LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

b1079300x

DEVELOPMENT OF A NON RADIOACTIVE DNA PROBE METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF BACULOVIRUS IN THE BLACK TIGER PRAWN

KANCHANA DOKLADDA

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1997

ISBN 974-589-100-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

T16d

3736276 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORD : DNP-11-dUTP/POLYMERASE CHAIN REACTION/DOT BLOT HYBRIDIZATION/*IN SITU* HYBRIDIZATION

KANCHANA DOKLADDA : DEVELOPMENT OF A NON RADIOACTIVE DNA PROBE METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF BACULOVIRUS IN THE BLACK TIGER PRAWN. THESIS ADVISOR : PICHIT TOSUKHOWONG, Ph.D., PRAYAD KOMARATAT, Ph.D. 79 p. ISBN 974-589-100-2

DNP-11-dUTP (6(2,4 dinitrophenyl)-ε-aminocaproyl[5-(3-amino)allyl] dUTP was synthesized from dUTP by known reactions. The side chain was introduced by converting dUTP to aminoallyl dUTP with the yield of 16 percent. The final product was obtained by linking the amino end of aminoallyl dUTP with DNP-aminocaproic acid -N-hydroxy succinimide ester, the latter compound was synthesized from caproic acid, FDNB and N-hydroxy succinimide. The product was purified by Sephadex-G15 gel filtration and DEAE-cellulose column chromatography. It was characterized by UV-visible absorption spectrum which has maximum wavelengths at 365 nm and 238 nm and about 2 moles of acid labile phosphate per mole of nucleotide (calculated from reported molar extinction of 16000 at 360 nm).

DNP-11-dUTP was incorporated into target sequence of DNA of SEMBV virus in Bluescribe M-13 plasmid by PCR. The ratio of DNP-11-dUTP to dTTP 1:10 or 1:5 gave the same incorporation by PCR as the control judging from agarose gel electrophoresis. The incorporation result was also confirmed by enzyme immuno assaywith rabbit anti DNP antibody, followed by goat anti rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase.

By using DNP-11-dUTP labeled PCR product 5 pg of Bluescribe M-13 plasmid containing SEMBV DNA can be detected in dot blot hybridization.

Tissue from black tiger prawn infected with SEMBV virus was tested for the virus by *in situ* hybridization technique. Probe labeled with 1:5 of DNP-11-dUTP to dTTP or 1:10 ratio gave positive test.

In conclusion DNP-11dUTP can be conveniently synthesized and DNA probe with this nucleotide analogue can be used to detect target DNA by *in situ* hybridization technique.

Copyright by Mahidol University

3736276 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

กาญจนา ดอกลัดดา : การพัฒนาระบบการตรวจวัดยีน โดยไม่ใช้สารรังสี สำหรับตรวจวินิจฉัย บาคิวโลไวรัส ในกุ้งกุลาดำ(DEVELOPMENT OF A NON RADIOACTIVE DNA PROBE METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF BACULOVIRUS IN THE BLACK TIGER PRAWN) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พิชิต โตสุโขวงศ์, Ph.D., ประหยัด โกมารทัต,Ph.D. 79 หน้า 974-589-100-2

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการสังเคราะห์ DNP-11-dUTP(6(2,4 dinitrophenyl)-ε-aminocaproyl [5(3-amino)allyl] dUTP ขึ้นโดยการเชื่อมปลาย อะมิโนของ aminoallyl dUTP เข้ากับปลาย carboxyl ของ DNP-aminocaproic acid -N-hydroxysuccinimide ester ในการสร้าง aminoallyl dUTP ประกอบด้วยปฏิกิริยาการเติมหมู่ปรอทเข้าที่ คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ dUTP (mercuration) และปฏิกิริยาการแทนที่อะตอมของปรอทด้วย allylamine สารตัวหลัง สร้างขึ้นมาได้ จาก aminocaproic acid, FDNB และ N-hydroxysuccinimide DNP-11-dUTP ที่สร้างขึ้นสามารถทำให้บริสุทธ์ โดย Sephadex G-15 gel filtration และ DEAE-cellulose column chromatography DNP-11-dUTP นี้ เมื่อวัดการดูดแสงที่ช่วงอุลทราไวโอเลต และช่วงที่ตามองเห็น จะมีการดูดแสงสูงสุดที่ 360 nm และ238 nm และมีฟอตเฟตที่สลายตัวในกรด ประมาณ2 โมล ต่อ โมลของนิวคลีโอไทด์ (จำนวนโมลของนิวคลีโอไทด์คำนวณจาก molar extinctionของ DNPที่ 360 nm ซึ่ง เท่ากับ 16000)

DNP-11dUTP สามารถเข้าสู่ DNA probe (DNA ของ SEMBV ไวรัสใน Bluescribe-M13โดยเทคนิค PCR เมื่อใช้ปริมาณของ DNP-11-dUTPต่อ dTTP 1:10 (10%)หรือ 1:5 (20%) จะได้ปริมาณ DNAใกล้เคียงกับในปฏิกิริยาที่ไม่ใช้ DNP-11dUTP (control) ซึ่งเห็นได้จาก agarose gel electrophoresis การพิสูจน์ว่ามี DNP-11-dUTP อยู่ใน DNA probe สามารถทำได้โดยเทคนิคของ enzyme immuno assay โดยใช้ rabbit anti DNP antibody ตามด้วย goat anti rabbit antibody ซึ่งติดอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase
DNA probe ที่เตรียมขึ้นนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณของพลาสมิด Bluescribe ที่มีชิ้นส่วนของไวรัส SEMBVแทรกอยู่ได้ถึง 5pg โดยเทคนิค dot blot hybridization

นอกจากนี้เมื่อนำ probe ที่เตรียมโดยใช้ DNP-11-dUTP ต่อ dTTP 1:10 หรือ1:5ไปตรวจหาไวรัส SEMBV ใน ชิ้นเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV ก็สามารถตรวจพบไวรัสได้

Copyright by Mahidol University