

VP – LOCI LAMP PCR

Bộ thuốc thử phát hiện vi khuẩn *Vibrio Parahaemolyticus*

1. Nguyên tắc

DNA tách chiết từ mẫu thử (mẫu tôm) được cho vào PCR mix, sự có mặt của *Vibrio Parahaemolyticus* (VP) trong mẫu thử được nhân lên hàng trăm tỷ bản sao, làm thay đổi màu của ống phản ứng PCR. Lúc này mẫu thử có nhiễm vi khuẩn VP hay không có thể được xác định bằng mắt thường.

2. Phạm vi áp dụng

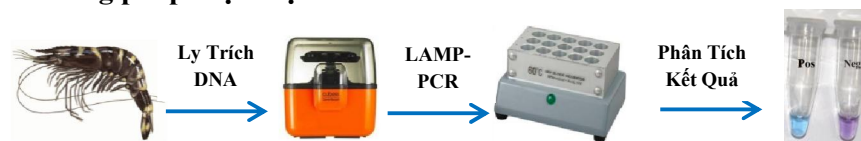
Dùng xác định mẫu tôm có nhiễm hoặc không nhiễm với vi khuẩn VP. Kết quả này giúp các trang trại tôm giống hay các nhà nuôi tôm có biện pháp xử lý hợp lý. Bộ thuốc thử còn được sử dụng trong các phòng thí nghiệm nhằm xác định mẫu tôm thương phẩm có chứa mầm bệnh hay không.

3. Thành phần bộ thuốc thử

Bảng 1: Thành phần bộ thuốc thử VP - LOCI LAMP PCR

Tên thuốc thử	Thành phần	Số lượng	Bảo quản
LAMP-Enzyme	Bst polymerase	60 tube	- 20 ⁰ C
VP-primer mix	Primer đặc hiệu cho vi khuẩn VP, dNTP, buffer LAMP PCR	03 tube 220µl/tube	- 20 ⁰ C
IC-primer mix	Primer đặc hiệu chỉ phát hiện chứng nội, dNTP, buffer LAMP PCR	03 tube 220µl/tube	- 20 ⁰ C
Chứng dương VP	Gen vi khuẩn VP	01 tube 100 µl/tube	- 20 ⁰ C
Chứng âm	Nước cất	01 tube 100 µl/tube	- 20 ⁰ C
Chứng nội IC	Plasmid chứa gen nội kiểm	02 tube 300 µl/tube	- 20 ⁰ C
Mineral oil	Dầu khoáng	02 tube 300 µl/tube	- 20 ⁰ C

4. Phương pháp thực hiện



a) Chuẩn bị mẫu thử

- Mẫu thử là tôm post, tôm giống: lấy khoảng 10 - 40 con (tùy kích cỡ tôm post) còn sống hoặc được cố định trong cồn.
- Mẫu thử là tôm nuôi: Lấy một phần gan tụy, có trọng lượng khoảng 0,3g đến 0,5g, mẫu tươi hoặc cố định trong cồn.
- Mẫu tôm bố mẹ: Lấy 1 phần chân bò hoặc chân bơi.
- Mẫu môi trường ao nuôi: Lấy 10 ml nước ao nuôi ly tâm lấy cặn làm xét nghiệm.

b) Ly trích DNA từ mẫu thử

- Tách DNA từ mẫu thử có thể tiến hành bằng nhiều cách khác nhau, các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu ý: Thêm 20µl dung dịch chứng nội IC vào mẫu trước khi tiến hành ly trích.

c) PCR khuếch đại VP

- Trước khi tiến hành, bật máy ủ nhiệt và cài đặt ở mức 60⁰C.
Tính toán số lượng mẫu cần xét nghiệm để chuẩn bị số lượng PCR mix cần thiết.
Ví dụ: Nếu tiến hành xét nghiệm 3 mẫu thử thì tiến hành như sau:
- Rửa đông hoàn toàn 1 ống VP-primer mix và một ống IC-primer mix.
- Lấy 10 ống LAMP-Enzyme, ly tâm lắng trong 10s.
- Trên 5 ống LAMP-Enzyme đầu tiên, thêm 19 µl dung dịch VP-primer mix, lúc này chúng ta có được hỗn hợp VP-LAMP mix.
- Trên 5 ống LAMP-Enzyme còn lại, thêm 19 µl dung dịch IC-primer mix, lúc này chúng ta có được hỗn hợp IC-LAMP mix.

Bảng 2: Cách tiến hành thí nghiệm

Tube số	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VP-LAMP mix	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl					
IC-LAMP mix						20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
Mẫu số 1	5µl					5µl				
Mẫu số 2		5µl					5µl			
Mẫu số 3			5µl					5µl		
Chứng (-)				5µl					5µl	
Chứng (+)					5µl					
Chứng nội IC										5µl

- Ly tâm nhẹ các ống cho phần dịch thuốc thử nằm ở đáy ống phản ứng (nếu chạy trên máy ủ nhiệt khô thì trên mỗi ống thêm 10 µl Mineral oil rồi ly tâm lắng). Đặt các ống phản ứng này vào máy ủ nhiệt (**đã lên nhiệt độ 60⁰C**), **ủ 100 phút** rồi phân tích kết quả.

d) Phân tích kết quả

Bảng 3: Phân tích kết quả

Mẫu	VP-LAMP mix	IC-LAMP mix	Kết luận
Chứng âm	Tím	Tím	Không ngoại nhiễm
Chứng dương	Xanh		LAMP PCR mix đạt độ nhạy
Chứng nội		Xanh	LAMP PCR mix đạt độ nhạy
Mẫu số 1	Tím	Xanh	Mẫu âm tính với VP
Mẫu số 2	Xanh	Xanh	Mẫu dương tính VP
Mẫu số 3	Tím	Tím	Mẫu ức chế, cần thực hiện lại

Lưu Ý:

- Khi phân tích kết quả không được mở nắp tube vì có thể gây ngoại nhiễm khu vực xét nghiệm, làm sai lệch kết quả của những lần xét nghiệm sau.
- Khi phân tích kết quả xong, gói kỹ các tube phản ứng trước khi bỏ.