

# MÔ TẢ KỸ THUẬT PCR (Polymerase Chain Reaction) TRONG CHUẨN ĐOÁN BỆNH VIRUS ĐÓM TRẮNG TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*, Boone 1931) Ở GIAI ĐOẠN GIỒNG

TECHNICAL DESCRIPTION PCR (Polymerase Chain Reaction) IN DIAGNOSTIC VIRUS WHITE SPOTS ON THE WHITE SHRIMP (*Penaeus vannamei*, Boone 1931) IN THE EARLY STAGES VARIETY

Nguyễn Văn Công\*, Pattarawan Chanakul  
Phòng Sau Đại học – Trường Đại học Vinh  
Email: [htc48ts.dhv@gmail.com](mailto:htc48ts.dhv@gmail.com)

## ABSTRACT

In this paper, an effective PCR technique was described to diagnose the white spot syndrome virus in white Shrimp fingerlings (*Penaeus vannamei*), (Boone 1931). The results also provide some new findings to supplement some previously published results to improve the accuracy of PCR technique to detect WSSV in Shrimp.

**Keywords:** PCR (Polymerase Chain Reaction), *Penaeus vannamei*, specimens.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm Thẻ Chân Trắng là loài tôm hiện đang được nuôi nhiều trên diện tích rộng và mang lại ngoại tệ tương đối lớn cho ngành Thủy sản Việt nam. Tuy nhiên, loài tôm này dễ cảm nhiễm với bệnh virus đốm trắng với cường độ cao. Vi rút gây bệnh đốm trắng được xem là một trong những tác nhân gây chết tôm hàng loạt ở nhiều mô hình nuôi tôm trên khắp thế giới. Sự cảm nhiễm của loài vi rút này trên nhiều loài vật chủ/vật mang mầm bệnh khác nhau (tôm biển, tôm nước ngọt, cua, tôm tép hoang dã) đã được chứng minh và công bố. WSSV tấn công nhiều cơ quan khác nhau trên cơ thể vật chủ và sở hữu cả hai phương thức lây lan ngang và dọc.



**Hình 1.** Loài Tôm Thẻ Chân Trắng (*Penaeus vannamei*, Boone 1931)

Cho đến hiện nay, các phương thức phòng bệnh hiện đang được ứng dụng vẫn chưa mang lại hiệu quả cao. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu mô tả thêm về kỹ thuật PCR trong chuẩn đoán bệnh virus đốm trắng trên Tôm Thẻ Chân Trắng giai đoạn con giống sản xuất tại Công ty Cổ Phần Chăn Nuôi C.P Việt Nam để qua đó có thể hiểu rõ về phương thức lây nhiễm của loài vi rút này và đề xuất phương thức quản lý bệnh hiệu quả hơn. PCR được sử dụng trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau, như phát hiện các bệnh di truyền, nhận dạng, chuẩn đoán những bệnh nhiễm trùng, tách dòng gen và xác định huyết thống.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

#### Đối tượng nghiên cứu



Loài Tôm Thẻ Chân Trắng (*Penaeus vannamei*, Boone 1931) ở các giai đoạn Nauplius và Postlarvae được ương tại Trại sản xuất giống thuộc Công ty Cổ Phần Chăn Nuôi C.P Việt nam – Chi nhánh Bình định 3.

**Hình 2.** Tôm Thẻ Chân Trắng giai đoạn thu mẫu nghiên cứu

### ***Vật liệu nghiên cứu***

Mẫu Nauplius và mẫu Postlarvae chưa nhiễm bệnh lý.

### **Địa điểm và thời gian nghiên cứu**

Các nghiên cứu được tiến hành thực hiện tại Phòng PCR thuộc Công ty Cổ Phần Chăn Nuôi C.P Việt nam – Chi nhánh Bình định 3, thôn Xuân Thạnh xã Mỹ An huyện Phù Mỹ tỉnh Bình định. Thời gian nghiên cứu tiến hành từ ngày 20/1/2012 đến ngày 20/10/2012.

### **Phương pháp nghiên cứu**

#### ***Phương pháp thu mẫu***

*Đối với mẫu Nauplius:* Chuẩn bị dụng cụ gồm que mũi nhọn, Microcentrifuge 1.5ml có chứa 800 $\mu$ l còn 96<sup>0</sup>, vợt cỡ 54T và găng tay y tế. Phương pháp thu mẫu Nauplius là dùng vợt vớt Nauplius quanh thùng ở độ sâu 10 – 15 cm sau đó dùng que lấy khoảng 500 $\mu$ l Nauplius cho vào ống nghiệm chứa cồn.

*Đối với mẫu Postlarvae:* Chuẩn bị dụng cụ gồm vợt cỡ 12T, chậu nhựa 2 – 2,5 lít, túi đóng tôm, dây thun. Phương pháp thu mẫu Postlarvae là dùng vợt lấy ở độ sâu 10 – 20 cm, ở 4 điểm trong bể, cần thực hiện khuấy nước để tách lấy những con yếu (600 – 800 con), sau đó cho vào túi đóng tôm và thêm 2 lít nước, thắt miệng túi và không bơm ôxy, cuối cùng ngâm thiết bị dùng chung vào soludine 50% ít nhất một phút và giữ mẫu khoảng 24 giờ.

#### ***Phương pháp nghiên cứu***

Phát triển, bổ sung kỹ thuật PCR sử dụng trong chuẩn đoán bệnh WSSV trên Tôm Thẻ Chân Trắng dựa trên kỹ thuật PCR đã công bố.

#### **Phương pháp xử lý số liệu**

Các số liệu thu thập được xử lý trên máy chạy PCR và đọc kết quả trên máy tính. Toàn bộ số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel và phần mềm SPSS 16.0.

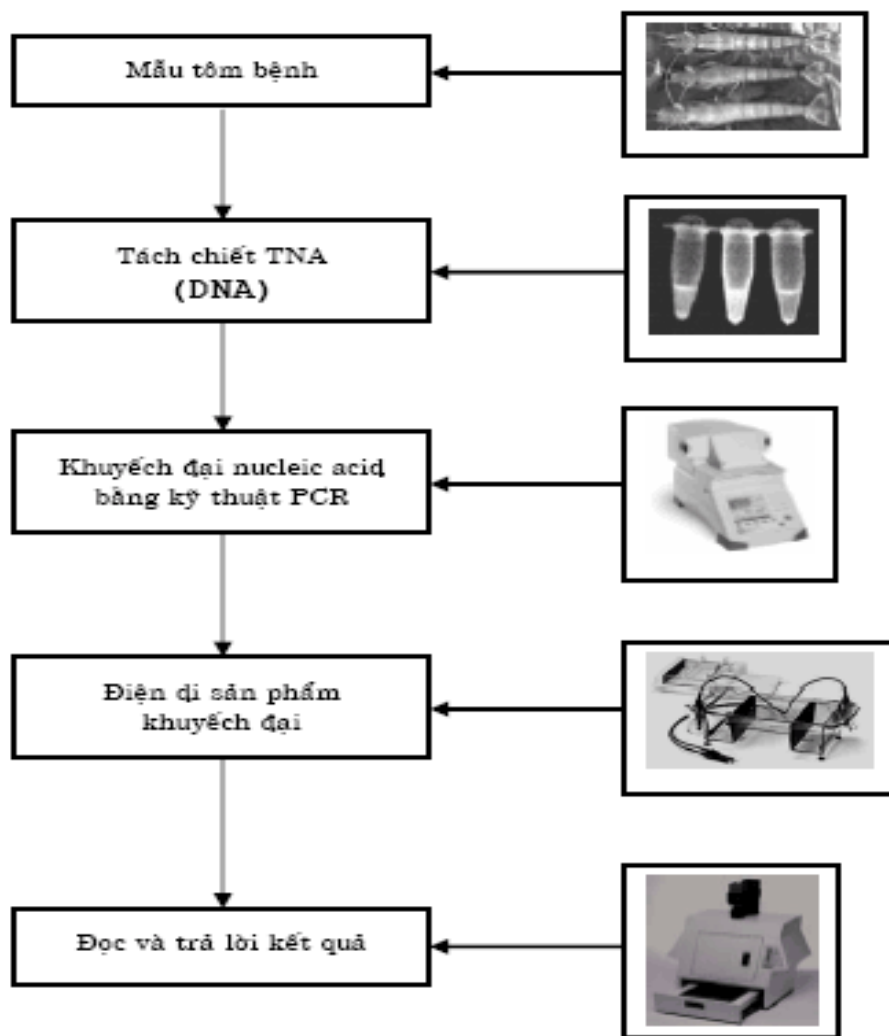
## **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

### **Phát triển các khái niệm về kỹ thuật PCR**

PCR là Polymerase chain reaction có nghĩa là phản ứng tổng hợp DNA nhân tạo dựa vào tính đặc hiệu của cặp mồi chuyên biệt cho đoạn DNA đích và các chu kỳ nhiệt. PCR là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA mà không cần sử dụng các sinh vật sống.

### **Mô tả quy trình chuẩn đoán bệnh virus đốm trắng bằng kỹ thuật PCR trên giống Tôm Thẻ Chân Trắng (*Penaeus vannamei*, Boone 1931)**

Mô hình chuẩn cho kỹ thuật PCR trên giống Tôm Thẻ Chân Trắng (*Penaeus vannamei*, Boone 1931):



**Hình 3.** Mô hình chung cho kỹ thuật chạy PCR

**Chuẩn bị mẫu chạy PCR và các bước làm PCR**

Các dụng cụ cần thiết gồm muống nhựa, chậu nhựa, Microcentrifuge 1.5 ml có 800 $\mu$ l cón 96<sup>0</sup>, giỏ nhựa cỡ nhỏ đáng cao, vải màn, nước cất, găng tay y tế, kẹp. Lọc tôm bằng vải màn, phun rửa bằng nước cất. Dùng muống nhựa lấy tôm vào microcentrifuge 1 ống cón. Hóa chất IQ 2000 WSSV dùng cho 1 mẫu:

Phản ứng thứ nhất (First): First PCR PreMix 7.5  $\mu$ l, IQzyme DNA Polymerase 0.5  $\mu$ l. Total 8.0  $\mu$ l.

Phản ứng thứ 2 (Nested): Nest PCR PreMix 14  $\mu$ l, IQzyme DNA Polymerase 1  $\mu$ l, Total 15  $\mu$ l.

**Kỹ thuật pha mẫu:** Đầu tiên hút 10 $\mu$ l positive standards 10<sup>4</sup> với 90 $\mu$ l dung dịch Yeast tRNA ta được positive standards 10<sup>3</sup>. Tiếp theo thực hiện hút 10 $\mu$ l positive standards 10<sup>3</sup> với 90 $\mu$ l dung dịch Yeast tRNA ta được positive standards 10<sup>2</sup> và cuối cùng hút 10 $\mu$ l positive standards 10<sup>2</sup> với 90 $\mu$ l dung dịch Yeast tRNA ta được positive standards 10<sup>1</sup>.

**Tiến hành pha hóa chất cho phản ứng First:** Trước hết là hút 2 $\mu$ l nước cất vào tube 0.2 ml làm mẫu chứng âm. Lần lượt hút 2 $\mu$ l chất hòa tan DNA (RNA) vào tube 0.2 ml chuẩn bị sẵn và chuẩn bị hóa chất như sau: Số mẫu chạy = số lượng mẫu + mẫu chứng âm + mẫu chứng dương + mẫu khác. Tiếp tục hút 8  $\mu$ l hóa chất First vào tube 0.2 ml chứa DNA (RNA), thực hiện vortex 30 giây ở vị trí số 2000 của máy và ly tâm nhanh 30 giây (khoảng 7500 vòng quay

xây ra) và tiến hành cho vào máy PCR và chọn chương trình. Cần ghi thông tin chạy máy vào sổ theo dõi để tiện kiểm soát quá trình chạy mẫu nhằm đem lại hiệu quả chính xác cao nhất.

**Tiến hành pha hóa chất cho phản ứng Nested:** Đối với phản ứng này cần chuẩn bị hóa chất trong tủ vô khuẩn hút 15µl vào tube 0.2 ml mẫu đã chạy phản ứng First, Vortex 30 giây ở vị trí số 2000 của máy và ly tâm nhanh 30 giây (khoảng 7500 vòng quay xây ra). Sau đó cho vào máy PCR và chọn chương trình. Cuối cùng cần ghi thông tin chạy máy vào sổ theo dõi.

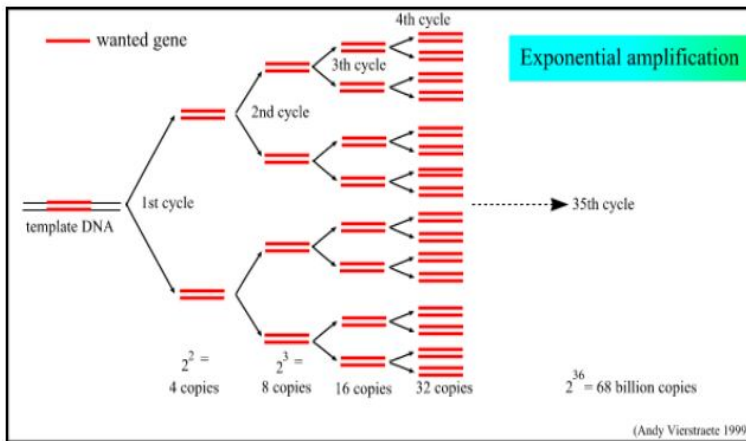
**Mô tả chương trình chạy máy PCR:** Thực hiện First PCR gồm các thông số 94<sup>0</sup>C 30sec, 62<sup>0</sup>C 30sec, 72<sup>0</sup>C 30sec, repeat 5 cycles, và 94<sup>0</sup>C 15sec, 62<sup>0</sup>C 15sec, 72<sup>0</sup>C 20sec, repeat 15 cycles, cuối cùng là dãy số 72<sup>0</sup>C 30sec, 20<sup>0</sup>C 30sec 4<sup>0</sup>C ∞ . Tiếp theo thực hiện Nested PCR gồm dãy số 94<sup>0</sup>C 20sec, 62<sup>0</sup>C 20sec, 72<sup>0</sup>C 30sec, 25 cycles, và 72<sup>0</sup>C 30sec, 20<sup>0</sup>C 30sec 4<sup>0</sup>C ∞ at the end of the final cycle.

**Quá trình tách chiết DNA trong kỹ thuật PCR**

Trong bước này kỹ thuật tách chiết DNA được mô tả lần lượt như sau: Lấy với lượng mẫu (300µl) cần thực hiện cho vào ống ly tâm 1.5 ml chứa 600µl Lysis buffer. Sau đó tiến hành nghiền mẫu tôm trên khay đá 2 – 3 phút sau đó vortex 2 – 3 phút ở vị trí số 4 của máy, đối với Nauplius vortex 10 phút ở vị trí số 8 của máy. Tiếp theo nấu mẫu ở 95 – 100<sup>0</sup>C trong 10 phút (làm lạnh khoảng 5 phút). Tiếp đến cần ly tâm 12000 rpm trong 10 phút. Tiếp theo hút 200µl dịch trong phía trên vào ống chứa sẵn 400µl Absolute (đã làm lạnh) và thực hiện trộn đều hỗn hợp này. Tiến hành ly tâm 12000 rpm trong 5 phút. Sau đó đổ Absolute và phơi ống trong 30 phút và thêm nước cất đã tiệt trùng. Tiến hành hấp ở 75<sup>0</sup>C trong vòng 10 phút và ly tâm 12000 rpm trong 10 phút và cuối cùng của quá trình là hút 2 µl DNA tinh sạch cho vào tube 0.2ml chạy phản ứng PCR. Nguyên tắc của việc tách chiết DNA là dựa trên sự phối hợp cơ học, hóa học và sốc nhiệt để tách chiết DNA virus ra dịch chiết.

**Quá trình khuếch đại DNA trong kỹ thuật chạy PCR**

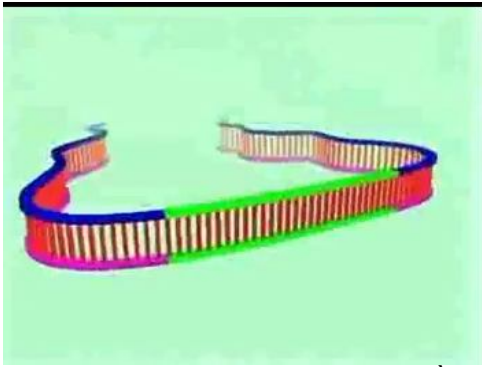
PCR (polymerase chain reaction) là phản ứng tổng hợp DNA nhân tạo dựa vào tính đặc hiệu của cặp môi chuyên biệt cho đoạn DNA đích và các chu kỳ nhiệt.



**Hình 4.** Hình mô phỏng kết quả trên máy tính về mỗi xuôi và mỗi ngược

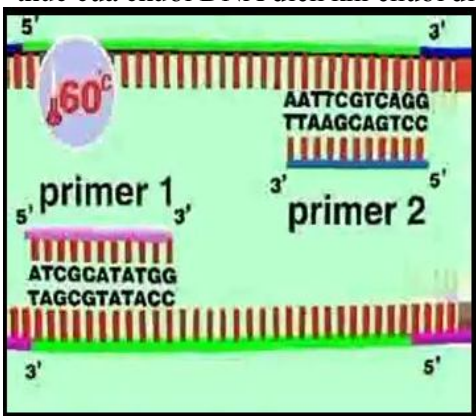
Thành phần của phản ứng gồm DNA bản mẫu, mỗi xuôi và mỗi ngược, dNTP (gồm 4 loại: dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Enzyme polymerase (*Taq polymerase*), dung dịch đệm, nước cất 2 lần (đã khử trùng). Trong đó DNA hay acid nucleic đích, tức là chuỗi acid nucleic đặc hiệu của vi khuẩn gây bệnh, của gene bệnh lý, của dấu ấn di truyền,...) mà phản ứng PCR sẽ khuếch đại lên để chúng có thể được phát hiện trong bệnh phẩm.





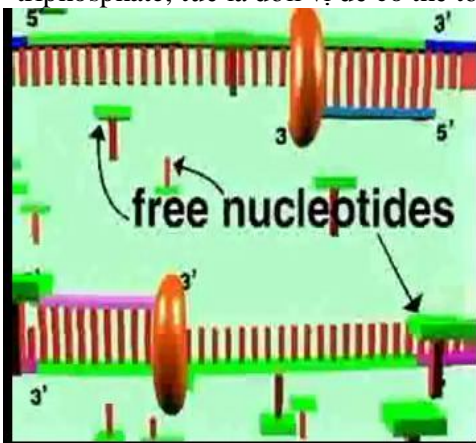
**Hình 5.** Mô phỏng đoạn khởi đầu và đoạn kết thúc của chuỗi DNA đích

Primer hay đoạn mồi, tức là những đoạn DNA đơn (oligonucleotide) có kích thước chỉ vài chục base (18 – 30), có thể bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung vào đoạn khởi đầu và đoạn kết thúc của chuỗi DNA đích khi chuỗi đích này được biến tính thành sợi đơn.



**Hình 6.** Mô phỏng các đoạn mồi thử nghiệm PCR

lên gọi là *up – stream primer* và một mồi xuống gọi là *down – stream prime*. Cặp mồi này quyết định nên kích thước của sản phẩm PCR. Chúng càng bắt cặp trên chuỗi đích xa nhau bao nhiêu thì kích thước của sản phẩm PCR càng lớn bấy nhiêu và ngược lại, càng gần nhau bao nhiêu thì kích thước càng nhỏ bấy nhiêu. Đáng lưu ý là dNTP deoxy nucleoside triphosphate, tức là đơn vị để có thể tổng hợp được các bản sao của DNA đích.

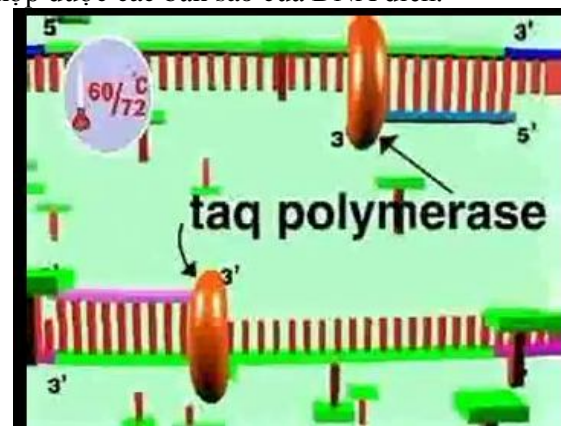


**Hình 7.** Mô phỏng free nucleotides

Phản ứng PCR sẽ không xảy ra được nếu bệnh phẩm không có nucleic acid đích. Một trường hợp khác là trong bệnh phẩm có nucleic acid đích, nhưng do bệnh phẩm được sửa soạn không thích hợp hoặc không đúng cách nên nucleic acid đích không bộc lộ ra, hoặc trong bệnh phẩm hãy còn các chất ức chế phản ứng PCR. Trong những trường hợp này kết quả PCR sẽ âm tính, nhưng là âm tính giả. Vì vậy vấn đề sửa soạn bệnh phẩm cho thử nghiệm PCR phải được coi trọng, đặc biệt trong các phòng thí nghiệm áp dụng PCR để chuẩn đoán phát hiện bệnh lý.

Trong thử nghiệm PCR, đoạn mồi có hai vai trò chính : Quyết định nên tính đặc hiệu của thử nghiệm, vì nếu đoạn mồi được chọn càng đặc hiệu cho chuỗi đích, nghĩa là chỉ có thể bắt cặp trên chuỗi đích mà không thể bắt cặp được trên các chuỗi DNA khác ngoài chuỗi đích, thì sản phẩm PCR càng đặc hiệu và thử nghiệm PCR càng đặc hiệu. Khởi động men polymerase vì men polymerase chỉ có thể bắt đầu tổng hợp sợi bổ sung cho chuỗi DNA đích một khi nó nhận dạng được đầu 3', (là đầu mà nó xúc tác cho một dNTP được gắn vào) đang ở tình trạng sợi đôi. Thông thường trong phản ứng PCR, người ta dùng một cặp mồi, gọi là *primer set*, trong đó có một mồi

lên gọi là *up – stream primer* và một mồi xuống gọi là *down – stream prime*. Cặp mồi này quyết định nên kích thước của sản phẩm PCR. Chúng càng bắt cặp trên chuỗi đích xa nhau bao nhiêu thì kích thước của sản phẩm PCR càng lớn bấy nhiêu và ngược lại, càng gần nhau bao nhiêu thì kích thước càng nhỏ bấy nhiêu. Đáng lưu ý là dNTP deoxy nucleoside triphosphate, tức là đơn vị để có thể tổng hợp được các bản sao của DNA đích.

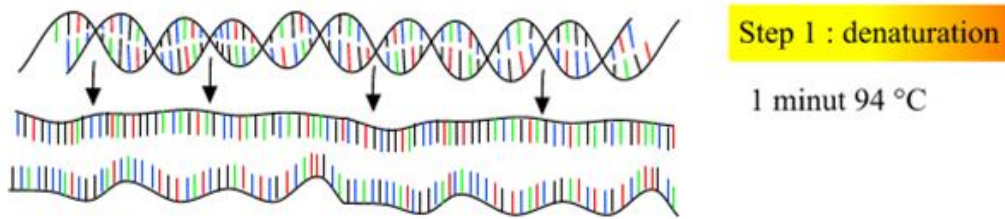


**Hình 8.** Mô phỏng taq polymerase

DNTP có cấu tạo gồm một đường deoxyribose có gắn một base, có thể là adenine (dATP) hay thymine (dTTP) hay Cytosine (dCTP) hay guanine (dGTP), ở carbone số 1 (C1). Ba phân tử

phosphate (triphosphate) được gắn tại carbone số 5 (C5) của phân tử deoxyribose này và đây chính là nơi mà dNTP gắn vào đầu 3' của chuỗi bổ sung trên chuỗi đích. Năng lượng để cho phản ứng này xảy ra được lấy từ các nối phosphate giàu năng lượng của triphosphate trên dNTP. Đó cũng chính là lý do tại sao phải là dNTP chứ không phải là dNDP (diphosphate) hay dNMP(monophosphate). Men polymerase, phải là men polymerase chịu được nhiệt độ. Ngày nay có nhiều loại polymerase chịu được nhiệt độ đã được ly trích hoặc tổng hợp, tùy mục đích sử dụng mà chúng ta có thể chọn polymerase thích hợp. Thường dùng nhất trong các phòng thí nghiệm là men Taq polymerase. Là men polymerase trích từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*, là các vi khuẩn sống được trong các suối nước nóng. Khuếch đại DNA là một chuỗi nhiều chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước:

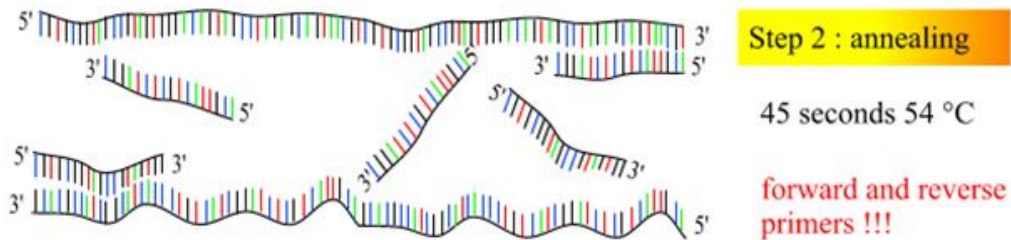
**Bước 1, Biến tính (denaturation):** DNA được biến tính ở nhiệt độ cao, thường là 94 – 95<sup>0</sup>C, trong thời gian 30s – 1 phút.



**Hình 9.** Mô phỏng Step 1

PCR là một thử nghiệm nhằm khuếch đại chuỗi nucleic acid đích thành hàng tỷ bản sao để sau đó có thể phát hiện được. Để thực hiện được việc khuếch đại acid nucleic đích, thử nghiệm PCR dựa vào những chu kỳ nhiệt mà mỗi chu kỳ có 3 bước (*hình 9*), mỗi bước kéo dài khoảng vài chục giây đến vài phút, tuần tự như sau : Đầu tiên là nhiệt độ được nâng lên khoảng 94<sup>0</sup>C để làm biến tính nucleic acid đích từ dạng sợi đôi (dsDNA) thành sợi đơn (ssDNA), đây là giai đoạn làm biến tính (denaturation) DNA đích.

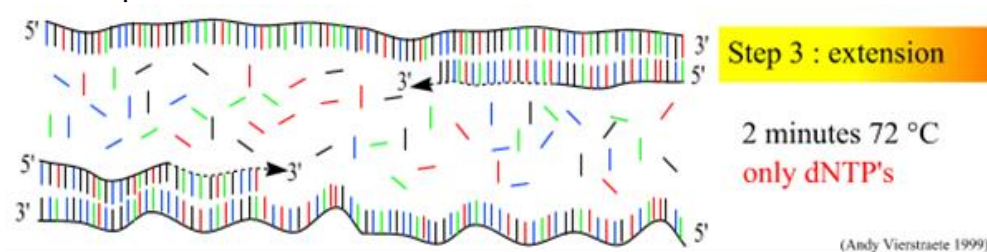
**Bước 2, Bắt cặp mồi (hybridization):** Nhiệt độ cần cho sự bắt cặp mồi với DNA mạch khuôn là khoảng 50 – 60<sup>0</sup>C.



**Hình 10.** Mô phỏng Step 2

Kế đó là giai đoạn bắt cặp (anealing), lúc này nhiệt độ trong buồng ủ PCR hạ xuống khoảng 55<sup>0</sup>C để các đoạn mồi (primer) bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung vào hai đầu của chuỗi nucleic acid đích, đây là giai đoạn quyết định nên tính đặc hiệu thì những sản phẩm PCR (PCR product) sẽ đặc hiệu.

**Bước 3, Kéo dài (elongation):** Nhiệt độ được tăng lên đến 72<sup>0</sup>C, để DNA polymerase hoạt động kéo dài mạch.



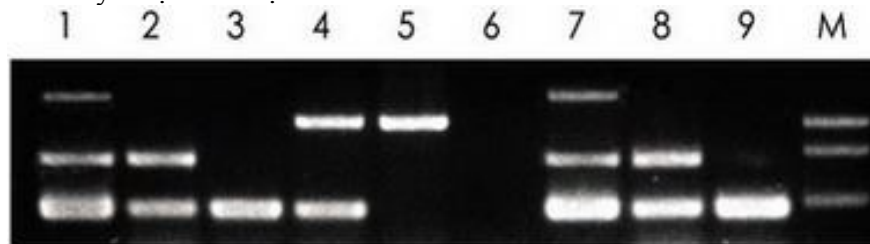
**Hình 11.** Mô phỏng Step 3

Cuối cùng là giai đoạn kéo dài (extension), lúc này nhiệt độ được nâng lên khoảng 72<sup>0</sup>C là nhiệt độ tối hảo để men polymerase chịu nhiệt xúc tác phản ứng tổng hợp bản sao của DNA đích theo nguyên tắc bổ sung trên khuôn là các sợi đơn (ssDNA) đích đã được đoạn mỗi bắt cặp vào trước đó (ở giai đoạn bắt cặp). Sự tổng hợp này cần phải có sự hiện diện các deoxy nucleoside tri phosphate (dNTP).

### ***Quá trình điện di và phân tích kết quả trong kỹ thuật PCR***

Quá trình chuẩn bị TBE 10X và TBE 1X là một công việc đòi hỏi thực hiện cẩn thận, chi tiết bởi vì nó liên quan tới kết quả cuối cùng mà kỹ thuật PCR chạy được và cho ra kết quả chính xác hay không phụ thuộc không nhỏ vào giai đoạn chuẩn bị này. Trước hết đối với chuẩn bị TBE 10X chúng ta sử dụng hợp phức hóa chất với công thức tổng quát gồm Tris HCl 108g + Acid Boric 55g + EDTA 7,44g, sau đó cho nước cất vào khuấy tan hóa chất cho vừa đủ lượng 1 lít. Rồi đem Auto tiệt trùng ở 121<sup>0</sup>C 15 phút chờ xong bước này. Còn đối với việc chuẩn bị TBE 1X: Đầu tiên đong 100ml TBE 10X, tiếp theo đong 900ml nước cất và cuối cùng lắc trộn đều thu được 1 lít dung dịch TBE1X. Cần thực hiện cẩn trọng và lắc thật đều dung dịch đã hòa tan theo kỹ thuật của PCR. Sau quá trình chuẩn bị TBE 10X và TBE 1X là đến quá trình chuẩn bị gel, cũng lần lượt đong 110ml TBE 1X cho vào bình tam giác bổ sung thêm 2g agarose cho vào bình tam giác, lắc đều và sau đó nấu trong lò vi sóng 2 phút, lấy ra lắc đều, nấu tiếp 1 phút, lắc đều rồi để nguội tới 65 – 70<sup>0</sup>C. Đến đây ta thêm 5µl SafeView vào bình tam giác lắc đều. Tiếp theo đổ gel vào khay chờ 1 – 2 phút cho lọc vào và cuối cùng để nguội ở nhiệt độ phòng khoảng 20 – 30 phút. Khi thực hiện xong các bước này thì chúng ta tiến hành điện di như sau: Trước hết cần pha dung dịch điện di gồm 100ml TBE1X thêm 5µl SafeView. Sau đó cho tấm gel vào máy điện di có chứa dung dịch điện di. Thực hiện hút 5µl dung dịch loading và sản phẩm PCR trộn đều, sau đó hút 5µl dung dịch vào các giếng trên tấm gel. Lưu ý mẫu postlarvae được hút sau cùng ở vị trí hai đầu tấm gel cùng với mẫu marker. Cần thực hiện chọn điều kiện điện di bằng dòng điện là 100A/1 máy, 110V, trong thời gian 30 – 45 phút. Cuối cùng của kỹ thuật PCR là thực hiện chụp ảnh dựa trên kết quả phân tích và điện di sản phẩm. Ta dùng nước cất lau máy chụp ảnh. Sau đó cho tấm gel vào, đặt số và tên bệnh lý. Tiến hành bật đèn UV và chụp ảnh.

Đọc kết quả của kỹ thuật PCR dựa vào hình ảnh sau:



**Hình 12.** Bảng mã hóa kết quả của quá trình chạy PCR

- Lane 1: Sample of severe WSSV infection
- Lane 2: Sample of moderate WSSV infection
- Lane 3: Sample of light WSSV infection
- Lane 4: Sample of very light WSSV infection
- Lane 5: WSSV negative sample
- Lane 6: Negative control (yeast tRNA or ddH<sub>2</sub>O)
- Lane 7: WSSV P(+) standard, 2000 copies/reaction
- Lane 8: WSSV P(+) standard, 200 copies/reaction
- Lane 9: WSSV P(+) standard, 20 copies/reaction
- Lane M: Molecular weight marker, 848 bp, 630 bp, 333 bp

### **KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

Bước đầu mô tả lại quá trình sử dụng kỹ thuật PCR chung và tiến hành phát triển, bổ sung kỹ thuật này vào trong công việc chuẩn đoán bệnh virus đốm trắng trên Tôm Thẻ Chân Trắng

giai đoạn giống. Đưa ra được các bước thực hiện và mô tả tương đối hoàn chỉnh các chi tiết trong kỹ thuật chạy PCR. Giải quyết được tính cấp thiết của thời điểm hiện tại cũng như nghiên cứu bổ sung mới một số vấn đề khi sử dụng kỹ thuật PCR trong lĩnh vực thủy sản. Cần thực hiện các nghiên cứu tổng thể về kỹ thuật PCR trên các đối tượng khác trong nghề nuôi thủy sản nhằm giảm được những thiệt hại đáng tiếc về bệnh lý của chúng.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Nguyễn Ân, Hoàng Dán, Lê Việt Ly, Nguyễn Thiện, Trần Xuân Thọ, 1983. *Di truyền học động vật*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Kim Đường, 1998. *Bài giảng Di truyền học*. Dành cho ngành nông nghiệp, chăn nuôi thú y, nuôi trồng thủy sản, Trường ĐH Nông Lâm Huế.
- Nguyễn Minh Hoàn, Nguyễn Kim Đường, Phạm Khánh Từ, 2000. *Di truyền học động vật*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Lê Đình Lượng, Phan Cự Nhân, 1994. *Cơ sở di truyền học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.
- Trần Đình Miên, Phan Cự Nhân, 1981. *Di truyền học đại cương*. NXB Nông nghiệp và NXB Mir Mat cơ va.
- Nguyễn Hồng Minh, 1999. *Di truyền học*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Hutt F. B, 1978. *Di truyền học động vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Douglas Tave, 1986. *Genetics for Fishery Managers*; AVI Publishing Company, Inc. Westport Connecticut.
- De Robertis E.D.P, Nowinski W.W., Saez F.A, 1965. *Biologia Celular*. Sexta edicion totalmente renovada, Edicion Revolucionada, Instituto del Libro, Vedado Habana, Cuba.
- Falconer D.S, 1981. *Introduction to Quantitative Genetics*. Second edition, Longman London and New York.
- Klug W.S., Cummingham M.R, 1986. *Concepts of Genetics*. Scott, Foresmen, and Company Glenview, Illinois, London England.