

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG5380034

ชื่อโครงการ: การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอให้มีการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ในกึ่งเพื่อยับยั้งไวรัส

hepatopancreatic parvovirus

ชื่อนักวิจัย: ดร.พงโสภิ อัครศาสตร์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมลล์: pongsopee.att@mahidol.ac.th และ attasart_aung@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

ในปัจจุบันการกระตุ้นกระบวนการ RNAi ด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ เป็นวิธีที่ใช้ในการป้องกันไวรัสในกึ่งอย่างมีประสิทธิภาพ เพียงแต่เสถียรภาพในการยับยั้งยีนเป้าหมายจำเป็นต้องได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่หลายครั้ง ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองและไม่สามารถทำได้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงกึ่งระดับฟาร์ม ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการสร้างพลาสมิดที่สามารถผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่อย่างต่อเนื่องในเซลล์กึ่ง

โดยมุ่งหวังให้มีการยับยั้งยีนที่สนใจได้ยาวนานขึ้น พลาสมิดชื่อ pGL3-ie1-dsRab7 ได้ถูกสร้างขึ้นประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของยีน ie1 จากไวรัสตัวแดงดวงขาวและชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rab7 ของกึ่งซึ่งโคลนในรูปแบบ inverted repeat เพื่อให้สามารถสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อยีน Rab7 ในเซลล์กึ่งได้ เมื่อทำการฉีดพลาสมิดนี้เข้าสู่กึ่งแล้ว 3 วันจึงทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าอาร์เอ็นเอของยีน Rab7 มีการลดระดับลงในรูปแบบ dose-dependent และลดลงอยู่ได้นานถึง 3 อาทิตย์ นอกจากนี้พบการลดระดับอาร์เอ็นเอของยีน Rab7 จากการกินอาหารผสมที่มีพลาสมิดนี้ด้วย แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กินอาหารผสมแบบที่เรียที่มีแต่พลาสมิด pGL3 สำหรับการประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งไวรัส hepatopancreatic parvovirus หรือ *Peneaus monodon* densovirus ได้นำกึ่งที่ตรวจสอบแล้วว่าติดไวรัสจากธรรมชาติมาทำการฉีดด้วยพลาสมิด pGL3-ie1-dsNS1 และ pGL3-ie1-dsVP ที่

สามารถผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อยีน ns1 และ ยีน vp ของไวรัส *PmDNV* ได้ตามลำดับ พบการลดระดับของไวรัสลงในกึ่งที่ถูกฉีด พลาสมิดดังกล่าวเมื่อเทียบกับกึ่งที่ถูกฉีดด้วย NaCl หรือ พลาสมิด pGL3 แสดงให้เห็นว่าน่าจะสามารถนำไปใช้ยับยั้งไวรัส *PmDNV* ในกึ่งแม่พันธุ์เพื่อให้ปราศจากไวรัสชนิดนี้ในอนาคตได้

Abstract

Project Code: DBG5380034

Project Title: DNA constructs expressing double-stranded RNA in shrimp for inhibition of
hepatopancreatic parvovirus

Investigator: Dr. Pongsopée Attasart

Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University

E-mail Address: pongsopée.att@mahidol.ac.th,
attasart_aung@hotmail.com

Project Period: 3 years

The dsRNA mediated RNAi activation is currently effective strategy for anti-virus in shrimp. However, the stability of its silencing effect requires multiple administrations, which are costly and not convenient when working in the shrimp farming industries. This study, therefore, we aimed to construct a plasmid that can long lastingly suppress a particular gene of interest. This recombinant plasmid, once administered, it can continuously produce dsRNA *in vivo* (shrimp). The plasmid vector pGL3-ie1-dsRab7, which containing the white spot syndrome virus (WSSV) ie1 promoter and the inverted repeat of shrimp Rab7 gene for dsRNA-Rab7 production was constructed. The result of semi-quantitative RT-PCR showed that the injected pGL3-ie1-Rab7 could suppress the level of shrimp Rab7 transcript at 3 days post injection. Moreover, this silencing effect was detected in a dose-dependent manner and maintained in shrimp for up to three weeks. The silencing efficacy of this DNA

construct via oral route was also investigated. It showed Rab7 suppression but not significantly different when compared with the control (fed with bacteria containing pGL3). For further anti-virus application, the naturally *Peneaus monodon* densovirus (*PmDNV*) (formerly hepatopancreatic parvovirus or HPV) pre-infected shrimp was treated only by injection with the combined plasmid vectors pGL3-ie1-dsNS1 and pGL3-ie1-dsVP that can generate dsRNAs specifically to the *PmDNV* ns1 and vp genes, respectively. The reduction of *PmDNV* was detected in treated shrimp when compared with the control (NaCl or pGL3). It revealed that the injected plasmids could suppress the level of viral ns1 and vp transcript during the replication process leading to the inhibition of *PmDNV*. It can be applied for cleaning up the naturally *PmDNV*-infected shrimp brood stock.

Keywords: Hepatopancreatic parvovirus, *Penaeus monodon* densovirus, shrimp, RNAi, plasmid expressing double-stranded RNA, ie1 promoter