



Original Article

Creation of Standard DNA for Detection and Quantification of White Spot Syndrome Virus in Shrimps by Real-time PCR (qPCR)

Tran Viet Cuong, Phan Tuan Nghia, Nguyen Thi Hong Loan*

VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Received 04 October 2022

Revised 26 October 2022; Accepted 28 November 2022

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is a double stranded DNA virus that causes WSS diseases for many crustaceans including the *Penaeidae* family shrimp. In this study, standard DNA for detection and quantification of WSSV by real-time polymerase chain reaction (qPCR) method was created. A specific gene fragment of 126 bp from WSSV genome was successfully amplified by PCR and cloned into pGEM-T vector. qPCR calibration curves using the created recombinant pGEM vector harboring 126 bp gene fragment as the standard DNA at concentrations of 3×10^2 to 3×10^8 copies/mL showed to have good linear regression with an efficiency of 99.1%, correlation coefficient R^2 of 0.998 and the slope of -3.344. The recombinant vector was also used as a positive standard for detection and quantification of WSSV in a number of WSSV-infected shrimp samples and the values ranging from 3.69×10^3 copies/mL to 1.25×10^8 copies/mL WSSV were found in the collected samples.

Keywords: Detection, quantification WSSV, *positive standard*, real-time PCR.

* Corresponding author.

E-mail address: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5508>

Tạo DNA chuẩn cho phân tích virus gây bệnh đốm trắng trên tôm bằng kỹ thuật real-time PCR (qPCR)

Trần Việt Cường, Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Hồng Loan*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 04 tháng 10 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 26 tháng 10 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2022

Tóm tắt: Virus gây hội chứng đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV) là loại virus DNA sợi kép gây bệnh cho nhiều động vật giáp xác trong đó có họ tôm he (*Penaeidae*). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng mẫu DNA chuẩn phục vụ việc phát hiện và định lượng WSSV bằng phương pháp real-time PCR (qPCR). Đoạn gen đặc hiệu 126 bp của WSSV đã được nhân bản bằng PCR và nhân dòng thành công vào vector pGEM-T. Đường chuẩn với khuôn là vector pGEM mang đoạn gen 126 bp đã được xây dựng với nồng độ 3×10^2 đến 3×10^8 bản sao/mL bằng qPCR có độ hồi quy tuyến tính tốt với hiệu quả PCR là 99,1%, hệ số tương quan R^2 có giá trị 0,998 và độ dốc của đường biểu diễn chuẩn là -3,344. Mẫu chuẩn tạo ra cũng đã được sử dụng để phát hiện và định lượng WSSV ở một số mẫu tôm sú nhiễm virus và kết quả là đã phát hiện được WSSV trong khoảng $3,69 \times 10^3$ - $1,25 \times 10^8$ bản sao/mL ở các mẫu thu được.

Từ khóa: Định lượng, phát hiện WSSV, mẫu chuẩn, real-time PCR.

1. Mở đầu

Virus hội chứng đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV) là nguyên nhân gây bệnh đốm trắng, một trong những bệnh do virus gây chết nhiều nhất ở tôm [1]. Bệnh có khả năng gây chết lên đến 100% trong vòng 10 ngày sau khi tôm xuất hiện các dấu hiệu nhiễm WSSV, gây tổn thất lớn cho nền công nghiệp nuôi trồng thủy sản [2]. Tại Việt Nam, WSSV lần đầu tiên gây ra tình trạng tôm nuôi chết hàng loạt ở Bà Rịa - Vũng Tàu (1993), đặc biệt, năm 2015 bệnh đốm trắng đã xảy ra trên diện rộng, trải dài từ Quảng Ninh đến Cà Mau [3]. Theo thống kê của Cục Thú y năm 2020, tổng diện tích tôm bị nhiễm bệnh chiếm 2,18% diện tích thả nuôi và đến nay tình trạng tôm chết do WSSV vẫn xảy ra và tiếp diễn ở các vùng nuôi. Cách duy nhất để tránh nguy cơ lây lan bệnh đốm trắng ở tôm là nhanh chóng phát hiện, xác

định tôm nhiễm WSSV và cô lập nguồn bệnh. Các phương pháp phát hiện WSSV phổ biến hiện nay là các kỹ thuật PCR (*in situ* PCR, real-time PCR, nested PCR, loop-mediated isothermal amplification - LAMP) dựa trên DNA của virus hoặc các phương pháp miễn dịch sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên [4-7]. Ở trong nước, Trần Thị Tuyết Hoa và cộng sự [8] đã thiết lập quy trình nested-PCR phát hiện WSSV trên một số giáp xác; Phạm Thế Yên và cộng sự [9] đã tạo que thử phát hiện nhanh WSSV ở tôm nuôi.

Real-time PCR (qPCR) có ưu điểm cho phép phát hiện và định lượng chính xác tác nhân gây bệnh. Một số nghiên cứu đã thiết lập thành công qPCR cho phát hiện, định lượng WSSV ở một số sinh vật nhiễm bệnh [6-7, 10-11]. Trong đó, mẫu DNA chuẩn (mẫu DNA chứa đoạn gen đích có độ sạch cao và nồng độ xác định) là cần thiết để đảm bảo định lượng được chính xác virus bằng qPCR. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tạo mẫu chuẩn DNA để phục vụ việc định lượng chính xác WSSV trong các mẫu tôm nhiễm virus bằng phương pháp qPCR.

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5508>

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Các mẫu tôm sú nhiễm WSSV được thu từ Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 2 và mẫu tôm chết do nhiễm WSSV trong quá trình nuôi tôm ở phòng thí nghiệm. Các mẫu tôm chết do nhiễm WSSV đều được bảo quản ở từ -80 °C đến khi sử dụng.

Các hóa chất: nTaq-HOT, Master mix TOPreal qPCR2X PreMIX (SYBR Green with low ROX, UDG Plus) của Enzymomics, Viral gene-spin Viral DNA/RNA extraction kit của INtRON, QIAprep Spin Miniprep kit của Qiagen, pGEM-T easy của Promega. Các hóa chất còn lại đều được mua từ các hãng Merk, Sigma, Thermo Scientific có đạt độ tinh khiết phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dịch chiết tôm nhiễm WSSV: phần mô nhiễm bệnh (đầu và chân bơi) của tôm nhiễm WSSV được nghiền đến đồng nhất trong đệm Tris-HCl pH 7,5 10 mM có NaCl 10 mM (đệm A) theo tỷ lệ 1 g mẫu: 1 mL đệm. Dịch nghiền được ly tâm 3500 vòng/phút, 4 °C, 15 phút để thu dịch chiết có WSSV và bảo quản ở nhiệt độ -80 °C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tinh sạch DNA của WSSV: DNA trong dịch chiết của tôm nhiễm WSSV được tách chiết bằng Viral gene-spin Viral DNA/RNA extraction kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA được định lượng bằng máy quang phổ Nanodrop trên cơ sở đo độ hấp thụ ánh sáng tại bước sóng 260 nm và được bảo quản tại -20 °C đến khi sử dụng.

Nhân bản, nhân dòng đoạn gen đặc hiệu cho WSSV: Đoạn gen bảo thủ, đặc hiệu cho WSSV có kích thước 126 bp (tại vị trí nucleotide 281.344 – 281.469) trên hệ gen WSSV (mã số KU216744.2) được nhân bản bằng PCR sử dụng cặp mồi WSSV-Fw: 5'-ACTAGGCTCTGACGACCTCT-3', WSSV-Rv: 5'-ACGGCATTCTTCATGGCTTC-3'. Thành phần phản ứng PCR nhân bản đoạn gen 126 bp bao gồm: 1 µL DNA khuôn (25 ng/µL),

1 µL WSSV-Fw/Rv 10 pmol, 2,0 µL dNTPs 2 mM, 2,0 µL đệm nTaq-HOT 10X, 0,2 µL nTaq-HOT (5 U/µL), bổ sung H₂O cất loại ion khử trùng (ddH₂O) đến 20 µL. Các thành phần phản ứng qPCR được trộn đều và chu trình phản ứng được thực hiện ở 95 °C trong 10 phút để biến tính bước đầu DNA, tiếp theo là 30 chu kỳ gồm 3 bước phản ứng: i) Biến tính DNA ở 95 °C trong 30 giây; ii) Gắn mồi ở nhiệt độ 59 °C trong 20 giây; và iii) Kéo dài ở 72 °C trong 20 giây. Sản phẩm PCR sau đó được nhân dòng trực tiếp vào vector pGEM-T theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tinh sạch plasmid và chuẩn bị mẫu chuẩn cho định lượng WSSV bằng qPCR: plasmid pGEM tái tổ hợp mang đoạn gen 126 bp (pGEM-WSSV) được tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất và xác định nồng độ bằng quang phổ kế tại bước sóng 260 nm. Từ nồng độ plasmid, số bản sao của DNA tương ứng với số thể WSSV có mặt được tính ra theo công thức:

$$\text{Số bản sao DNA đích} = \frac{\text{ng} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{chiều dài} \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó: ng (khối lượng tính bằng ng của DNA plasmid chuẩn trong 1 µL); chiều dài là kích thước của plasmid (tính bằng bp); $6,022 \times 10^{23}$ là số Avogadro; khối lượng trung bình của mỗi cặp bazơ nitơ (bp) là 650 Dalton hoặc là 650 g/mol (khối lượng phân tử mol).

Trên cơ sở tính toán được số bản sao, plasmid pGEM-WSSV được pha loãng cách nhau 10 lần với các nồng độ 3×10^2 - 3×10^8 bản sao/mL và được dùng làm khuôn cho phản ứng qPCR để xây dựng đường chuẩn cho định lượng WSSV.

Phát hiện và định lượng WSSV bằng qPCR: thành phần phản ứng qPCR nhân bản đoạn gen 126 bp bao gồm: 10 µL Master mix TOPreal qPCR 2X PreMIX, 1 µL WSSV-Fw/Rv 10 pmol, 1 µL DNA (25 ng/µL), bổ sung H₂O cất loại ion khử trùng (ddH₂O) đến 20 µL. Các thành phần phản ứng qPCR được trộn đều và thực hiện chu trình phản ứng gồm các bước: 50 °C trong 4 phút để Uracil-DNA glycosylase (UDG) hoạt động (UDG có tác dụng cắt các gốc UMP trong DNA nhân bản trước đó, vì vậy

các đoạn DNA nhân bản của các phản ứng trước đó không thể làm khuôn cho phản ứng tiếp theo), 95 °C trong 10 phút để biến tính bước đầu DNA. Tiếp theo, DNA đích được khuếch đại trong 40 chu kỳ gồm 3 bước phản ứng tương tự như bước nhân bản đoạn gen 126 bp bằng PCR. Sau đó, chương trình melting curve được thực hiện để xác định nhiệt độ tách chuỗi của sản phẩm khuếch đại. Nhiệt độ phản ứng sẽ được tăng dần từ 72-95 °C theo từng 0,5°C/lần, máy sẽ đọc tín hiệu 47 lần trong bước phân tích này. Các kết quả của qPCR được phân tích bằng phần mềm IQ5 Optical System.

Sản phẩm phản ứng qPCR được kiểm tra bằng điện di gel polyacrylamide 15% và chụp ảnh bằng hệ thống Geldoc.

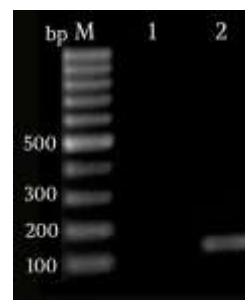
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nhân bản và nhân dòng đoạn gen đặc hiệu của WSSV

Trong nghiên cứu này, đoạn gen 126 bp đặc hiệu cho WSSV được nhân bản bằng PCR. Kết quả điện di Hình 1 cho thấy sự xuất hiện một băng DNA với kích thước khoảng 126 bp như tính toán lý thuyết (giếng 2). Trong khi đó, mẫu đối chứng âm không có DNA không xuất hiện băng DNA nào (giếng 1). Như vậy, đoạn gen 126 bp đặc hiệu cho WSSV đã được nhân bản thành công. Hafer và cộng sự [7] đã thiết kế cặp mồi nhân bản đặc hiệu đoạn gen 71 bp (tại vị trí nucleotide 281.429-281.499) trong khung đọc ORF191 của WSSV để phát hiện sự có mặt của virus bằng PCR. Tương tự, Sun và cộng sự [12] cũng thiết kế cặp mồi nhân bản đoạn gen tại vị trí nucleotide 282.668-282.740 trên hệ gen của WSSV để phát hiện sự có mặt của virus. Trên cơ sở các công bố, nghiên cứu của chúng tôi đã thiết kế cặp mồi cho nhân bản đoạn gen đặc hiệu của WSSV tại vị trí nucleotide 281.344-281.469, đoạn gen 126 bp phù hợp cho phản ứng qPCR cũng như thuận tiện cho nhân dòng tạo mẫu chuẩn.

Sản phẩm PCR 126 bp sau đó được gắn vào vector nhân dòng pGEM-T và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 α . Tế bào sau đó được nuôi cấy trên môi trường thạch LB đặc

có ampicillin 100 μ g/mL, isoprortopyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) và Xgal. Bốn khuẩn lạc trắng và một khuẩn lạc xanh trên đĩa thạch được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra sự có mặt của vector tái tổ hợp bằng PCR sử dụng cặp mồi pUC19-Fw/Rv đặc hiệu cho vector pGEM-T. Kết quả Hình 2 A cho thấy sản phẩm PCR với khuôn là các khuẩn lạc trắng đều cho băng DNA kích thước khoảng 445 bp, bao gồm đoạn gen 126 bp của WSSV và 319 bp trên vector pGEM-T (giếng 2-5).



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen đặc hiệu của WSSV với cặp mồi WSSV-Fw/Rv.

M. Thang chuẩn DNA 100 bp, 1. đối chứng âm không chứa DNA, 2. DNA của WSSV.

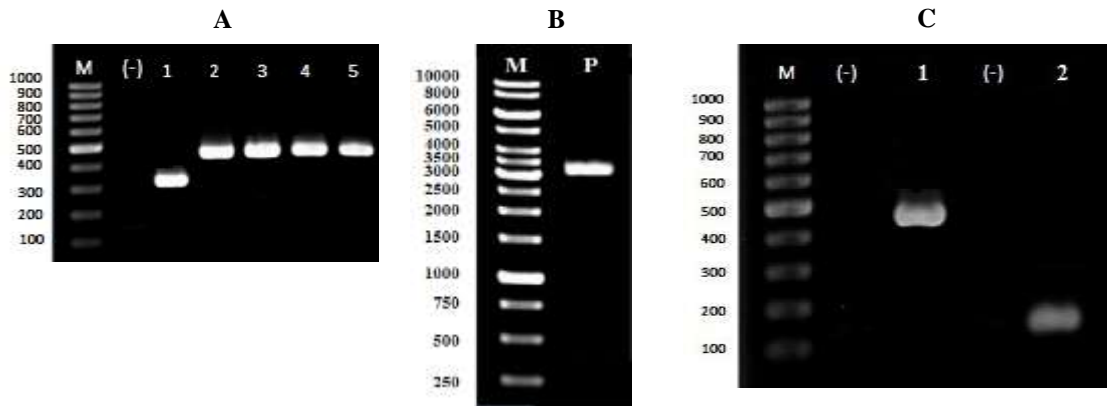
Trong khi đó, sản phẩm PCR với khuôn là khuẩn lạc xanh cho một băng DNA kích thước khoảng 319 bp (giếng 1). Bước đầu có thể kết luận rằng các khuẩn lạc trắng có chứa vector tái tổ hợp mang đoạn gen kích thước 126 bp, ký hiệu pGEM-WSSV. Plasmid pGEM-WSSV đã được tinh sạch từ khuẩn lạc trắng số 1 và cho băng DNA trên điện di đồ (Hình 2 B, giếng P). Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng plasmid pGEM-WSSV làm khuôn với 2 cặp mồi pUC19-Fw/Rv và WSSV-Fw/Rv đã cho băng DNA kích thước tương ứng khoảng 445 bp và 126 bp như tính toán lý thuyết (Hình 2 C, giếng 1 và 2). Như vậy, đoạn gen 126 bp đặc hiệu cho WSSV đã được nhân dòng vào vector pGEM.

3.2. Xây dựng đường chuẩn để định lượng WSSV bằng qPCR

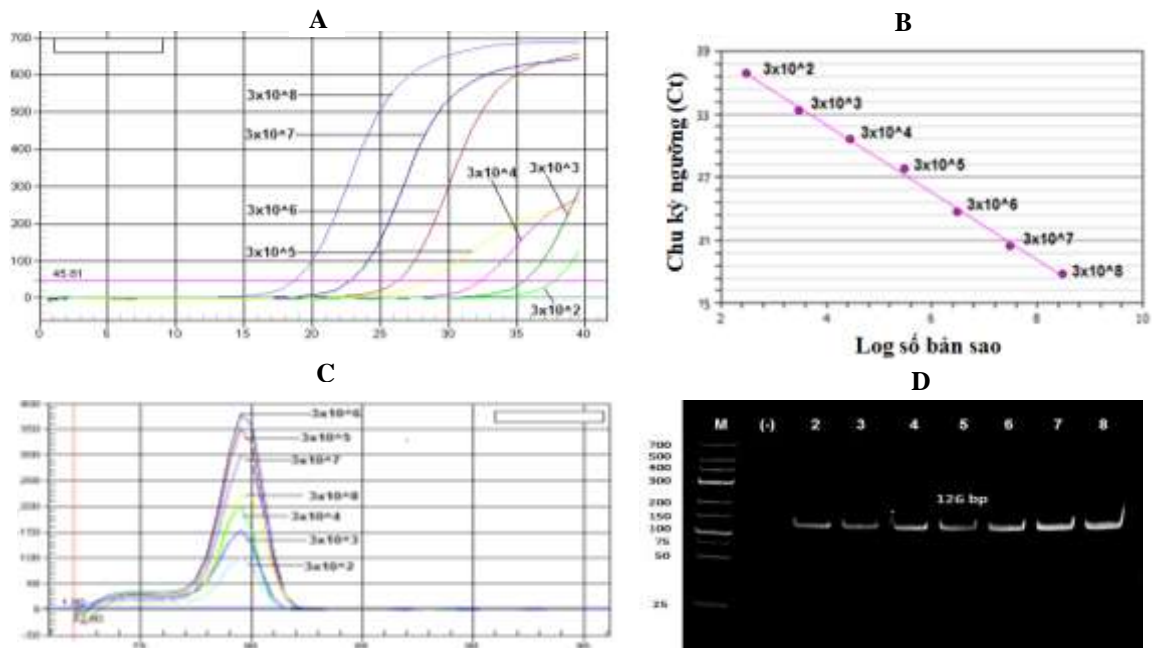
Plasmid tái tổ hợp pGEM-WSSV tinh sạch có nồng độ 57,37 ng/ μ L tương ứng là $1,69 \times 10^{10}$ bản sao/ μ L hay $1,69 \times 10^{13}$ bản sao/mL được pha

loãng bằng ddH₂O để có các nồng độ 3×10^2 - 3×10^8 bản sao/mL (dung dịch DNA chuẩn). Các dung dịch DNA này được dùng để xây dựng đường chuẩn cho qPCR định lượng WSSV. Kết quả qPCR với khuôn là pGEM-WSSV và cặp mồi WSSV-Fw/Rv (Hình 3) cho thấy, các mẫu

DNA chuẩn có nồng độ plasmid từ 3×10^2 đến 3×10^8 bản sao/mL đều cho đường cong khuếch đại với giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) tăng dần từ 18,27 đến 37,05 (cách nhau khoảng 3,3 chu kỳ, tương ứng với nồng độ cách nhau 10 lần) (Hình 3 A).



Hình 2. Hình ảnh điện di các sản phẩm DNA trên gel agarose: thang chuẩn DNA 100 bp (M), đối chứng âm không chứa DNA (-). A) Sản phẩm PCR nhận bản đoạn gen đặc hiệu của WSSV sử dụng cặp mồi pUC19-Fw/Rv với khuôn là các khuẩn lạc xanh (1), trắng (2-5). B) Plasmid tinh sạch (P). C) Sản phẩm PCR với khuôn là plasmid tinh sạch sử dụng cặp mồi pUC19-Fw/Rv (1) và WSSV-Fw/Rv (2).



Hình 3. qPCR của các mẫu pGEM-WSSV với các nồng độ 3×10^2 - 3×10^8 bản sao/mL. A) đường cong khuếch đại của qPCR. B) Đường chuẩn của phản ứng qPCR. C) Nhiệt độ tách chuỗi của các phản ứng qPCR. D) Điện di sản phẩm qPCR trên gel polyacrylamide 15%; M: thang điện di trên gel, (-): đối chứng âm, 2-8: sản phẩm qPCR với khuôn là plasmid pGEM-WSSV với các nồng độ tương ứng 3×10^2 - 3×10^8 bản sao/mL.

Trên cơ sở đường cong khuếch đại của các mẫu, đường chuẩn (Hình 3 B) đã thể hiện có độ hồi quy tuyến tính tốt với giá trị hiệu quả PCR (E) là 99,1% (nằm trong khoảng tin cậy 90-105%), hệ số tương quan R^2 là 0,998 ($>0,99$) và độ dốc của đường biểu diễn chuẩn (slope) là -3,344 (xấp xỉ giá trị -3,32). Sản phẩm của qPCR có độ đặc hiệu cao đều cho duy nhất một đỉnh nhiệt độ tách chuỗi có giá trị là 79,5 °C với chiều cao của các đỉnh này dao động từ 100 đến 377,58 (Hình 3 C).

Kết quả điện di sản phẩm qPCR trên gel polyacrylamide 15% (Hình 3 D) đều cho duy nhất một băng DNA có kích thước khoảng 126 bp và độ sáng của băng tăng dần theo nồng độ các mẫu chuẩn. Các kết quả trên đây cho phép khẳng định plasmid pGEM-WSSV đạt yêu cầu làm DNA chuẩn để định lượng WSSV.

Tương tự nghiên cứu của chúng tôi, Menazo-cano và cộng sự [6] đã thiết lập đường chuẩn với mẫu chuẩn là plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen 141 bp mã hóa cho protein vỏ VP28 của WSSV trong dải nồng độ $1,24 \times 10^2$ - $1,24 \times 10^8$ bản sao/mL để phát hiện WSSV bằng qPCR.

3.3. Định lượng số bản sao của WSSV từ một số mẫu tôm nhiễm WSSV bằng qPCR

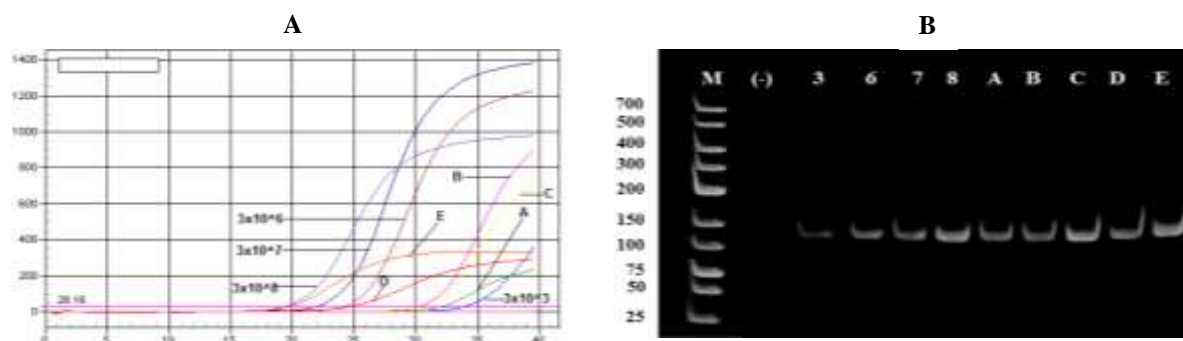
Trên cơ sở mẫu DNA chuẩn đã tạo được, chúng tôi đã tiến hành định lượng số bản sao của WSSV trong các mẫu nghiên cứu bằng qPCR đã thiết lập.

Năm mẫu tôm nhiễm WSSV bao gồm 02 mẫu (ký hiệu mẫu A và B) từ phòng Protein tái tổ hợp (thuộc Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ Enzym và Protein); 01 mẫu thu nhận từ Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I (ký hiệu C) và 02 mẫu từ Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 2 (ký hiệu D và E) đã được thu dịch chiết và tách DNA. Các mẫu DNA tinh sạch có nồng độ 40-195 ng/ μ L với giá trị A_{260}/A_{280} thu được nằm trong khoảng 1,84-1,9 đạt yêu cầu cho các phân tích tiếp theo.

Kết quả qPCR được thể hiện ở Hình 4 cho thấy các mẫu qPCR với khuôn là mẫu chuẩn

pGEM-WSSV (nồng độ 3×10^3 - 3×10^8 bản sao/mL) và các mẫu DNA tinh sạch từ các mẫu tôm nhiễm WSSV đều có đường cong khuếch đại (Hình 4 A). Trong khi đó, đối chứng âm (không chứa DNA) không xuất hiện giá trị chu kỳ ngưỡng (đường biểu diễn khuếch đại không cắt đường nền). Hình ảnh điện di sản phẩm qPCR trên gel polyacrylamide Hình 4 B cũng cho kết quả tương tự. Các mẫu (ngoại trừ đối chứng âm) đều cho một băng DNA đặc hiệu khoảng 126 bp với mật độ băng đậm khác nhau phụ thuộc vào số bản sao DNA của WSSV. Cụ thể, các mẫu chuẩn có nồng độ cách nhau 10 lần cho chu kỳ ngưỡng hơn kém nhau 3 đến 4 chu kỳ. Năm mẫu DNA tinh sạch từ tôm nhiễm WSSV (ký hiệu từ A đến E) đều có đường khuếch đại rõ nét, với các giá trị chu kỳ ngưỡng tương ứng là 34,36; 32,28; 33,42; 28,15; 19,98 và số bản WSSV tương ứng là $3,69 \times 10^3$ bản sao/mL; $2,27 \times 10^4$ bản sao/mL; $8,78 \times 10^3$ bản sao/mL; $3,15 \times 10^5$ bản sao/mL và $1,25 \times 10^8$ bản sao/mL. Trong đó mẫu E (từ Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II đợt 2) có nồng độ virus lớn nhất. Như vậy, mẫu chuẩn plasmid tái tổ hợp pGEM-WSSV và các điều kiện qPCR thiết lập đã cho phép phát hiện và định lượng chính xác sự có mặt của WSSV trong các mẫu tôm thu được.

Các phương pháp phát hiện WSSV dựa trên kỹ thuật PCR thường có giới hạn phát hiện từ vài trăm bản sao DNA/mL trong thời gian từ 4-12 giờ. Tương tự, các phương pháp dot blots, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sử dụng các phản ứng kháng nguyên-kháng thể để phát hiện protein vỏ của WSSV thường có giới hạn phát hiện đến 1000 bản sao DNA (que thử) và 120 ng/mL (ELISA) [2]. Zhu và cộng sự [5] đã thiết lập đường chuẩn với dải nồng độ 10^3 - 10^9 bản sao/mL để định lượng WSSV bằng phương pháp Taqman-qPCR, và giới hạn thấp nhất mà tác giả phát hiện được là $1,365 \times 10^4$ bản sao/mL, giới hạn này là cao hơn giới hạn 3×10^3 bản sao/mL trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi.



Hình 4. qPCR định lượng số bản sao của các mẫu tôm nhiễm WSSV. A) đường cong khuếch đại của qPCR. B) Điện di sản phẩm qPCR trên gel polyacrylamide 15%; thang điện di trên gel (M), đối chứng âm (-), qPCR với khuôn là plasmid pGEM-WSSV với các nồng độ tương ứng 3×10^3 - 3×10^8 bản sao/mL (3-8) và DNA tách từ các mẫu tôm nhiễm WSSV (A-E).

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, mẫu DNA chuẩn mang đoạn gen đặc hiệu của WSSV dưới dạng plasmid tái tổ hợp pGEM-WSSV đã được tạo ra và được sử dụng cho việc phát hiện và định lượng chính xác WSSV trong các mẫu tôm nhiễm WSSV.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia, mã số NAFOSTED.106.02.2018.07.

Tài liệu tham khảo

- [1] C. F. Lo, C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, et al., White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV) Detected in Cultured and Captured Shrimp, Crabs and other Arthropods, *Diseased of Aquatic Organisms*, Vol. 27, 1996, pp. 215-225, <https://doi.org/10.3354/dao027215>.
- [2] K. Takemura, J. Satoh, J. Boonyakida, S. Park, A. D. Chowdhury, E. Y. Park, Electrochemical Detection of White Spot Syndrome Virus with a Silicone Rubber Disposable Electrode Composed of Graphene Quantum Dots and Gold Nanoparticle-Embedded Polyaniline Nanowires, *Vol. 18, No. 152*, 2009, <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00712-4>.
- [3] T. M. H. Truong, T. V. Pham, T. B. Phan, T. M. L. Huynh, T. V. Phan, A Study on White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection on Crayfish (*Macrobrachium nipponense*) and Possibility of WSSV Transmission to White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, Vol. 19, No. 8, 2017, pp. 33-38 (in Vietnamese).
- [4] L. M. Nunan, D. V. Lightner, Optimized PCR Assay for Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV), *Journal of Virological Methods*, Vol. 171, 2011, pp. 18-21.
- [5] F. Zhu, H. Quan, A New Method for Quantifying White Spot Syndrome Virus: Experimental Challenge Dose Using TaqMan Real-time PCR Assay, *Journal of Virological Methods*, Vol. 188, 2012, pp. 121-124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.026>.
- [6] F. M. Cano, A. S. Paz, Development and Validation of a Quantitative Real-time Polymerase Chain Assay for Universal Detection of the White Spot Syndrome Virus in Marine Crustaceans, *Virology Journal*, Vol. 10, No. 186, 2013, <http://www.virologyj.com/content/10/1/186>.
- [7] Y. M. Hafez, N. Y. Moustafa, A. F. Magouz, N. F. A. Maria, Isolation of White Spot Syndrome Virus (WSSV) Egyptian Shrimp Using Conventional PCR and Real time PCR (qPCR) Techniques, *Slovenian Veterinary Research*, Vol. 56, No. 22, 2019, pp. 457-64, <https://doi.org/10.26873/SVR-783-2019>.
- [8] T. T. H. Tran, A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Decapod Genes

- Serving as Internal Control in Various Infected Hosts, Can Tho University of Science, Vol. 17a, 2011, pp. 1-8 (in Vietnamese).
- [9] T. Y. Hoang, T. N. Nguyen, T. H. Pham, T. H. Nguyen, M. T. Tran, et al., Detection of White Spot Syndrome Virus in Shrimp by Using a Rapid Test, Vietnam Journal of Biotechnology, Vol. 10, No. 1, 2012, pp. 145-150 (in Vietnamese).
- [10] W. Wu, L. Wang, X. Zhangb, Identification of White Spot Syndrome Virus (WSSV) Envelope Proteins Involved in Shrimp Infection, Virology, Vol. 332, 2005, pp. 578-583, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.011>.
- [11] P. H. Choua, Y. C. Lina, P. H. Tenga, C. L. Chenb, P. Y. Leec, Real-time Target-specific Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification for White Spot Syndrome Virus Using Fluorescence Energy Transfer-based Probes, Journal of Virological Methods, Vol. 173, 2011, pp. 67-74, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.009>.
- [12] B. Sun, Z. Wang, F. Zhu, The Crustin-like Peptide Plays Opposite Role in Shrimp Immune Response to *Vibrio alginolyticus* and White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection, Fish & Shellfish Immunology, Vol. 66, 2017, pp. 487-496, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.055>.