

Bước đầu đánh giá mức độ phiên mã của một số gen liên quan tới đáp ứng miễn dịch của tôm đối với kháng nguyên VP28 của virus đốm trắng

Đỗ Thị Hồng Thu¹, Đỗ Thị Hoàng Kim^{1,2}, Nhữ Văn Hùng¹, Trần Thị Mỹ^{1,3}
Nguyễn Thị Vân Anh¹, Phạm Thị Thu Hương^{1*}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Y học, Đại học WonKwang, Hàn Quốc

³Công ty Cổ phần Nghiên cứu và Phát triển ANABIO

Ngày nhận bài 4/2/2016, ngày chuyển phản biện 17/2/2016, ngày nhận phản biện 14/3/2016, ngày chấp nhận đăng 17/3/2016

Tôm là loài động vật giáp xác có hệ miễn dịch tự nhiên với sự tham gia mạnh mẽ của các enzyme hệ thực bào để chống lại các tác nhân gây bệnh. Khả năng thực bào ở tôm đã được chứng minh có sự tham gia của gen *Rho* (Ras-like GTPase) và *Ran* (Ran binding protein) [1]. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng kỹ thuật RT-PCR nhân bản đặc hiệu gen *Rho* và *Ran* nhằm đánh giá mức độ phiên mã của các gen này trong đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng đối với kháng nguyên VP28, một loại protein vỏ của virus đốm trắng (WSSV). Kết quả bước đầu cho thấy, tôm được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28 của nhóm nghiên cứu về Enzyme và Protein thuộc Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, có mức độ biểu hiện mRNA của gen *Rho* tăng lên theo thời gian 7, 14 và 28 ngày lần lượt khoảng 1,7; 2,7 và xấp xỉ 3 lần. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả bảo hộ tôm chống lại WSSV với hiệu quả bảo hộ trên 75%. Trong khi đó, dường như không có thay đổi về mức độ biểu hiện mRNA gen *Ran* trước và sau khi tôm thẻ chân trắng ăn chế phẩm. Kết quả này hứa hẹn tiềm năng sử dụng gen *Rho* như một dấu ấn marker cho việc đánh giá hiệu quả tác động của chế phẩm probiotics lên hệ miễn dịch tôm bằng phản ứng RT-PCR.

Từ khóa: miễn dịch ở tôm, probiotic, *Ran*, *Rho*, VP28.

Chỉ số phân loại 4.6

Mở đầu

Như chúng ta đã biết, tôm là loài động vật giáp xác có cơ chế bảo vệ phụ thuộc chính vào hệ miễn dịch tự nhiên [2]. Hệ miễn dịch tự nhiên của tôm chủ yếu dựa trên các yếu tố thực bào và thể dịch mà không có các tế bào có khả năng ghi nhớ hay tự sản xuất kháng thể [3]. Trong khi đó, tôm lại thường xuyên bị tiếp xúc với nguồn bệnh trong môi trường nuôi nên rất dễ bị các loại virus hoặc vi khuẩn gây bệnh khiến tôm chết hàng loạt, gây thiệt hại lớn về kinh tế. Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào việc hỗ trợ hệ miễn dịch cho tôm bằng các loại chế phẩm probiotics làm tăng khả năng chống lại sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh mà chủ yếu là do virus gây ra. Nhiều nghiên cứu về hệ miễn dịch của tôm cho thấy, dạng miễn dịch tự nhiên là hàng rào bảo vệ đầu tiên chống lại các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập, trong đó, thực bào là cơ chế cốt lõi giúp cơ thể tôm loại bỏ sự nhiễm của vi sinh vật và các tác nhân gây hại khác. Cơ chế này thông

qua các trình tự sau: tìm kiếm và bắt cặp tại chỗ với các chuỗi actin, cắt chuỗi actin, co myosin và cuối cùng là phá hủy các mầm bệnh với sự tham gia của các enzyme phân giải và các phức hệ oxy hóa [2]. Các tế bào máu ở họ tôm *Penaeid* nói chung có đặc tính sinh học và chức năng tương tự với các đại thực bào, bạch cầu hạt và tế bào giết tự nhiên của động vật có xương sống [3]. Những tế bào này thực hiện các quá trình thực bào, hình thành thể hạch, thể bao, melanin, hoạt hóa proPO và apoptosis. Chúng cũng tạo ra các yếu tố dính kết tế bào (agglutinin-lectin system), hệ thống đông máu (hemolymph coagulation system), hệ thống bổ thể (complement system) và peptide kháng khuẩn (AMP) [4-6].

Trong những nghiên cứu mới nhất về hệ miễn dịch và quá trình thực bào của tôm, người ta đã tìm thấy sự tham gia của họ protein G, điển hình là: *Rho*, *Ran*, *Rab* GTPases [1]. Việc gia tăng mức độ biểu hiện các gen này có thể gắn liền với hoạt động thực bào mạnh mẽ,

*Tác giả liên hệ: Email: pthuongibt@gmail.com

Evaluation on the transcription level of some genes related to the shrimp innate immune responses to the VP28 antigen of white spot syndrome virus

Summary

Shrimp is a crustacean species that just has an innate immune system against invading pathogens mainly using enzymes of the phagocytosis system. The phagocytosis process of shrimp is mainly performed by some components of G protein family including Ras-like GTPase (*Rho*) and Ran binding protein (*Ran*). In this study, the authors use RT-PCR technique to amplify a specific *Rho* and *Ran* genes, those are genetically related to the phagocytic mechanism of shrimp. Initial results show that shrimp fed with food contained VP28-antigen spores (CotB-VP28, a product of the Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science) indicates an increase in *Rho* mRNA expression level over time at 7, 14 and 28 days around 1.7, 2.7 and 3 folds, respectively. This is consistent with the protection efficiency against white spot syndrome virus (WSSV) which is over 75%. Whereas, there is no change in *Ran* mRNA expression level at the same experiment condition. This result is promising a potential of using *Rho* as a molecular marker for assessing the impacts of probiotics on the shrimp immune system by RT-PCR method.

Keywords: probiotic, *Ran* binding protein (*Ran*), *Ras*-like GTPase (*Rho*), shrimp immune system, VP28.

Classification number 4.6

thể hiện khả năng bảo vệ cơ thể được nâng cao. *Rho* được cho là có liên quan tới sự hình thành superoxide trong suốt quá trình thực bào [7]. *Rho* còn có vai trò trong quá trình opsonized hóa và bổ sung phân tử iC3b, là một trong những cơ chế không thể thiếu của quá trình thực bào [7]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tôm không có khả năng bảo vệ cơ thể khi tiếp xúc lần đầu tiên với các tác nhân gây bệnh mới xuất hiện [8]. Tuy nhiên, một số loài tôm vẫn có khả năng tồn tại và phát triển tương đối tốt khi tiếp xúc với tác nhân gây bệnh. Mặt khác, tôm khỏe mạnh thường bị nhiễm virus ở mức độ thấp [9-11] và tôm tiếp xúc với tác nhân gây bệnh virus đã được chứng minh có khả năng kháng khi tiếp xúc virus ở lần tiếp theo [12].

Do vậy, một trong các giải pháp đã được nghiên cứu sử dụng để tăng cường khả năng miễn dịch cho tôm hiện nay là sử dụng các chế phẩm dạng probiotic mang những tính năng đặc trưng hỗ trợ hệ miễn dịch tôm chống lại sự xâm nhập của virus. Nhiều chất chiết xuất từ các loài sinh vật khác nhau được kết hợp trong chế độ ăn của tôm trước và sau khi nhiễm WSSV cho thấy có cải thiện khả năng miễn dịch và làm giảm tỷ lệ chết của tôm bị nhiễm WSSV [13]. Ngoài ra, chế độ ăn có các chất kích thích miễn dịch như β -1, 3-glucan [14], lipopolysaccharide [15], peptidoglycan [16] có khả năng kích thích miễn dịch bẩm sinh giúp tôm có khả năng sống sót cao hơn khi nhiễm WSSV. Gần đây, trong một công bố của nhóm nghiên cứu về enzyme và protein của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên cho thấy, chế phẩm probiotic dạng bào tử biểu hiện kháng nguyên VP28 trên bề mặt có khả năng tăng cường miễn dịch của tôm thẻ chân trắng [17], có tiềm năng giúp tôm chống lại sự xâm nhiễm của WSSV.

Việc đánh giá tác dụng của các loại chế phẩm lên hệ miễn dịch tôm thường thông qua các chỉ tiêu về hoạt độ enzyme tham gia vào quá trình tiêu diệt mầm bệnh như tăng hoạt độ của enzyme SOD (Superoxide dismutase) liên quan tới quá trình tiêu thụ các gốc tự do gây độc cơ thể tôm, của enzyme PO (Phenoloxidase) liên quan tới quá trình chuyển hóa các hợp chất dạng quinon hình thành melanin chôn vùi thể lạ xâm nhập hoặc phóng thích chúng ra bên ngoài [17-19] hay của enzyme NOS (Nitrite oxide synthase) liên quan tới khả năng chống lại các mầm bệnh bằng cách tác động phá vỡ lớp màng lipid hoặc DNA của mầm bệnh [20, 21]. Tuy nhiên, các đánh giá hoạt độ enzyme trong điều kiện thử nghiệm trong phòng thí nghiệm thường gặp

một số khó khăn do lượng mẫu ở mỗi mẻ thí nghiệm có hạn và giá trị thu được qua mỗi đợt lặp lại thường cho mức độ khác biệt thấp giữa nhóm thí nghiệm và đối chứng. Hơn nữa, các phép đo hoạt độ enzyme cần có độ nhạy cao, đòi hỏi phải sử dụng vật liệu có gần đồng vị phóng xạ, các nguyên vật liệu đắt tiền, có tính đặc thù, khó thực hiện trong điều kiện thí nghiệm hiện tại ở Việt Nam.

Vì thế, việc tìm ra dấu ấn phân tử phản ánh tác dụng hỗ trợ của chế phẩm lên hệ miễn dịch tôm là cần thiết và phù hợp với nhu cầu thực tế. Chúng tôi đề xuất giải pháp sử dụng kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) để nhân bản đặc hiệu gen *Rho* và *Ran*, là các gen liên quan tới khả năng thực bào ở tôm trong quá trình chống lại vi khuẩn gây bệnh.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Chế phẩm bào tử *B. subtilis* PY79-CotB-VP28 là sản phẩm của nhóm nghiên cứu đề tài KC04.09/11-15 thuộc Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên [22]. Mẫu tôm thẻ chân trắng sạch bệnh, khoảng 60 ngày tuổi (2-3 g/con), được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1. Mẫu WSSV được lấy từ mẫu tôm có biểu hiện nhiễm thu thập từ Huế, Sóc Trăng (Việt Nam) được bảo quản trong cồn 95° được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu đề tài KC04.09/11-15.

Phương pháp

Nuôi thử nghiệm bảo hộ tôm chân trắng chống lại WSSV bởi bào tử PY79 biểu hiện VP28 trên bề mặt bảo hộ: tôm thẻ chân trắng được nuôi thuần 2 tuần sau đó được chia thành 4 nhóm, mỗi nhóm lặp lại 2 bể trong cùng một lần thử nghiệm. Các bể thí nghiệm có kích thước 45 x 25 x 30 (cm), có sục khí, bơm tuần hoàn để loại bỏ cặn. Mỗi bể được bổ sung 25 l nước muối biển nhân tạo với độ mặn 16-20‰. Định kỳ mỗi ngày giặt tắm lọc 1 lần, 3 ngày thay 70% nước. Mỗi bể thử nghiệm được bố trí 30 cá thể tôm. Nhiệt độ được duy trì 25-28°C. Lượng thức ăn: 5 g/1 bể/30 con, được chia làm 4 lần cho ăn, mỗi lần cách nhau 3 giờ. Tôm được ăn chế phẩm bào tử (10^6 CFU/g thức ăn) liên tục trong suốt thời gian nuôi và thử thách virus. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong các thời điểm khác nhau.

Các nhóm thí nghiệm được bố trí như sau: 1) Nhóm đối chứng âm (ĐC-): cho ăn thức ăn công nghiệp và không cảm nhiễm WSSV; 2) Nhóm đối chứng dương

(ĐC+): cho ăn thức ăn công nghiệp và cảm nhiễm WSSV; 3) Nhóm thí nghiệm (PY79): cho ăn thức ăn trộn bào tử chủng đại PY79 và cảm nhiễm; 4) Nhóm thí nghiệm (PY79-CotB-VP28): cho ăn thức ăn trộn bào tử PY79-CotB-VP28 và cảm nhiễm. Các nhóm không ăn hoặc được ăn chế phẩm liên tiếp, đến ngày thứ 14 thì cảm nhiễm tôm với WSSV ($1,3 \times 10^4$ copy/ml nước nuôi). Các lô tôm được theo dõi trong 14 ngày, mỗi ngày 2 lần ghi nhận số lượng tôm chết tích lũy, từ đó xác định tỷ lệ tôm chết sau 14 ngày và được tính toán theo công thức được mô tả của Nguyen A.T và cộng sự (2014). Tỷ lệ bảo hộ sẽ được tính bằng: $(1 - \text{tỷ lệ tôm chết ở nhóm thử nghiệm} / \text{tỷ lệ tôm chết ở nhóm đối chứng dương}) \times 100$ [17].

Thu mẫu và tách RNA tổng số: mô cơ tôm từ các nhóm mẫu trên được lấy mẫu vào ngày trước khi ăn chế phẩm (ngày 0), vào ngày sau khi ăn chế phẩm 7 và 14 ngày; đồng thời lấy mẫu tôm sau khi được thử thách với WSSV 14 ngày (ngày thứ 28 của thí nghiệm). Mẫu được giữ lạnh ở -80°C chuẩn bị cho tách RNA tổng số hoặc được nghiền trên đá lạnh, phân giải trong đệm và tách chiết RNA tổng số theo hướng dẫn của bộ kit MPN07 - Magpure Tissue RNA mini kit (ANABIO R&D, Việt Nam).

Phản ứng chuyển hóa RT-PCR: phản ứng được thực hiện với 2 µg RNA tổng số và được dùng để tổng hợp sợi cDNA thứ nhất nhờ enzyme phiên mã ngược M-MLV-Reverse Transcriptase (Enzynomic, Korea). Để khuếch đại mRNA của gen *Rho* và *Ran*, phản ứng PCR cho sản phẩm tương ứng lần lượt khoảng 180 bp và 270 bp đã được thực hiện ở 95°C - 10 phút và 30 chu kỳ với (94°C - 30 phút; 52°C - 30 phút; 72°C - 30 phút), tiếp theo với 72°C - 5 phút. Cặp mỗi đặc hiệu gen *Rho* (dựa trên trình tự đã được công bố ở ngân hàng gen AY622688.1) là: Fw: 5'- GAA AAT ATT CCA GAA AAA TGG ACG-3'; Rv: 5'- TTT ATC TTC TCA GCC ATG TTA CGA-3'. Cặp mỗi đặc hiệu gen *Ran* (dựa trên trình tự JN596104.1) là: Fw: 5'- ACATGGGGCTCGAAGCCTTGAC-3'; Rv: 5'- TCCTTCACATCAACCTTGTT-3'. Để khuếch đại gen quản gia β -actin, phản ứng PCR cho sản phẩm khoảng 500 bp được thực hiện ở 94°C - 5 phút và 27 chu kỳ với (94°C - 30 phút; 64°C - 30 phút; 72°C - 45 phút), tiếp theo với 72°C - 5 phút. Cặp mỗi dùng cho β -actin [21] là: Fw: 5'- GAC TCG TAC GTC GGC GAC GAG G-3' và Rv: 5'- AGC AGC GGT CAT CTC CTG CTC-3'. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1,5%, được nhuộm với dịch

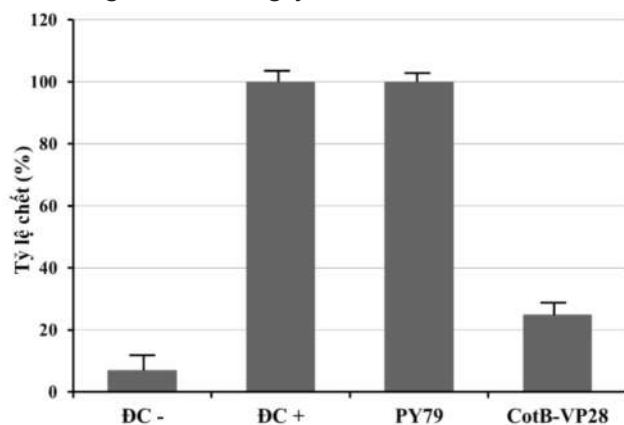
chứa ethidium bromide và đem soi dưới ánh sáng UV của hệ thống soi gel (Biorad, Mỹ).

Kết quả

Ảnh hưởng bảo hộ của chế phẩm PY79-CotB-VP28 lên khả năng chống lại WSSV ở tôm thẻ chân trắng

Sau 14 ngày thử thách với WSSV cho thấy, nhóm tôm ăn bào tử mang CotB-VP28 có tỷ lệ chết thấp (23%), chỉ cao hơn tỷ lệ chết tự nhiên ở nhóm (ĐC-) là nhóm không ăn chế phẩm và cũng không bị cảm nhiễm WSSV (7,4%) là 15,6%; trong khi nhóm ăn bào tử thể đại là PY79 và nhóm (ĐC+), là nhóm không ăn chế phẩm nhưng bị nhiễm WSSV thì tỷ lệ tôm chết sau 14 ngày tăng rất cao, tương ứng lần lượt là 100% và 99,2% (hình 1). Như vậy, tỷ lệ bảo hộ của mẫu tôm thẻ chân trắng được ăn chế phẩm bào tử mang kháng nguyên VP28 thu được là 75%.

Dựa trên kết quả bảo hộ này, chúng tôi cho rằng, chế phẩm mang kháng nguyên VP28 đã thực sự hỗ trợ hệ miễn dịch của tôm, giúp tôm chống lại sự xâm nhập gây chết của WSSV. Điều này là cơ sở cho việc sử dụng các mẫu tôm thẻ chân trắng của thí nghiệm để đánh giá biểu hiện các gen liên quan tới quá trình thực bào chống lại tác nhân gây bệnh ở tôm.

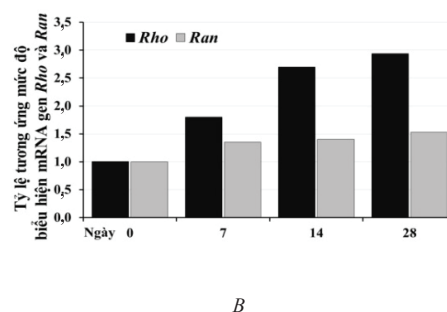
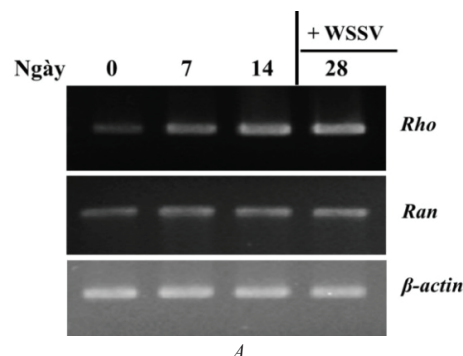


Hình 1: khả năng bảo hộ chống lại WSSV ở tôm thẻ chân trắng. Tỷ lệ chết được đánh giá vào thời điểm ngày thứ 14 sau cảm nhiễm tôm với WSSV. Kết quả đưa ra dựa trên số liệu của 3 lần thử nghiệm độc lập

Mức độ phiên mã gen Rho và Ran

Với mục đích tìm ra dấu ấn phân tử cho việc đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng sau khi được ăn thức ăn trộn bào tử *Bacillus* PY79 CotB-VP28, chúng tôi sử dụng kỹ thuật RT-PCR để nhân bản đặc hiệu gen liên quan tới cơ chế thực bào ở tôm. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi chọn gen *Rho* và *Ran* được cho là có liên quan tới quá trình

thực bào bảo vệ cơ thể tôm trước các tác nhân gây bệnh [23].



Hình 2: mức độ biểu hiện mRNA gen Rho và Ran

A) Mức độ biểu hiện mRNA của gen Rho và Ran sau khi tôm được ăn chế phẩm PY79-CotB-VP28. Tôm được ăn thức ăn trộn chế phẩm liên tục trong suốt quá trình thử nghiệm, 1-2 con tôm tại các thời điểm ngày thứ 0, 7, 14 trước khi nhiễm với WSSV và sau khi nhiễm WSSV 14 ngày tiếp theo (ngày thứ 28) được lấy và tách lấy RNA tổng số dùng cho phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen Rho và Ran. β -actin được dùng như gen nội chuẩn ở mỗi loại mẫu. (B) Tỷ lệ tương ứng mức độ biểu hiện mRNA của các gen Rho và Ran so sánh tại các thời điểm thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Image J

Sản phẩm phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen *Rho* và *Ran* (như đã mô tả ở phần phương pháp) được kiểm tra trên gel agarose chỉ ra sản phẩm là băng duy nhất có kích thước lần lượt khoảng 180 và 270 bp, đúng như kích thước dự đoán. Kết quả cho thấy, có sự tăng dần mức độ biểu hiện gen *Rho* theo thời gian tôm được ăn thức ăn có chứa bào tử PY79-CotB-VP28; tuy nhiên, chúng tôi quan sát không thấy có sự thay đổi rõ rệt về mức độ biểu hiện mRNA gen *Ran* (hình 2). Sau 7 ngày, hàm lượng mRNA gen *Rho* đã bắt đầu tăng và tăng rõ rệt từ ngày thứ 14 trở đi, tăng khoảng trên 2,7 lần so với mẫu tôm ngày 0 chưa ăn chế phẩm (hình 2). Sau khi tôm bị cảm nhiễm với WSSV 14 ngày (tức ngày thứ 28 của thí nghiệm), mức độ biểu hiện gen *Rho* cao hơn ở mẫu ngày 0 và ngày 7 lần lượt gần 3 và 1 lần (hình 2B).

Kết quả bước đầu này cho thấy, tôm thẻ chân trắng có khả năng chống lại được WSSV khi được ăn chế phẩm chứa VP28, đồng thời, những tôm thí nghiệm

này có mức biểu hiện mRNA gen *Rho* tăng lên so với nhóm không được ăn chế phẩm, chứng tỏ khả năng thực bào tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh ở tôm đã diễn ra mạnh mẽ.

Bàn luận

Khả năng chống lại WSSV ở tôm thẻ chân trắng do chế phẩm bào tử PY79-CotB-VP28 đã được công bố lần đầu trong công trình của Nguyen A.T và cộng sự, 2014 [17] với khả năng bảo hộ đạt xấp xỉ 50%. Khả năng bảo hộ của tôm chống lại WSSV có được do tôm được ăn thức ăn chứa bào tử CotB-VP28 ở mật độ 10^6 CFU/g thức ăn, thu được trong nghiên cứu này tương ứng là 75% (hình 1) cũng phù hợp với rất nhiều công trình công bố trước đó về tác dụng bảo hộ tôm, cá chống lại WSSV [18, 19]. Giá trị bảo hộ này cao hơn so với mức hiệu quả quy ước khi kiểm định hiệu quả vaccine dùng cho thủy sản của Ủy ban châu Âu (Relative percent protection score (RPP) > 60%).

Gen *Rho* và *Ran* đã được chứng minh là có biểu hiện tăng lên ở tôm khi bị nhiễm với WSSV [23]. Khi bị nhiễm WSSV, hàng rào miễn dịch tự nhiên với sự hoạt động mạnh mẽ của các enzyme tham gia vào quá trình thực bào. Tác dụng của chế phẩm được ghi nhận thông qua việc tăng khả năng thực bào ở tôm. Chúng tôi cho rằng, tôm có khả năng tăng sức bảo vệ chống lại sự xâm nhiễm của WSSV bằng cách tăng khả năng thực bào nhờ chế phẩm khi có sự tham gia của *Rho* và *Ran*. Tuy nhiên, kết quả cho thấy, chỉ có mức độ biểu hiện mRNA của gen *Rho* có sự tăng tuyến tính với thời gian tôm được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28 của WSSV (hình 2). Hơn nữa, ở ngày thứ 28 của thí nghiệm (tôm đã bị nhiễm với WSSV 14 ngày), mức độ biểu hiện mRNA gen *Rho* vẫn ở mức cao (khoảng gần 3 lần) so với thời điểm chưa được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28. Điều này có thể giải thích rằng, tôm vẫn duy trì khả năng thực bào mạnh mẽ ngay cả khi có mặt WSSV, chứng tỏ hàng rào miễn dịch của tôm đã được cải thiện bởi chế phẩm mang kháng nguyên VP28. Trong khi đó, nhóm tôm ăn thức ăn chứa bào tử chủng đại PY79 sau khi thử thách với virus đã bị nhiễm bệnh và chết gần hết. Không như dự đoán, chúng tôi không quan sát thấy có sự khác biệt mức biểu hiện mRNA gen *Ran* tại các thời điểm tôm đã được ăn chế phẩm mang kháng nguyên VP28 so với thời điểm chưa được ăn chế phẩm, cho thấy gen *Ran* có thể không phải đối tượng chính chịu tác động trong quá trình chống lại mầm bệnh ở tôm thẻ. Hiện tại thí nghiệm của chúng tôi mới thiết kế trên tôm thẻ chân

trắng, để đi đến kết luận cuối cùng về mức biểu hiện gen *Ran* khi tôm được ăn chế phẩm mang VP28, chúng tôi cần kiểm tra đáp ứng của gen này trong cùng điều kiện thí nghiệm trên một số loài tôm khác nữa, chẳng hạn như tôm sú.

Kết luận

Chúng tôi đã xác định được gen *Rho* (là một trong các gen liên quan đến cơ chế thực bào ở tôm) có thể được dùng làm chỉ thị chuẩn (marker) cho việc đánh giá tác dụng của chế phẩm probiotic mang kháng nguyên VP28 giúp tăng cường miễn dịch ở tôm chống lại WSSV bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả nghiên cứu này cũng khẳng định tác dụng bảo hộ của chế phẩm mang VP28 của nhóm nghiên cứu đề tài KC04.09-11/15 về khả năng chống lại WSSV.

Từ kết quả nghiên cứu bước đầu này, chúng tôi cho rằng, phương pháp RT-PCR nhân bản đặc hiệu gen *Rho* được dùng ở đây có thể sử dụng để đánh giá tác động của các chế phẩm lên hệ miễn dịch của tôm một cách hiệu quả. Điều này cũng mở ra tiềm năng khai thác mức độ biểu hiện các gen liên quan tới khả năng thực bào ở tôm trong việc đánh giá tác động của các chế phẩm probiotics hỗ trợ miễn dịch cho tôm nuôi nói chung tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Tập thể tác giả trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thông qua đề tài mã số TN.15.29.

Tài liệu tham khảo

- [1] W. Liu, F. Han, X. Zhang (2009), "Ran GTPase regulates hemocytic phagocytosis of shrimp by interaction with myosin", *Journal of proteome research*, **8**(3), pp.1198-1206.
- [2] P.H. Wang, T. Huang, X. Zhang, J.G. He (2014), "Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection", *Antiviral research*, **108**, pp.129-141.
- [3] C.B. Van de Braak, M.H. Botterblom, N. Taverne, W.B. Van Muiswinkel, J.H. Rombout, W.P. Van Der Knaap (2002), "The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected: *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp", *Fish & shellfish immunology*, **13**(4), pp.293-309.
- [4] P. Jiravanichpaisal, B.L. Lee, K. Soderhall (2006), "Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization", *Immunobiology*, **211**(4), pp.213-236.
- [5] H. Liu, K. Soderhall, P. Jiravanichpaisal (2010), "Antiviral immunity in crustaceans", *Fish & shellfish immunology*, **27**(2), pp.79-88.

- [6] A. Tassanakajon, P. Amparyup, K. Somboonwiwat, P. Supungul (2010), "Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp", *Mar Biotechnol (NY)*, **12**(5), pp.487-505.
- [7] J.S. Kim, B.A. Diebold, J.I. Kim, J.Y. Lee, J.B. Park (2004), "Rho is involved in superoxide formation during phagocytosis of opsonized zymosans", *The Journal of biological chemistry*, **279**(20), pp.21589-21597.
- [8] P. Kanchanaphum, C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumarnkul, T.W. Flegel (1998), "Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*", *Diseases of aquatic organisms*, **34**(1), pp.1-7.
- [9] H.C. Hsu, C.F. Lo, S.C. Lin, K.F. Liu, S.E. Peng, Y.S. Chang, L.L. Chen, W.J. Liu, G.H. Kou (1999), "Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders", *Diseases of aquatic organisms*, **39**(1), pp.13-19.
- [10] J.A. Cowley, C.M. Dimmock, K.M. Spann, P.J. Walker (2001), "Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns. Molecular evidence for the first invertebrate nidovirus", *Advances in experimental medicine and biology*, **494**, pp.43-48.
- [11] S. Iwanaga, B.L. Lee (2005), "Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals", *Journal of biochemistry and molecular biology*, **38**(2), pp.128-150.
- [12] C.A. Venegas, L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa, K. Murog (2000), "Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV)", *Diseases of aquatic organisms*, **42**(2), pp.83-89.
- [13] T.J. Hsieh, J.C. Wang, C.Y. Hu, C.T. Li, C.M. Kuo, S.L. Hsieh (2008), "Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge", *Fish & shellfish immunology*, **25**(5), pp.581-588.
- [14] C.F. Chang, M.S. Su, H.Y. Chen, I.C. Liao (2003), "Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus", *Fish & shellfish immunology*, **15**(4), pp.297-310.
- [15] Y. Takahashi, M. Kondo, T. Itami, T. Honda, H. Inagawa, T. Nishizawa, G.I. Soma, Y. Yokomizo (2000), "Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS)", *Fish & shellfish immunology*, **10**(6), pp.555-558.
- [16] H.H. Lee, T. Osaki, J.Y. Lee, M.J. Baek, R. Zhang, J.W. Park, S. Kawabata, K. Soderhall, B.L. Lee (2004), "Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3-beta-D-glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect", *Journal of biological chemistry*, **279**(5), pp.3218-3227.
- [17] A.T. Nguyen, C.K. Pham, H.T. Pham, H.L. Pham, A.H. Nguyen, L.T. Dang, H.A. Huynh, S.M. Cutting, T.N. Phan (2014), "Bacillus subtilis spores expressing the VP28 antigen: a potential oral treatment to protect *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome", *FEMS microbiology letters*, **358**(2), pp.202-208.
- [18] L.L. Fu, J.B. Shuai, Z.R. Xu, J.R. Li, W.F. Li (2010), "Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles", *Fish & shellfish immunology*, **28**(1), pp.49-55.
- [19] D. Ning, X. Leng, Q. Li, W. Xu (2011), "Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration", *Journal of applied microbiology*, **111**(6), pp.1327-1336.
- [20] G. Jiang, R. Yu, M. Zhou (2006), "Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection", *Nitric oxide: biology and chemistry/official journal of the Nitric Oxide Society*, **14**(3), pp.219-227.
- [21] C. Ongravarrasopone, M. Chanasakulniyom, K. Sritunialucksana, S. Panyim (2008), "Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp", *Marine Biotechnology*, **10**(4), pp.374-381.
- [22] Phạm Kiên Cường, Bùi Thị Ngọc Ánh, Trần Thị Thanh Quỳnh, Nguyễn Thị Vân Anh, Bùi Thị Việt Hà, Phạm Thị Lương Hằng, Nguyễn Thị Hồng Loan, Nguyễn Hòa Anh, Phan Tuấn Nghĩa (2014), "Nhân dòng và biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên VP28 của virus đốm trắng trên lớp áo ngoài của bào tử *B. subtilis*", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **12**(2), tr.247-253.
- [23] D. Pan, N. He, Z. Yang, H. Liu, X. Xu (2005), "Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization", *Developmental and comparative immunology*, **29**(2), pp.103-112.