

3936475 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY :M.sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : PENAEUS MONODON/PCR/DNA PROBE/FAECES/
POST LARVAE/HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS

JURAI RAT PHROMJAI : THE APPLICATION OF GENE PROBES TO DETECT HPV OF PENAEUS MONODON BY *IN SITU* HYBRIDIZATION, DOT BLOT HYBRIDIZATION AND PCR AMPLIFICATION. THESIS ADVISORS : TIMOTHY WILLIAM FLEGEL Ph.D., VICHAI BOONSAENG Ph.D., BOONSERM WITHYACHUMNARNKUL Ph.D., 117 p. ISBN 974-662-570-5

Hepatopancreatic parvo virus (HPV) infects the hepatopacreas in panaeid shrimp. It may cause stunting of growth or death to shrimp and can thus cause reduced harvests for shrimp farmers. This work was based on the fact that commercial PCR primers developed for HPV from *Penaeus chinensis* (HPVchin) produced a unique 732 bp DNA fragment for HPV from *P. monodon* (HPVmon). Analysis of the nucleotide sequence of this unique DNA fragment showed that it was 696 bp in length and contained 47% GC content. A sequence alignment of the 696 bp HPVmon DNA fragment gave 84% homology with the HPVmon genome, while alignment of a portion of it gave 76.7% homology with a 350 bp DNA fragment of HPVchin.

Specific primers for HPVmon (H441F and H441R) were designed from this 696 bp DNA fragment. These primers gave a 441 bp product with as little as 1 fg template consisting of purified HPVmon DNA while no product was obtained from any other DNA templates derived from other viral pathogens or from *P. monodon*. In direct PCR assays using H441 primer set to detect HPVmon DNA added to shrimp faecal and post larval samples preserved in lysis buffer, no PCR amplicons were obtained. However, if DNA was first extracted from post larvae homogenized in lysis buffer, added (spiked) HPVmon DNA could be detected by this PCR reaction at as little as 1 pg. The detection limit for HPVmon DNA added to faecal and post larval samples preserved in 0.025%NaOH and 0.0125%SDS was 0.1 pg.

A DIG-labeled PH441 probe was prepared from the 441 bp HPVmon amplicon using a PCR labeling kit and this probe was used for HPV detection by dot blot hybridization and *in situ* hybridization.

By dot blot hybridization, this probe gave no specific signal when using templates derived from shrimp culture water, shrimp food, shrimp faeces (HPV-free), *V. parahemolyticus*, *P. monodon* and other shrimp viruses (both DNA and RNA). The probe did give a visible signal with purified HPV DNA at the lowest concentration of 0.01 pg. When used for detection of HPVmon DNA in spiked faeces and post larval samples, a strong intense signal was visible down to 1 pg and 0.1 pg spiked HPVmon DNA, respectively.

Based on *in situ* hybridization, PH441 probe gave a blue-black staining reaction with HPV infected nuclei of hepatopancreatic cells from *P. monodon*, whereas no signals were found in slides prepared from normal shrimp or shrimp infected with other viruses.

3936475 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

จุไรรัตน์ พรหมใจ : การประยุกต์ใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอจำเพาะเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส HPV

ใน กุ้งกุลาดำโดยวิธีอินซิติวไฮบริไดเซชัน คือตบรีอทไฮบริไดเซชัน และพีซีอาร์

(THE APPLICATION OF GENE PROBES TO DETECT HPV OF *PEANAeus MONODON* BY *IN SITU* HYBRIDIZATION, DOT BLOT HYBRIDIZATION AND PCR AMPLIFICATION)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล Ph.D., วิชัย บุญแสง Ph.D.,

บุญเสริม วิทยชำนาญกุล Ph.D., 117 หน้า ISBN 974-667-570-5

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัส (HPV) สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้ง penaeid โดยทำให้กุ้งมีลักษณะแคะแกรนส่งผลให้ผลผลิตและผลกำไรในการเลี้ยงกุ้งลดลง ดังนั้นการศึกษานี้เริ่มจากผลของใช้คู่ของไพรเมอร์ที่พัฒนามาจาก ดีเอ็นเอของ HPV ใน *Penaeus chinensis* (HPVchin) เพื่อตรวจหา ดีเอ็นเอของ HPV ใน *P.monodon* (HPVmon) โดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้ทำให้เกิดผลผลิตของดีเอ็นเอที่มีขนาด 732 คู่เบส กับ HPVmon จากการหาลำดับเบสของผลผลิต 732 คู่เบส พบว่า ขนาดที่แท้จริงของผลผลิตนี้คือ 696 คู่เบส และให้ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของคู่เบสกับดีเอ็นเอของ HPV และ ส่วนของดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส ของ HPVchin เท่ากับ 84% และ 76.7% ตามลำดับ

ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับการตรวจหา HPVmon (H441F และ H441R) ได้พัฒนาจากข้อมูลลำดับเบสของส่วนของดีเอ็นเอขนาด 696 คู่เบส โดยสามารถขยายดีเอ็นเอขนาด 441 คู่เบส และความไวในการตรวจอยู่ในระดับ 1 เฟมโตกรัมเมื่อใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของ HPV เป็นดีเอ็นเอตั้งต้น ไพรเมอร์คู่นี้ไม่ทำให้เกิดผลจากการขยายดีเอ็นเอจากกุ้งกุลาดำหรือไวรัสชนิดอื่น การประยุกต์ใช้ไพรเมอร์นี้เพื่อตรวจหา HPVmon ในมูลกุ้ง และ ลูกกุ้ง ที่เก็บใน 0.025%NaOH และ 0.0125%SDS สามารถให้ความไวในการตรวจ เท่ากับ 0.1 พิโคกรัม ส่วนในการตรวจหา HPVmon ในลูกกุ้ง โดยมีขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอของ HPVmon ก่อนขยายดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์ให้ความไวในการตรวจเท่ากับ 1 พิโคกรัม ในการตรวจหา HPVmon ในมูลกุ้ง และ ลูกกุ้งที่เติมดีเอ็นเอของ HPV ซึ่งเก็บใน lysis buffer เกิดผลลบลง

ส่วนตัวติดตามดีเอ็นเอ (PH441) ซึ่งเตรียมจากการติดตัวติดตามที่ผลผลิต 441 คู่เบสโดยวิธีพีซีอาร์ การใช้ PH441 ให้ความไวในการตรวจหา HPV ดีเอ็นเอบริสุทธิ์, HPV ในมูลกุ้ง และ ลูกกุ้ง โดยวิธีคือตบรีอทไฮบริไดเซชัน เท่ากับ 0.01, 1 และ 0.1 พิโคกรัม ตามลำดับ โดยวิธีนี้ PH441 ให้ผลลบกับน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง, อาหารกุ้ง, *V. parahemolyticus* และ ไวรัสตัวอื่น

โดยวิธีอินซิติวไฮบริไดเซชัน PH441 ให้ผลบวกซึ่งติดสีน้ำเงินเข้มถึงดำกับนิวเคลียสของตัวอ่อนที่มีการติดเชื้อ HPV แต่ให้ผลลบกับเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ปกติหรือมีการติดเชื้อไวรัสตัวอื่น