

TIÊU CHUẨN NGÀNH

28 TCN202:2004

QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN BỆNH VIRUS ĐỐM TRẮNG TRÊN CÁC LOÀI THUỘC HỌ TÔM HE BẰNG KỸ THUẬT *Polymerase Chain Reaction*

1 Đối tượng và phạm vi áp dụng

1.1 Quy trình này quy định trình tự, nội dung phương pháp phát hiện virus gây hội chứng đốm trắng (sau đây gọi tắt là bệnh virus đốm trắng) bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (sau đây gọi tắt là PCR).

1.2 Quy trình này để chẩn đoán bệnh virus đốm trắng trên tôm bố mẹ, tôm giống, tôm nuôi thương phẩm của các loài tôm thuộc họ tôm He bằng kỹ thuật PCR.

Có thể sử dụng Quy trình này để chẩn đoán bệnh virus đốm trắng cho các loài giáp xác khác.

2 Tài liệu tham khảo

2.1 Lightner D.V. (Ed.) (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

2.2 Lo C.F., Ho C.H., Peng S.E., Chen C.H., Hsu H.C., Chiu Y.L., Chang C.F., Liu K.F.,

Su M.S., Wang C.H. & Kou G.H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Org., 27, 215-225.

2.3 Lo C.F., Leu J.H., Ho C.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. & Kou G.H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org., 25, 133-141.

2.4 Newton C.R. and Graham A. (1994). PCR. The Alden ss Ltd, Oxford, UK.

3 Giải thích thuật ngữ

Trong Quy trình này, các thuật ngữ dưới đây được hiểu như sau:

3.1 Kỹ thuật Polymerase chain reaction (PCR) là kỹ thuật sử dụng chuỗi các phản ứng nối tiếp nhau dùng để khuếch đại số lượng bản sao của một trình tự ADN đích thông qua các chu kỳ gồm 3 bước: biến tính ADN, bắt cặp bổ sung với mỗi và tổng hợp mạch mới nhờ enzym ADN polymerase.

3.2 ADN polymerase là enzym tổng hợp nên mạch ADN mới từ một mạch khuôn, có thể tham gia vào quá trình sao chép.

3.3 Bp (Base pair) là cặp liên kết A - T hoặc C - G trên một phân tử ADN mạch kép và là đơn vị đo chiều dài của một phân tử ADN.

3.4 Mồi (Primer) là một trình tự ADN ngắn, bắt cặp với một mạch khuôn ADN có mang một đầu 3'-OH tự do giúp ADN polymerase bắt đầu tổng hợp mạch mới.

3.5 Mồi xuôi và mồi ngược: được hiểu theo chiều của phiên mã ngược.

3.6 Sự biến tính (Denaturation) là sự biến tính của ADN tách từ mạch kép sang dạng mạch đơn. Tác nhân gây nên sự biến tính thường là nhiệt.

3.7 Phiến mang tôm là phần cấu tạo gồm nhiều tơ mang hợp thành mang tôm. Các tơ mang gồm các tế bào có chức năng chính là hô hấp.

4 Thiết bị, dụng cụ, mồi và hóa chất

4.1 Thiết bị, dụng cụ

4.1.1 Bộ nghiền mẫu vô trùng.

4.1.2 Máy trộn mẫu.

4.1.3 Máy khuấy từ.

4.1.4 Máy cất nước.

4.1.5 Máy ly tâm (tốc độ không nhỏ hơn 13.000 vòng/phút).

4.1.6 Máy luân nhiệt.

4.1.7 Bộ điện di gồm nguồn và bồn điện di ngang.

4.1.8 Bàn đọc kết quả với tia UV, bước sóng 302 nm.

4.1.9 Bộ phận chụp ảnh để lưu kết quả.

4.1.10 Tủ lạnh nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn.

4.1.11 Tủ lạnh nhiệt độ 4°C.

4.1.12 Tủ thao tác vô trùng.

4.1.13 Tủ sấy dụng cụ.

4.1.14 Lò vi sóng (microwave).

4.1.15 Cân phân tích (độ chính xác tới 0.001 g).

4.1.16 Micropipette các loại: 1 - 5; 5 -10; 20 -100 và 100 -1000 ml.

4.1.17 ống eppendorf chuyên dùng cho PCR các loại: 1,5 ml và 0,5 ml.

4.1.18 Đầu tip có lọc.

4.2 Môi, hóa chất

4.2.1 Môi

Môi đặc hiệu của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV) sử dụng trong kỹ thuật PCR 2 bước gồm có môi xuôi (146F1, 146F2) và môi ngược (146R1, 146R2) được thiết kế từ trình tự DNA Sall 146. Trình tự môi cụ thể như sau:

146F1: 5' ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG 3' (môi xuôi);

146R1: 5'TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A 3' (môi ngược);

146F2: 5'GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A 3' (môi xuôi);

146R2: 5' TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3' (môi ngược).

Nồng độ của môi sử dụng trong phân tích được pha loãng thành 25 mM trong dung dịch đệm TBE. Đệm TBE có thành phần như sau: 10 mM Tris -HCl (pH = 8,0) và 1 mM EDTA.

4.2.2 Hóa chất

4.2.2.1 Dung dịch để tách chiết ADN: sodium dodecyl sulfat - NaOH (SDS - NaOH)

NaOH 0,5 N (20 X): hoà tan 2 g NaOH trong 100 ml nước cất vô trùng.

SDS 0,25 % (20 X): hoà tan 0,25 g SDS trong 100 ml nước cất vô trùng (không được hấp vô trùng).

4.2.2.2 Dung dịch NaOH 0,025 N - SDS 0,0125 %

NaOH 0,5 N: 5 ml

SDS 0,25%: 5 ml

Nước cất vô trùng vừa đủ: 100 ml

Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ 4°C.

4.2.2.3 Master mix: lượng PCR master mix cho 50 ml phản ứng khuếch đại gồm:

Taq ADN Polymerase: 1,25 units

Tris-HCl (pH = 8,8 ở nhiệt độ 25°C): 75 mM

(NH₄)₂SO₄: 20 mM

MgCl₂: 1,5 mM

Tween 20: 0,01%

dATP, dCTP, d GTP và dTTP: 0,2 mM mỗi loại

4.2.2.4 Thang ADN fX174/HaeIII

4.2.2.5 Dung dịch đệm TBE (Tris - axit boric - EDTA)

EDTA (ethylene diamine tetra acetic) 0,5 M: hoà tan 93,05 g EDTA trong 350 ml nước rồi chỉnh cho dung dịch có pH = 8 bằng NaOH. Sau đó, thêm nước cất cho đủ 500 ml. Tiến hành hấp vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng.

TBE 1 X:

Tris: 108 g

Axit boric: 55 g

EDTA 0,5 M: 40 ml

Pha chế dung dịch 10 X (đậm đặc 10 lần) bằng cách hòa tan 108 g Tris và 55 g axit boric trong khoảng 600 ml nước. Sau đó, thêm 40 ml EDTA 0,5 M rồi chỉnh thể tích bằng nước cho đủ 1 lít. Bảo quản ở nhiệt độ trong phòng. Khi sử dụng mới pha loãng với nước cất vô trùng thành dung dịch 1 X.

4.2.2.6 Agarose 1% trong dung dịch TBE

4.2.2.7 Dung dịch nạp mẫu (bromophenol blue và glycerol) 6 X gồm: bromophenol blue 0,25 % và glycerol 40 %

4.2.2.8 Dung dịch ethidium bromide (10 mg/ml)

5 Chuẩn bị mẫu

5.1 Số lượng mẫu

5.1.1 Đối với mẫu tôm hậu ấu trùng (postlarvae)

Lượng mẫu dùng cho mỗi phản ứng là 100 cá thể lấy nguyên con.

5.1.2 Đối với mẫu tôm bố mẹ

Lượng mẫu dùng cho mỗi phản ứng là 100 mg lấy ở phần mang tôm hoặc cuống mắt hoặc chân bơi.

5.1.3 Đối với mẫu tôm thương phẩm

Lượng mẫu cần dùng cho mỗi phản ứng là 100 mg lấy ở phần mang tôm. Mẫu tôm thương phẩm được lấy trong 2 trường hợp:

- Nếu ao có tôm bị bệnh, phải lấy mẫu khoảng 10 - 20 cá thể có dấu hiệu bệnh lý rõ nhất.
- Nếu ao tôm đang phát triển bình thường hoặc không thấy dấu hiệu bệnh lý, phải lấy ngẫu nhiên khoảng 20 - 30 cá thể.

5.2 Yêu cầu đối với mẫu để phân tích

Mẫu phải được lấy khi tôm còn sống và được bảo quản ngay trong cồn 95 %. Thể tích cồn sử dụng để bảo quản phải không nhỏ hơn 3 lần so với thể tích mẫu cần phân tích. Sau khi cố định, mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ khoảng 25 - 30oC trong 1 tuần lễ. Khi cần bảo quản mẫu lâu hơn nữa phải thay cồn mới.

6 Phương pháp tiến hành

6.1 Xử lý mẫu

6.1.1 Mẫu được nghiền trong bộ nghiền mẫu vô trùng (4.1.1) với 900 ml dung dịch tách chiết ADN (4.2.2.1). Dung dịch sau khi nghiền được dồn vào eppendorf 1,5 ml (4.1.17) để làm biến tính bằng cách đun sôi cách thủy trong khoảng 5 - 10 phút rồi làm lạnh nhanh bằng cách cho vào nước đá.

6.1.2 Tiến hành ly tâm dịch nghiền trong 5 phút bằng máy ly tâm (4.1.5) với tốc độ 13.000 vòng/phút. Sau đó, thu phần dịch nổi để thực hiện phản ứng PCR. Nếu mẫu chưa được phân tích ngay phải bảo quản mẫu ở nhiệt độ -20oC trong vòng 1 tuần lễ.

6.2 Phản ứng khuếch đại PCR

Phản ứng gồm hai lần khuếch đại đặc hiệu một đoạn gen của WSSV dựa trên cặp mồi đặc hiệu (4.2.1). Dùng cặp mồi 146F1, 146R1 để khuếch đại lần 1 cho sản phẩm có độ dài 1441 bp và cặp mồi 146F2, 146R2 để khuếch đại lần 2 cho sản phẩm khuếch đại có độ dài 941 bp.

6.2.1 Bước khuếch đại lần 1

Thành phần 50 µl phản ứng PCR bước 1 như sau:

6.2.1.1 Đối với mẫu thử: hút 46 µl PCR master mix cho vào ống eppendorf 0,2 ml rồi thêm vào 1 µl mồi 146F1 và 146R1 có nồng độ 25 mM (4.2.1) và 2 µl dịch chiết ADN từ mẫu cần phân tích thu được tại Điều 6.1.2.

6.2.1.2 Mẫu đối chứng dương: thay dịch chiết ADN từ mẫu cần phân tích bằng dịch chiết ADN từ mẫu bệnh đốm trắng đã biết.

6.2.1.3 Mẫu đối chứng âm: thay dịch chiết ADN từ mẫu cần phân tích bằng nước cất vô trùng.

6.2.2 Bước khuếch đại lần 2

Hút 46 µl PCR master mix cho vào ống eppendorf 0,2 ml rồi thêm vào 1 µl mồi 146F2 và 146R2 có nồng độ 25 mM (4.2.1) và 2 µl sản phẩm khuếch đại lần 1.

Phản ứng khuếch đại PCR cả 2 bước được thực hiện trên máy luân nhiệt (4.1.6) và cài đặt với cùng một chế độ phản ứng.

Chế độ phản ứng khuếch đại: ở nhiệt độ 94oC trong 4 phút (1 chu kỳ); ở nhiệt độ 94oC trong 1 phút; ở nhiệt độ 55oC trong 1 phút; ở nhiệt độ 72oC trong 2 phút (39 chu kỳ); ở nhiệt độ 72oC trong 2 phút (1 chu kỳ); ở nhiệt độ 4oC cho đến khi phân tích.

Sản phẩm khuếch đại bước 2 được điện di ngay trên thạch agarose 1% (4.2.2.6) có chứa ethidium bromide (4.2.2.8).

6.3 Tiến hành điện di

6.3.1 Chuẩn bị gel agarose 1%

Gel agarose được pha trong dung dịch đệm TBE 1 X (4.2.2.5). Sau khi đun chảy hoàn toàn thạch, để nguội tới nhiệt độ khoảng 60°C rồi thêm vào 5 ml dung dịch ethidium bromide (4.2.2.8). và 100 ml agarose (4.2.2.6). Gel agarose được đổ vào khuôn có sẵn các lược để tạo giếng. Gel điện di phải có độ dày khoảng 3 - 4 mm. Gel sau khi đã chuẩn bị phải được ngâm chìm trong dung dịch đệm TBE 1 X.

6.3.2 Khay điện di

Khay điện di chứa dung dịch đệm TBE 1 X (4.2.2.5).

6.3.3 Điện di

Trộn 10 ml sản phẩm khuếch đại (6.2) với 2 ml dung dịch nạp mẫu (4.2.2.7) rồi cho vào các giếng thạch. Điện di trong thời gian 30 phút ở điện thế 100 V và cường độ 50 mA.

7 Đọc kết quả

Kết quả được đọc trên bàn đọc với tia UV (bước sóng 302 nm). Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu của WSSV ở bước 1 là 1441 bp và bước 2 là 941 bp.

Căn cứ vào thang ADN chuẩn, mẫu được xác định là dương tính hay âm tính với WSSV dựa trên sản phẩm khuếch đại đặc hiệu của bước khuếch đại lần 1 và 2.

8 Quy định về đảm bảo an toàn

Trong quá trình tiến hành thao tác phải thực hiện đúng các quy định sau đây:

8.1 Thuốc nhuộm ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ.

8.2 Chỉ được bật đèn cực tím UV để quan sát kết quả sau khi đã đóng kính bảo vệ.

8.3 Nghiêm cấm sử dụng các dụng cụ liên quan đến sản phẩm sau khuếch đại cho việc chuẩn bị mẫu.

8.4 Phòng thí nghiệm phải bố trí riêng biệt khu chuẩn bị mẫu trước khi khuếch đại và khu xử lý sản phẩm sau khi khuếch đại để tránh hiện tượng nhiễm chéo gây kết quả dương tính giả.