

19 JUN 2002



**DEVELOPMENT OF A SPECIFIC DNA PROBE AND
PCR BASED TECHNIQUE FOR DETECTION OF
LUMINOUS *VIBRIO HARVEYI* IN PENAEID SHRIMP**

SRISOMBAT WANNAYING

=

**With compliments
of**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2002

ISBN 974-04-1599-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S7740
2002
318

Copyright by Mahidol University

4136677 SCBT/M : MAJOR: BIOTECHNOLOGY; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : DETECTION/DEVELOPMENT/DNA PROBE/PCR/*VIBRIO HARVEYI*

SRISOMBAT WANNAYING : DEVELOPMENT OF A SPECIFIC DNA PROBE AND PCR BASED TECHNIQUE FOR DETECTION OF LUMINOUS *VIBRIO HARVEYI* IN PENAEID SHRIMP. THESIS ADVISORS : TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., VICHAI BOONSAENG, Ph.D., ORASA SUTHIENKUL, Ph.D., 146 p. ISBN 974-04-1599-7

This study aims to find a species-specific DNA probe and to develop a PCR method for detection of *Vibrio harveyi* (VH) pathogenic to penaeid shrimp.

Since many strains of VH have been isolated from shrimp, a genomic library was constructed from a representative standard strain (ATCC 14126). Among all recombinant clones, three candidates were selected by colony blot methodology for further specificity tests. Two of these candidate clones (pVH48, pVH46-766) were tested for hybridization patterns by the Southern blot hybridization technique with *EcoRI/HindIII* digested DNA extracts from various bacteria. Clone pVH48 contained an 899 bp fragment that cross-hybridized with *V. vulnificus*, *Shigella boydii* and *Salmonella paratyphi* but at different fragment sizes than in the VH strains tested. After sequencing this fragment, six primers were designed and used in various combinations in PCR trials.

Primer VH_3F and VH_3R showed the best results yielding only one identical 306 bp PCR product for all VH strains. However, a cross-amplification occurred with *V. vulnificus* that could not be solved by manipulation of the PCR conditions (e.g., increasing the annealing temperature) or by combining PCR with the Southern blot hybridization, since the *V. vulnificus* amplified products hybridized with the positive control, a digoxigenin-labeled 306 bp amplified product. Thus, clone pVH46-766 was subcloned to obtain a 766 bp DNA fragment, which could have been a species-specific DNA probe for VH if it did not hybridize with *E. coli* EPEC DNA. After sequencing and design of primers VH_141F and VH_449R, PCR yielded a 335 bp product with VH strains but a variety of cross-amplification products with various other bacterial DNA templates. However, those amplified products differed from the 335 bp amplicon of the VH strains. When the specificity of all the amplified products was tested with a digoxigenin-labeled probe derived from the parent 766 bp fragment, it was astonishing that two strains (*V. harveyi* ATCC 14126 and 639) did hybridize while two others (*V. harveyi* 1114GL and 9804) with PCR amplicons of identical size did not.

All this work suggested that there is little likelihood of developing a species-specific probe or a species-specific PCR method for VH that will separate it from other closely related species of *Vibrio*. Data from this thesis and from published sequences of the 16S rRNA gene of *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* and *V. campbellii* suggests that they may comprise varieties of a single bacterial species.

4136677 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ศรีสมบัติ วรรณยิ่ง : การพัฒนาตัวตรวจสอบดีเอ็นเอจำเพาะและวิธีพีซีอาร์เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio harveyi* ในกุ้ง (DEVELOPMENT OF A SPECIFIC DNA PROBE AND PCR BASED TECHNIQUE FOR DETECTION OF LUMINOUS *VIBRIO HARVEYI* IN PENAEID SHRIMP). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., วิชัย บุญแสง, Ph.D., อรยา สุตเชียรกุล, Ph.D., 146 หน้า ISBN 974-04-1599-7

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อค้นหาตัวตรวจสอบดีเอ็นเอจำเพาะ และพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *V. harveyi* (VH) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง ด้วยขบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

ทั้งนี้เชื้อ VH ที่แยกได้จากกุ้งมีด้วยกันหลายสายพันธุ์ (strain) ห้องสมุดดีเอ็นเอของ VH จึงถูกสร้างขึ้นจากดีเอ็นเอของตัวแทนสายพันธุ์, VH ATCC 14126 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน จากชุดโคลนที่ได้ทั้งหมดมี 2 โคลน (pVH48 และ pVH46_766) ให้ผลไฮบริดเซชันที่น่าสนใจ (hybridization patterns) กับชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบหลายสายพันธุ์ ด้วยวิธีเข้าเทิร์น บล๊อต ไฮบริดเซชัน (Southern blot hybridization) โดยโคลน pVH48 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 899 เบส ให้ผลไฮบริดเซชัน (cross-hybridization) กับเชื้อ *V. vulnificus*, *Shigella boydii* และ *Salmonella paratyphi* แต่ลักษณะการไฮบริดเซชันที่ได้แตกต่างจากที่พบในเชื้อ VH และชิ้นส่วนดีเอ็นเออื่น ถูกนำมาหาลำดับเบส เพื่อออกแบบไพรเมอร์บริเวณต่างๆ 6 สาย และทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ VH แบบจำเพาะ

จากการทดสอบมีเพียงไพรเมอร์ VH_3F และ VH_3R ที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจโดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาด 306 เบส ใน VH ทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยังคงไม่จำเพาะ เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *V. vulnificus* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเดียวกัน ซึ่งไม่สามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นได้ถึงแม้จะเพิ่มอุณหภูมิในปฏิกิริยา หรือเพิ่มวิธีการทดสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ (amplified product) จากขบวนการโพลีเมอเรสด้วยการทำเข้าเทิร์น บล๊อต ไฮบริดเซชัน ส่วนโคลน pVH46-766 ที่ให้ผลน่าสนใจเช่นกันนั้น มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นตัวตรวจสอบดีเอ็นเอจำเพาะกับ VH ถ้าไม่ให้ผลไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 766 เบส ที่ได้จากโคลนนี้ถูกนำมาออกแบบไพรเมอร์ 2 สาย VH_141F และ VH_449R โดยชิ้นไพรเมอร์ทั้งสอง สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ VH สายพันธุ์ต่างๆ ได้ดีเอ็นเอขนาด 335 เบส ต่างจากที่พบในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น แต่เมื่อทดสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยา (amplified product) ด้วยวิธีเข้าเทิร์น บล๊อต ไฮบริดเซชัน ว่ามีความจำเพาะหรือไม่ ผลที่ได้คือชิ้นดีเอ็นเอ 766 เบส สามารถไฮบริดเซชันได้กับชิ้นดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยา (amplified product) ของเชื้อ VH เพียง 2 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 4 สายพันธุ์ที่เลือกมาทดสอบ

จากผลการศึกษาดังกล่าว โอกาสในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* แบบจำเพาะซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างจากเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์อื่นที่มีความใกล้เคียงกันด้วยวิธีการทางดีเอ็นเอมีความเป็นไปได้ยาก ซึ่งผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้ร่วมกับผลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. campbellii* สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันเหล่านี้เป็นความหลากหลาย (variety) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว (single bacterial species)