

TỐI ƯU HÓA VÀ ỨNG DỤNG QUI TRÌNH PHÂN TÍCH CÁC CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH TỰ NHIÊN Ở TÔM CÀNG XANH (*MACROBRACHIUM ROSENBERGII*)

Dặng Thị Hoàng Oanh¹, Lê Hữu Thôi¹ và Nguyễn Thanh Phương¹

ABSTRACT

The protocols for determination of several innate immunological parameters in prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) were optimized. These protocols include: (1) procedures for total haemocyte count by using haemocytometer and for haemocyte identification which can determine 2 kinds of haemocytes in blood sample; (2) Protocols for analysis of phenoloxidase, respiratory burst and superoxide dismutase activities by creating colour complexes and measured by absorb wavelength of 490 nm, 630 nm and 560 nm, respectively. The optimized protocols were used to determine innate immunological parameters in prawns which were experimentally challenged with white spot syndrome virus. The obtained result revealed a significant change ($P < 0.05$) in number of haemocytes as well as activities of phenoloxidase, respiratory burst and superoxide dismutase. Therefore, these protocols appear to have good application for study the immune response in prawns.

Keywords: natural immune response, haemocyte identification, phenoloxidase, respiratory burst, superoxide dismutase, *Macrobrachium rosenbergii*

Title: Optimization and application of protocols for immune response analysis in *Macrobrachium rosenbergii*

TÓM TẮT

Các qui trình xác định một số chỉ tiêu miễn dịch tự nhiên trên tôm càng xanh được thực hiện có điều chỉnh. Các qui trình này bao gồm: (1) qui trình xác định tổng bạch cầu và định loại bạch cầu trong máu tôm bằng buồng đếm hồng cầu và nhận dạng được hai loại tế bào bạch cầu có hạt và không hạt; (2) các qui trình xác định hoạt tính của phenoloxidase, respiratory burst và superoxide dismutase trên cơ sở tạo ra các phức hợp màu và hấp thụ ở các bước sóng tương ứng 490 nm, 630 nm và 560 nm. Các qui trình sau khi chuẩn hóa được ứng dụng để xác định đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở tôm càng xanh cảm nhiễm vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV). Kết quả phân tích cho thấy có sự thay đổi có ý nghĩa ($P < 0.05$) của các loại bạch cầu, hoạt tính của phenoloxidase, hoạt tính respiratory burst và superoxide dismutase. Vì thế, các qui trình có thể được ứng dụng để nghiên cứu đáp ứng miễn dịch trên tôm.

Từ khóa: miễn dịch tự nhiên, định loại bạch cầu, phenoloxidase, respiratory burst, superoxide dismutase, *Macrobrachium rosenbergii*

1 GIỚI THIỆU

Nghề nuôi tôm ở nước ta đã và đang phát triển rất nhanh trong những năm qua với mức độ thâm canh hóa ngày càng cao. Tuy nhiên, đi cùng với sự phát đó là vấn đề dịch bệnh bùng phát và ô nhiễm môi trường ngày càng tăng. Dịch bệnh, nhất là bệnh do vi-rút đang là mối nguy hiểm, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

tôm. Bên cạnh đó còn có ảnh hưởng của việc sử dụng hóa chất xử lý môi trường, thuốc bảo vệ thực vật và nước thải sinh hoạt từ các khu công nghiệp làm ảnh hưởng đến sức khỏe của tôm nuôi. Một trong những biện pháp có thể hạn chế ảnh hưởng của dịch bệnh và tác động của môi trường là tăng cường sức đề kháng cho tôm nuôi dựa trên những cơ chế đáp ứng miễn dịch của chúng đối với những yếu tố trên. Tuy nhiên, nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của tôm với các yếu tố lây bệnh truyền nhiễm và các yếu tố môi trường nuôi ở nước ta còn rất hạn chế. Các phương pháp phân tích các chỉ tiêu miễn dịch trên tôm chưa được sử dụng phổ biến. Trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học về “Sự tự vệ của tôm chống lại vi-rút đốm trắng” tại Trường Đại học Cần Thơ, chúng tôi đã thực hiện (có điều chỉnh) một số qui trình phân tích các chỉ tiêu miễn dịch ở tôm gồm: qui trình định loại bạch cầu (theo Cornick và Stewart, 1978; Moullac *et al.*, 1997), xác định hoạt tính phenoloxidase (theo Herández-López *et al.*, 1996), khả năng tạo ra hợp chất kháng khuẩn superoxide anion (O_2^-) (hay hoạt tính respiratory burst) (theo Song và Hsieh, 1994) và superoxide dismutase (theo Beauchamp và Fridovich, 1971) và ứng dụng nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của tôm càng xanh với vi-rút gây bệnh đốm trắng. Trong bài báo này, chi tiết và khả năng ứng dụng của các qui trình được trình bày nhằm cung cấp thông tin kỹ thuật làm cơ sở cho các nghiên cứu miễn dịch ở tôm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tôm càng xanh có trọng lượng từ 15-25g được chọn từ trại nuôi tôm ở Cần Thơ được chuyển về thuần dưỡng trong bể nước ngọt (thể tích 1m³) tại phòng thí nghiệm ươm, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Nhiệt độ nước trong bể được duy trì trong khoảng 28-32°. Tôm được cho ăn mỗi ngày 2 lần bằng thức ăn viên theo nhu cầu. Trước khi được sử dụng để thực hiện nghiên cứu, 3 mẫu tôm được thu ngẫu nhiên để kiểm tra xác định tôm không bị nhiễm các mầm bệnh ký sinh trùng và vi-rút gây bệnh đốm cơ (MrNV/XSV).

Nguồn tôm sú bệnh đốm trắng (trữ ở -80°C) của Khoa thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ được sử dụng để chuẩn bị dịch chiết WSSV.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị vi-rút gây cảm nhiễm

Nguồn vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) sử dụng để gây cảm nhiễm được chuẩn bị theo phương pháp của Oseko *et al.* (2006) bằng cách nghiền mang tôm nhiễm WSSV trong dung dịch PBS (theo tỷ lệ 1:10). Sau khi ly tâm 10000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C, phần dịch chiết được lọc qua màng lọc (0,45 μm). Phần dịch qua lọc được trữ ở -80°C đến khi sử dụng. Dịch chiết được xác định dương tính với WSSV bằng phương pháp PCR (OIE, 2006).

2.2.2 Phương pháp xác định tổng số bạch cầu và định loại bạch cầu

Tổng số bạch cầu được đếm theo phương pháp của Le Moullac *et al.* (1997). Máu tôm (100μl) được thu bằng cách dùng kim tiêm vô trùng có chứa 900 μl dung dịch

chống đông (AS- trisodium citrate 30 mM, NaCl 338 mM, glucose 115 mM, EDTA 10 mM). Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X). Qui trình thực hiện tiêu bản, nhuộm và định loại bạch cầu được thực hiện theo phương pháp của Cornick và Stewart (1978). Máu tôm cũng được thu bằng ống tiêm (1ml) vô trùng có chứa dung dịch chống đông, ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch phía trên và rửa phần viên với 200 µl formalin-AS (pH 4.6) rồi nhẹ nhàng hòa tan phần viên cũng trong dung dịch formalin-AS (pH 4.6). Một giọt mẫu máu được trải lên lam thủy tinh, làm khô, cố định 5 phút trong ethanol, rửa bằng nước cất và ngâm trong thuốc nhuộm Giemsa trong 30 phút. Lam đã nhuộm được rửa bằng acetone và xylen. Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi (100X) theo hình z-z.

2.2.3 Phương pháp xác định hoạt tính của Phenoloxidase (PO)

Hoạt tính của Phenoloxidase được xác định dựa theo phương pháp của Hernández-López *et al.* (1996). Mẫu máu sau khi thu (như ở mục 2.2.1) được ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, rồi loại bỏ phần dịch phía trên. Phần viên được hòa tan nhẹ nhàng trong 1 ml đệm cacodylate-citrate (0.01M sodium cacodylate, 0.45M sodium chloride và 0.10M trisodium citrate, pH 7.0), sau đó ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần viên lại được hòa tan với 200 µl đệm cacodylate (0.01M sodium cacodylate, 0.45M sodium chloride, 0.01M calcium chloride và 0.26 M magnesiumchloride, pH 7.0) rồi ủ 100 µl mẫu với 50 µl trypsin (1 mg/ml) trong 10 phút ở 25-26°C. Tiếp đến, 50 µl L-DOPA (3 mg/ml) được cho vào dung dịch vừa ủ xong, để 5 phút sau cho thêm 800 µl đệm cacodylate rồi đo mẫu bằng máy so màu quang phổ (microplate reader) ở bước sóng 490 nm. Mẫu đối chứng gồm có 100 µl mẫu, 50 µl đệm cacodylate (thay thế trypsin) và 50 µl L-DOPA. Đọc kết quả sau 1 phút hoặc đến khi OD trong mẫu đối chứng khoảng từ 0,02-0,05.

2.2.4 Phương pháp xác định hoạt tính respiratory burst (RES)

Hoạt tính respiratory burst (RES) được thực hiện theo Song và Hsieh (1994). Nguyên tắc cơ bản của phương pháp là dựa vào sự biến đổi của nitroblue tetrazolium (NBT) trên mẫu máu được cố định để định lượng hoạt tính respiratory burst. 100 µl máu trong thuốc chống đông được làm lắng xuống trong đĩa 96 giếng đã được phủ với 100 µl dung dịch poly-L-lysine (0,2%) để tăng sự kết dính của tế bào. Đĩa được ly tâm 300 x g trong 15 phút, loại bỏ huyết tương. Thêm vào 100 µl zymosan (0,1% zymosan trong Hanks' solution minus phenol red, Sigma). Để 30 phút ở nhiệt độ phòng, loại bỏ zymosan, tế bào máu được rửa 3 lần với 100 µl dung dịch Hanks' (Hanks' solution, Sigma). Nhuộm với 100 µl dung dịch NBT (0,3%) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, rồi loại bỏ dung dịch NBT. Lúc này tế bào máu được cố định. Tế bào máu sau đó được rửa 3 lần với 100 µl methanol 70%, để khô, rồi hòa tan bằng cách thêm vào 120 µl KOH 2M và 140 µl dimethyl sulphoxide. Đo 3 lần ở bước sóng 630 nm bằng microplate reader.

2.2.5 Hoạt tính của superoxide dismutase

Hoạt tính của superoxide dismutase (SOD) được xác định dựa theo phương pháp của Beauchamp và Fridovich (1971). 200mg cơ hoặc gan tụy tôm được cho vào 1 ống eppendorf lạnh có chứa 1 ml đệm phosphate (50 mM, pH 7,8). Mẫu được

nghiên rồi ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Phần dịch phía trên được chuyển sang 1 eppendorf mới, ủ 5 phút ở 65°C, sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Phần dịch phía trên lại được chuyển sang 1 eppendorf mới và trữ ở -20°C. 2 ml dung dịch SOD (0.1 mM EDTA, 13 µM methionine, 0.75 mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT) và 20 µM riboflavin trong 50 mM đệm phosphate, pH 7,8) và từ 0-100 µL dịch tách chiết thô được so màu bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 560nm. Đọc kết quả sau 1 phút hoặc đến khi độ hấp thụ trong mẫu đối chứng khoảng 0.2-0.25.

2.2.6 Bố trí thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch tự nhiên của tôm

Tôm được bố trí trong 3 bể nhựa (150L) chứa nước ½ thể tích bể, sục khí liên tục, nhiệt độ nước dao động từ 28-32°C. Mỗi bể có 20 conS. Tôm sau khi được bố trí vào bể 2 ngày thì thu 2 con/bể để lấy máu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Tôm còn lại trong bể được tiêm dịch chiết WSSV (50 µl/con) vào đốt bụng thứ 2. Sau khi gây cảm nhiễm 1, 3, 5, 10, 15 ngày, thu 2 con tôm/bể để lấy máy xác định các chỉ tiêu miễn dịch.

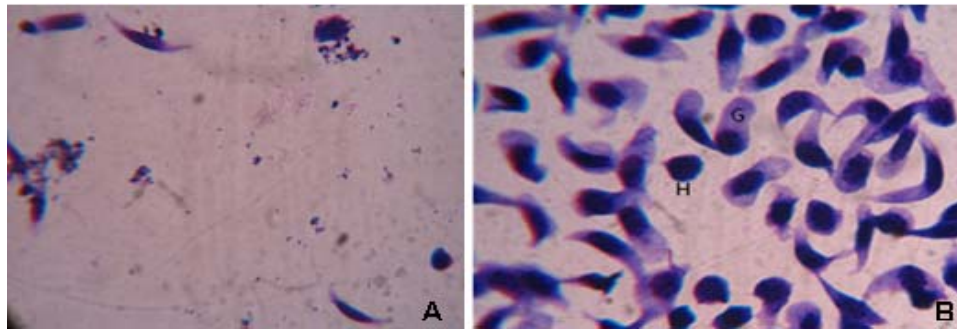
2.2.7 Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu thu được được phân tích bằng thống kê ANOVA một nhân tố (P < 0,05) sử dụng chương trình SPSS 16.0.

3 KẾT QUẢ

3.1 Định loại bạch cầu

Kết quả thực hiện tiêu bản máu và nhuộm để xác định các loại bạch cầu theo phương pháp của Cornick và Stewart (1978) cho thấy mật độ bạch cầu rất thưa và không sạch (Hình 1A). Qui trình được điều chỉnh bằng cách dùng ống tiêm (có chứa 200 µl formalin-AS pH 4.6) rút 200 µl máu tôm cho vào ống eppendorf 1.5ml, trộn đều, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch phía trên được loại bỏ. Tiếp tục cho 200 µl dung dịch formalin-AS vào phần tế bào máu còn lại, hòa tan, ly tâm và loại bỏ dung dịch phía trên. Cuối cùng hòa tan phần tế bào máu bằng 50 µl dung dịch formalin-AS. Mục đích của các bước này là để làm tăng mật độ và rửa tế bào bạch cầu trước khi thực hiện tiêu bản máu và nhuộm để quan sát các loại bạch cầu chính xác hơn (Hình 1B).



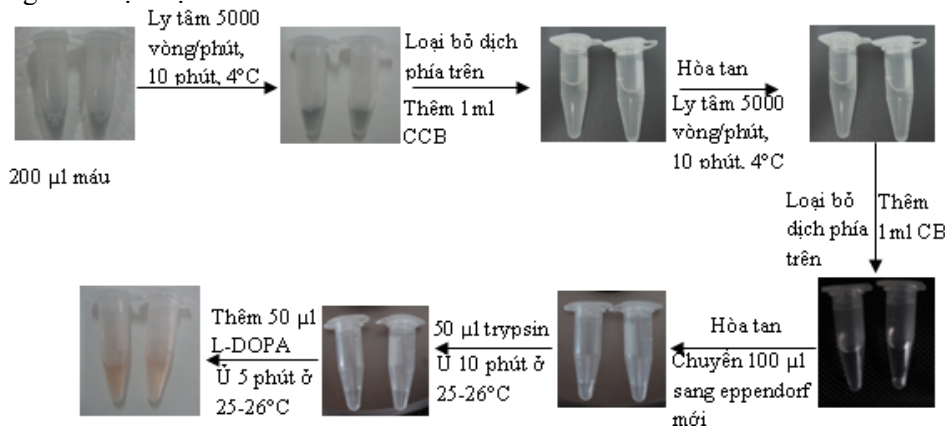
Hình 1: Tế bào máu nhuộm Giemsa. (H: bạch cầu không hạt, G: Bạch cầu có hạt). A: Trước, B: Sau khi điều chỉnh qui trình

Theo Söderhäll và Cerenius (1992), bạch cầu đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch của giáp xác. Chúng có 3 dạng bạch cầu là bạch cầu không hạt, bán hạt và có hạt. Tùy loại bạch cầu mà chúng có thể có chức năng khác nhau trong hệ miễn dịch của giáp xác như thực bào, phong tỏa và hình thành khối u, melanin hóa hay làm độc tế bào. Sự thay đổi tăng hay giảm thành phần các loại bạch cầu là một trong các chỉ tiêu để đánh giá đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở tôm.

3.2 Hoạt tính của Phenoloxidase

Khi thực hiện qui trình xác định hoạt tính của Phenoloxidase (PO) theo Herández-López *et al.* (1996) kết quả không cho kết tủa sau khi ly tâm 100 µl máu 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Khi thể tích máu được tăng lên 200 µl và được ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C cũng không thấy xuất hiện kết tủa trong mẫu phân tích. Sau đó, hai mẫu này được sử dụng để thực hiện các bước tiếp theo nhưng khi thêm 50 µl L-DOPA vào mẫu thì không có sự thay đổi màu. Qui trình sau đó được điều chỉnh bằng cách tăng vận tốc ly tâm mẫu máu lên 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C thì thấy xuất hiện kết tủa và khi thêm 50 µl L-DOPA vào mẫu thì thấy có sự chuyển đổi màu (Hình 2 và 6). Khi tăng thể tích mẫu máu lên 200 µl thì cho kết quả rõ và tốt hơn. Kết quả này cho thấy khi ly tâm ở vận tốc 2000 vòng/phút thì không kết tủa tế bào bạch cầu tôm càng xanh dẫn đến không thể xác định được hoạt tính của phenoloxise trong mẫu cần phân tích.

Hệ thống Phenoloxidase (ProPO) là một thành phần quan trọng của hệ thống miễn dịch tự nhiên tôm. Sự phóng thích hệ thống proPO từ những tế bào bán hạt được bắt đầu bởi β-1,3-glucan hoặc lipopolysaccharide (LPS). Trong quá trình hoạt động của nó xuất hiện các phản ứng bảo vệ cơ thể như: thực bào, hình thành các khối u và nang, sự di chuyển tế bào máu, tổng hợp melanin trong khối u và nang. Vì thế, hoạt tính của Phenoloxidase là một trong chỉ tiêu cần thiết để đánh giá đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở tôm.

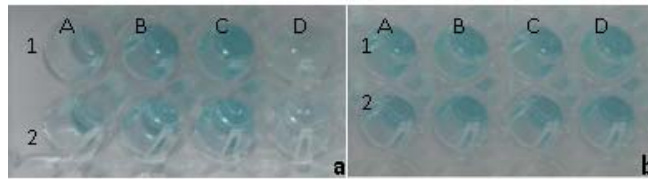


Hình 2: Sơ đồ qui trình xác định hoạt tính của Phenoloxidase sau điều chỉnh

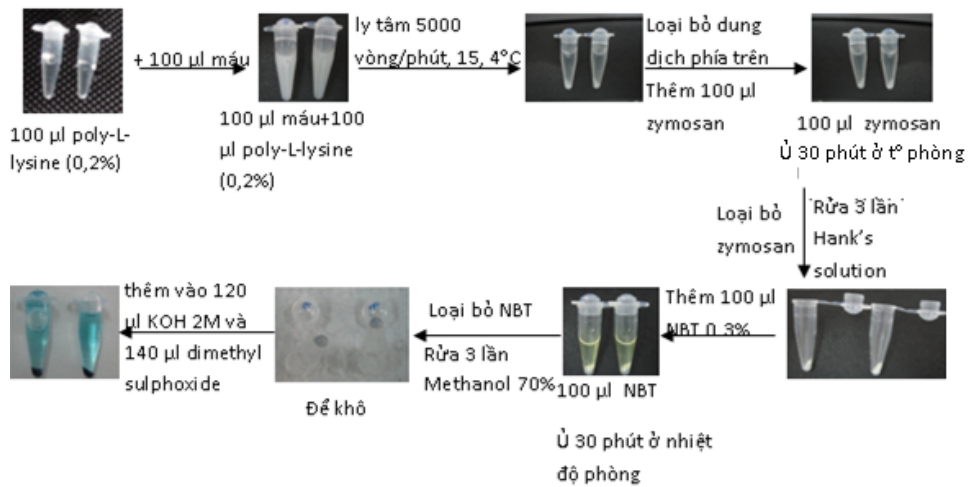
3.3 Hoạt tính Respiratory burst

Kết quả thực hiện qui trình xác định hoạt tính respiratory burst (RES) theo Song và Hsieh (1994) không ổn định, mặc dù phân tích trên cùng mẫu tôm nhưng lại có sự thay đổi màu sắc khác nhau (Hình 3a). Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này là

do sau khi ly tâm thì mẫu kết tủa không hoàn toàn nên trong các bước thực hiện sau xảy ra hiện tượng thiếu kết dính của kết tủa. Quy trình được điều chỉnh bằng cách tăng số vòng ly tâm thành 5000 vòng/phút giống như khi phân tích hoạt tính phenoloxidase. Kết quả cho thấy có sự ổn định giữa các lần lặp lại trong cùng một mẫu (Hình 3b). Quy trình xác định hoạt tính RES được mô tả như ở hình 4 và 6.



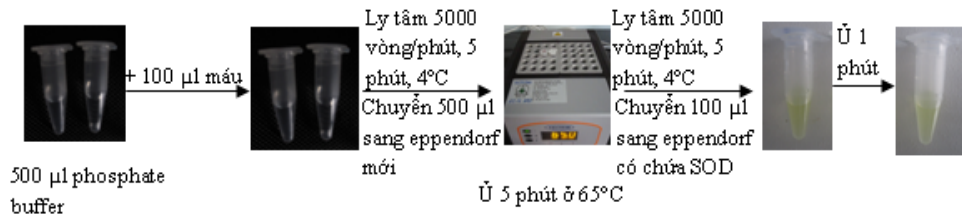
Hình 3: Kết quả phân tích Respiratory burst trên cùng một mẫu máu của tôm. a: Trước, b: Sau khi điều chỉnh (A, B, C, D: phân tích lặp lại 4 lần; 1, 2: đo mẫu lặp lại 2 lần)



Hình 4: Quy trình xác định hoạt tính Respiratory burst sau điều chỉnh

3.4 Hoạt tính của Superoxide dismutase

Trong số các mẫu cơ, gan tụy (Beauchamp and Fridovich, 1971) và máu tôm (Campa-Córdova *et al.*, 2002) khi sử dụng để phân tích hoạt tính của Superoxide dismutase (SOD) thì mẫu cơ và gan tụy cho kết quả sai khác rất lớn do quá trình nghiền và ly tâm mẫu không kết tủa được mẫu. Trong khi đó, sử dụng mẫu máu tôm để phân tích thì kết quả ổn định hơn. Quy trình được điều chỉnh bằng cách cho 50 µl máu (rút bằng ống tiêm có chứa 50 µl dung dịch AS; pH 7.0) vào 1 ống eppendorf lạnh có chứa 500 µl phosphate buffer (50 mM, pH 7,8), lắc đều rồi ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Sau đó 500 µl phần dịch phía trên được chuyển sang 1 ống eppendorf mới, ủ 5 phút ở 65°C rồi ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Phần dịch phía trên lại được chuyển sang 1 ống eppendorf mới và trữ ở -20°C. Cho 100 µl dịch chiết vào 500 µl hỗn hợp SOD. Sau 1 phút đo mẫu ở bước sóng 560 nm bằng microplate reader. (Hình 5 và 6). Với quy trình này, thể tích đệm phosphate và dung dịch SOD được giảm xuống 500 µl nên giảm được chi phí phân tích.



Hình 5: Quy trình xác định hoạt tính Superoxide dismutase burst sau điều chỉnh



Hình 6: Đĩa 96 giếng chứa mẫu phân tích Phenoloxidase, Superoxide dismutase và Respiratory burst

3.5 Ứng dụng xác định các chỉ tiêu miễn dịch tự nhiên ở tôm càng xanh

Mẫu được sử dụng là những mẫu tôm càng xanh trước và sau 1, 3, 5, 10, 15 ngày gây cảm nhiễm với WSSV để theo dõi sự biến đổi đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm. Kết quả phân tích (Bảng 1) cho thấy đã xác định được tổng bạch cầu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt, hoạt tính của phenoloxidase, hoạt tính respiratory burst và superoxide dismutase tại những thời điểm thu mẫu khác nhau.

Bảng 1: Sự thay đổi các chỉ tiêu miễn dịch ở tôm càng xanh cảm nhiễm WSSV

Ngày thu mẫu	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	10 ngày	15 ngày
Tổng bạch cầu (x10 ⁴ tb/ml)	420 ^a ±14	391 ^a ±9	439 ^a ±27	406 ^a ±30	395 ^a ±14	375 ^a ±14
Bạch cầu có hạt (%)	83.0 ^a ±1.4	86.5 ^b ±2.1	87.5 ^{bc} ±0.7	72.5 ^d ±0.7	69.0 ^e ±0.0	90.0 ^e ±1.4
Bạch cầu Không hạt (%)	17.0 ^a ±1.4	13.5 ^b ±2.1	12.5 ^{bca} ±0.7	27.5 ^d ±0.7	31.0 ^c ±0.0	10.0 ^c ±1.4
Phenoloxidase	0.057 ^a ±0.002	0.075 ^b ±0.004	0.098 ^c ±0.002	0.070 ^b ±0.008	0.064 ^{ab} ±0.005	0.069 ^{ab} ±0.004
Respiratory burst	0.086 ^a ±0.006	0.121 ^b ±0.003	0.108 ^c ±0.004	0.086 ^a ±0.001	0.081 ^a ±0.001	0.084 ^a ±0.003
Superoxide dismutase	0.899 ^a ±0.032	0.860 ^a ±0.045	0.832 ^a ±0.015	0.736 ^b ±0.068	0.573 ^c ±0.032	0.533 ^c ±0.005

a, b, c, d, e: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa trong cùng nghiệm thức sử dụng ANOVA một nhân tố (P < 0,05)

Tôm càng xanh sau khi tiêm WSSV không có sự khác biệt về số lượng bạch cầu khi so sánh với mẫu trước khi tiêm. Tuy nhiên, thành phần từng loại bạch cầu ở tôm sau 1 và 3 ngày tiêm WSSV khác biệt có ý nghĩa (P < 0.05) so tôm trước khi

tiêm WSSV (số lượng bạch cầu có hạt tăng nhưng số lượng bạch cầu không hạt giảm). Đến ngày thứ 5 sau khi tiêm WSSV thì bạch cầu có hạt có xu hướng giảm và bạch cầu không hạt tăng. Hoạt tính của phenoloxidase tăng đến ngày thứ 3 sau khi tiêm WSSV và khác biệt có ý nghĩa so với trước khi tiêm ($P < 0.05$). Bắt đầu từ ngày thứ 5 thì nồng độ của phenoloxidase giảm dần và đến ngày 10 thì không còn khác biệt so với trước khi tiêm WSSV. Hoạt tính respiratory burst tăng cao chỉ sau 1 ngày tiêm WSSV và sau đó giảm dần. Trong khi đó, hoạt tính respiratory burst khác biệt có ý nghĩa ($P < 0.05$) so với trước khi tiêm ở các ngày 1, 3 sau khi tiêm và ở các ngày 5, 10, 15 thì trở lại bình thường và không khác biệt so với trước khi tiêm. Ngược lại, hoạt tính superoxide dismutase giảm dần sau khi tiêm WSSV. Tuy nhiên, sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0.05$) bắt đầu từ ngày 5 sau khi tiêm WSSV.

4 THẢO LUẬN

Kết quả chuẩn hóa các qui trình phân tích các chỉ tiêu miễn dịch cho thấy đã thể hiện được những biểu hiện đặc trưng của từng chỉ tiêu. Kết quả định loại bạch cầu đã nhận dạng được 2 loại tế bào bạch cầu là bạch cầu có hạt và bạch cầu không hạt, kết quả này phù hợp với kết quả của Moullac *et al.* (1997) và Sung *et al.* (1998).

Các qui trình phân tích phenoloxidase, respiratory burst và superoxide dismutase cho ra kết quả tốt, trong mỗi qui trình có sự biến đổi và tác dụng của các thành phần trong phản ứng và cuối cùng cho ra các phức hợp màu đặc trưng (Hình 6). So với các qui trình phân tích phenoloxidase (Herández-López *et al.*, 1996), hoạt tính respiratory burst (Song và Hsieh, 1994) và superoxide dismutase (Beauchamp và Fridovich, 1971) thì các qui trình được chuẩn hóa cho thấy được những sự thay đổi trong phản ứng cũng như những phức hợp màu tạo thành.

Các qui trình này khi được ứng dụng để nghiên cứu đáp ứng miễn dịch tự nhiên trên tôm càng xanh với WSSV cho thấy có sự thay đổi có ý nghĩa ($P < 0.05$) của đa số những chỉ tiêu miễn dịch. Nồng độ phenoloxidase, respiratory burst và superoxide dismutase thay đổi trong thí nghiệm giống với kết quả nghiên cứu của Sarathi *et al.* (2008). Theo Sarathi *et al.* (2008) thì nồng độ phenoloxidase tăng dần đến ngày thứ 5 và sau đó giảm, sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0.05$) ở ngày 3 và 5 so với đối chứng. Kết quả cũng tương tự đối với nồng độ superoxide dismutase. Tuy nhiên, so với kết quả của Sarathi *et al.* (2008) thì hoạt tính respiratory burst tăng đến ngày thứ 10, sau đó bắt đầu giảm.

5 KẾT LUẬN

Kết quả ứng dụng cho thấy các qui trình phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tự nhiên bao gồm: định loại bạch cầu, hoạt tính phenoloxidase, hoạt tính respiratory burst và superoxide dismutase có thể ứng dụng để nghiên cứu đáp ứng miễn dịch trên tôm càng xanh cũng như những loài tôm khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beauchamp, C. and I. Fridovich, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44, 276–286.
- Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavdra, R. De Philippis and F. Ascencio, 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 353–366.
- Cornick, J. W. and J. E. Stewart, 1978 . Lobster (*Hommarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts and associated agglutinin activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 31, 194–203
- Herández-López J., T. S. Gollas-Galván, F. Vargas-Albores, 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemical Physiology* 113C, 61-66.
- Le Moullac G., M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard and P. L. Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 227-234.
- Oseko, N., T. T. Chuah, Y. Maeno, B. C. Kua and V. Palanisamy, 2006. Examination for Viral Inactivation of WSSV (White Spot Syndrome Virus) Isolated in Malaysia Using Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*). *JARQ* 40 (1), 93 – 97.
- Sarathi, M., A. Nazeer Basha, M. Ravi, C. Venkatesan, B. Senthil Kumar and A.S. Hameed, 2008. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 222-230.
- Söderhäll, K., L. Cerenius, 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, pp. 3-23.
- Song, Y. L. and Y. T. Hsieh, 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of micribicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Sung, H. H., H. J. Chang, C. H. Her, J. C. Chang and Y. L. Song, 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of intertebrate pathology* 71, 26-33.