12	0,0341	0,0176	1,9399
13	0,0197	0,0126	1,5554
14	0,0292	0,0189	1,5477
15	0,0470	0,0291	1,5988
16	0,0522	0,0332	1,5752
17	0,04180	0,0265	1,5763

Phần lớn các mẫu ADN trích có tỉ lệ ADN/ARN dao động khoảng 1,55 -1,96.

3.2 Nghiên cứu phát triển bộ kit PCR tổ (Nested PCR)

Thành phần phản ứng PCR

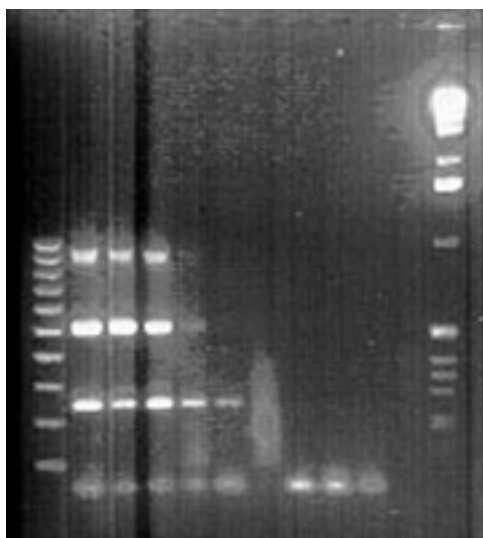
Thành phần	Thể tích (µl)
H2O cất 2 lần	39,5
PCR buffer	5
dNTPs	2
Primers mix	1
Taq 5 U	0,5
ADN khuôn	2
Tổng	50

Chu kỳ phản ứng

1 chu kỳ	93°C 5'
5 chu kỳ	93°C 20" 70°C 20" 72°C 20"
20 chu kỳ	93 °C20" 55 °C20" 72 °C 20"
25 chu kỳ	93 °C 20" 50 °C 20" 72 °C 20".

Phổ điện di

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M₂



← 950 bp

← 526 bp

← 250 bp

Hình 1: Phổ điện di thể hiện kết quả chẩn đoán bệnh đốm trắng dùng bộ kit PCR tổ - agarose 1%, dung dịch đệm TE 0.1. M: 100 bp ladder; 1-3: mẫu tôm nhiễm bệnh nặng; 4: mẫu tôm nhiễm trung bình; 5: mẫu tôm nhiễm nhẹ; 6-9: mẫu tôm không bệnh; M₂: 1 kb ladder

Do đặc điểm của phương pháp là dùng nhiều đoạn mồi với nhiệt độ bắt cặp khác nhau và có trình tự lồng vào nhau nên sản phẩm khuếch đại của vòng lặp trước sẽ được dùng làm khuôn cho vòng lặp sau; số chu kì trong mỗi vòng lặp thấp hơn bình thường. Kết hợp hai điều này, mẫu cho kết quả trên phổ điện di nhiều vạch hơn là mẫu có số lượng ADN khuôn ban đầu (ADN của vi rút) nhiều hơn, trên cơ sở đó có thể định lượng tương đối được mức độ nhiễm của bệnh trong mẫu kiểm nghiệm nếu có.

Nghiên Cứu Phát Triển Bộ Kít PCR Cổ Điển (Conventional PCR)

Xây dựng được quy trình ổn định như sau

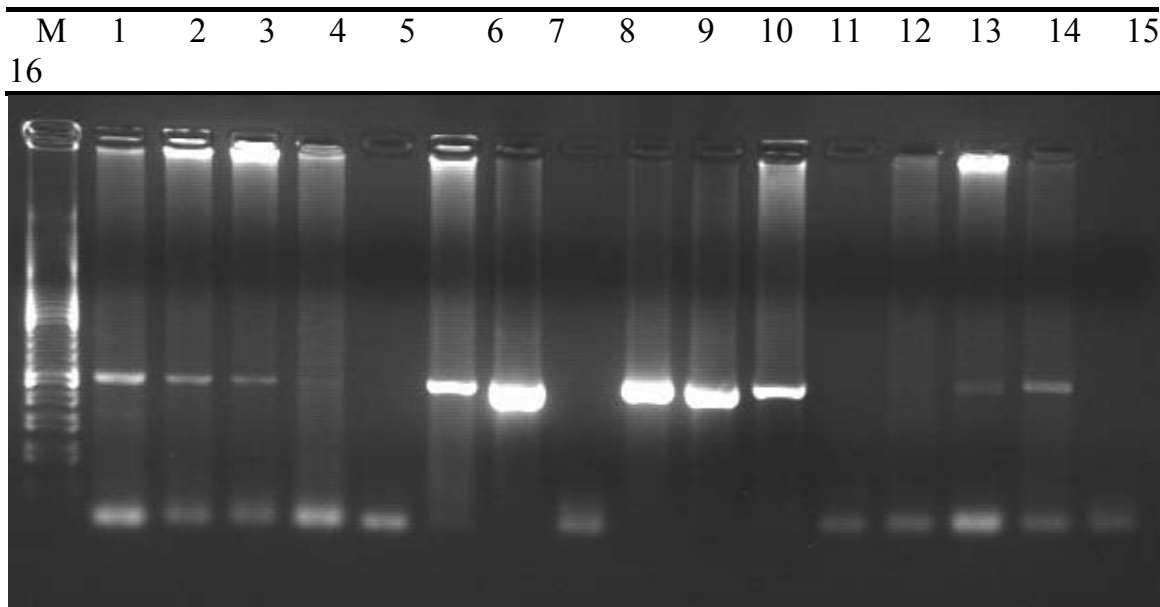
Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)
H ₂ O cất 2 lần	34.5
PCR buffer	5
dNTPs	2
Primer TTD9	0.25
Primer TTD10	0.25
Taq 5 U	0.5
ADN khuôn (100ng/µl)	2.5
Tổng	50

Chu kỳ PCR

1 chu kỳ	95°C 90"
30 chu kỳ	92°C 50"
	55°C 50"
	72°C 90"
1 chu kỳ	72°C 3'

Sau khi thực hiện nhiều lần, kết quả bộ kit mới tỏ ra nhạy và tin cậy. Dưới đây là hình một gel mới nhất. Hình này so sánh kết quả của Taq + buffer Viện và Taq + buffer công ty Promega. Các mẫu nhiễm wssv có sản phẩm PCR kích thước 512 bp.

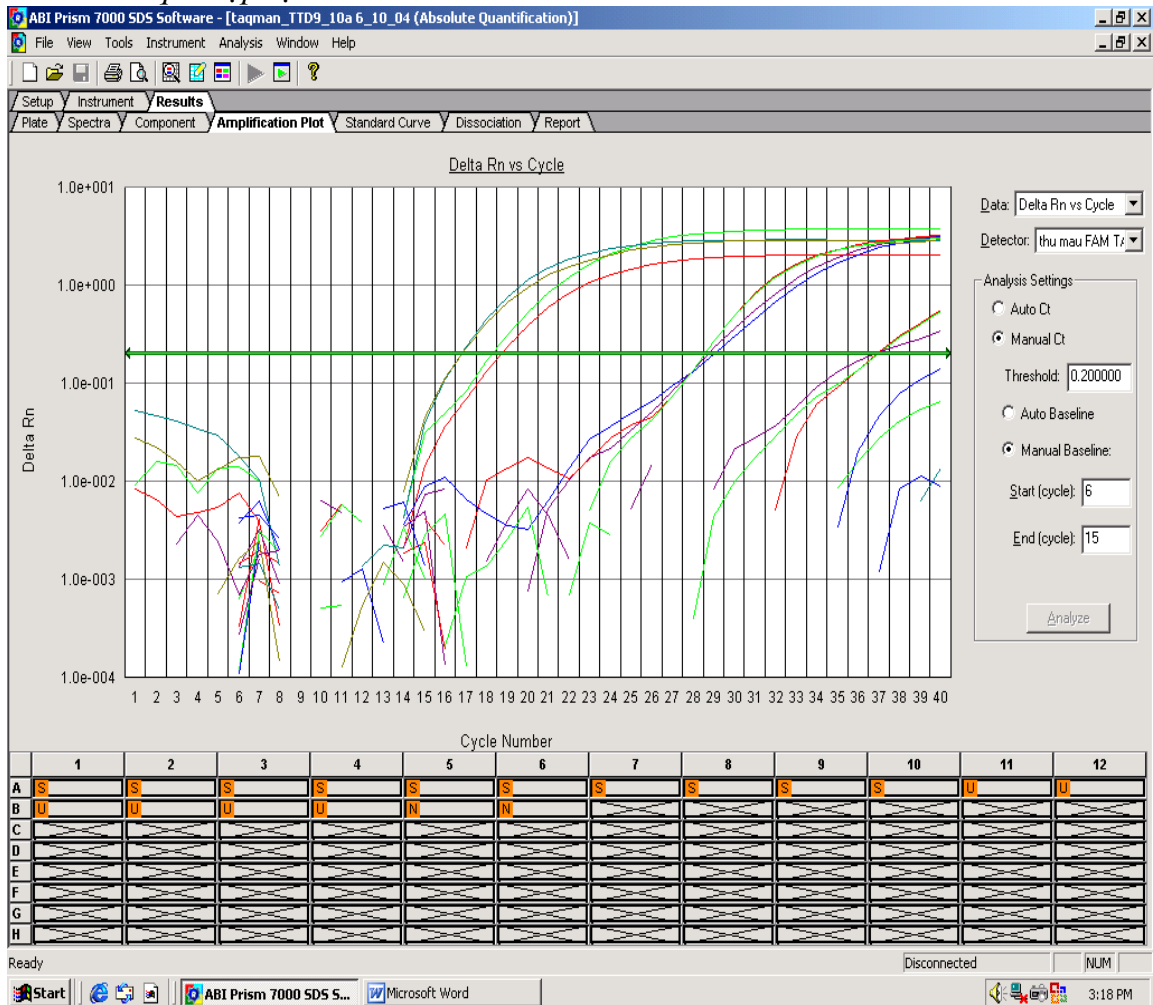


Hình 2: Kết quả chẩn đoán bệnh đốm trắng trên các mẫu tôm sú: mẫu 1-8 Taq + buffer Promega, mẫu 9-16 Taq + buffer Viện. Các mẫu 1, 9: nhiễm nặng; 2,10 nhiễm vừa; 3,11: nhiễm nhẹ; 4, 5, 12,13: đối chứng không nhiễm; 6, 7, 14, 15 mẫu xét nghiệm (dương tính); 8, 16: đối chứng nước không băng. M: ladder 100 bp Promega

Bộ kit mới tỏ ra rất nhạy và tin cậy. Sản phẩm PCR chỉ có một băng nên không định lượng: bị nhiễm bệnh nặng, vừa, nhẹ như bộ kit 1. Tuy nhiên nó đơn giản, dễ sử dụng nên rất thích hợp dùng để kiểm tra tôm post giúp cho người nuôi trong quy trình chọn giống, một vấn đề rất lớn và cấp thiết hiện nay. Một ưu điểm nữa là, từ bộ kit này là có thể phát triển lên thành một kit có khả năng phát hiện được cùng lúc nhiều bệnh truyền nhiễm khác nhau trên tôm.

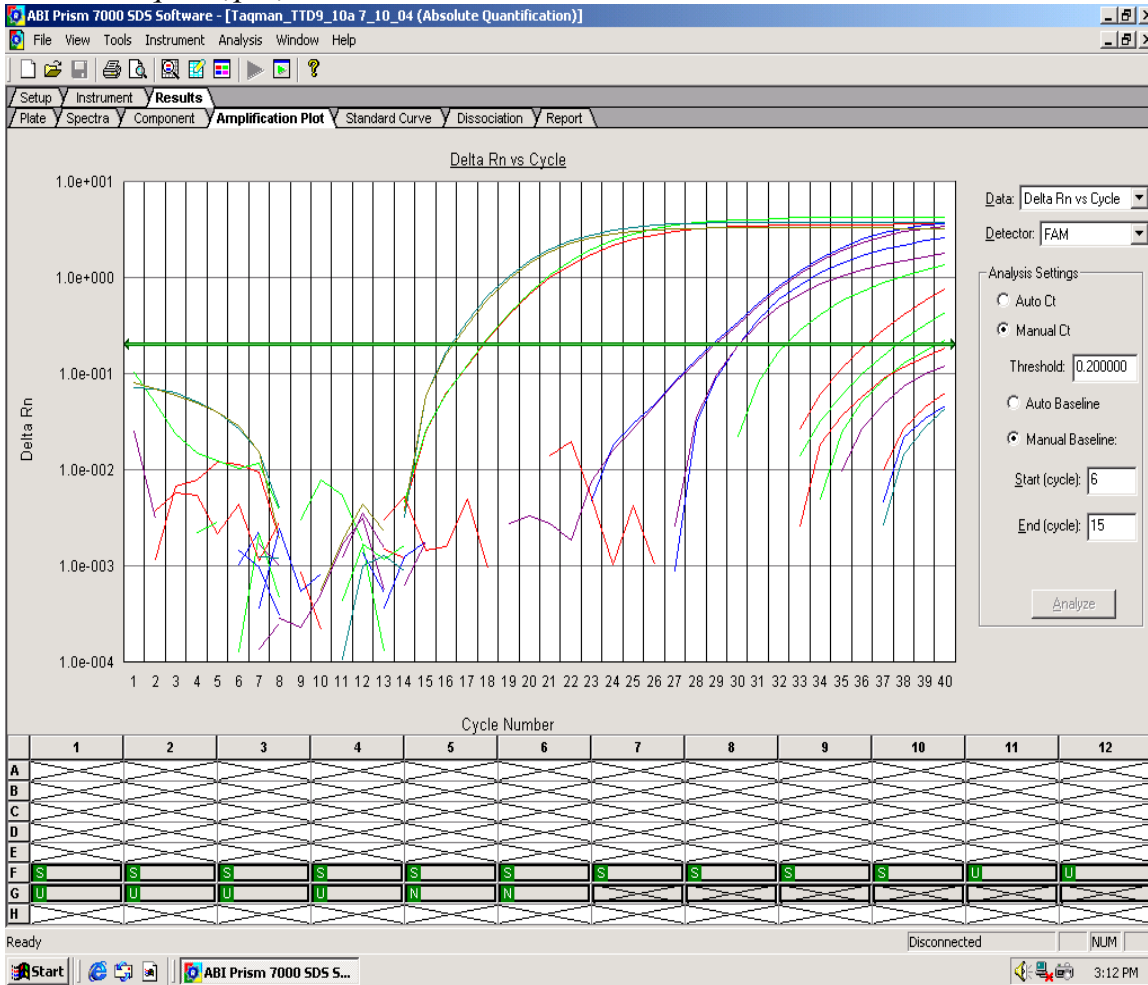
3.3 Nghiên Cứu Phản Ứng Real Time PCR – Taqman probe

3.3.1 Kết quả lặp lại lần 1



Hình 3: Biểu đồ chỉ lượng huỳnh quang tăng lên của các nghiệm thức theo chu kỳ. S₁: số bản sao là 10¹⁰; S₂: số bản sao là 10⁷; S₃: số bản sao là 10⁵; S₄: số bản sao là 10³; S₅: số bản sao là 10¹; 4a: mẫu tôm sú nhiễm bệnh nặng (*dương tính*); 21: mẫu tôm sú Miền Trung chẩn đoán kết quả Tương đương 10⁷; 3: mẫu tôm lò rèn âm tính; NTC: đối chứng không bỏ ADN

3.3.2 Kết quả lặp lại lần 2

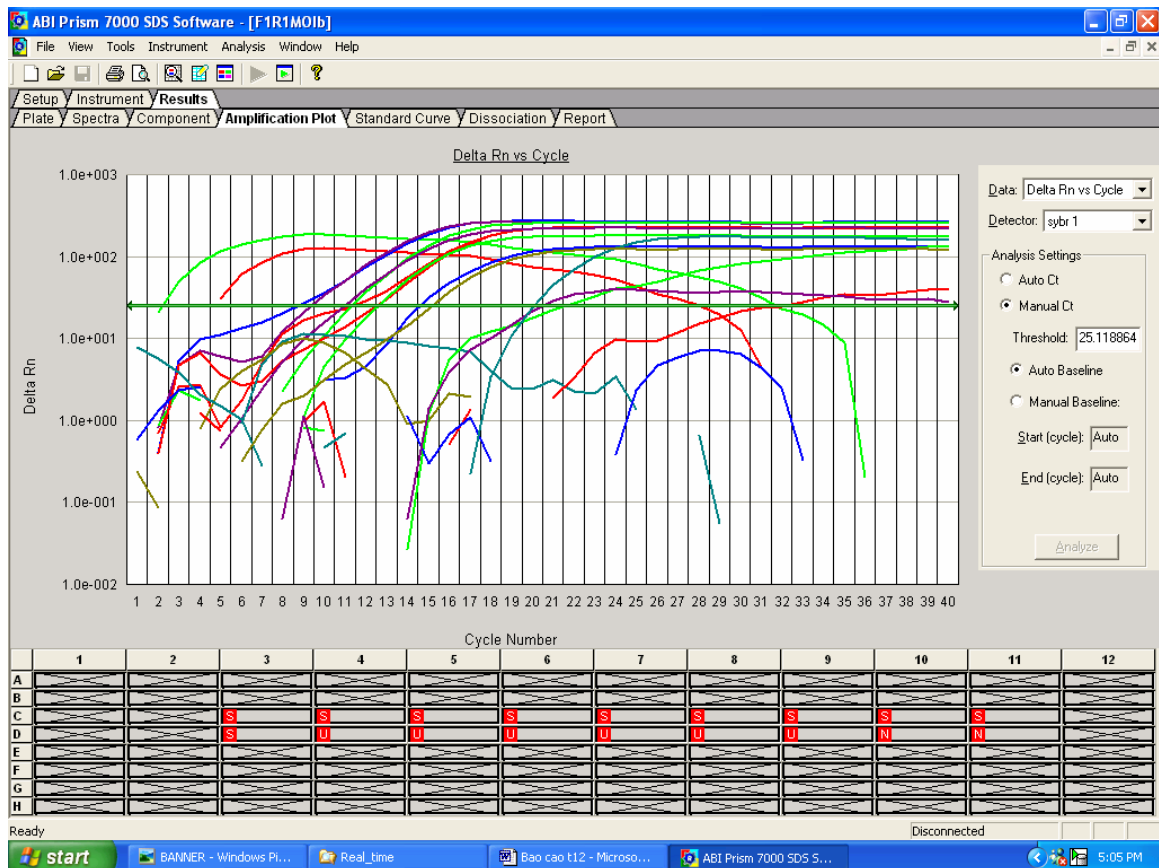


Hình 4: Biểu đồ chỉ lượng huỳnh quang tăng lên của các nghiệm thức theo số chu kỳ: S₁: số bản sao là 10¹⁰; S₂: số bản sao là 10⁷; S₃: số bản sao là 10⁵; S₄: số bản sao là 10³; S₅: số bản sao là 10¹; 4a: mẫu tôm sú nhiễm bệnh nặng (*đương tính*); 21: mẫu tôm sú Miền Trung chẩn đoán kết quả tương đương 10⁷; 3: mẫu tôm lò rèn âm tính; NTC: đối chứng không bỏ ADN

Các bộ kit PCR tổ hay PCR cổ điển đều phải qua bước chuẩn bị sau PCR, nghĩa là phải đổ gel agarose, chạy điện di và phân tích gel bằng hệ thống phân tích gel. Kỹ thuật Real time PCR khắc phục được nhược điểm trên, trong khi phản ứng PCR đang diễn ra chúng ta vẫn có thể đọc được kết quả một cách trực tiếp từ màn hình hệ thống về số lượng sản phẩm PCR sinh ra (biểu hiện qua biểu đồ). Mặt khác, thông qua việc dựng đường chuẩn, hệ thống sẽ xử lý và xuất ra kết quả số lượng các bản sao tương ứng có trong từng mẫu xét nghiệm.

3.4 Nghiên Cứu Phản Ứng Real Time PCR – Sybr Green

Ưu điểm: không qua giai đoạn chạy điện di để đọc kết quả từ đó tiết kiệm được thời gian và chi phí đồng thời cũng tránh được việc dùng Et.Bromide, là chất rất độc. Một ưu điểm nữa của phương pháp là chúng tôi không sử dụng maxter mix có sẵn, rất đắt tiền (600 USD/5ml), của công ty ABI mà dùng công thức có SYBR GREEN của Viện tự phối chế với giá thành tương đương Buffer PCR cổ điển.



Hình 5: Biểu đồ chỉ lượng huỳnh quang tăng lên của các nghiệm thức theo chu kỳ ST1: số bản sao là 10^{10} ; ST2: số bản sao là 10^7 ; ST3: số bản sao là 10^5 ; ST4: số bản sao là 10^3 ; ST5: số bản sao là 10^1 ; Kb: tôm Post không bệnh; Cb: Tôm lớn bệnh; Mt: 21 Miền trung; NTC: Đối chứng không cho ADN

4 KẾT LUẬN ĐỀ NGHỊ

- Phương pháp trích ADN vi-rút: hàm lượng ADN trích bằng dung dịch trích tương đối thấp nhưng sạch ít nhiễm các tạp chất. Dung dịch sinh tan và quy trình trích ADN này có thể sử dụng để trích nhanh ADN của vi rút trên mẫu tôm cần xét nghiệm.
- Bộ kit PCR Tổ (Nested PCR): cho phép định lượng một cách tương đối mức độ nhiễm bệnh của tôm thông qua số vạch hiển thị trên phổ điện di của mẫu xét nghiệm. Tuy nhiên, quy trình thực hiện phản ứng PCR tổ còn phức tạp nên khó đưa ra ứng dụng đại trà.

- Bộ kit PCR Cổ Điển (Conventional PCR): bộ kit được xây dựng theo tiêu chí đơn giản, dễ sử dụng nên rất thích hợp dùng để phổ biến cho việc kiểm tra tôm post ở các địa phương. Chúng tôi sẽ tiếp tục phát triển bộ kit này thành một kit có khả năng phát hiện được cùng lúc nhiều bệnh truyền nhiễm khác nhau trên tôm.
- Phản ứng real time PCR – Taqman probe: Real time PCR taqman probe cho kết quả chính xác, nhanh, tránh được những dương tính giả. Nhưng do sử dụng các hoá chất pha sẵn của công ty ABI nên giá thành còn cao (584.80 USD/200 phản ứng). Trong tương lai, chúng tôi sẽ nghiên cứu tự pha các dung dịch này với mục đích hạ giá thành xuống.
- Phản ứng Real Time PCR – Sybr Green: kỹ thuật real time chính xác, nhanh. Đã bước đầu thành công trong việc tự phối trộn hoá chất để giảm chi phí thực hiện. Chúng tôi sẽ tiếp nghiên cứu để đưa ra một quy trình mang tính ổn định cao và có giá thành thấp.

LỜI CẢM TẠ

Nhóm tác giả xin chân thành cảm tạ Sở Khoa Học Công Nghệ Tỉnh Kiên Giang đã hỗ trợ một phần kinh phí để thực hiện đề tài. Sở Thủy sản Tỉnh Kiên Giang, Trại Giống Hòn Chông và Chi Cục Bảo Vệ Nguồn Lợi Thủy sản Tỉnh Kiên Giang đã tham gia thu mẫu và thử nghiệm bộ kit chẩn đoán bệnh đốm trắng trên tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Thủy sản, 1996. Phát triển nuôi trồng thủy sản khu vực ven biển: Tổng quan tình hình nuôi trồng thủy sản ven biển. Tập 2.
- Bộ Thủy sản, 2001. Tổng kết chương trình phát triển nuôi trồng thủy sản năm 2001 và giải pháp thực hiện chương trình phát triển thủy sản năm 2002.
- Bộ Thủy sản, 2001. Tổng kết chương trình phát triển nuôi trồng thủy sản ở các tỉnh ven biển. Báo cáo tiến độ 1 năm thực hiện Nghị quyết 09/NQ-CP.
- Bộ Thủy sản, Báo cáo tổng kết các năm 2000, 2001, 2002, 2003. Bộ Thủy sản, Hà Nội.
- Chính phủ Việt Nam, 2004. Quyết định số 112/2004/QĐ- TTg ngày 23 tháng 6 năm 2004 của Thủ tướng Chính phủ phê duyệt chương trình phát triển giống thủy sản đến năm 2010.
- Flegel, T.W., Sriurairatana, S., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S. and Withyachumrarnkul, B. 1995. Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. Pp. 76-83 In: C.L. Browdy and J.S. Hopkins, editors. Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- <http://www.fistenet.gov.vn/> thông tin khoa học – công nghệ - kinh tế thủy sản.
- <http://www.vietnamnet.vn/khoahoc/hoso/2004/04/57424/> - Làm Sao Để Nuôi Tôm Hiệu Quả Và Bền Vững
- <http://www.vnn.vn/kinhte/toancaanh/2003/12/39177/> - Báo Động Đỏ Về Bệnh Tôm Nuôi.
- Huang, J., Song, X.L., Yu, J. and Yang, C.H. 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - study on the pathogen and pathology of the shrimp explosive epidemic disease of shrimp. Marine Fisheries Research 16, 1-10.
- Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, and T. Kimura. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathol. 29:149-158.

- Kathy F. J. Tang, Lightner, D.V. 1996. Quantitative of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* 189: 11 - 12
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 304 p.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 133-141.
- Nguyễn Văn Hào. 2005. Tình hình nhiễm bệnh đốm trắng ở tôm nuôi các tỉnh phía nam sông Hậu. Báo cáo khảo sát tình hình nuôi tôm sú quý 1 năm 2002. (Fistenet.gov.vn/Vietnamese/Anpham_TS/TapchiTS/2002/So 4-2002/04.html)
- OIE. 1997. Diagnostic Manual for Aquatic Diseases. Office International des Epizooties, Paris, 251 p.
- Van Hulten, M. C. W., and Vlak, J. M. 2001a. Genetics evident for a unit taxonomic position of white syndrome virus of shrimp: Genus Whispovirus. In "Proceeding of the Fourth Asean Conference on Disease in Aquaculture" (Fleg et al. Eds.) in Press.
- Van Hulten, M. C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K., and Vlak M., 2001b. The White Spot Virus DNA Genome Sequence. *Virology* 286, 7 – 22.
- WALKER, P.J.R.S. 2000. DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardisation and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Aquaculture Newsletter* 24, 15-19.
- Wang, C.H., Lo, C.F., Leu, J.H., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Chou, H.Y., Tung, M.C., Chang, C.F., Su, M.S. and Kou. G.H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 239-242.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 69-77.