DEVELOPMENT OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHODS USING A SIMPLE TURBIDIMETER FOR DETECTION OF TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) AND WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

WANSADAJ JAROENRAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

DEVELOPMENT OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHODS USING A SIMPLE TURBIDIMETER FOR DETECTION OF TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) AND WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

WANSADAJ JAROENRAN 5036932 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: TIMOTHY WILLIAM FLEGEL, Ph.D., WANSIKA KIATPATHOMCHAI, M.Sc., ADISORN TUANTRANONT, Ph.D., IDSADA MUNGSANTISUK, Ph.D.

ABSTRACT

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a nucleic acid amplification method that allows the synthesis of large amounts of DNA in a short time with high specificity. Since a white magnesium pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) precipitate is a characteristic by-product of LAMP reactions, a simple turbidimetric, end-point detection method was devised and tested for the detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) by spectroscopic measurement of the LAMP reaction precipitate. The device incorporated a heating block that maintained the optimal temperature of 63ºC for the duration of the 25 µl LAMP reaction performed in a 0.2 ml tube. The temperature control and the turbidity measurements of this apparatus were sufficiently uniform for conducting LAMP reactions and monitoring the turbidity. The optimal conditions for TSV-RT-LAMP and WSSV-LAMP were 63°C at 30 min. and 63°C at 45 min., respectively. Using these conditions, LAMP-turbidity measurement revealed comparable sensitivity to that of LAMP-AGE, LAMP-LFD and nested PCR. Cross reactions with other shrimp viruses as templates were not found, indicating that the LAMP methods were highly specific to both TSV and WSSV. Combining 10 min. for nucleic acid preparation by a rapid method with 30-45 min. for LAMP amplification followed by turbidity measurement resulted in a total assay time of less than 1 h compared to 4-8 hrs. for the nested PCR. In addition, use of the turbidimeter yielded results immediately at the end of the LAMP reaction, without the need to open the reaction tube (avoidance of contamination) or to add further reagents. Thus, LAMP plus turbidity measurement constitutes a platform for the development of more rapid and user-friendly detection of shrimp viruses in the field without risk of amplicon contamination.

KEY WORDS: TSV/ WSSV/ LAMP-TURBIDITY MEASUREMENT/ LAMP-LFD

95 pages.

Copyright by Mahidol University

การพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และเครื่องมือตรวจวัดความขุ่นสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคทอร่า (TSV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV)

DEVELOPMENT OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHODS USING A SIMPLE TURBIDIMETER FOR DETECTION OF TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) AND WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

วันเสด็จ เจริญรัมย์ 5036932 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย, M.Sc., อดิสร เตือนตรานนท์, Ph.D., อิษฎา มุ่งสันติสุข, Ph.D.

บทคัดย่อ

แลมป์เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำนวนมากโดยใช้เวลาสั้นและเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง ข้อได้เปรียบของแลมป์คือมีความขุ่นของตะกอนแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตเกิดขึ้น ซึ่งเป็นตัวชี้ว่ามีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจไวรัสทอร่าและไวรัสตัวแดงดวงขาวในภาคสนามโดยการวัดความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาแลมป์โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นแบบง่าย เครื่องมือดังกล่าวประกอบด้วยส่วนควบคุมอุณหภูมิและส่วนวัดความขุ่นที่สามารถวัดความขุ่นที่เกิดขึ้นได้ทันทีหลังจากที่ปฏิกิริยาสิ้นสุดลง จากการทดลองพบว่าระบบควบคุมอุณหภูมิและระบบตรวจวัดความขุ่นของเครื่องมือดังกล่าวมีความแม่นยำและเสถียรมากพอสำหรับการตรวจไวรัสทั้งสองชนิด โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแลมป์ในการตรวจเชื้อไวรัสทอร่าและไวรัสตัวแดงดวงขาว คือที่ 63°C 30 นาที และ 63°C 45 นาทีตามลำดับ และเมื่อทดลองใช้ไวรัสชนิดอื่นเป็นสารตั้งต้น ไม่พบค่าความขุ่นเกิดขึ้น แสดงว่าเทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะสูง นอกจากนี้การวัดความขุ่นของปฏิกิริยาแลมป์ยังมีความไวเทียบเท่ากับการดูผลโดยเทคนิคการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า หรือเทคนิคการดูผลด้วยแผ่นทดสอบ LFD นอกจากนี้ยังมีความไวเทียบเท่ากับเทคนิค nested-PCR ด้วย และเมื่อใช้วิธีสกัดสารพันธุกรรมอย่างง่ายร่วมกับเทคนิคดังกล่าวพบว่าสามารถลดเวลาในการตรวจให้น้อยกว่า 1 ชั่วโมง ในขณะที่เทคนิค nested-PCR ต้องใช้เวลา 4-8 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้นการตรวจสอบผลผลิตแลมป์ด้วยการวัดความขุ่นยังสามารถทำได้โดยอัตโนมัติหลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดลงโดยไม่ต้องเปิดหลอดทดลองเพื่อเติมสารเคมีใดๆที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นได้ จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสกุ้งในภาคสนาม

95 หน้า

Copyright by Mahidol University