

639.543

63837

ร.๒

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงจุดขาวในกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Multiplex RT – PCR

Development of diagnostic kit for detection of yellow-head and white-spot
virus in *Penaeus monodon* using multiplex RT – PCR

-3 ส.ค. 2546

งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2544

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

h. # 153740

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง	2
สารบัญตาราง	4
สารบัญภาพ	4
กิตติกรรมประกาศ	5
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	6
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	7
บทนำ	8
- ภูมิหลัง	8
- วัตถุประสงค์	10
- ขอบเขตการวิจัย	10
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	10
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ	11
ระเบียบวิธีวิจัย	12
- อุปกรณ์และสารเคมี	13
- การทดลอง	14
- การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อกุ้ง	14
- สกัด RNA จากกุ้งที่เลี้ยงในห้องทดลองโดยใช้ Trizal	15
- การออกแบบไพรเมอร์และทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส	16
- การเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส	17
- ตัวแดงจุดขาว บริเวณ conserve sequence ด้วยเทคนิค PCR	
- การเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสหัวเหลือง	18
- บริเวณ ORF 1b gene ด้วยเทคนิค RT-PCR	
- การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบไวรัส 2 ชนิด	20
ผลการทดลอง	22
- การตรวจสอบ WSSV จากบริเวณ Conserve swquence	22
- การศึกษา conserve sequence ในยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง	22
- การศึกษาความไวและความจำเพาะในการตรวจ WSSV	24
- จากบริเวณ VP28 และ nVP28	
- การศึกษาความไวและความจำเพาะในการตรวจ YHV บริเวณ ORF1b gene	25
- การทำ Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงจุดขาว	25

การทำ Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัดเหืองและตัวแดงจุดขาวภาคสนาม	26
สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28

สารบัญตาราง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	12
ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	13
ตาราง 3 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	14
ตาราง 4 ส่วนผสมของ PCR reaction	18
ตาราง 5 ส่วนผสมของ RT-PCR reaction	19
ตาราง 6 ส่วนผสมของ Multiplex RT-PCR reaction	20

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 Multiple Sequence Alingment ของ VP28 coding gene	22
รูปที่ 1 Multiple Sequence Alingment ของ nVP28 noncoding gene	23
รูปที่ 3 ผล PCR product ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ที่ได้จากการใช้ primer NVP500F และ VP500R	24
รูปที่ 4 ผลการศึกษาความจำเพาะในการตรวจสอบ เชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว โดยใช้ primer NVP500F และ VP500R	24
รูปที่ 5 Multiplex RT – PCR product ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัสหัวเหลือง	25
รูปที่ 6 ตัวอย่างการใช้ชุดตรวจสอบ Multiplex RT – PCR product เพื่อตรวจ ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัสหัวเหลือง	26

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอแสดงความขอบพระคุณต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้พิจารณาให้รับ
ทุนอุดหนุนวิจัย จากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2544

ผศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศ และยังมีส่วนในการจ้างแรงงาน มีผลสำคัญต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าผลผลิตกุ้งกุลาดำมีแนวโน้มลดลง สาเหตุหลักเนื่องจากปัญหาการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ในระยะเวลาที่ผ่านมาได้มีผู้ทำการวิจัยและสร้างวิธีตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อทั้งสองชนิด โดยมีความไวในการตรวจสอบสูงและนำมาใช้ตรวจในภาคสนามได้แล้ว สิ่งสำคัญในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสทั้งสองคือ วิธีการตรวจที่ง่าย และรวดเร็ว ประหยัดเวลา สารเคมี และค่าใช้จ่าย ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคไวรัสที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้พร้อมๆกัน เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า Multiplex RT – PCR ได้ทำการออกแบบ primer 2 คู่ จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 135 เบส และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีน noncoding VP28 และ coding VP28 ขนาด 500 เบส จากผลการทดลองสามารถตรวจเชื้อไวรัสได้ประมาณ 10^4 ตัว ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการทำ RT – PCR เพียงขั้นตอนเดียว ซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและสะดวก รวมถึงได้พัฒนาเทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิก (Total nucleic) ที่เป็น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้พร้อมกัน ทำให้ประหยัดเวลาและต้นทุนในการตรวจสอบ

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) applied in diagnosis has the very useful advantages of sensitivity, specificity. We have developed a method for the simultaneous detection of both genomic RNA and DNA for two different species of shrimp viruses, yellow – head virus (YHV) and white – spot syndrome virus (WSSV), which are currently the cause of very serious and widespread losses in the shrimp industry in Thailand and in Asia. We describe a method which allows rapid diagnosis by performing a single step of extraction for both RNA and DNA using CTAB. The co – extract was then used for successful nucleic acid amplification in a multiplex RT – PCR reaction employing the Super Script One multiplex RT – PCR process with primer 10F – 144R for YHV and primer nVP500F and VP500R for WSSV. This multiplex RT – PCR assay system is convenient and sensitivity and should be useful to shrimp aquaculturists for simultaneous detection of YHV and WSSV in post – larvae and broodstock of *P. monodon* and in other asymptomatic carriers.

บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำนับว่ามีบทบาทที่สำคัญต่อการสร้างรายได้ นำเงินตราเข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 50,000 ล้านบาทต่อปี และยังมีส่วนในการจ้างงาน ทำให้เศรษฐกิจโดยรวมของประเทศดีขึ้น แต่ผลผลิตกุ้งในปัจจุบันกลับมีแนวโน้มเป็นไปในทางลดลง สาเหตุหลักเนื่องมาจากปัญหาการระบาดของไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ไวรัสตัวแดงจุดขาว (White spot syndrome virus)

ไวรัสตัวแดงจุดขาวเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้น แต่ยังมีการระบาดไปทั่วภูมิภาคในเอเชีย เช่น อินโดนีเซีย จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น (Lo et al. 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานความเสียหายมากกว่า 80 % ของพื้นที่การเพาะเลี้ยงเมื่อต้นปี พ.ศ. 2542 ในกลุ่มประเทศอเมริกาใต้ สำหรับประเทศไทย โรคนี้ได้ระบาดอย่างมากในทั้งพื้นที่ชายฝั่งทะเลรอบอ่าวไทย ฟังทะเลอันดามัน และบางพื้นที่ทางภาคตะวันออกของประเทศ โดยไวรัสชนิดนี้จะก่อให้เกิดการตายของกุ้งที่เลี้ยงไว้อย่างรวดเร็ว

ในช่วงแรกซึ่งเริ่มมีการระบาดของโรคนี้ สถานการณ์โดยรวมสามารถควบคุมไว้ได้ในระดับหนึ่ง อันเนื่องมาจากใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งเปิดกึ่งปิด ซึ่งช่วยป้องกันไม่ให้สัตว์พาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวเข้ามาในบ่อเลี้ยงได้ ประกอบกับการขยายพื้นที่เพาะเลี้ยงเข้าไปในตอนกลางของประเทศ เช่น นครปฐม สุพรรณบุรี และฉะเชิงเทรา โดยใช้น้ำเค็มต่ำหรือเกือบจืด ทำให้ประเทศไทยยังสามารถครองตำแหน่งผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำแช่แข็ง และสามารถนำรายได้เข้าประเทศได้ถึง 50,000 ล้านบาท ซึ่งนับเป็นมูลค่าที่สูงกว่าปีก่อนหน้านั้น (พ.ศ. 2537) ถึง 50,000 ล้านบาท

อย่างไรก็ดีในช่วงราวปลายปี พ.ศ. 2538 ถึงต้นปี พ.ศ. 2539 ได้มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง ทำให้ฟาร์มเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ส่วนใหญ่ของจังหวัดสุราษฎร์ธานีซึ่งเป็นจังหวัดที่มีผู้ประกอบการอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งมากที่สุดในประเทศไทย ต้องได้ประสบกับปัญหาความสูญเสียอย่างมหาศาล นอกจากพื้นที่ในจังหวัดสตูล กระบี่ ภูเก็ต และระนอง ซึ่งไม่เคยประสบปัญหาไวรัสชนิดนี้มาก่อนก็ต้องเผชิญกับปัญหานี้ ทั้งๆที่พื้นที่ในจังหวัดดังกล่าวมีชายฝั่งอันดามันที่ยาวเหยียดมีระดับน้ำขึ้นลงในวันหนึ่งๆต่างกันถึงประมาณ 2 เมตร ทำให้การเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นไปได้ง่าย ซึ่งหมายความว่าบ่อเลี้ยงกุ้งในแถบนี้ สามารถชำระล้างสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ได้อย่างสะดวก จนยากที่จะคาดคิดได้ว่าจะมีโรคระบาดเข้ามาได้เช่นนี้ ในช่วงเวลาดังกล่าวมีการประมาณกันได้ว่า ความเสียหายที่เกิดขึ้นในพื้นที่ต่างๆรวมกันแล้วไม่ต่ำกว่าร้อยละ 50 ของฟาร์มเลี้ยงกุ้งทั่วประเทศ ไวรัสชนิดนี้ทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว โดยที่ลำตัวของกุ้งที่ติดเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีค่อนข้างแดง และมีจุดขาวขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 มม. ติดอยู่บริเวณเปลือกหุ้มส่วนหัว เมื่อดึงเปลือกหุ้มส่วนหัวออกมาและชุคเอาเนื้อเยื่อที่ติดออก จะสังเกตเห็นจุดขาวที่เปลือกหุ้มอย่างชัดเจน ไวรัสนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม baculovirus มีสารพันธุกรรมเป็น DNA เส้นคู่ (Wongteerasupaya et al., 1995a)

การศึกษาเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวในเวลาที่ผ่านมา ผู้วิจัยได้เริ่มการทำ genomic cloning บางส่วนของไวรัส แล้วนำมาทำเป็น DNA ตรวจสอบ โดยพัฒนาการตรวจสอบเพื่อให้สามารถตรวจพบเชื้อในระยะต้น (early detection) จนปัจจุบันได้พัฒนาวิธีตรวจสำเร็จไปส่วนหนึ่งแล้ว ได้แก่ in situ hybridization ,วิธี PCR และวิธี Nested PCR ตามลำดับ โดยวิธี in situ hybridization สามารถทำการตรวจตัวอย่างกึ่งจากแหล่งต่างๆทั้งภายในประเทศและภายนอกประเทศ เช่น อินโดนีเซีย จีน อินเดีย พบว่าดีเอ็นเอตรวจสอบขนาด 4.2 kb ที่สร้างขึ้นสามารถตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาวในกึ่งชนิดอื่นนอกจากกึ่งกุลาคำอีกด้วย เช่น *P.chinesis* , *P.indicus* , *P.merguiensis* และ *P.vannamei* (Wongteerasupaya et. al.,1996 Kanchanaphum et.al.,1998) ส่วนวิธี PCR และวิธี Nested PCR ได้พัฒนาจนสามารถนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสได้โดยวิธีควมไวในการตรวจสูง และนำมาใช้ตรวจภาคสนามได้แล้ว

ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus ; YHV)

โรคหัวเหลืองในกึ่งกุลาคำเป็นโรคร้ายแรงและเกิดการระบาดอย่างมากเช่นเดียวกับโรคตัวแดงจุดขาว โรคนี้เกิดขึ้นในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อกลางปี พ.ศ. 2534 ที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงกึ่งกุลาคำในแถบจังหวัดสมุทรสาครและสมุทรสงคราม ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งเป็นอย่างมาก และได้มาระบาดอย่างรุนแรงอีกครั้งเมื่อปลายปี พ.ศ. 2540 จนกระทั่งบางพื้นที่ เช่น สมุทรสาครและสมุทรสงคราม ไม่สามารถทำการเลี้ยงกึ่งได้อีกต่อไป ต่อมาโรคนี้ยังได้ระบาดสร้างความเสียหายต่อไปยังจังหวัดในภาคตะวันออกอีกด้วย เช่น ฉะเชิงเทรา จันทบุรี และจังหวัดทางภาคใต้ เช่น นครศรีธรรมราช

กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองนั้นจะสังเกตได้ว่าหัวของกึ่งจะมีสีเหลืองอ่อนแตกต่างจากกึ่งปกติอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งบางครั้งเหงือกจะกลายเป็นสีเหลืองด้วย กึ่งจะกินอาหารน้อยลงจนกระทั่งตายภายในเวลาเพียง 2-3 วัน ฟาร์มที่ประสบกับโรคนี้จะเห็นได้ในวันแรกว่า กึ่งจะว่ายอยู่ที่ผิวน้ำและมีการตายให้เห็นบางเป็นประปราย แต่ต่อมาจำนวนกึ่งที่ตายจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด จนกระทั่งตายหมดบ่อในวันต่อมา ไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ขนาด 160–186x38–50 nm. (Nadala et. al.,1997) ในระยะแรกมีรายงานว่า ไวรัสหัวเหลืองมีสารพันธุกรรมเป็น DNA แต่ภายหลังจากการวิจัยอย่างละเอียดจากคณะผู้วิจัยได้พบว่าสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนี้เป็น RNA (Wongteerasupaya et. al.,1999)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบผสม (multiplex RT-PCR)
2. เพื่อนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจภาคสนาม เช่น ตรวจสอบหาเชื้อในพ่อ แม่ พันธุ์กุ้ง และตรวจลูกกุ้ง nauplii เพื่อเป็นการคัดเลือกลูกกุ้ง หรือตรวจหาการเกิดเชื้อไวรัสในขณะที่ยังไม่แสดงอาการ และเพื่อการตรวจหาพาหะของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด

ขอบเขตการวิจัย

โครงการนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และทำการเก็บตัวอย่างกุ้งไวรัสที่ติดเชื้อตัวแดงจุดขาวและเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากแหล่งต่างๆในประเทศไทยที่มีรายงานการระบาดของเชื้อ และจากห้องปฏิบัติการภาคเอกชนต่างๆ เช่น ศูนย์วิจัยสัตว์น้ำเครือเจริญโภคภัณฑ์ ห้องปฏิบัติการตรวจโรคกุ้งกุลาดำของชมรมกุ้งสุราษฎร์ธานี และห้องปฏิบัติการ Q-PCR จังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ประโยชน์เชิงเศรษฐศาสตร์

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่ทำรายได้เข้าประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกกุ้งสดแช่เย็นและกุ้งแช่แข็งมากเป็นอันดับ 1 ของโลก โดยสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละประมาณ 50,000 – 60,000 ล้านบาทแต่ปัจจุบันอัตราการส่งออกของกุ้งกุลาดำลดลงเป็นอย่างมากเนื่องจากผลผลิตของกุ้งลดลง ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของกุ้งลดลงเนื่องมาจาก เกิดการระบาดของไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง เหตุการณ์ดังกล่าวส่งผลกระทบต่อธุรกิจต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น เกษตรผู้เลี้ยงกุ้ง โรงฟัก โรงงานผลิตอาหารกุ้ง โรงงานห้องเย็น โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์ ทำให้สภาพคล่องในการเพาะเลี้ยงลดลงและจะก่อให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ การพัฒนาชุดตรวจสอบของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดจะทำให้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของการก่อโรคเพื่อป้องกันหรือบำบัดรักษา ซึ่งจะเป็นการลดความเสี่ยงต่อความเสียหายในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้อย่างมาก และในที่สุดจะสามารถเพิ่มผลผลิตและเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน

2. ประโยชน์ทางสังคม

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยติดอันดับ 1 ใน 10 ของสินค้าส่งออกซึ่งเกี่ยวข้องกับการว่าจ้างแรงงานเป็นจำนวนไม่ต่ำกว่า 150,000 คน ผลกระทบที่เกิดจากการระบาดของเชื้อไวรัสโดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัสตัว

แดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองจึงเป็นปัญหาถูกใช้เชื่อมต่อไปยังรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ตลอดจนผู้ประกอบการในธุรกิจต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยง ดังนั้นหากปัญหาดังกล่าวไม่ได้รับการแก้ไขจะส่งผลกระทบต่อสังคมอย่างรุนแรงเนื่องจากไม่มีการจ้างงานทำให้เกิดปัญหาว่างงาน คุณภาพชีวิตของประชากรในพื้นที่ที่เคยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งลดลง ผลการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีของชุดตรวจไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ จะช่วยให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถดำเนินต่อไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

3. ประโยชน์เชิงวิชาการ

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติเรื่อง

Development of multiplex RT-PCR for yellow – head and white – spot virus in *Penaeus monodon*.

4. ประโยชน์ด้านการจดสิทธิบัตร

คาดว่าจะสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงจุดขาวในกุ้งกุลาดำโดยวิธี multiplex RT-PCR ได้สำเร็จซึ่งจะได้ทำการจดทะเบียนสิทธิบัตรในลำดับต่อไป

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับการวิจัยที่ทำ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนมากจะเป็นการพัฒนาความไว (Sensitivity) ของการตรวจเชื้อและการเสาะหาโปรตีนเป้าหมายเพื่อนำไปสู่การพัฒนาวัคซีน รวมถึงการพัฒนาชุดตรวจทางระบาดวิทยาเพื่อป้องกันโรคไวรัส โดยกลุ่มงานวิจัยของ ศ.ดร. วิชัย บุญแสง การศึกษาคุณลักษณะของกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสโดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Peter Walker จาก ออสเตรเลีย การทำ Polyclonal antibody โดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Phipip Lo จากฮาวาย การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีเทคนิค RT-PCR โดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Lightner จากประเทศสหรัฐอเมริกา และการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวโดยเทคนิค PCR โดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Lo จากประเทศไต้หวัน

ระเบียบวิธีวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

- 1.1 กุ้งกุลาดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร แปะดรีว
- 1.2 กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากการทำให้ติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ
ต่างๆ

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม (PCR)	MJ Research Inc., U.S.A.
2.2 เครื่องปั่นเนื้อเชื้อ	Warning, U.S.A.
2.3 ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิต่ำ	Sharp, Japan
2.4 เครื่องชั่งวางน้ำหนักด้านบน	Sartorius, Germany
2.5 เครื่องดูดสารละลายปริมาณต่ำ	Gilson Medical Electronics S.A., France
2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก	Hettich, Germany
2.7 ตู้เย็น – 70 องศาเซลเซียส	Revco, U.S.A.
2.8 ไมโครเวฟ	National, Japan
2.9 เครื่องอิเล็กทรอนิกส์	
2.10 โกร่งบด	Pyrex
2.11 Laboratory sealing film	Whatman
2.12 ชุดถ่ายภาพเจล	Fotodyne

3.เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยเป็นเกรดห้องปฏิบัติการ (Labolatory grade)

ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัท
3.1 thermus aquaticticus (Taq) DNA polymerase	Gibco BRL, U.S.A.
3.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Gibco BRL, U.S.A.
3.3 QIAGEN one step RT-PCR	QIAGEN
3.4 PCR buffer	Gibco BRL, U.S.A.
3.5 SuperSCRIPT one step RT-PCR with PLATINUM <i>Taq</i>	Invitrogen
3.6 $MgCl_2$	Gibco BRL, U.S.A.
3.7 Agarose	Sigma chemical Company , U.S.A.
3.8 Ethidium bromide	Sigma chemical Company , U.S.A.
3.9 Phenol	Gibco BRL, U.S.A.
3.10 Chloroform	Merck, Germany
3.11 Lambda DNA – <i>HindIII</i> Marker	Promega, U.S.A.
3.12 100 bp DNA Ladder	Gibco BRL, U.S.A.
3.13 CTAB buffer	
3.14 DEPC-water	
3.15 Dye	
3.16 70 % ethanol	
3.17 10x TBE buffer	

4. วัสดุภัณฑ์

ตาราง 3 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

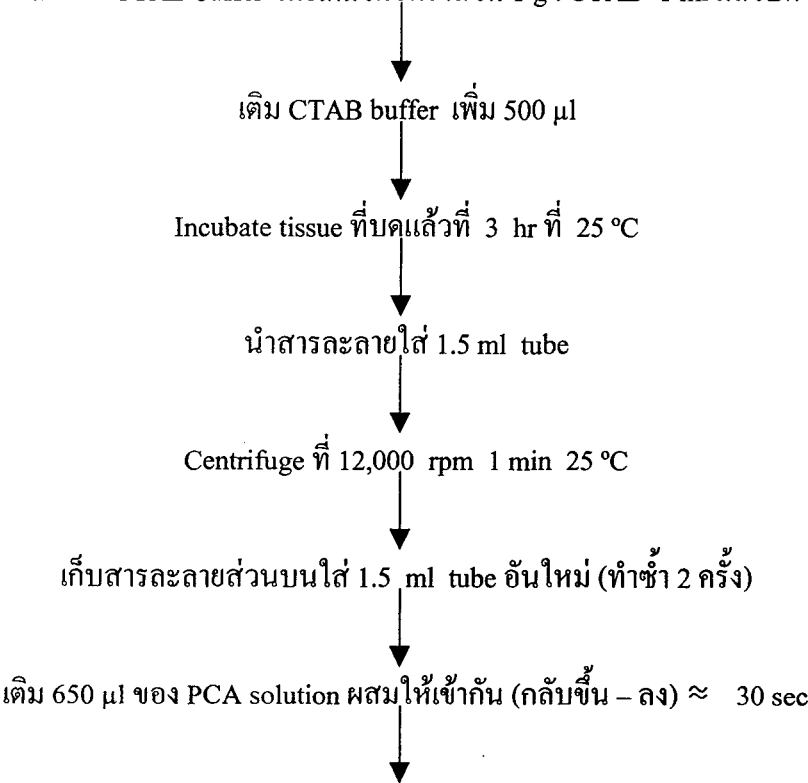
วัสดุภัณฑ์	บริษัท
4.1 Microtube ขนาด 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร	Treff Lab , Switzerland
4.2 Autoclave	Hirayama manufacturing corporation
4.3 Flask 200 ml	Pyrex
4.4 Gravity convection oven	Precision

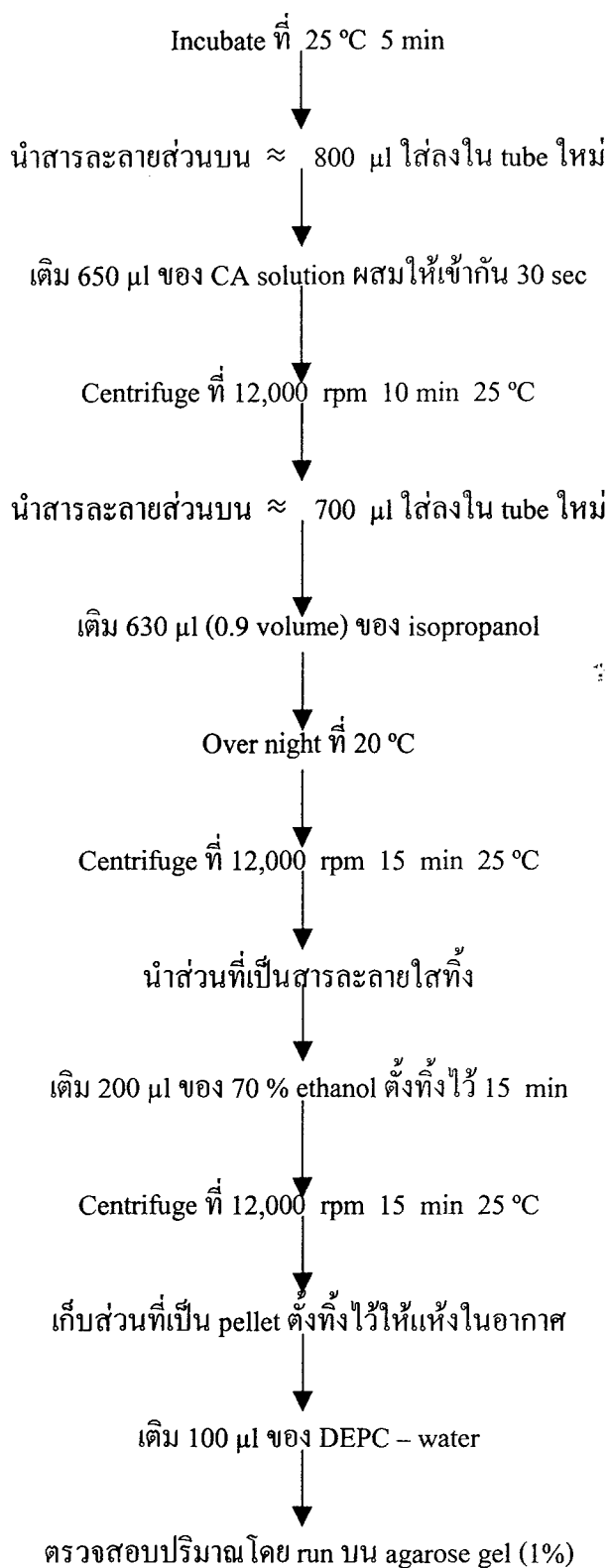
5. การทดลอง

5.1 การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อกุ้ง

โดยนำกุ้งที่เก็บได้จากบ่อตามจังหวัดต่างๆ ที่คาดว่าจะติดเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว นำมาสกัด DNA โดยใช้ CTAB buffer ดังขั้นตอนดังนี้

ทำให้ tissue ละลายใน CTAB buffer โดยเติมในอัตราส่วน 1 g : CTAB 1 ml แล้วบดให้เข้ากัน

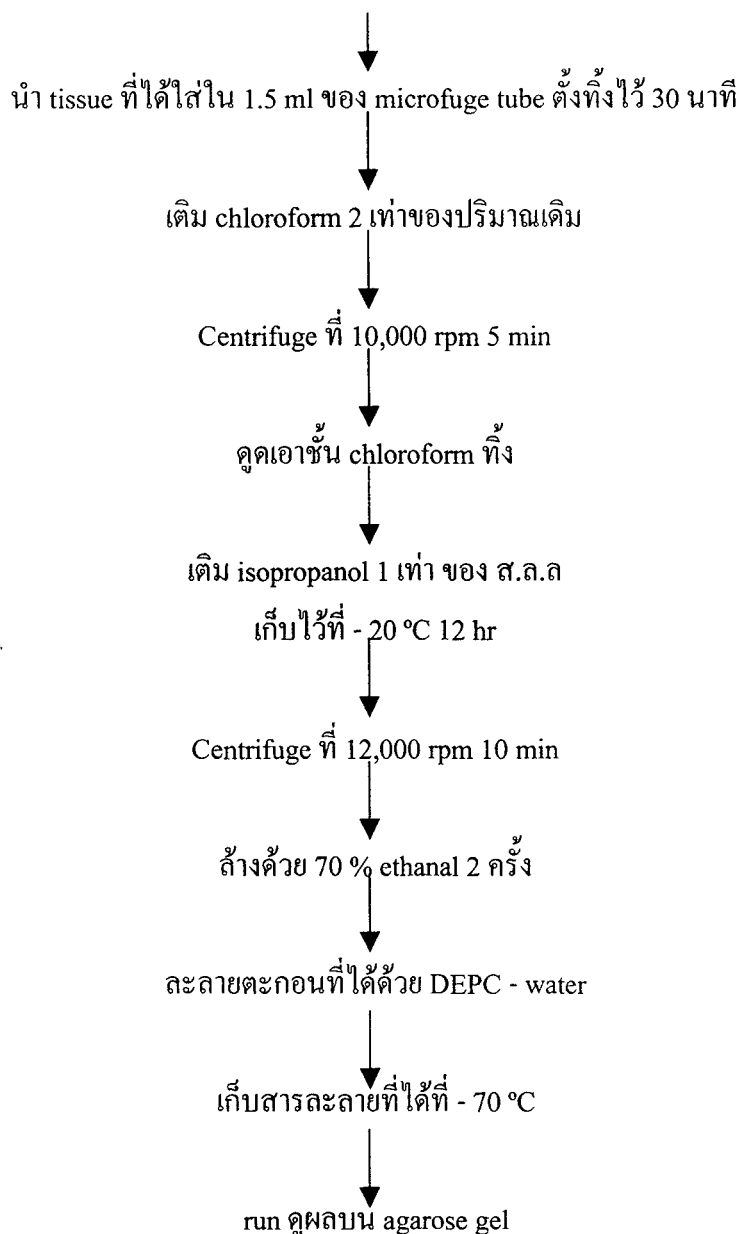




5.2 สกัด RNA จากกุ้งที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองโดยใช้ Trizol

ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ให้กับกุ้งที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลอง ติดตามการ
แสดงออกของโรคในกุ้ง และเก็บกุ้งที่ตายและแสดงอาการของโรคมาสกัด RNA โดยใช้ Trizol
สกัดจากส่วนเหงือก และขาวายน้ำ ดังขั้นตอนดังนี้

นำ tissue ใส่ที่บด เติม Trizol reagent ในอัตราส่วน 1 g : Trizol 1 ml บดให้เข้ากัน



5.3 ออกแบบไพรเมอร์และทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

ออกแบบ primer จากยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างเพื่อศึกษา Conserve sequence ของ WSSV โดยได้ทำการออกแบบ primer จากลำดับเบสของยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง VP28 และ VP28 เป็น 2 ชุด ดังนี้

PCR primer of VP28 coding regions

VP28F ATGGATCTTTCTTCACTCTC

VP28R TTACTCGGTCTCAGTGCCAG

PCR primer of nVP28 for non coding regions

nVP28F	ATTACGGTTACGAAAATTCC
nVP28R	AGAGTGAAAGAAAGATCCAT

5.4 ทำ Polymerase chain reactions

ทำ PCR โดยใช้ 10 ng DNA, 30 pmol primer ในสารละลาย 10 mm

Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM Mg Cl₂, 200 μ m each dATP, dTTP, dCTP

และ dGTP, 25 U Taq PWO DNA polymerase (Gibco-BRL) โดยใช้ PCR cycle

ดังนี้

94°C	30	วินาที
52°C	30	วินาที
72°C	1	นาที
จำนวน	30	รอบ
72°C	10	นาที
จำนวน	1	รอบ

จากนั้นทำการ elute และ purified ผลผลิต PCR โดยใช้

QIAquickTM column (QIAGEN)

5.5 Sequence Analysis

ทำการหาลำดับเบสด้วยใช้ Sequenare (Amersham) และได้ทำการ

เปรียบเทียบ (Alignment) ลำดับเบสโดยใช้ซอฟต์แวร์ Clustal x 1.0 เพื่อการวิเคราะห์หา

ส่วน Conserve

5.6 การเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อ WSSV จากบริเวณ Conserve sequence ด้วยเทคนิค PCR

จากผลการศึกษา conserve sequence ในยีนสังเคราะห์โปรตีน โครงสร้างสามารถนำข้อมูลมาใช้ในการออกแบบ primer จากลำดับเบสของ Viral code protein VP28 ควบคู่กับ Viral code protein nVP28 โดยมีขนาดของผลผลิต PCR เท่ากับ 500 เบส (รูปที่ 2) และมีลำดับเบสดังนี้

NVP 500 F : 5' CAT ATT CTG GCA GCT CAA CCA G

NVP 500 R : 5' TTT GCC CAA GGT GTC GCT GTC

โดยมีส่วนผสมของ PCR reaction ดังนี้

ตาราง 4 ส่วนผสมของ PCR reaction

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Sterile distilled water	13.25
10xPCR buffer	2.50
50 mM MgCl ₂	1.50
dNTPs (10mM)	1
Primer NVP 500 F (20 μM)	1.25
Primer NVP 500 R (20 μM)	1.25
DNA template	2
RNA template	2
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.25
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้น ไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- นำส่วนผสมที่ได้ไปไว้ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้
 - Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 - Annealing step 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 - Extention step 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - Final extention 72 องศาเซลเซียส 10 นาที
 ทำซ้ำ 35 รอบ จากนั้นนำ PCR product เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน
- บันทึกภาพ โดยชุดถ่ายภาพเจล

5.7 การเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสหัวเหลืองบริเวณ ORF 1b gene ด้วย

เทคนิค RT - PCR

ในการทำ RT – PCR มีส่วนประกอบสำคัญ 4 ส่วนคือ

- RNA template คือ RNA สายเดี่ยว ที่ได้จากการสกัด RNA จากกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง DNA template
- QIAGEN one step RT – PCR Enzyme mix

- dNTP mix ความเข้มข้น 10 mM
- Oligonucleotide primer

Primer ที่ใช้

Primer นี้ออกแบบมาจากลำดับเบสบริเวณ ORF 1b gene ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งผลว่าเป็นบริเวณที่มี Conserve sequence ในเชื้อ YHV (รายงานในทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สกว.ปี 2543)

Primer ที่ใช้คือ : YHV135F (forward) 5' GAC ATA ACA CCT TAC GAA

YHV 135R (reverse) 5' AAG GTG TTA TGT CGA GGA AG

ตาราง 5 ส่วนผสมของ RT - PCR reaction

ส่วนผสมของ RT - PCR reaction	ปริมาตร (μl)
DEPC water	13
5x QIAGEN RT – PCR buffer	5
dNTP mix (10 mM)	1
Primer 135F	0.5
135R	0.5
RNA templete	2
DNA templete	2
QIAGEN one step RT – PCR Enzyme mix	1
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- นำส่วนผสมที่ได้ไปไว้ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

DNA synthesis and pre – denaturation

1 cycle of

45 องศาเซลเซียส 30 วินาที

94 องศาเซลเซียส 2 นาที

PCR amplication

40 cycle of

Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Annealing step 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Extention step 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Final extention

1 cycle of

72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ทำซ้ำ 40 รอบ จากนั้นทำ PCR product เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

- ❑ นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน
- ❑ บันทึกภาพ โดยชุดถ่ายภาพเจล

5.8 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบไวรัส 2 ชนิด

ในการทำ Multiplex RT – PCR มีส่วนประกอบสำคัญ 4 ส่วนคือ

- ❑ DNA Templat ,RNA Template
- ❑ QIAGEN one step RT – PCR Enzyme mix
- ❑ dNTP mix (10 mM)
- ❑ Oligonucleotide primer

Primer ที่ใช้

Primer นี้ออกแบบจากลำดับเบสบริเวณ ORF 1b gene ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง ตามลำดับ

Primer ที่ใช้คือ :NVP500F (forward) 5' CAT ATT CGT GCA GCT CAA CCA G
VP500R (reverse) 5' TTT GCC CAA GGT GTC GCT GTC
135F (forward) 5' GAC ATA ACA CCT TAC GAA
135R (reverse) 5' AAG GTG TTA TGT CGA GGA AG

ตาราง 6 แสดงส่วนผสมของ Multiplex RT - PCR reaction

ส่วนผสมของ Multiplex RT - PCR reaction	ปริมาตร (µl)
Autoclaved disstilled water	2.75
2x reaction mix	5
Primer NVP500F	0.25

VP500R	0.25
135F	0.25
135R	0.25
RNA template	-
DNA template	1
RT - platinum <i>Taq</i> mix	0.25
รวม	10

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 นาที
- นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

DNA synthesis and pre - denaturation

1 cycle of

45 องศาเซลเซียส 30 วินาที

94 องศาเซลเซียส 2 นาที

PCR amplication

40 cycle of

Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Annealing step 30 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Extention step 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Final extention

1 cycle of

72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ทำซ้ำ 40 รอบ จากนั้นนำ PCR product เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับขนาด กับ DNA มาตรฐาน
- บันทึกภาพโดยชุดถ่ายภาพเจล

ผลการทดลอง

1.การตรวจสอบ WSSVจากบริเวณconserve sequence

1.1 การศึกษา conserve sequence ในยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง

จากการศึกษาลำดับเบสของยีนสังเคราะห์โปรตีนในส่วน nonCoding จำนวน WSSV 6 isolates และในส่วน coding จำนวน WSSV 4 isolates พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกัน (รูปที่ 1 และรูปที่ 2) แสดงว่ายีนในส่วนของสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง VP28 และ nVP28 มีลักษณะ Conserve สูงมาก จากผลการศึกษา conserve sequence ในยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างนี้สามารถนำข้อมูลมาใช้ในการออกแบบprimer จากลำดับเบสของ Viral code protein VP28 ควบคู่กับ Viral code protein nVP28 (NVP 500 F : 5' CAT ATT CTG GCA GCT CAA CCA G และ VP 500 R : 5' TTT GCC CAA GGT GTC GCT GTC) โดยมีขนาดของผลผลิต PCR เท่ากับ 500 เบส (รูปที่ 3)

```

Sur2nvp28  AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Sur7nvp28  AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Chu1nvp28  AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Chu2nvp28  AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Pad1nvp28  AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Pad2nvp28  AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
vp28       AACTAAAAAATTCATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
-----
Sur2nvp28  CACCCAAGAGANCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
Sur7nvp28  CACCCAAGAGAGCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
Chu1nvp28  CACCCAAGAGANCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
Chu2nvp28  CACCCAAGAGAGCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
Pad1nvp28  CACCCAAGAGAGCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
Pad2nvp28  CACCCAAGAGAGCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
Nvp28      CACCCAAGAGAGCAAACTTCTTCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA CATATTCTGGCAGCTCAACAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAC
-----
Sur2nvp28  AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
Sur7nvp28  AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
Chu1nvp28  AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
Chu2nvp28  AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
Pad1nvp28  AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
Pad2nvp28  AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
Nvp28      AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCTGGCTTACTGTA ACAGAAAAAGAGTAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGCTGTTAC
-----
Sur2nvp28  GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
Sur7nvp28  GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
Chu1nvp28  GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
Chu2nvp28  GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
Pad1nvp28  GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
Pad2nvp28  GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
Nvp28      GTACTCTGTGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAGGTAACCTTTTTTTT TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTGATAAA
-----

```

รูปที่1 Multiple Sequence Alingment ของ VP28 coding gene ในตัวอย่างกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ WSSV
Sur= สุราษฎร์ธานี Chu= ชุมพร Cha= ฉะเชิงเทรา Ref= a reference VP28 noncoding
sequence reported by van Hulten et al
ที่ขีดเส้นใต้คือ primer nVP500F

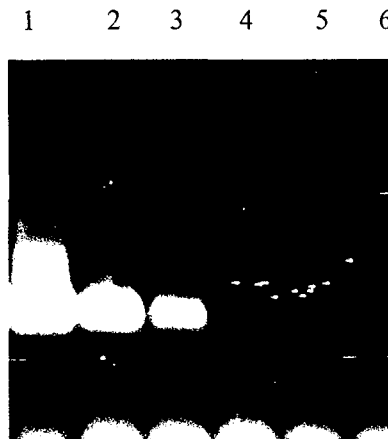
Sur2vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGATTATTGATTTTTAGGTATCA CAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGA
Sur7vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGATTATTGATTTTTAGGTATCA CAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGA
Chu1vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGATTATTGATTTTTAGGTATCA CAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGA
Chu2vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGATTATTGATTTTTAGGTATCA CAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGA
Vp28	-----
Sur2vp28	CAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGAT CAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGG
Sur7vp28	CAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGAT CAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGG
Chu1vp28	CAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGAT CAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGG
Chu2vp28	CAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGAT CAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGG
Vp28	-----
Sur2vp28	CAAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAG AAGATGCGGATCTTGTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAG
Sur7vp28	CAAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAG AAGATGCGGATCTTGTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAG
Chu1vp28	CAAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAG AAGATGCGGATCTTGTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAG
Chu2vp28	CAAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAG AAGATGCGGATCTTGTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAG
Vp28	-----
Sur2vp28	TGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAA CAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAG
Sur7vp28	TGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAA CAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAG
Chu1vp28	TGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAA CAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAG
Chu2vp28	TGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAA CAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAG
Vp28	TGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAA CAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAG

Sur2vp28	ATTAACCCATCAAAGGCCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACC CCCGTCTNTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC
Sur7vp28	ATTAACCCATCAAAGGCCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACC CCCGTCTNTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC
Chu1vp28	ATTAACCCATCAAAGGCCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACC CCCGTCTNTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC
Chu2vp28	ATTAACCCATCAAAGGCCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACC CCCGTCTNTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC
Vp28	ATTAACCCATCAAAGGCCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTCACC CCCGTCTNTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC

รูปที่2 Multiple Sequence Alingment ของ VP28 coding gene ในตัวอย่างกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ WSSV Sur= สุราษฎร์ธานี
Chu= ชุมพร Ref= a reference VP28 coding sequence reported by van Hulten et al 2000
ที่ขีดเส้นใต้คือ primer VP500R

1.2 การศึกษาความไวและความจำเพาะในการตรวจ WSSV บริเวณ VP 28 และ nVP28

ในการตรวจวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของไวรัสตัวแดงจุดขาว โดยไพรเมอร์ nVP500F และ VP 500R พบว่าให้ความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว และให้ความไวในการตรวจสอบในระดับ 0.1 pg (รูปที่3และ 4)



รูปที่3 ผล PCR product ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ที่ได้จากการใช้

primer NVP500F และ VP500R

ช่องที่1-6 WSSV 100-0.001 pg

1 2 3 4 5 6



รูปที่ 4 ผลการศึกษาความจำเพาะในการตรวจสอบไวรัส WSSV โดยใช้

ไพรเมอร์ primer NVP500F และ VP500R

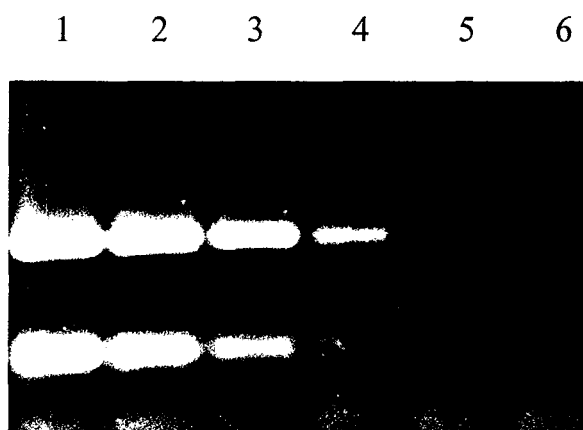
ช่องที่ 1	10 ng of HPV	ช่องที่ 2	10 ng of WSSV
ช่องที่ 3	10 ng of YHV	ช่องที่ 4	10 ng of <i>Salmonella</i>
ช่องที่ 5 –6	100 และ 10 ng of <i>P.monodon</i>		

2.การศึกษาความไวและความจำเพาะในการตรวจYHVบริเวณ ORF 1b gene

จากรายงานครั้งที่1 คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา Conserve sequence ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในส่วนORF1b ขนาด 300bp ซึ่งเป็นขนาดที่ง่ายในการอ่านผลการทดลอง อย่างไรก็ตามหลังจากพบว่primerชุดดังกล่าวให้ผลผลิตที่ไม่จำเพาะร่วมด้วย(nonspecific product :ซึ่งไม่ได้รายงานผล) จึงได้เปลี่ยนมาใช้ primer YHV 135F – YHV144R(Wongteerasupaya et al.,1995b) ซึ่งให้ผลผลิต RT - PCR ที่ได้มีขนาด 135 เบสและไพรเมอร์ ให้ความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลือง และให้ความไวในการตรวจสอบในระดับ 0.01 pg

3.การทำ Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

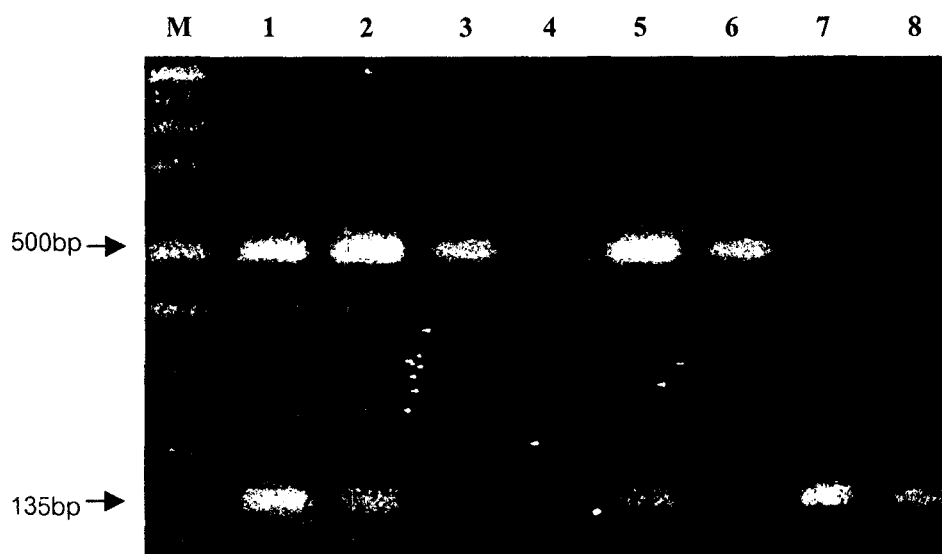
คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการทำMultiplexRT-PCRระหว่างWSSVซึ่งเป็น DNA virus และ YHV ซึ่งเป็นRNA virus(รูปที่5) โดยการทำRT-PCR เพียงขั้นตอนเดียว และยังสามารถทำการสกัดไวรัสที่เป็น DNAและRNA ร่วมกันได้ภายในขั้นตอนเดียว



รูปที่ 5 ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ คือ primer 135F และ 135R กับ primer NV500F และ VP500R ช่อง1-6 คือDNAของเชื้อWSSV และ RNA ของเชื้อ YHV ปริมาณ 100-0.001 pg ตามลำดับ

4.การทำ Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวภาคสนาม

คณะผู้วิจัยได้ทำ Multiplex RT-PCR ระหว่าง WSSV และ YHV ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มีรายงานการติดเชื้อจากที่ต่างๆ ซึ่งการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ผลการตรวจสอบเป็นอย่างดี (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ตัวอย่างการใช้ชุดตรวจสอบ Multiplex-RT-PCR เพื่อตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวในภาคสนามจำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1 2 และ 5 แสดงถึงสถานะติดเชื้อผสม (Mix infection) ตัวอย่างที่ 3 และ 6 ติดเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวและตัวอย่างที่ 4 7 และ 8 ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพียงอย่างเดียว

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงจุดขาว ซึ่งเป็นการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Multiplex RT-PCR ในการทดลองนี้ ได้ทำการออกแบบ primer 2 คู่จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 135 เบส และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีนสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้ม VP 28 และ nVP28 ขนาด 500 เบส ในบริเวณ conserve sequence

ผลการทดลองที่ได้พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองและตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว โดยมีความไวการตรวจอยู่ในระดับ 0.1pg และ 1pg ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณเป็นจำนวนของไวรัสที่จะตรวจได้แล้วนั้น ค่าที่คำนวณได้อยู่ระดับความไวที่สามารถตรวจเชื้อไวรัสได้ในระดับประมาณ 10^4 ตัว ซึ่งนับว่าเป็นระดับความไวเพียงพอกับการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อทั้งสองชนิดพร้อมกันได้ อย่างไรก็ตามความไวในการตรวจสอบยังต่ำกว่าการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ละเชื้อประมาณ 10 เท่า ซึ่งเทคนิค multiplex RT-PCR ที่ต้องมีการพัฒนาให้มีความไวในการตรวจสอบสูงขึ้น

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการทำ Multiplex RT-PCR เพียง 1 ชั้นระหว่าง WSSV ซึ่งเป็น DNA virus และ YHV ซึ่งเป็น RNA virus อีกทั้งยังสามารถทำการสกัดไวรัสที่เป็น DNA และ RNA ร่วมกันได้ภายในขั้นตอนเดียว จึงสามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งได้ถึง 2 เชื้อได้ในเวลาเดียวกันในหลอดทดลองหลอดเดียว ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยประหยัดเวลาในการตรวจสอบ สะดวกในการนำไปใช้ทั้งในห้องทดลองและภาคสนาม รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ ซึ่งในปัจจุบันการตรวจเชื้อไวรัสจากกุ้งโดยแยกเชื้อที่ใช้อยู่มีราคาสูงมาก

ในอนาคตควรมีการพัฒนาชุดตรวจสอบที่สามารถตรวจเชื้อไวรัส HPV ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งไปควบคู่กับการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงจุดขาวให้มีความไวในการตรวจเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นการลดเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ รวมไปถึงลดการสูญเสียรายได้จากการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศ

บรรณานุกรม

- Cowly, AJ., Dimmock, CM., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S. and Walker PJ. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill – associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of Aquatic Organisms*. 36:153-157
- Fegan, DF, TW. Flegel, Siriporn Sriratana and Manuschai Waiakrutra, 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *penaeus monodon* in Southern Thailand. *Aquaculture*. 96:205-217
- Kanchanaphum, P., Boonsaeng, V., Panyim, S., Wongteerasupaya, C., Tassanakajon, A., Withyamchumnarnkul, B., and Flegel, T.W. 1998. Experimental transmission of White – spot baculovirus (WSBV) from crabs to shrimp (*penaeus monodon*) *Diseases of Aquatic Organisms*. 34:1-7
- Lo, CF., Ho, CH., Chen, CH., Liu, KF., Chiu, YL., Yeh, Py., Peng, SE., Hsu, HC., Liu HC., Chang, CF., Su, Ms., Wang, CH. And Kou, GH. 1997. Detection and tissue tropism of white spot baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organ. *Diseases of Aquatic Organisms* .30:53-72
- Lo, CF., Leu, JH., Ho, CH., Chen, CH., Peng, SE., Chen, YT., Chou, CM., Yeh, Py., Huang, CJ., Chou, HY., Wang, CH. And Kou, GH. 1996. Detection of baculovirus with white spot Syndrom virus (WSBV) in penaeid using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25:133-141
- Mullis, K. et al. 1986. “ Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase chain reaction” *Biology*. England: Cold Spring Harbor Symp. Quant
- Nadala, EC., Tapay, LM. And Loh, PC. 1997. Yellow head virus: a rhabdovirus – like pathogen of Penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31:141-146

- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurawatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995a. A non – occluded, systemic Baculovirus that occurs in cells of Ectodermal and Mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21:69-77
- Wongteerasupaya, C., Sriurawatana, S., Vickers, J.E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995b. Yellow – head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22:45-50
- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* Baculovirus PmNOBII give positive *in situ* hybridization with white – spot virus Infection in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*. 143:23-32
- Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow – head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT – PCR amplication. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31: 181-186