

**TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF BLACK TIGER SHRIMP  
HAEMOCYTES IN RESPONSE TO YELLOW HEAD VIRUS INFECTION**

**LERDCHAI CHINTAPITAKSAKUL**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2003**

**ISBN 974-04-3968-3  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การเปลี่ยนแปลงระดับทรานสคริปต์ในเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำภายใต้การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง  
(TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF BLACK TIGER SHRIMP'S HEMOCYTES IN  
RESPONSE TO YELLOW HEAD VIRUS INFECTION)

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล 4336305 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D., Duncan R. Smith, Ph.D., อภินันท์  
อุดมกิจ, Ph.D.

### บทคัดย่อ

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ปัจจุบันนี้มีการผลิตกุ้งกุลาดำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงหลายหมื่นแห่งในแถบชายฝั่งของเอเชียและแปซิฟิก ด้วยขนาดตลาดที่มีขนาดใหญ่มากถึงหลายพันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ความเสียหายต่อกุ้งที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มด้วยเชื้อโรคต่างๆจึงสูงมากตามไปด้วย เช่นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ไวรัสโรคจุดขาว เป็นต้น ปัจจุบันเราเชื่อว่าระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคเหมือนในสัตว์ระดับสูง ประกอบกับไม่มีผลงานวิจัยตีพิมพ์ที่เกี่ยวกับการตอบสนองของกุ้งในระดับยีนส์หรือโมเลกุลต่อไวรัสของกุ้ง ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นการสำรวจครั้งแรกในระดับยีนส์ว่า จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับทรานสคริปต์ของเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งใดบ้างที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เหตุที่ศึกษาจากเซลล์เม็ดเลือดเพราะเซลล์เม็ดเลือดเป็นเซลล์หลักในระบบป้องกันตัวของกุ้ง การศึกษาเริ่มต้นจากการคัดเลือก cDNA โคลนที่ทราบลำดับรหัสดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ ๕๖ โคลน แล้วเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจากแต่ละโคลนโดยวิธี พีซีอาร์ พร้อมทั้งหาคำขึ้นดีเอ็นเอดังกล่าวลงบนเมมเบรนเป็นรูปแบบกริด ต่อมานำเมมเบรนนี้ไปใช้ไฮบริไดซ์กับโพรบ ที่เตรียมมาจาก mRNA และติดสลาด้วยกัมมันตภาพรังสี ( $^{32}$ P) สามกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งคือ เซลล์เม็ดเลือดจากกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทำอะไร เซลล์เม็ดเลือดจากกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยบัฟเฟอร์ไปแล้ว ๒๔ ชั่วโมง และ เซลล์เม็ดเลือดจากกุ้งในกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองไปแล้ว ๒๔ ชั่วโมง ผลจากการทดลองที่แสดงว่ามีจุดบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์มีความเข้มเปลี่ยนไป ในแง่เพิ่มขึ้นหรือลดลง เทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อนำไปทำซ้ำใหม่ จุดที่ให้ผลในการทดลองสอดคล้องกันสองครั้ง ผลคือ โคลนสองโคลนที่มีการลดระดับทรานสคริปต์อย่างชัดเจนได้แก่ โคลนหมายเลข PMC0252 (Clathrin light chain) และ PMC0238 (Selenoprotein W) และอีกสองโคลนที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นได้แก่ โคลนหมายเลข PMCP423 (Innexin or prp33) และ NF229 (Chitinase) ต่อมาเราได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PMC0238 เพิ่มเติมจากที่มีรหัสบางส่วนอยู่แล้วจากปลาย 3' โดยทำสองซ้ำ และพบว่ารหัสดีเอ็นเอที่ปลายด้าน 3'UTR มีบริเวณรหัสที่มีรูปแบบเฉพาะในกลุ่มของยีน Selenoprotein W

**TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF BLACK TIGER SHRIMP HEMOCYTES IN RESPONSE TO YELLOW HEAD VIRUS INFECTION**

LERDCHAI CHINTAPITAKSAKUL 4336305 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: BURACHAI SONTHEYANON, Ph.D., DUNCAN R. SMITH Ph.D., APINUNT UDOMKIT, Ph.D.

**ABSTRACT**

Black tiger prawn, *Penaeus monodon*, is one of the world's economically most important marine organism. It is currently mainly supplied by some ten thousand aquaculture farms in Asia and the Pacific coastal regions. With the multibillion dollar size of the shrimp business, heavy losses of farmed shrimp have resulted from a number of pathogens, including yellow-head virus, and white spot syndrome virus. Despite numerous studies on viruses and some understanding of the functions of the shrimp's innate immune system, no literature has been available on the shrimp host response at the molecular level to an infecting virus. This study aimed to survey possible transcriptional alterations of the shrimp's haemocytes, the major defense related cells, after they were infected by yellow-head virus in the laboratory. A collection of cDNA clones of putatively known DNA sequence were selected from our laboratory's cDNA libraries to be used as hybridization targets in a grid pattern. DNA inserts from 96 cDNA clones were prepared by polymerase chain reaction, and then spotted into a grid pattern on GeneScreen *Plus* nylon membranes. They were then hybridized with radioactively-labeled probes prepared from mRNA isolated from three haemocytes preparations: 1) collected at 0 hour with no injection; 2) collected 24-hours after buffer injection at 0 hour; and 3) and 24-hours after yellow head virus infection at 0 hour. Spots showing different intensities in autoradiograms among the three sets of probes were confirmed in a second experiment. Results from the two sets of experiments showed that transcripts probed by clones PMC0252 and PMC0238, of putatively known identities as clathrin light chain and selenoprotein W respectively, decreased, while clones PMCP423 and NF229 also putatively known identities as innexin (or prp33) and chitinase respectively, increased. We also confirmed the cDNA sequence of the PMC0238, in particular the 3' untranslated region revealing this sequence showed the presence of a conserved sequence motif characteristic of selenoprotein W. In this study I found that in response to infection by yellow-head virus the black tiger prawn's amount of mRNA encoding innexin (or prp33) and chitinase increased and amount of mRNA encoding clathrin light chain and selenoprotein W decreased.

**KEY WORDS:** MACROARRAY HYBRIDIZATION / *Penaeus monodon* / SELENOPROTEIN W / YELLOW HEAD VIRUS / BLACK TIGER PRAWN / TRANSCRIPTIONAL RESPONSE

94 P. ISBN 974-04-3968-3