

## KHẢ NĂNG PHÒNG BỆNH ĐÓM TRẮNG CỦA BÀO TỬ *Bacillus subtilis* BIỂU HIỆN GEN VP28 TRÊN TÔM SÚ (*Penaeus monodon*)

Hồng Mộng Huyền<sup>1</sup> và Trần Thị Tuyết Hoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 06/09/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

### Title:

Protection against white spot syndrome virus infection in *Penaeus monodon* by oral administration of VP28-*Bacillus subtilis*

### Từ khóa:

Tôm sú, *Bacillus subtilis*, VP28, đáp ứng miễn dịch

### Keywords:

*Penaeus monodon*, *Bacillus subtilis*, VP28, immune response

### ABSTRACT

Recombinant VP28 (rVP28) of WSSV has been shown in different expression systems such as Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*), gram-positive bacteria, insect's cell, yeast and silkworm. Many studies have been conducted assessing the impact of VP28 against WSSV on *Procambarus clarkii*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus japonicus*, *Litopenaeus vannamei*. In this study, *Bacillus subtilis* displaying VP28 on the spore surface was tested and used as a vaccine against WSSV on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The shrimp were fed by food containing *B. subtilis* spores displaying VP28 under CotB-VP28, CotB-GST-VP28 within 7 days, followed by a challenge experiment with WSSV. The effectiveness of the spore was assessed by: (i) the number of immunological parameters including total hemocyte count, hemocyte differential, phenoloxidase activity, and superoxide dismutase activity, and (ii) the survival rate of shrimps after being challenged with WSSV. The results showed that after 14 days of infection, shrimp fed with food containing CotB-VP28, CotB-GST-VP28 had a high survival rate compared to the control group, PY79. In particular, the relative percentage survival (RPS) was obtained in the group of shrimp fed with food containing CotB-VP28 at the highest level of 53.4%.

### TÓM TẮT

Protein tái tổ hợp VP28 (rVP28) của WSSV đã được thể hiện trong các hệ thống biểu hiện khác nhau như trong vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli*), vi khuẩn Gram dương, các tế bào côn trùng, nấm men và tằm. Đã có nhiều nghiên cứu đánh giá tác động tích cực của VP28 trên *Procambarus clarkii*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus japonicus*, *Litopenaeus vannamei* chống lại WSSV. Trong nghiên cứu này, bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28 được thử nghiệm và sử dụng như một loại vaccin giúp tôm sú (*Penaeus monodon*) kháng lại WSSV. Tôm sú được cho ăn thức ăn có chứa bào tử *B. subtilis* biểu hiện gen VP28 ở các dạng CotB-VP28, CotB-GST-VP28 trong vòng 7 ngày, sau đó cảm nhiễm với WSSV. Đánh giá hiệu quả của bào tử thông qua: (i) chỉ tiêu miễn dịch bao gồm chỉ tiêu tổng tế bào máu, phân loại tế bào máu, hoạt độ PO, hoạt độ SOD và (ii) tỉ lệ sống của tôm sau cảm nhiễm với WSSV. Kết quả ghi nhận: sau 14 ngày cảm nhiễm, tôm sú ăn thức ăn chứa CotB-VP28, CotB-GST-VP28, có tỉ lệ sống cao hơn nhóm đối chứng PY79. Trong đó, tỉ lệ bảo hộ tương đối (RPS) đạt được cao nhất với nhóm tôm cho ăn thức ăn chứa bào tử CotB-VP28 ở mức 53,4%.

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh đốm trắng do white spot syndrome virus (WSSV), là một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi tôm trên toàn thế giới. Bệnh xuất hiện đầu tiên ở Đài Loan vào năm 1992 (Chou *et al.*, 1995) và sau đó lan nhanh ra nhiều nước trên thế giới. Nghiên cứu phát hiện protein vỏ của WSSV, VP28, đóng vai trò như một protein gắn kết rất quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của WSSV lên vật chủ (van Hulten *et al.*, 2001). Theo Yi *et al.* (2004), protein vỏ đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của nhiều loại virus khác nhau. Về đặc điểm của protein VP28 - WSSV, có 5 vị trí có khả năng thực hiện glycosyl hóa đầu N, 2 vị trí glycosyl hóa ở vị trí O, 9 vị trí có thể thực hiện sự phosphoryl hóa và một vùng kỵ nước cực mạnh hiện diện ở đầu N của VP28. Ngoài ra, khả năng gắn kết của VP28 lên bề mặt tế bào cảm thụ còn phụ thuộc vào nồng độ pH. Vaccine giúp phòng bệnh đốm trắng điều chế từ protein vỏ VP28 đã được thử nghiệm trên nhiều đối tượng khác nhau. Witteveldt *et al.* (2004) sử dụng VP28 tái tổ hợp (rVP28) bao ngoài viên thức ăn và cho tôm sú (*Penaeus monodon*) ăn, phương pháp này cho kết quả bảo hộ khoảng 70% sau khi gây nhiễm tôm với WSSV. Ở nghiên cứu khác, tôm he Nhật Bản (*Penaeus japonicus*) sau thời gian 2 tuần sử dụng thức ăn có bổ sung vaccine điều chế rVP28 tạo khả năng bảo hộ khác nhau, từ 30% đến 70% (Caipang *et al.*, 2008). Như vậy, VP28 là một trong những protein tiềm năng: là thành phần chính của quá trình tạo vaccine, giúp phòng chống bệnh đốm trắng ở tôm nuôi, một trong những bệnh virus hiện nay chưa có biện pháp chữa trị hữu hiệu. Ngoài ra, hệ thống biểu hiện protein cũng ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả của VP28. Cụ thể, protein tái tổ hợp VP28 đã được thử nghiệm trong các hệ thống biểu hiện khác nhau bao gồm: *Escherichia coli* (Jha *et al.*, 2006), vi khuẩn Gram dương (Caipang *et al.*, 2008), các tế bào côn trùng, nấm men (Jha *et al.*, 2006) và tằm (Xu *et al.*, 2006). Tuy nhiên, thử nghiệm trên các hệ thống biểu hiện này không mang lại kết quả khả quan. Gần đây, vi khuẩn *Bacillus subtilis* là một trong những hệ thống giúp vận chuyển protein vào vật chủ được chú ý hiện nay. *B. subtilis* có khả năng tạo bào tử khi sống trong điều kiện bất lợi, nên việc chuyển gen VP28 vào *B. subtilis* rất có ý nghĩa như để lưu trữ, bảo quản hay phục vụ cho những nghiên cứu ứng dụng trên qui mô lớn. Do đó, thử nghiệm đánh giá khả năng phòng bệnh đốm trắng của bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28 trên tôm sú (*Penaeus monodon*) được thực hiện.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm: (i) Các loại bào tử (CotB-VP28, CotB-GST-VP28, PY79) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ enzyme và protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên; (ii) Mẫu WSSV từ bộ sưu tập vi sinh vật của Bộ môn Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản; (iii) Tôm sú có kích cỡ 4-7 g/con, được kiểm tra không nhiễm một số mầm bệnh phổ biến trên tôm với phương pháp PCR (WSSV, MBV, IHHNV).

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp chuẩn bị thức ăn có chứa bào tử:** Sử dụng lượng bào tử trộn với thức ăn viên công nghiệp đảm bảo đạt mật độ  $10^9$  cfu/g thức ăn. Sau đó áo ngoài viên thức ăn bằng lượng vừa đủ chất kết dính (2ml/100g thức ăn). Thức ăn được phơi khô tự nhiên và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

**Thí nghiệm cho ăn bào tử:** Tôm sú chia làm 4 nhóm (100 con/nhóm): (i) nhóm tôm ăn thức ăn có bổ sung CotB-VP28 (NT1), (ii) nhóm tôm cho ăn thức ăn có bổ sung bào tử thường PY79 (NT2), (iii) nhóm tôm cho ăn thức ăn có bổ sung CotB-GST-VP28 (NT3), và (iv) nhóm tôm ăn thức ăn không bổ sung bào tử (NT4). Tôm được cho ăn thức ăn bổ sung các dạng bào tử liên tục 7 ngày sau đó cảm nhiễm ngâm với dịch chiết WSSV ở liều gây chết tôm 75%.

**Phân tích các chỉ tiêu miễn dịch:** Tôm được thu ngẫu nhiên 3 con/bể, phân tích các chỉ tiêu miễn dịch tại thời điểm trước khi cho ăn bào tử, sau khi cho ăn bào tử 7 ngày (ngày 0 sau khi cảm nhiễm), và ngày 3 sau khi cảm nhiễm WSSV. Các mẫu tôm được phân tích các chỉ tiêu miễn dịch bao gồm: (i) xác định tổng số tế bào máu (Le Moullac *et al.*, 1997); định loại bạch cầu (Cornick và Stewart, 1978); (iii) xác định hoạt độ của phenoloxidase (PO) (Hernández-Lospez *et al.*, 1996) và (iv) xác định hoạt độ của superoxide dismutase (SOD) (Beauchamp và Fridovich, 1971).

**Tỉ lệ bảo hộ tương đối (Relative Percentage Survival - RPS):**  $RPS = (1 - A/B) \times 100$ , trong đó A là % tôm chết của nhóm cho ăn bào tử; B là % tôm chết của nhóm đối chứng tính đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

**Phương pháp xử lý số liệu:** Các số liệu được nhập liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. Sử dụng

chương trình SPSS 20.0 phân tích ANOVA 1 nhân tố ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Ảnh hưởng của thức ăn chứa bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28 lên các chỉ tiêu miễn dịch của tôm sú

Kết quả phân tích mẫu máu cho thấy tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt của tôm sú thí nghiệm trước khi cho ăn bào tử và ngày 0 sau khi cảm nhiễm (7 ngày ăn bào tử) không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ) trừ nghiệm thức NT1 (Hình 1). Tuy nhiên, kết quả này ở ngày 0 thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so

với ngày 3 sau khi cảm nhiễm. Bên cạnh đó, khi so sánh giữa các nghiệm thức với nhau ở ngày 0 thì nghiệm thức NT1 khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức NT2, NT3, NT4. Ngày 3 sau khi cảm nhiễm mặc dù có sự tăng lên về số lượng tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt ở tất cả các nghiệm thức, nhưng chỉ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở nghiệm thức NT1 (bào tử có biểu hiện gen VP28: CotB-VP28), NT3 (bào tử có biểu hiện gen VP28: CotB-GST-VP28) so với nghiệm thức NT2 (bào tử thường PY79), NT4 (thức ăn viên thường không trộn bào tử) (Bảng 1, Bảng 2).

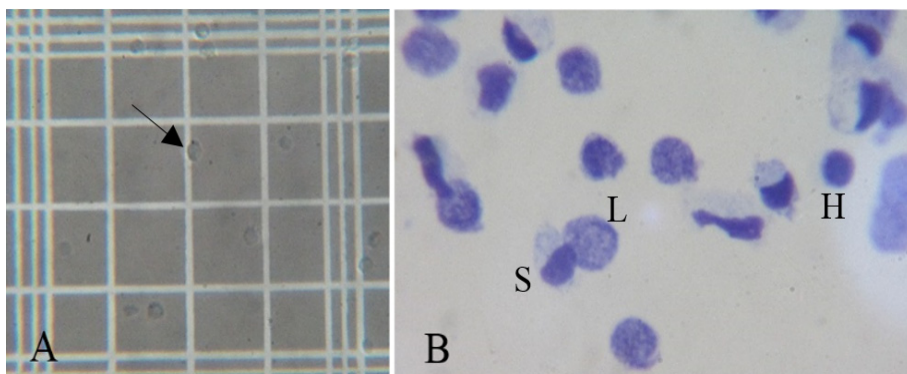
**Bảng 1: Sự thay đổi tổng tế bào máu của tôm sú thí nghiệm ( $\times 10^4 \text{tb/mm}^3$ )**

Nghiệm thức	Trước khi cho ăn bào tử	Ngày sau cảm nhiễm WSSV	
		Ngày 0	Ngày 3
NT1	0,99±0,06 <sup>A</sup>	1,98±0,05 <sup>aB</sup>	2,49±0,05 <sup>aC</sup>
NT2		1,03±0,02 <sup>bA</sup>	1,75±0,07 <sup>bB</sup>
NT3		1,09±0,09 <sup>bA</sup>	2,36±0,06 <sup>aB</sup>
NT4		1,05±0,11 <sup>bA</sup>	1,76±0,05 <sup>bB</sup>

**Bảng 2: Sự thay đổi số lượng bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt của tôm sú thí nghiệm ( $\times 10^4 \text{tb/mm}^3$ )**

Nghiệm thức	Trước khi cho ăn bào tử		Ngày cảm nhiễm			
			Ngày 0		Ngày 3	
	Có hạt	Không hạt	Có hạt	Không hạt	Có hạt	Không hạt
NT1	0,89±0,05 <sup>A</sup>	0,11±0,01 <sup>A</sup>	1,68±0,03 <sup>aB</sup>	0,22±0,00 <sup>aB</sup>	2,14±0,05 <sup>aC</sup>	0,31±0,02 <sup>aC</sup>
NT2			0,78±0,13 <sup>bA</sup>	0,11±0,00 <sup>bA</sup>	1,45±0,04 <sup>bB</sup>	0,19±0,02 <sup>bcB</sup>
NT3			0,98±0,10 <sup>bA</sup>	0,13±0,02 <sup>bA</sup>	1,68±0,28 <sup>abB</sup>	0,26±0,02 <sup>abB</sup>
NT4			0,86±0,02 <sup>bA</sup>	0,10±0,00 <sup>bA</sup>	1,28±0,20 <sup>bB</sup>	0,19±0,02 <sup>cB</sup>

Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c), trong cùng một hàng mang mẫu tự (A,B,C) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )



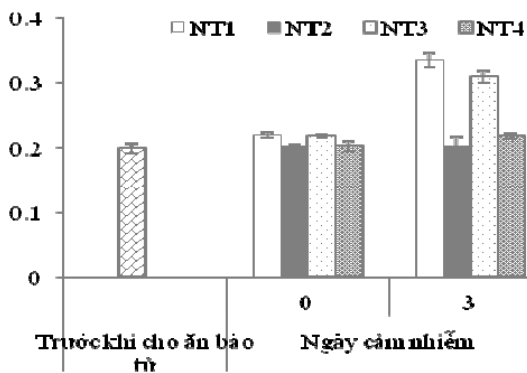
**Hình 1: Tế bào máu tôm sú chụp dưới kính hiển vi**

(A) Tế bào máu trên buồng đếm Neubauer (40X); (B) Tế bào máu nhuộm Giemsa; H (Hyaline cell - Bạch cầu không hạt), S (Semigranular cell - bạch cầu bán hạt), L (Large granular cell - Bạch cầu có hạt) (100X)

Kết quả phân tích hoạt độ PO trên tôm sú cho thấy: (i) trước khi cho ăn bào tử và ngày 0 sau khi cảm nhiễm WSSV không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

Đồng thời không có sự khác biệt giữa ngày 0 và ngày 3 sau khi cảm nhiễm ở nghiệm thức NT2 (bào tử thường PY79), NT4 (thức ăn viên thường không

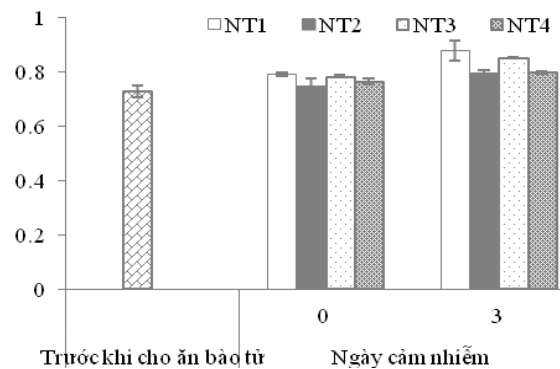
trộn bào tử); (ii) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) giữa ngày 0 và ngày 3 sau cảm nhiễm WSSV ở nghiệm thức NT1 (CotB-VP28), NT3 (CotB-GST-VP28). Bên cạnh đó, tại thời điểm ngày 3 sau khi cảm nhiễm hoạt độ PO tăng lên ở các nghiệm thức và chỉ số này tăng lên khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) ở nghiệm thức NT1, NT3 so với nghiệm thức NT2, NT4. Điều này có thể là khi WSSV tấn công vào cơ thể tôm thì tế bào bạch cầu thực hiện chức năng phagocytosis, thực bào, với lượng lớn WSSV thì kích thích bạch cầu tăng lên, đồng thời xuất hiện enzyme protease, hoạt hóa proPO thành hoạt độ PO, dẫn đến hoạt độ PO tăng lên (Hình 2).



Hình 2: Sự thay đổi hoạt độ PO của tôm sú (OD. 490 nm)

Như vậy, tôm có chế độ bổ sung thức ăn chứa bào tử *B. subtilis* biểu hiện gen VP28 liên tục 7 ngày cho thấy có sự tác động tích cực đến các chỉ tiêu miễn dịch ở tôm sú thí nghiệm. Cụ thể: có sự thay đổi có ý nghĩa số lượng bạch cầu có hạt, gia tăng hoạt độ PO, gia tăng hoạt độ SOD qua đó giúp cơ thể tôm sản sinh ra các đáp ứng miễn dịch chống lại WSSV.

Tương tự, kết quả phân tích hoạt độ SOD cho thấy: (i) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) ở thời điểm trước và sau khi cho ăn bào tử 7 ngày (ngày 0 sau khi cảm nhiễm); (ii) hoạt độ SOD của các nghiệm thức tăng lên vào ngày 3 sau khi cảm nhiễm WSSV, không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ) ở nghiệm thức NT2, NT4, nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở nghiệm thức NT1, NT3 so với ngày 0. Bên cạnh đó, khi so sánh giữa các nghiệm thức với nhau tại ngày 3 sau khi cảm nhiễm WSSV, nghiệm thức NT1 (CotB-VP28), NT3 (CotB-GST-VP28) cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với 2 nghiệm thức còn lại là NT2 (bào tử thường PY79), NT4 (thức ăn viên thường không trộn bào tử) (Hình 3).



Hình 3: Sự thay đổi hoạt độ SOD của tôm sú (OD. 560 nm)

### 3.2 Ảnh hưởng của thức ăn chứa bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28 lên tỉ lệ sống của tôm sú sau cảm nhiễm với WSSV

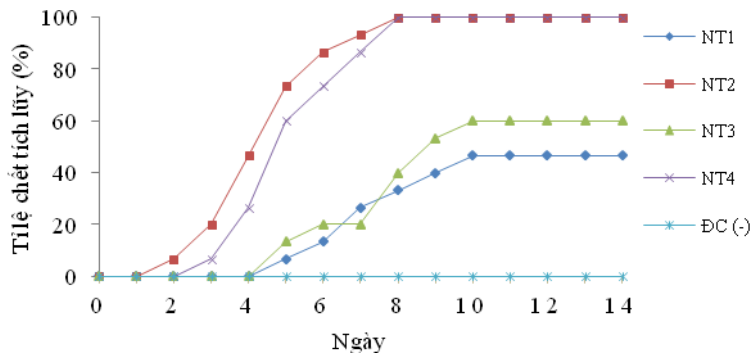
Sau thời gian bổ sung thức ăn có chứa bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28, tôm được gây cảm nhiễm với WSSV bằng phương pháp ngâm. Tôm chết trong thí nghiệm cảm nhiễm được ghi nhận với các dấu hiệu đỏ thân, xuất hiện các đốm trắng trên giáp đầu ngực và các đốm trên thân đặc biệt ở đốt thứ 5, 6 (Hình 4).



Hình 4: Dấu hiệu tôm sú sau khi cảm nhiễm với WSSV

(A) Đỏ thân; (B) Đốm trắng trên giáp đầu ngực





**Hình 5: Biểu đồ thể hiện tỉ lệ chết tích lũy của tôm sú sau 14 ngày cảm nhiễm**

Thí nghiệm cảm nhiễm được theo dõi liên tục trong vòng 14 ngày và tôm vẫn cho ăn thức ăn có chứa bào tử *B. subtilis* biểu hiện gen VP28. Kết quả cho thấy tỉ lệ chết tích lũy cao ở nghiệm thức NT2 (PY79), NT4 (thức ăn viên thường không trộn bào tử) với 100% vào ngày thứ 8, nghiệm thức NT1 (CotB-VP28) là 46,6%, nghiệm thức NT3 (CotB-GST-VP28) là 60% (Hình 5). Kết quả phân tích các chỉ tiêu tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt, hoạt độ PO, hoạt độ SOD của tôm sú cho thấy các giá trị này tăng lên khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) giữa ngày 0 và ngày 3 sau khi cảm nhiễm, điều đó chứng tỏ tôm sú có đáp ứng miễn dịch chống lại WSSV. Bên cạnh đó, phân tích thống kê cho thấy các chỉ tiêu này ở nghiệm thức NT1 (CotB-VP28), NT3 (CotB-GST-VP28) tăng cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức NT2 (PY79), NT4 (thức ăn viên thường không trộn bào tử). Tỉ lệ bảo hộ tương đối (RPS) đạt được cao nhất với nhóm tôm cho ăn thức ăn chứa bào tử CotB-VP28 (NT1) ở mức 53,4% sau khi cảm nhiễm tôm với WSSV bằng phương pháp ngâm. Khi thử nghiệm cùng loại bào tử (CotB-VP28; CotB-GST-VP28 và PY79) trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*), kết quả cũng ghi nhận bào tử CotB-VP28 cho kết quả tốt nhất với tỉ lệ bảo hộ tương đối là 47% (Anh *et al.*, 2014).

Năm 2004, Witteveldt *et al.* đã thực hiện thí nghiệm khảo sát khả năng chống bệnh đốm trắng ở tôm với loại vaccine được tạo ra từ VP19 và VP28 của WSSV. VP19 và VP28 đã được phát hiện là protein vỏ của WSSV (van Hulten *et al.*, 2001). Vaccine được trộn với thức ăn và bổ sung cho tôm trong 7 ngày sau đó, tiến hành cảm nhiễm bằng cách ngâm tôm trong nước biển chứa WSSV. Kết quả cho thấy: ở nhóm tôm được bổ sung vaccine chứa VP28 có tỉ lệ chết tích lũy là 30%; nhóm tôm được bổ sung vaccine chứa hỗn hợp VP28 + VP19

có tỷ lệ chết tích lũy 50% thấp hơn so với nhóm đối chứng (tôm được bổ sung vaccine là các vector rỗng và nhóm đối chứng dương). Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu cũng khảo sát tìm hiểu thời điểm khởi đầu và thời gian bảo hộ của vaccine. Khảo sát tiến hành ở nhóm tôm được bổ sung vaccine chứa VP28 (vaccine cho tỷ lệ tôm sống cao). Nhóm tôm này được chia làm 3 nhóm nhỏ, tiến hành cảm nhiễm ở các thời điểm khác nhau 3, 7 và 21 ngày sau khi ngừng bổ sung vaccine. Kết quả cho thấy: tỉ lệ sống cao đáng kể ở các nghiệm thức 3 và 7 ngày sau khi bổ sung vaccine (64% và 77%) trong khi ở nghiệm thức 21 ngày chỉ đạt tỉ lệ sống 21%. Điều này chứng tỏ hiệu quả bảo hộ của vaccine đã giảm sau thời gian ngừng bổ sung.

Nghiên cứu khảo sát khả năng giúp kháng bệnh đốm trắng ở tôm nhờ vào protein vỏ VP28 cũng được nghiên cứu trên đối tượng tôm *F. Chinensis* (Fu *et al.*, 2010). Kết quả tỉ lệ sống tích lũy của tôm sử dụng bào tử *B. subtilis* biểu hiện rVP28 (rVP28-bs) là 83,3%, cao hơn đáng kể ( $p < 0,001$ ) so với nhóm tôm sử dụng *E. coli* biểu hiện rVP28 (rVP28-E21) vào ngày cảm nhiễm thứ 14. Ngoài ra, hoạt độ phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD) và nitric oxide synthase (iNOS) trong máu tôm thử nghiệm cũng có sự thay đổi. Kết quả ghi nhận việc bổ sung rVP28-bs dẫn đến sự gia tăng rõ rệt nhất của iNOS ( $p < 0,001$ ). Ngoài ra, tác giả kiểm tra tỉ lệ bảo hộ của VP28 tại các thời điểm khác nhau, đối với tôm sau 7 ngày dừng cho ăn cho tỉ lệ sống 46,4-50%, và chỉ đạt 30-33,3% sau 21 ngày dừng cho ăn. Ngoài ra, ở đối tượng tôm hùm nước ngọt (*Procambarus clarkii*), việc bổ sung CotB-VP28 cho tỉ lệ sống cao 37,9% và CotC-VP28 là 44,8% so với nhóm tôm không được cho ăn thức ăn chứa VP28 (10,3%) sau khi cảm nhiễm với WSSV (Ning *et al.*, 2011). Những kết quả này cho thấy khi cho tôm ăn thức ăn có bổ sung protein VP28, tôm sẽ có khả năng chống lại

WSSV và đồng thời loại thức ăn này có ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch không đặc hiệu của tôm. Các kết quả thí nghiệm và tham khảo cho thấy phương thức tạo vector mang gen biểu hiện VP28, liều lượng bổ sung cũng như thời gian bổ sung sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả của quá trình đáp ứng miễn dịch giúp tôm chống lại WSSV.

#### 4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu bước đầu ghi nhận ảnh hưởng tích cực của thức ăn có chứa bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28 đến khả năng phòng chống bệnh đốm trắng trên tôm sú. Trong đó, bào tử CotB-VP28 cho kết quả khả quan hơn so với bào tử CotB-GST-VP28 về sự thay đổi ở các chỉ tiêu miễn dịch và tỉ lệ sống của tôm sau khi cảm nhiễm ngấm với WSSV. Tỉ lệ bảo hộ tương đối (RPS) đạt được cao nhất với nhóm tôm cho ăn thức ăn chứa bào tử CotB-VP28 ở mức 53,4%.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu thông qua đề tài cấp nhà nước mã số KC.04.09/11-15.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anh, T.V.N., Cuong, K.P., Huong, T.T. P., Hang, L.P., Anh, H.N., Lua, T.D., Hong, A.H., Simon, M.C., Tuan-Nghia, P, 2014. *Bacillus subtilis* spores expressing the VP28 antigen: a potential oral treatment to protect *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome. FEMS Microbiol Lett 358(2):202-8.
2. Beauchamp, C., and I. Fridovich, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 44:276-286.
3. Caipang, C.M.A., N. Verjan, E.L. Ooi, H. Kondo, I. Hirono, T. Aoki, H. Kiyono, and Y. Yuki, 2008. Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 Expressed in *Brevibacillus brevis*. Fish and Shellfish Immunology. 25: 315-320.

4. Chou, H.Y., C.H. Wang, H.C. Chiang, C.F. Lo, 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in culture penaeid shrimp in Taiwan. Diseases Aquatic Organisms. 23:165-173.
5. Cornick, J.W. and J.E. Stewart, 1978. Lobster (*Homarus ameri-canus*) hemocytes: classification, differential counts, and associated agglutinin activity. J Invertebr Pathol. 3:194-203.
6. Fu, L.L., 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. 28:49-55.
7. Hernández-Lospez, T.S. Gollas-Galván and F. Vargas-Albores, 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp Biochem Physiol. 113C:61-66.
8. Jha, R.K. Xu, Z.R. Shen, J. Bai, S.J. Sun, JY and W.F. Li, 2006. The efficacy of recombinant vaccines white spot syndrome virus against in *Procambarus clarkia*. Immunology Letters. 105: 68-76.
9. Le Moullac, G., B. Klein, D. Sellos and A. VanWormhoudt, 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and a-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 208:107-125.
10. Ning, D., X. Leng, Q.Li and W. Xu, 2011. Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. J Appl Microbiol. 111(6):1327-1336.
11. Nonaka, I and N. Konno, 1998. The concept of 'ba': building a foundation for knowledge creation. California Management Review. 40(3), 40-54.

12. van Hulst M.C.W., J. Witteveldt, M. Snippe & J.M. Vlak, 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 285: 228–233.
13. Witteveldt, J., Cifuentes, C.C., Vlak, J.M. and van Hulst, M.C., 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol* 78: 2057–2061.
14. Xu, Z., H. Du, Y. Xu, J. Sun, and J. Shen, 2006. Crayfish (*Procambarus clarkii*) protected Against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins Expressed in silkworms. *Aquaculture*. 253: 179-183
15. Yi, G., Z. Wang, Y. Qi, L. Yao, J. Qian and L. Hu, 2004. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration in to shrimp cells. *J Biochem Mol Biol*. 37:726-734.