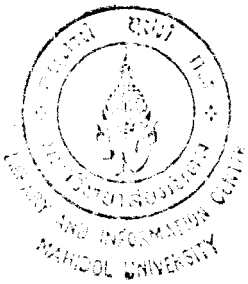
- 4 OCT 2000



A SENSITIVE DETECTION OF YELLOW-HEAD VIRUS (YHV) OF PENAEUS MONODON BY NESTED RT-PCR AMPLIFICATION

RATCHANEE KLINPUTSORN

ห้องสมุดกลาง
ของ
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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 974-664-537-4

Copyright by Mahidol University
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

45439 c 2

4036410SCBC/ M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc.(BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS: YELLOW HEAD VIRUS (YHV)/ONE-STEP NESTED RT-PCR PENAEUS MONODON/SESARMA SP./UCA PUGILATOR/ SCYLLA SERRATA/PORTUNUS PELAGICUS /IN SITU HYBRIDIZATION

RATCHANEE KLINPUTSORN: A SENSITIVE DETECTION OF YELLOW-HEAD VIRUS(YHV)OF PENAEUS MONODON BY NESTED RT-PCR AMPLIFICATION. THESIS ADVISORS: VICHAI BOONSAENG Ph.D., SAKOL PANYIM Ph.D., CHAINARONG WONGTEERASUPAYA Ph.D., 178 P. ISBN 974-664-537-4

Yellow head virus (YHV) causes a severe disease in Penaeus monodon, a type of shrimp, in Thailand. The aim of this project was to develop a rapid, simple, specific and sensitive detection method for YHV in Penaeus monodon by one-step nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). One-step nested RT-PCR assay was more convenient than conventional two-step nested RT-PCR assay and it gave additional information for grading the relative concentration of YHV infections in this shrimp.The new one-step nested RT-PCR was developed using 2 sets of primers. The first primer set contained one forward primer (10F) and two reverse primers (144R and 209R) which produced 135 bp and 200 bp PCR products, respectively. The second primer set contained one forward primer (9F) and two reverse primers (144R and 196R) which produced 136 bp and 188 bp PCR products, respectively. The developed technique had greater sensitivity compared to RT-PCR and could detect 0.01 fg of purified YHV-RNA. The tests were very specific and did not cross react with white spot syndrome virus, hepatopancreatic parvovirus, *Vibrio harveyi* and host nucleic acid. The technique of *in situ* hybridization in haemolymph and tissues was developed and compared with conventional hematoxylin and eosin staining in haemolymph and tissues to confirm pathology and localization of YHV infection.

Several tissues (gills, lymphoid organs, pleopods and eyestalk) and haemolymph from YHV-infected Penaeus monodon were investigated by using the developed one-step nested RT-PCR technique. It was found that two PCR products (200 bp and 135 bp) were observed only in haemolymph sample at 6 hr after YHV-intramuscular injection. Another advantage of using haemolymph sample was that collection did not require sacrificing the shrimp. The results indicated that haemolymph was the most appropriate source for the detection of YHV.

One-step nested RT-PCR was also used for screening potential asymptomatic carriers. The results demonstrated that all four crabs studied (Sesarma sp., Uca pugilator, Scylla serrata and Portunus pelagicus) were the carriers which could transmit the virus to this shrimp via water.

4036410 SCBC / M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

รัชนี กลิ่นพุฒซ้อน : การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่ไวโดยวิธี Nested RT-PCR (A SENSITIVE DETECTION OF YELLOW-HEAD VIRUS (YHV) OF *PENAEUS MONODON* BY NESTED RT-PCR AMPLIFICATION) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิชัย บุญแสง Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D., ชัย ณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ Ph.D., 178 หน้า ISBN 974-664-537-4

เชื้อไวรัสหัวเหลืองก่อให้เกิดโรคระบาดที่รุนแรงในกุ้งกุลาดำซึ่งมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลือง one-step nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ให้ผลที่มีความจำเพาะ และมีความไวสูงในการตรวจสอบ อีกทั้งเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว สามารถป้องกันการปนเปื้อนระหว่างหลอดทดลองจาก PCR product รอบแรกได้ นอกจากนี้วิธีการ one-step nested RT-PCR สามารถบอกระดับความรุนแรงของการติดเชื้อได้ เทคนิค one-step nested RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด โดยชุดที่ 1 จะประกอบไปด้วย forward primer (10F) 1 ตัว และ reverse primers (144R กับ 209R) อีก 2 ตัว กรณีที่การตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้ผลบวกจะเกิดแถบขนาด 135 bp และ 200 bp ส่วนในชุดที่ 2 ประกอบไปด้วย forward primer (9F) 1 ตัว และ reverse primers (144R กับ 196R) อีก 2 ตัว กรณีที่การตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้ผลบวกจะเกิดแถบขนาด 136 bp และ 188 bp เทคนิค one-step nested RT-PCR สามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ได้ถึง 0.01 fg และไม่มีการปนเปื้อนจาก PCR product รอบแรก จากการทดลองไพรเมอร์มีความจำเพาะกับไวรัสหัวเหลืองเท่านั้นโดยไม่มีผลผลิตจากต้นแบบจากนิวคลีอิกของไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่นรวมถึงตัวกุ้งกุลาดำเองด้วย นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธี *in situ* hybridization เพื่อเปรียบเทียบกับวิธี H&E staining ทั้งใน haemolymph และ tissue ซึ่งช่วยในการตรวจสอบพยาธิสภาพและตำแหน่งของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

การศึกษาการกระจายตัวของไวรัสหัวเหลืองในเหงือก, ต่อมน้ำเหลือง, ขาว่ายน้ำ, ก้านชูตา และใน haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อ ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองคือเลือดกุ้ง เนื่องจาก 6 ชั่วโมงหลังจากกุ้งติดเชื้อจะเกิดผลบวก 2 แถบ (200 bp และ 135 bp) เมื่อใช้ haemolymph เป็นตัวต้นแบบในการตรวจด้วยวิธี one-step nested RT-PCR ในขณะที่ตัวอย่างชนิดอื่นเกิดผลบวกเพียง 1 แถบ (135 bp) นอกจากนี้เลือดกุ้งยังเป็นตัวอย่างที่เก็บทำการทดลองได้สะดวกและไม่ทำให้กุ้งตายระหว่างการทดลอง

จากนั้นทำการทดสอบต่อว่า ปูทั้ง4 ชนิดคือ ปูม้า, ปูทะเล, ปูแสม และปูก้ามดาบปูเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งได้หรือไม่ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าปูเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำปกติได้โดยผ่านทางน้ำ

Copyright by Mahidol University