

**RNA INTERFERENCE MEDIATED INHIBITION OF TAURA  
SYNDROME VIRUS REPLICATION**

**VARUNYA VUDTIJUN**

**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**

**2006**

**ISBN 974-04-6843-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสทอราด้วยกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน  
(RNA INTERFERENCE MEDIATED INHIBITION OF TAURA SYNDROME  
VIRUS REPLICATION)

วริญญา วุฒิจันทร์ 4636873 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิฑูรย์ ธีระโสภณ, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.,  
นาริรัตน์ วิเศษกุล, DVM, Ph.D.

บทคัดย่อ

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Penaeus vannamei*) เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย โรคติดเชื้อที่สำคัญของกุ้งขาวแปซิฟิกคือโรคจากไวรัสทอรา ซึ่งที่ผ่านมาได้ทำความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งทั่วโลก ในปัจจุบันนี้ยังไม่พบวิธีการรักษาหรือวัคซีนสำหรับโรคติดเชื้อไวรัสทอราในกุ้งทะเล

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้แยกเชื้อไวรัสทอราจากตัวอย่างกุ้งจากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งขาว 3 แห่งในประเทศไทย การวิเคราะห์ลำดับเบสและกรอบการอ่านเปิด (open reading frame) ของยีนที่ 1 (ORF1) ของไวรัสทอราแสดงให้เห็นว่าในบริเวณนี้ของจีโนมไวรัสมีการอนุรักษ์สูง (conserved region) มาก ลำดับเบสใน ORF1 บางส่วนถูกเลือกเป็นบริเวณเป้าหมายสำหรับศึกษาการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโดยเทคนิคกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เรียกว่า RNAi เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้กลไก RNAi นี้ป้องกันโรคติดเชื้อจากไวรัสทอราในกุ้งขาวแปซิฟิก การทดลองในกุ้งขาวแปซิฟิกโดยการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีนของไวรัสทอรา (TSV-specific dsRNA) เข้าสู่ตัวกุ้ง จากนั้นติดตามว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้หรือไม่ ซึ่งพบว่ากุ้งที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีนที่ไม่ใช่ยีนโปรตีนโครงสร้าง (nonstructural gene) ของไวรัสทอรา คือยีน helicase protease และ polymerase ก่อนได้รับเชื้อไวรัส พบว่าระดับของเชื้อไวรัสทอราในกุ้งกลุ่มนี้ลดลงเมื่อเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ โดยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีน helicase ของไวรัสพบมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสมากที่สุด ขณะที่อาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีน polymerase นั้นแสดงความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้น้อยที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีนของไวรัสทอราสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ในกุ้งที่ติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Robalino และคณะ ที่พบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ทั้งที่มีลำดับเบสจำเพาะและไม่จำเพาะนั้นแสดงความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสในกุ้งขาวได้

**RNA INTERFERENCE MEDIATED INHIBITION OF TAURA SYNDROME VIRUS REPLICATION**

VARUNYA VUDTIJUN 4636873 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : WITON TIRASOPHON, Ph.D.,  
SAKOL PANYIM, Ph.D., NAREERAT VISESHAKUL, DVM, Ph.D.**ABSTRACT**

Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) is an economically important farmed penaeid shrimp species in many countries, including Thailand. One of the most important diseases of the white shrimp is caused by Taura syndrome virus (TSV), which has recently affected shrimp cultivation throughout the world. At present, there is no known treatment or vaccine available for this viral disease.

TSV were isolated from three different cultivation areas of Thailand. Analysis of nucleotide and deduced amino acid sequences in open reading frame 1 (ORF1) of the TSV revealed that this region of the viral genome is highly conserved with overall identity. Subregions of the ORF1 (helicase, protease and polymerase) were chosen as targets for RNAi mediated viral suppression study. The feasibility of RNAi-based technique to prevent TSV infection was assessed in the pacific white shrimp. Shrimps were injected with TSV specific dsRNAs, followed by virus infection. Shrimp treated with specific dsRNA targeting the nonstructural gene of TSV (ORF1) showed a reduction in the viral level as compared with untreated shrimp. The dsRNA targeting helicase domain exhibited the strongest inhibitory effect while the domain targeting polymerase exhibited the least effect. Robalino *et al.* found that either virus sequence-specific or nonspecific dsRNA could afford antiviral immunity in shrimp. In agreement, these results suggested that virus specific dsRNAs could suppress TSV replication in white shrimp.

**KEY WORDS:** *Penaeus vannamei* / TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) / RNA INTERFERENCE (RNAi) / DOUBLE-STRANDED RNA (dsRNA) / RT-PCR

113 P. ISBN 974-04-6843-8