

IMNV- Real time PCR KIT

Bộ thuốc thử phát hiện IMNV trên tôm

1. Nguyên tắc

Bộ thuốc thử Realtime PCR có khả năng phát hiện sự hiện diện của *infectious myonecrosis virus* (IMNV) gây bệnh hoại tử cơ trong mẫu thử dựa trên màu huỳnh quang đặc hiệu:

Chứng nội kiểm Deca: Màu Hex (Joe, Vic)

Virus gây bệnh hoại tử cơ (IMNV): Màu CY5

Do IMNV là virus có vật chất di truyền là RNA do đó ta có thêm bước tổng hợp cDNA trước khi chạy realtime-PCR

2. Phạm vi áp dụng

Dùng xác định mẫu tôm có nhiễm hoặc không nhiễm với IMNV. 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 IMNV - Realtime PCR

Tên thuốc thử	Thành phần	Số lượng	Bảo quản
IMNV - Realtime PCR mix	Primer và probe đặc hiệu cho IMNV, taq polymerase, dNTP, buffer PCR	03 tube 150µl/tube	-20°C
Chứng dương IMNV	Gen các đối tượng gây bệnh IMNV	01 tube 100 µl/tube	-20°C
Chứng âm	Nước cất	01 tube 100 µl/tube	-20°C
Chứng nội IC	Plasmid chứa gen nội kiểm	02 tube 300 µl/tube	-20°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 RNA từ mẫu thử

- Tách RNA 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 tổng hợp cDNA

- Chạy PCR tổng hợp cDNA từ dịch RNA ly trích được, các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Dịch cDNA sẽ được sử dụng cho bước chạy Realtime-PCR tiếp theo.

d) PCR khuếch đại IMNV

- Tính toán số lượng mẫu cần xét nghiệm để chuẩn bị số lượng PCR mix cần thiết.
Ví dụ: Nếu tiến hành xét nghiệm 2 mẫu thử thì cần chuẩn bị 4 ống phản ứng, tiến hành như sau:

Lấy 1 tube IMNV - Realtime PCR mix đã đông hoàn toàn, lắc úp ngửa nhẹ 3 lần, ly tâm nhẹ ống để phân dung dịch nằm ở đáy ống. Tiến hành như sau:

Bảng 2: Cách tiến hành thí nghiệm

Tube số	1	2	3	4
IMNV- Realtime PCR mix	15µl	15µl	15µl	15µl
Mẫu số 1	5µl			
Mẫu số 2		5µl		
Chứng (-)			5µl	
Chứng (+)				5µl

- Ly tâm nhẹ các ống cho phân 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 15 phút.

45 chu kỳ lặp lại 2bước:

95⁰C trong 15 giây

60⁰C trong 60giây (**Độc huỳnh quang Hex, Cy5**)

e) Phân tích kết quả

- Phân tích kết quả trên từng kênh màu riêng biệt, rồi ghi nhận kết quả cho từng mẫu. Từ đó đưa ra kết quả mẫu âm tính, dương tính với đối tượng gây bệnh nào.
- Khi phân tích cần kiểm tra chứng âm phải không ngoại nhiễm, chứng dương phải đạt độ nhạy, thì mới kết luận kết quả trên mẫu thí nghiệm.

Bảng 3: Phân tích kết quả

Mẫu	Hex	Cy5	Kết luận
Chứng âm	(-)	(-)	Không ngoại nhiễm
Chứng dương		(+)	Mix đạt độ nhạy
Mẫu số 1	(+)	(-)	Âm tính
Mẫu số 2	(+) or (-)	(+)	Dương IMNV