# DEVELOPMENT OF DOUBLE-STRANDED RNA-DELIVERY SYSTEM FOR CONTROL OF LAEM-SINGH VIRUS (LSNV) IN THAI *PENAEUS MONODON*

**THITIPORN THAMMASORN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT**
**OF THE REQUIREMENTS FOR**
**THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)**
**FACULTY OF GRADUATE STUDIES**
**MAHIDOL UNIVERSITY**
**2013**

Copyright by Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

DEVELOPMENT OF DOUBLE-STRANDED RNA-DELIVERY SYSTEM FOR CONTROL OF LAEM-SINGH VIRUS (LSNV) IN THAI *PENAEUS MONODON*

THITIPORN THAMMASORN 5436694 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUPARERK BORWORNPINYO, Ph.D., VANVIMON SAKSMERPROME, Ph.D., SIRIPONG THITAMADEE, Ph.D., BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, M.D. Ph.D.

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) technology through the trigger of double-stranded RNA (dsRNA) has been applied to inhibit viral replication in penaeid shrimp. In this study, we have developed a new methodology to deliver dsRNA for controlling Laem-Singh virus (LSNV), a causative agent of Monodon Slow Growth Syndrome in *Penaeus monodon* (*P. monodon*). First, the transformed *Escherichia coli (E. coli*) expressing red fluorescent protein (RFP) was tested in the *Artemia* enrichment process. RFP signals detectable in the gut of *Artemia* under confocal microscope were evident for the successful encapsulation. Second, the *Artemia* enrichment process was performed using *E. coli* producing LSNV-specific dsRNA. By reverse transcription-PCR (RT-PCR), dsRNA-LSNV was detected in *Artemia* after enriching with 4.3 x $10^{11}$ CFU of *E. coli* expressing dsRNA-LSNV for 2 hours. *Artemia* containing dsRNA-LSNV were subjected to the feeding test with *P. monodon* postlarvae 1-15. According to RT-PCR analysis, 38% and 74% LSNV-infected shrimp were observed in the dsRNA-treated and control groups, respectively. Quantitative RT-PCR indicated that a number of LSNV copies in most of the treated shrimp were, at least, 1000-fold lower than the untreated controls. During 11-17 weeks after feeding, the average body weight of the treated group was markedly increased relative to the control group. These results suggest that feeding shrimp with the dsRNA-enriched *Artemia* can eliminate LSNV infection, which is the cause of retarded growth in *P. monodon*. An additional investigation on feed formulated with dsRNA-LSNV suggests the potential of this method for delivering dsRNA to juvenile shrimp. In conclusion, therapeutic dsRNA can be delivered to post larval and juvenile shrimp via *Artemia* enrichment and feed formulation, respectively.

KEY WORDS: PENAEUS MONODON, LAEM-SINGH VIRUS (LSNV), DOUBLE-STRANDED RNA (DSRNA), ORAL DELIVERY, *ARTEMIA*

73 pages

Copyright by Mahidol University

การพัฒนาระบบการส่งผ่านอาร์เอ็นเอสายคู่เพื่อใช้ในการป้องกันไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ

DEVELOPMENT OF DOUBLE-STRANDED RNA-DELIVERY SYSTEM FOR CONTROL OF LAEM-SINGH VIRUS (LSNV) IN THAI *PENAEUS MONODON*

ฐิติพร ธรรมสอน 5436694 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ศุภฤกษ์ บวรภิญโญ, Ph.D., วรรณวิมล ศักดิ์เสมอพรหม, Ph.D., สิริพงษ์ ฐิตะมาดี, Ph.D., บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, M.D. Ph.D.

## บทคัดย่อ

กระบวนการ RNA interference (RNAi) ซึ่งอาศัยการทำงานของอาร์เอ็นเอสายคู่ ได้มีการประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งอย่างกว้างขวาง โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาระบบการส่งผ่านอาร์เอ็นเอสายคู่ขึ้น เพื่อป้องกันไวรัสแหลมสิงห์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโตช้าในกุ้งกุลาดำ เริ่มต้นจากการทดสอบการส่งผ่านแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร red fluorescent protein (RFP) เข้าสู่อาร์ทีเมีย โดยพบสัญญาณสีแดงของสาร RFP ภายในลำไส้ของอาร์ทีเมียเมื่อส่องใต้กล้อง confocal ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความสำเร็จในการนำส่งสารโดยใช้อาร์ทีเมียเป็นตัวกลาง ในส่วนที่สองคือการใช้อาร์ทีเมียเป็นตัวกลางในการส่งผ่านอาร์เอ็นเอเข้าสู่กุ้ง จากวิธี reverse-transcription PCR (RT-PCR) พบสารอาร์เอ็นเอสายคู่ ภายในอาร์ทีเมียที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่จากแบคทีเรียปริมาณ 4.3 x $10^{11}$ CFU เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านทานไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้ง ได้ทำการให้อาร์ทีเมียที่มีอาร์เอ็นเอสายคู่แก่กุ้งในระยะ postlarvae (PL) 1 ถึง PL15 ผลการทำ RT-PCR พบไวรัสในกุ้งร้อยละ 38% และ 74% ในกุ้งกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่ากุ้งที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่มีปริมาณไวรัสที่น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับถึง 1000 เท่า สำหรับน้ำหนักกุ้งพบว่าสัปดาห์ที่ 11-17 หลังจากได้รับอาร์ทีเมีย กุ้งที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการส่งผ่านอาร์เอ็นเอสายคู่โดยผ่านอาร์ทีเมียให้ผลในการกำจัดไวรัสแหลมสิงห์ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การใช้อาหารเม็ดซึ่งมีส่วนผสมของแบคทีเรียที่มีอาร์เอ็นเอสายคู่แสดงผลในการลดลงของไวรัสแหลมสิงห์ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักกุ้งเช่นกัน จากการพัฒนาระบบการส่งผ่านสารอาร์เอ็นเอสายคู่นี้ สามารถส่งผ่านอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าสู่กุ้งในระยะ PL และ juvenile โดยการใช้อาร์ทีเมียและอาหารเม็ดเป็นตัวกลางในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่

73 หน้า

Copyright by Mahidol University