PCR-BASED DETECTION OF HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS AND WHITE-SPOT SYNDROME VIRUS IN PENAEUS MONODON

KARNYUPHA JITTIVADHNA

ขาก

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2000

ISBN 974-664-264-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
K18p
2000
C.2

44890 C 2

3936079 SCBC/M: MAJOR: BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS: HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS / WHITE-SPOT SYNDROME VIRUS / PENAEUS MONODON / ONE-TUBE NESTED PCR / MULTIPLEX PCR

KARNYUPHA JITTIVADHNA: PCR-BASED DETECTION OF HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS AND WHITE-SPOT SYNDROME VIRUS IN PENAEUS MONODON. THESIS ADVISORS: VICHAI BOONSAENG, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., 150 P. ISBN 974-664-264-2

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) causes stunting of growth thus reducing the harvested yield of shrimp. One-tube nested PCR for detection of HPV was developed in this study. Specific primers for HPV were designed from partial nucleotide sequence of HPV genome. These primers gave HPV specific product with as little as 0.001 fg of HPV DNA while no product was obtained from other DNA templates derived from other viral pathogens or from Penaeus monodon. The primers produced HPV specific product of 375 and 262 bp fragments when at least 10 fg of HPV DNA were included in one-tube nested PCR. Only a band of 262 bp fragment was detected from 0.001 fg to 1 fg of HPV DNA. In one-tube PCR assays to detect HPV DNA in shrimp hepatopancreas, hemolymph, eye stalk, pereiopod, pleopod, and feces, the virus was found in all six parts. HPV was found in greatest concentration in the hepatopancreas and feces while its concentration in hemolymph was the lowest.

Multiplex PCR for simultaneous detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and white-spot syndrome virus (WSSV) was also developed in this study. Specific primers for HPV was designed to be used in parallel with the previously developed WSSV-specific primers. The HPV primers used in multiplex PCR amplified an expected 362 bp product while WSSV primers amplified a 232 bp product. The specific primers for each virus were able to detect as little as 0.01 pg of each viral DNA template. No fragment was obtained using nucleic acid templates extracted from healthy Penaeus monodon and other shrimp pathogens. By using multiplex PCR assays to detect HPV and WSSV DNA in the hepatopancreas and pleopod of 20 shrimps, those tissues of ten shrimps were all HPV positive. All pleopods of the other ten shrimp specimens were also found to contain WSSV. In completed PCR reaction containing hepatopancreas DNA of the latter shrimp group, WSSV artifacts were observed in 5 shrimp specimens. No co-infection of the two viruses was found from those infected shrimps.

3936079 SCBC/M: สาขาวิชา: ชีวเคมี; วท.ม. (ชีวเคมี)

กานต์ยุพา จิตติวัฒนา: การใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเอ็ชพีวีและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (PCR - BASED DETECTION OF HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS AND WHITE-SPOT SYNDROME VIRUS IN PENAEUS MONODON)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิชัย บุญแสง Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D., 150 หน้า ISBN974-664-264-2

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัส (เอ็ชพีวี) สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้ง penaeid โดยทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้า ส่งผลให้เกิดลักษณะแคระแกร็น ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี one-tube nested PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อเอ็ชพีวีโดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับการตรวจหาเชื้อจากข้อมูลลำดับเบสบางส่วน ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถขยายดีเอ็นเอขนาด 375 และ 262 คู่เบส ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อเอ็ชพีวีเท่านั้น และความไวในการตรวจอยู่ในระดับ 0.001 เฟมโตกรัม เมื่อใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของเชื้อเอ็ชพีวีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้น เทคนิค one-tube nested PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้บ่งบอกปริมาณเชื้อเอ็ชพีวีในตัวอย่างได้ โดยสามารถตรวจพบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 375 และ 262 คู่เบส เมื่อใช้ดีเอ็นเอของเชื้อเอ็ชพีวี ตั้งแต่ 10 เฟมโตกรัมขึ้นไปเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นและสามารถตรวจพบผลผลิตพีซีอาร์เฉพาะขนาด 262 คู่เบส เมื่อใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นของเชื้อเอ็ชพีวีตั้งแต่ 0.001 เฟมโตกรัมถึง 1 เฟมโตกรัม ในการนำเทคนิค one-tube nested PCR ไปตรวจหาเชื้อเอ็ชพีวีในตับ เลือด ก้านตา ขาเดิน ขาว่ายน้ำ และมูลกุ้ง พบว่าส่วนที่มีการตรวจพบเชื้อมากที่สุดได้แก่ตับและมูลกุ้ง ส่วนที่มีการตรวจพบเชื้อน้อยที่สุดคือ เลือดกุ้ง

นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อเอ็ชพีวีและไวรัสตัวแดงดวงขาวได้พร้อมกันในหลอดเดียว โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อเอ็ชพีวี เพื่อใช้ควบคู่ไปกับไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งได้มีผู้พัฒนาไว้แล้ว ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเชื้อเอ็ชพีวีให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 362 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับไวรัสตัวแดงดวงขาวให้ผลผลิตขนาด 232 คู่เบส ความไวของการตรวจพบเชื้อทั้งสองอยู่ในระดับ 0.01 พิโคกรัม เมื่อใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของเชื้อเอ็ชพีวีหรือไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นดีเอ็นเอตั้งต้น การนำเทคนิค multiplex PCR ไปตรวจหาการติดเชื้อเอ็ชพีวีและไวรัสตัวแดงดวงขาวในธรรมชาติจากตับและขาว่ายน้ำของกุ้ง พบการติดเชื้อเอ็ชพีวีในเนื้อเยื่อทั้งสองจากกุ้งตัวอย่าง 10 ตัว ที่มีลักษณะการติดเชื้อเอ็ชพีวี และพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในขาว่ายน้ำของกุ้งตัวอย่าง 10 ตัว ที่มีการติดเชื้อไวรัสนี้โดยธรรมชาติ ทั้งนี้สามารถตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในตับของกุ้งตัวอย่างกลุ่มหลังได้เพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น จากตัวอย่างกุ้งทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ไม่พบการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสทั้งสองชนิด