

EHP/AHPND - Multiplex PCR KIT

Bộ thuốc thử phát hiện cùng lúc EHP/AHPND trên tôm

1. Nguyên tắc

Bộ thuốc thử Multiplex PCR có khả năng phát hiện cùng lúc 2 tác nhân thường xuyên gây bệnh trên tôm, mỗi tác nhân gây bệnh được xác định bởi kích thước PCR đặc hiệu:

Chứng nội kiểm Deca:	190 bp
Vi khuẩn <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> (VP):	96 bp
Hoại tử gan tụy cấp (AHPND,EMS):	392 bp
Vi bào tử trùng (EHP):	247 bp

2. Phạm vi áp dụng

Dùng xác định mẫu tôm có nhiễm hoặc không nhiễm với VP, AHPND và EHP. 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 EHP/AHPND - Multiplex PCR

Tên thuốc thử	Thành phần	Số lượng	Bảo quản
EHP/AHPND - Multiplex PCR mix	Primer đặc hiệu cho EHP, AHPND ,taq polymerase, dNTP, buffer PCR	30 tube 35µl/tube	-20 ⁰ C
Chứng dương EHP/AHPND	Gen các đối tượng gây bệnh EHP, AHPND	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

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 (đối với mẫu không phải là tôm) trước khi tiến hành ly trích.

c) PCR khuếch đại EHP/AHPND

- Tính toán số lượng mẫu cần xét nghiệm để chuẩn bị số lượng PCR mix cần thiết.
Ví dụ: Nếu tiến hành xét nghiệm 5 mẫu thử thì cần chuẩn bị 7 ống phản ứng, tiến hành như sau:

Lấy 7 ống EHP/AHPND -Multiplex PCR mix, ly tâm nhẹ các ống cho phần dung dịch nằm ở đáy ống.

Tiến hành thí nghiệm theo hướng dẫn ở bảng 2.

Bảng 2: Cách tiến hành thí nghiệm

Tube số	1	2	3	4	5	6	7
EHP/AHPND-Multiplex PCR mix	35µl	35µl	35µl	35µl	35µl	35µl	35µl
Mẫu số 1	5µl						
Mẫu số 2		5µl					
Mẫu số 3			5µl				
Mẫu số 4				5µl			
Mẫu số 5					5µl		
Chứng (-)						5µl	
Chứng (+)							5µl

- Ly tâm nhẹ các ống cho phần dịch thuốc thử nằm ở đáy ống PCR. Đặt các ống PCR này vào máy luân nhiệt và chạy chu trình luân nhiệt như sau:

95⁰C trong 10 phút.

50 chu kỳ lặp lại 3 bước:

95⁰C trong 15 giây

55⁰C trong 30 giây

72⁰C trong 1 phút.

72⁰C trong 7 phút.

d) Phân tích kết quả

- Tiến hành điện di 6µl sản phẩm PCR cùng với thang chuẩn (ladder) trên gel agarose 2%, set up máy điện di ở mức 100V trong 45 phút đối với bản gel dài 6 cm.
- Dựa vào thang chuẩn để xác định kích thước sản phẩm PCR, từ đó kết luận kết quả

Bảng 3: Phân tích kết quả

Mẫu	190bp	96bp	247bp	392bp	Kết luận
Chứng âm	(-)	(-)	(-)	(-)	Không ngoại nhiễm
Chứng dương		(+)	(+)	(+)	Mix đạt độ nhạy
Mẫu số 1	(+)	(-)	(-)	(-)	Âm tính
Mẫu số 2	(+) or (-)	(+)			Dương VP
Mẫu số 3	(+) or (-)	(+) or (-)		(+)	Dương AHPND
Mẫu số 4	(+) or (-)		(+)		Dương EHP
Mẫu số 5	(+) or (-)	(+)	(+)	(+)	Dương VP, AHPND, EHP