

Tóm tắt Khóa luận tốt nghiệp

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP *IN SITU* HYBRIDIZATION (ISH) ĐỂ CHẨN ĐOÁN MÀM BỆNH WSSV (White Spot Syndrome Virus) TRÊN TÔM SÚ (*Penaeus monodon*) VÀ TSV (Taura Syndrome Virus) TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*)

Sinh viên: Phạm Thị Tuyết Anh

Khóa: 2001 – 2005

Đề tài được thực hiện từ 1 – 3 – 2005 đến 30 – 7 – 2005, tại Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II, trên hai đối tượng là TSV trên *P. vannamei* (Postlarvae và thương phẩm) và WSSV trên *P. monodon* (Postlarvae và thương phẩm). Hai loại virus này có mức độ nguy hiểm và khả năng tạo dịch bệnh lớn ở tôm nuôi tại Việt Nam. Do đó, chúng tôi sử dụng phương pháp *In Situ* hybridization (ISH) hay lai tại chỗ nhằm mục tiêu phát hiện nhanh và chính xác các mẫu tôm nhiễm bệnh Taura và đốm trắng, để có biện pháp xử lý kịp thời, góp phần phòng ngừa sự lây lan và bùng phát hai loại dịch bệnh này. Đề tài gồm các thí nghiệm sau:

1. Các thí nghiệm trên *P. vannamei*

- Thí nghiệm theo quy trình chuẩn của bộ kit để ổn định phương pháp ISH chẩn đoán TSV trên *P. vannamei*. Sau khi thực hiện thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp ISH được ứng dụng rất hiệu quả trong chẩn đoán TSV trên *P. vannamei*.
- Thí nghiệm tìm quy trình ISH tối ưu áp dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Viện, gồm các thí nghiệm nhỏ sau:
 - ❖ Thí nghiệm tìm nhiệt độ biến tính mẫu tối ưu, thực hiện trên 5 nghiệm thức. Kết quả nhiệt độ biến tính mẫu theo nghiệm thức thứ ba (probe được biến tính trước ở 95⁰C trong 10 phút, làm lạnh nhanh và giữ ở 4⁰C; khi lai thì cho dung dịch lai có probe đã biến tính lên mẫu và thực hiện biến tính mẫu ở 70⁰C trong 6 phút, sau đó ủ mẫu qua đêm ở 42⁰C) là tốt nhất trên postlarvae và tôm thương phẩm.
 - ❖ Thí nghiệm tìm thời gian cắt tối ưu với Proteinase K, thực hiện trên 5 nghiệm thức: 11 phút, 13 phút, 15 phút, 17 phút và 19 phút. Kết quả thời gian cắt với Proteinase K tối ưu trên postlarvae là 15 phút và trên tôm thương phẩm là 17 phút.
 - ❖ Thí nghiệm tìm dung dịch lai thích hợp, thực hiện trên 3 nghiệm thức: 100 μ l, 75 μ l và 50 μ l. Kết quả thể tích dung dịch lai thích hợp nhất trên tôm postlarvae và tôm thương phẩm là 75 μ l.

2. Các thí nghiệm trên *P. monodon*

- Thí nghiệm theo quy trình chuẩn của bộ kit để ổn định phương pháp ISH chẩn đoán WSSV trên *P. monodon*. Sau khi thực hiện thí nghiệm này, chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp ISH được ứng dụng rất hiệu quả trong chẩn đoán WSSV trên *P. monodon*.
- Thí nghiệm tìm quy trình ISH tối ưu áp dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Viện, gồm các thí nghiệm nhỏ sau:
 - ❖ Thí nghiệm thay đổi một số hóa chất thông dụng như cồn tuyệt đối, xylene và paraformaldehyde do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất, nhằm giảm chi phí chẩn đoán. Kết quả thí nghiệm cho thấy không có sự khác biệt so với thí nghiệm dùng các hóa chất như bộ kit đã khuyến cáo sử dụng.
 - ❖ Thí nghiệm dùng quy trình xử lý mẫu nhanh: thực hiện trên cả tôm postlarvae và thương phẩm, kết quả lai thực hiện theo quy trình này không khác với kết quả lai theo quy trình chuẩn.
 - ❖ Thí nghiệm biến tính mẫu và probe đồng thời trên lame trước khi lai: thực hiện trên cả tôm postlarvae và thương phẩm và thu được kết quả không khác với kết quả lai theo quy trình chuẩn.
 - ❖ Thí nghiệm kết hợp xử lý mẫu nhanh với biến tính probe và mẫu đồng thời trên lame: thực hiện trên cả tôm postlarvae và thương phẩm và thu được kết quả không khác với kết quả lai theo quy trình chuẩn.

3. Thí nghiệm so sánh phương pháp ISH với mô học và PCR

Thí nghiệm được thực hiện trên *P. vannamei* (postlarvae và tôm thương phẩm) và *P. monodon* (postlarvae và tôm thương phẩm). Kết quả thí nghiệm cho thấy phương pháp ISH có độ ổn định, độ chính xác và nhạy hơn mô học và PCR.

Từ các kết quả thực nghiệm như trên, chúng tôi đã đưa ra quy trình ISH có độ nhạy, độ ổn định, độ chính xác cao và thời gian chẩn đoán nhanh, đáp ứng được việc kiểm tra các mầm bệnh do WSSV và TSV gây ra trên tôm nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm và trong các hệ thống nuôi tôm ở Việt Nam.