LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

8 JAN 1997

# DETECTION OF WHITE SPOT AND YELLOW-HEAD VIRUSES IN *PENAEUS MONODON* BY AMPLIFICATION OF CONSERVED SEQUENCES

WANSIKA TONGCHUEA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

With compliments
of
มหาวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
W251d
1996

37880 c.1

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การตรวจสอบไวรัสจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ โดยการขยายยีนในส่วนของลำดับอนุรักษ์

**ผู้วิจัย** วรรณสิกา ทองเชื้อ

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(ชีวเคมี)

**คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์**

วิชัย บุญแสง, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

อัญชลี กมลนาวิน, Ph.D.

**วันที่สำเร็จการศึกษา** ๑๔ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๓๙

## บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยได้ขยายตัวขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ปีพ.ศ.2528เป็นต้นมา ปริมาณการส่งออกในปีพ.ศ.2537มีมากถึง 248,000 เมตริกตัน และทำรายได้เข้าประเทศเป็นเงินถึงสองหมื่นห้าพันล้านบาท แต่อย่างไรก็ตามความสำเร็จทางด้านการผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นไปพร้อมๆกับปัญหามลภาวะจากสภาพแวดล้อม, การขาดการจัดการที่ดี และโรคระบาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคระบาดที่เกิดจากไวรัส ซึ่งในปัจจุบันมีไวรัส 2 ชนิดที่ได้ทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก ได้แก่ ไวรัสจุดขาว และ ไวรัสหัวเหลือง ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาการตรวจสอบที่ไวและจำเพาะต่อการติดเชื้อจากไวรัสทั้งสอง

ไวรัสจุดขาวถูกค้นพบอย่างบังเอิญครั้งแรกในปีพ.ศ.2537 ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า ไวรัสชนิดนี้อยู่ในรูป envelope มีลักษณะเหมือนแบคทีเรียบาซิลไล มี fibril จำนวนมากยื่นออกมา ไวรัสชนิดนี้มีขนาด 276 X 121 นาโนเมตรและถูกจัดอยู่ในกลุ่ม baculovirus

การศึกษาครั้งนี้ดีเอ็นเอของไวรัสจุดขาวได้ถูกนำมาเป็นตัวต้นแบบ ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส(PCR) ไพรเมอร์ถูกเลือกจากลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโน polyhedrin gene จากไวรัสในกลุ่ม baculovirus ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีขนาด 473 คู่เบส ต่อจากนั้นได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pUC18 และโคลนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5α โคลนลูกผสมหมายเลข 1 ได้ถูกคัดเลือกเพื่อทำการหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับขยายยีนของไวรัสจุดขาวโดยเฉพาะ นอกจากนี้โคลนลูกผสมหมายเลข 1 ยังได้ถูกนำไปเป็นตัว

Copyright by Mahidol University

ตรวจสอบไวรัสจุดขาวโดยเทคนิค *in situ* hybridization อีกด้วย ผลการตรวจสอบโดยวิธีนี้ พบว่า ตัวตรวจสอบที่ได้จากโคลนลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 473 คู่เบส สามารถตรวจไวรัสจุดขาวได้อย่างจำเพาะโดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัส MBV และไวรัสหัวเหลือง ผลผลิตจากการขยายยีนของไวรัสจุดขาวโดยอาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ จากโคลนลูกผสมหมายเลข 1 พบว่าเกิดผลผลิตขนาด 236 คู่เบสเฉพาะการขยายยีนของไวรัสจุดขาวเท่านั้น โดยไม่พบผลผลิตขนาดดังกล่าวจากไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งชนิดอื่นเลย นอกจากนี้ไพรเมอร์อีก 2 คู่ ได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับไพรเมอร์คู่แรกเพื่อยืนยันผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอีกด้วย การตรวจสอบไวรัสจุดขาวโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนี้พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง กล่าวคือสามารถตรวจดีเอ็นเอของไวรัสจุดขาวในระดับ 10 เฟมโตกรัม การขยายยีนได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจกุ้งกุลาดำในภาคสนาม พบว่า การตรวจโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่

ไวรัสหัวเหลืองถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศไทยในปีพ.ศ.2535 ไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งถึงเจ็ดร้อยห้าสิบล้านบาท หลักฐานจากการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนและจากการเตรียมกรดนิวคลีอิค ชี้ให้เห็นว่าไวรัสหัวเหลืองเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส

อาร์เอ็นเอของไวรัสหัวเหลืองได้ถูกนำมาปั่นตัวต้นแบบในปฏิกิริยาการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอคู่สมและปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ไพรเมอร์ถูกออกแบบจากลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโน L(polymerase) protein gene จากไวรัสในกลุ่ม Rhabdoviruses ผลผลิตจากการขยายยีนมีขนาด 450 คู่เบส ต่อจากนั้นได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอคู่สมนี้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pUC18 และโคลนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5α โคลนลูกผสมหมายเลข 10 และ 20 ได้ถูกคัดเลือกเพื่อทำการหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ พบว่าโคลนลูกผสมทั้งสองมีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพียง 4 ตำแหน่งเท่านั้น หลังจากนั้นได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์จากโคลนลูกผสมหมายเลข 10 ผลผลิตที่ได้มีขนาด 151 คู่เบส ซึ่งพบในการขยายยีนจากไวรัสหัวเหลืองเท่านั้นแต่ไม่พบในไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งชนิดอื่น การตรวจไวรัสหัวเหลืองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนี้ พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงกล่าวคือสามารถตรวจอาร์เอ็นเอของไวรัสหัวเหลืองในระดับ 5 เฟมโตกรัม การตรวจสอบโดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีย้อมสี H&E พบว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสามารถตรวจไวรัสหัวเหลืองได้ภายใน 6 ช.ม.หลังการติดเชื้อ แต่การย้อมสี H&E จะตรวจไวรัสพบได้เมื่อติดเชื้อไปแล้ว 48

ช.ม.

Copyright by Mahidol University

**Thesis Title** Detection of White Spot and Yellow-Head Viruses in *Penaeus monodon* by Amplification of Conserved Sequences

**Name** Wansika Tongchuea

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Thesis Supervisory Committee**

Vichai Boonsaeng, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Anchalee Kamolnavin, Ph.D.

**Date of Graduation** 14 October B.E. 2539 (1996)

## ABSTRACT

Shrimp aquaculture has expanded rapidly in Thailand since the 1980's. In 1994 total export production totaled 248,000 metric tons and brought in foreign exchange revenue of billions of dollars. Although the shrimp culture industry is undergoing rapid development in a number of Asian countries, successful production is increasingly hampered by many factors, including environmental pollution, poor management and disease. Two new viruses, Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) or White Spot Baculovirus (WSBV) and Yellow-Head virus (YHV), presently overshadow all other agents as the leading causes of major production losses in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The present study was intended to develop sensitive and specific procedures for SEMBV and YHV detection.

SEMBV or WSBV was first reported as an accidental infection in laboratory reared shrimp in early 1994. An examination by transmission electron microscopy (TEM) revealed enveloped, bacilliform virions with a distinctive multifibrillar appendage that measured 276 x 121 nm (excluding the appendage). This virus was placed in Baculovirus group.

Copyright© by Mahidol University

In this study, SEMBV DNA was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) amplification of viral DNA fragments. PCR primers were designed from regions of conserved amino acid sequence in the polyhedrin genes of baculoviruses. A 473 bp PCR product was obtained. This DNA fragment was ligated to pUC18 plasmid and cloned into *E. coli* DH5α. Clone no.1 was selected and sequenced because it hybridized strongly to SEMBV DNA. The 473 bp inserted fragment of clone no.1 was used as a probe in *in situ* hybridization. The probe were able to hybridize with SEMBV infected *P. monodon* but not with MBV and YHV infected specimens.

A set of PCR primers derived from a cloned SEMBV DNA fragment was designed to amplify a 236 bp SEMBV-specific DNA fragment. No cross reaction was observed with other shrimp viruses. Two other sets of primers designed from SEMBV genomic sequence and from authentic IL-1α mRNA were combined with the first set of primers to confirm the PCR reaction. The limits of detection using purified DNA and crude DNA as templates were 10 fg in PCR using either one set of primers or three sets of primers. Detection in field samples using PCR with one set of primers or three sets of primers gave the same results

Yellow-head virus (YHV) was first reported in Thailand in 1992 when it caused pond-side losses of approximately 30 million US dollars. The morphology of negatively stained virions by TEM and nucleic acid preparation from purified YHV indicated that YHV was an RNA virus.

Purified YHV-RNA was used as a template for reverse transcription and PCR amplification (RT-PCR). RT-PCR primers were designed from regions of conserved amino acid sequence in the L(polymerase) protein gene of Rhabdoviruses. A 450 bp RT-PCR product was obtained. This 450 bp product was ligated to pUC18 plasmid and cloned into *E. coli* DH5α. The inserted fragments from clone no.10 and clone no.20 were selected and sequenced because they hybridized strongly to YHV-RNA.

Copyright by Mahidol University

Using the selected sequences, a set of RT-PCR primers was designed to amplify a 151 bp YHV-specific RNA fragment. No cross reaction was observed with other shrimp viruses. The limit of detection was 5 fg of purified RNA. A comparative study of RT-PCR and H&E staining methods for detection of YHV in experimentally infected *P. monodon* was performed. The RT-PCR was able to detect YHV 6 hrs post infection of the virus whereas the H&E staining method was able to confirm YHV histopathology at 48 hrs post infection.

Copyright by Mahidol University