APOPTOSIS IN YELLOW HEAD VIRUS INFECTED SHRIMP

CHUMPORN SOOWANNAYAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2000

ISBN 974-664-823-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
C559a
2000
c.2

46199

4036470 SCBT/M: MAJOR: BIOTECHNOLOGY; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

KEY WORDS: PENAEUS MONODON YELLOW HEAD VIRUS/ APOPTOSIS/ IMMUNOHISTOCHEMICAL/ TUNEL/ DAPI/ LYMPHOID ORGANS/ SPHEROIDS/ HEMOCYTES/ CELL CULTURES

CHUMPORN SOOWANNAYAN: APOPTOSIS IN YELLOW HEAD VIRUS INFECTED SHRIMP. THESIS ADVISORS: TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, MD., Ph.D., SUKATHIDA UBOL, Ph.D. 118 P. ISBN 974-664-823-3

A study of apoptosis was conducted in several organs of yellow head virus (YHV) injected shrimp. The cells and tissues studied included hemocytes, lymphoid organs (LO), gills, hepatopancreas (HP) and others. Four detection methods were used. These were haematoxylin & eosin staining, 4,6-diamidine-2-phenylidole dihydrochloride (DAPI) staining, TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay staining and DNA fragmentation analysis. All these methods were used with hemocytes while only the first two methods were used with other tissues. The percentage of apoptotic hemocytes detected with all the staining methods increased with time after YHV injection from about 12% at 36 hours post injection to about 36% at 46 hours post injection. DNA extracted from hemocytes at 50 hours post YHV injection was found to be degraded to give a ladder-like pattern of about 200bp intervals when sorted by size using agarose gel electrophoresis. In the LO, many apoptotic cells were observed in the functional lobes while only a few apoptotic cells were found in lymphoid organ spheroids (LOS). The number of apoptotic cells in the LO and other organs increased with time post injection of YHV, in the same manner as with hemocytes. An immunohistochemical study of YHV infected shrimp sections using a specific monoclonal antibody against YHV revealed positive reactions in various organs and tissues. In the LO at early stages of infection, positive reactions were first observed in functional lobes and not in LOS. At later stages of infection positive reactions were seen at the periphery of Type B and Type C LOS and uniformly in Type A LOS. Many apoptotic cells in Type B and Type C LOS of both YHV and control shrimp were found to be negative for YHV. These results suggested that the shrimp used may have been co-infected with another virus. As an adjunct to this study, many methods of making hemolymph smears were tested. The best results were obtained with hemolymph smears allowed to attach to slides before fixation with either modified Davidson's fixative or with 10% formalin in PBS or in shrimp salt solution (SSS). Primary shrimp cell cultures were also studied. Primary cultures of hemocytes were successfully established on Fisher-plus® slides using Grace's insect medium supplemented with 5% FBS. The cultures could be kept at room temperature for up to 9 months, but they did not proliferate and they were not susceptible to YHV infection as determined by gross cytopathology. Primary LO cell culture experiments were also conducted using several culture media and supplements. Among these, 2x Leibovitz L-15 supplemented 15% FBS, 5g/L NaCl, 1g/L glucose, and 10% shrimp meat extract (SME) gave the most promising results, but the cultures obtained could not be subcultured and were not suitable for viral inoculation experiments.

4036470 SCBT/ M: สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ชุมพร สุวรรณยาน : การศึกษาการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อโรคหัวเหลือง และการเพาะเลี้ยงเซลล์กุ้งขั้นพื้นฐาน(APOPTOSIS IN YELLOW HEAD VIRUS INFECTED SHRIMP) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, MD. Ph.D., ศุขธิดา อุบล, Ph.D.,
118 หน้า. ISBN 974-664-823-3

การตายของเซลล์แบบ Apoptosis เป็นขบวนการที่มีความสำคัญในการพัฒนาของสิ่งมีชีวิตชนิดหลายเซลล์และในการทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อหรือเซลล์ที่ไม่เป็นที่ต้องการของร่างกาย การติดเชื้อไวรัสหลายชนิดสามารถทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis ได้ ในการศึกษาครั้ง นี้ได้ ตรวจสอบการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์ในเนื้อเยื่อหลายชนิดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อโรคหัวเหลือง ด้วย วิธีการตรวจสอบดังต่อไปนี้: การย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin, การย้อมด้วยสารย้อมสีย้อมสารพันธุกรรม 4,6- diamidine-2- phenylidole dihydrochloride(DAPI) และ การตรวจสอบการแตกตัวของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ด้วย TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) assay ได้ตรวจการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ หลังการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองไปแล้ว 36 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ Apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามเวลา ด้วยทุกวิธีการตรวจสอบ สารพันธุกรรมที่สกัดจากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ หลังการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองไปแล้ว 50 ชั่วโมง มีการแตกตัวให้ลักษณะแบบขั้นบันได บน Agarose gel electrophoresis. ในต่อมน้ำเหลือง(Lymphoid organ) พบ Apoptosis จำนวนมากใน functional lobe(LO) และ จำนวน Apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามเวลาหลังการฉีดเชื้อ ใน spheroid (LOS) พบ Apoptosis เช่นเดียวกันกับใน LO แต่การเพิ่มของ Apoptosis ไม่เด่นชัด ในเนื้อเยื่ออื่นก็เป็นเช่นเดียวกัน การตรวจสอบด้วย monoclonal antibody ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองพบปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวกในเนื้อเยื่อหลายชนิด ในต่อมน้ำเหลืองพบปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวกใน functional lobe(LO) ในช่วงแรกของการติดเชื้อ จากนั้นเชื้อจะลุกลามไปยัง LOS ชนิด Bและ C ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ ในเวลาเดียวกันกับการก่อตัวของ LOS ชนิด A ซึ่งมีการติดเชื้ออย่างรุนแรง Apoptotic cells ที่พบใน LOS ชนิด Bและ C ของกุ้งกุลาดำทั้ง กลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัส และ กลุ่มควบคุม ให้ผลเป็นลบกับ monoclonal antibodyต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง แสดงว่ากุ้งอาจมีการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย

ได้ทำการศึกษาวิธีการทำเม็ดเลือด Smear ด้วยวิธีการหลายวิธี รวมทั้งน้ำยารักษาสภาพหลายชนิด พบว่าวิธีการทำ smearก่อน Fix ด้วยน้ำยารักษาสภาพ modified Davidson's Fixative, 10% Formalin ใน PBS หรือ 10% Formalin ใน SSS ให้ผลดีที่สุด

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์กุ้งกุลาดำขั้นพื้นฐาน ,เซลล์เพาะเลี้ยงของเม็ดเลือดสามารถเลี้ยงได้เป็นอย่างดีด้วย Grace's insect medium เสริมด้วย 5% Fetal bovine serum บน Fisher ®Plus slideเซลล์เพาะเลี้ยงของเม็ดเลือดสามารถเก็บในอุณหภูมิห้องได้นานถึง 9 เดือน แต่เชื้อโรคหัวเหลือง ไม่สามารถ infect เซลล์เพาะเลี้ยงนี้ได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองนั้น ได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเซลล์ และ สารเสริมหลายชนิด พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วย Leibovitz L-15 +15% FBS + 5g/L NaCl + 1g/L glucose และ 10% สารสกัดจากเนื้อกุ้ง ให้ผลเป็นที่น่าพอใจแต่ไม่สามารถทำการ subculture และไม่ดีพอสำหรับการทดลองกับไวรัส

Copyright by Mahidol University