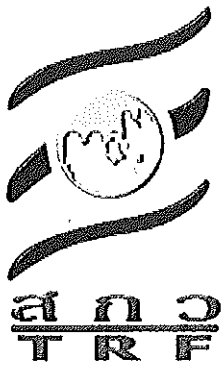


รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ The construction of dsRNA-LSNV and its use for prevention or treatment of LSNV infection in *Penaeus Monodon*

"การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัสแหลมสิงห์และการใช้เพื่อการป้องกันการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ"

โดย นางสาวสมใจ อภิเศวตกานต์

๑๕ พฤษภาคม ๒๕๕๙

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากการที่ผู้ดำเนินการวิจัยได้รับความช่วยเหลือดูแล เอาใจใส่เป็นอย่างดีจากหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะจากอาจารย์นักวิจัยที่ปรึกษา ศาสตราจารย์สกล พันธุ์ยิ้ม และรองศาสตราจารย์เฉลิมพร องค์วรโสภณ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาอย่างดีเยี่ยม ให้ความรู้ อบรมสั่งสอนทักษะการแก้ปัญหาต่างๆ ในการทำวิจัย รวมถึงการปฏิบัติตนเป็นแบบอย่างทั้งในฐานะการเป็นอาจารย์ที่ดี มีคุณธรรมจริยธรรม และเป็นแบบอย่างในการเป็นนักวิจัยมืออาชีพ ตลอดจนยังสละเวลาส่วนตัวของท่านในการให้คำแนะนำที่มีประโยชน์มากมาย และคอยติดตามผลอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังอนุญาตให้ผู้ดำเนินการวิจัยสามารถเข้าทำงานวิจัยให้ห้องปฏิบัติการของท่าน ณ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล รวมทั้งช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยของผู้ดำเนินการวิจัยทุกอย่าง สนับสนุนด้านอุปกรณ์การทำวิจัย ตลอดไปจนถึงสารเคมีราคาแพงที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ผู้ดำเนินการวิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณานี้เป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิจัย นักศึกษาในกลุ่มวิจัยชีววิทยาโมเลกุลของกุ้ง สำหรับคำแนะนำที่มีประโยชน์ น้องๆ นักศึกษาปริญญาเอก ปริญญาโท ผู้ช่วยวิจัยทุกๆ คน ประจำห้องปฏิบัติการ C121 ของ รศ.เฉลิมพร องค์วรโสภณ สำหรับความเป็นเพื่อนที่ดี ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในขณะทำวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดลทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือด้านเอกสารต่างๆ ทำให้การทำวิจัยครั้งนี้ได้รับความสะดวกมากขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอบคุณคุณแพมาลา อุทะนุต สำหรับการให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดจนการดูแลติดตามอย่างต่อเนื่อง

สมใจ อภิเศวตกานต์
ผู้ดำเนินการวิจัย

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG058
(รหัสโครงการ)

Project Title : The construction of dsRNA-LSNV and its use for prevention or
(ชื่อโครงการ) treatment of LSNV infection in *Penaeus Monodon*
"การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัสแหลมสิงห์และการใช้เพื่อการป้องกัน
การติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ"

Investigator : นางสาวสมใจ อภิเศวตกานต์
(ชื่อนักวิจัย) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

E-mail Address : sungko8@yahoo.com

Project Period : 2 ปี
(ระยะเวลาโครงการ)

Abstract

Laem Singh virus (LSNV), was found and appeared to be a candidate for MSGS shrimp. Currently, however, there is no any effective method to stop the widespread of LSNV. Therefore, in the present study, it will be interesting to demonstrate whether dsRNA-LSNV can inhibit LSNV replication in prevention aspects in *P. monodon*. Double stranded RNA-LSNV was produced by means of *in vivo* bacterial expression system. This dsRNA, which encodes for RdRp region (GenBank Accession No. DQ127905), was used to investigate the inhibitory effect using coinjection manner between dsRNA-LSNV vs. crude extract LSNV from lymphoid organ into 500-700 mg healthy shrimp free of LSNV infection. The suppression result was compared with the control coinjection groups of the crude extract LSNV vs. NaCl; and the crude extract LSNV vs. dsGFP. The primarily result exhibited that band intensity of PCR products from dsRNA-LSNV vs. LSNV showed partial inhibition of LSNV replication compared with the virus group.

ไวรัสแหลมสิงห์ (LSNV) ดูเหมือนจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการ monodon slow growth syndrome (MSGS) หรืออาการโตช้าในกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ดีปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่ดีที่สุด

ในการยับยั้งการระบาดของ LSNV ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัสแหลมสิงห์ หรือ dsRNA-LSNV จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ในลักษณะป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้หรือไม่ โดยอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัสแหลมสิงห์บริเวณ RdRp region ถูกสร้างด้วยวิธี bacterial expression system แบบ *in vivo* เพื่อใช้ในการศึกษาผลการยับยั้งเพิ่มจำนวนไวรัส จากนั้นฉีด dsRNA-LSNV พร้อมกับ crude extract LSNV ที่สกัดมาจาก lymphoid organ ของกุ้งที่ติดไวรัสชนิดนี้ แบบ coinjection เข้าไปในกุ้งกุลาดำที่มีขนาด 500-700 mg ที่ไม่เคยติดไวรัส LSNV มาก่อน โดยมีกุ้งกลุ่มที่ฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV พร้อมกับ NaCl เป็นกลุ่มควบคุมแบบ positive control กุ้งกลุ่มที่ฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV พร้อมกับ dsGFP เป็นกลุ่มควบคุมแบบ nonspecific double strand control และกุ้งกลุ่มที่ฉีดด้วย NaCl อย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุมแบบ negative control จากการศึกษาพบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีด coinjection ด้วย dsRNA-LSNV พร้อมกับ LSNV ให้ผลสามารถยับยั้งการติดเชื้อ LSNV ได้บางส่วนเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม

Keywords : *Penaeus Monodon*, LSNV, dsRNA-LSNV
(คำหลัก)

เนื้อหางานวิจัย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส LSNV เมื่อฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV กับ dsRNA-LSNV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus Monodon* แบบ prevention mode

วิธีทดลอง

1. *In vivo* stem production of dsRNAs

1.1 Cell culture and induction

ในการศึกษานี้ได้ผลิต RNA สายคู่ของไวรัสแหลมสิงห์ (dsRNA-LSNV) จาก plasmids pET17b-LSNV รวมทั้งผลิต RNA สายคู่ของ green fluorescent protein (dsRNA-GFP) เพื่อเป็นกลุ่ม dsRNA control จาก plasmids pET3a-GFP โดย plasmids ทั้ง 2 ชนิดเก็บอยู่ในโฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ HT115 (RNase III deficient *E. coli* strain) โดยนำ single colony ของแบคทีเรียสายพันธุ์ HT115 ที่มี pET17b-LSNV หรือ pET3a-GFP บรรจุอยู่ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ LB medium ปริมาณ 5 ml ที่มี 100 µg/ml Ampicillin และ 12.5 µg/ml Tetrachloride ข้ามคืน จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงต่อใน 2XYT medium (สัดส่วน = 1:100) ที่อุณหภูมิ 37°C จนได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.4-0.5 จึงเติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.2 mM ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อกระตุ้นการ expression ของ dsRNA ให้เพิ่มปริมาณมากขึ้น หลังจากบ่มเลี้ยงเซลล์ต่อไปที่อุณหภูมิ 37°C จนได้ค่า OD_{600} ประมาณ 1 หรือจนครบ 4 ชั่วโมง แล้ว จึงทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นตกที่ 6000xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนเก็บ pellet ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

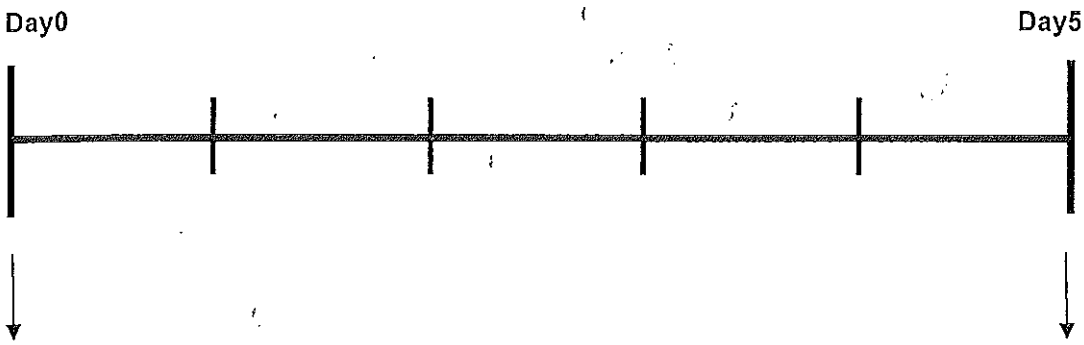
1.2 Treat with RNase A

เพื่อจะกำจัด RNA สายเดี่ยว (single-stranded RNA) บริเวณส่วนที่เป็น loop ของ RNA สายคู่ที่ต้องการศึกษา รวมทั้งกำจัดส่วนที่เป็น RNA ของเซลล์โฮสต์ด้วยนั้น เซลล์แบคทีเรียที่เก็บไว้จะถูกนำมาละลายในสารละลาย 0.1% SDS (สัดส่วน 1OD ของเซลล์ : 50 µl ของ 0.1% SDS) จากนั้นนำ mixture ไปต้มนาน 2 นาที เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแตก ก่อนเติมสารละลาย 5x RNase A buffer ตามด้วยการเติมสารละลาย RNase A (1 µg/OD) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที

1.3 RNA isolation with TriReagent

สกัดและ purify ส่วนของ dsRNA ที่ต้องการศึกษาด้วย TRIZOL reagent (Molecular Research Center) ตามที่แนะนำในคู่มือการใช้ จากนั้นวัดความเข้มข้นของ dsRNA ที่ได้ด้วย UV spectrophotometry ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ –80°C จนกว่าจะใช้ ทำการวิเคราะห์คุณภาพของ dsRNA ที่ได้โดยการทดสอบด้วย RNase A และ RNase III digestion analysis

2. Experimental Plan



Shrimp injection:

Injected into shrimp abdominal muscle (10 shrimp/group) = 30 µl

Group 1: inject NaC (negative control)

Group 2: inject Virus x10^0 + dsGFP (2.5 µg/1g shrimp)

Group 3: inject Virus x10^0 + dsLSNV (2.5 µg/1g shrimp)

Group 4: inject Virus x10^0 (positive control)

Collected gill

↓

RNA isolation

↓

RT-PCR analysis

Setting for RT reaction (10 µl)

PRT (500 ng/µl) 0.25 µl

LSNV-R (10 µM) 0.25 µl

Sample RNA (2.5 µg) + ddH_2O = 5.05 µl

→ incubate 70^{0}C, 5 min

↓

→ on ice 5 min

↓

Add master mix →

annealing 25^{0}C = 5 min

extension 42^{0}C = 2 h

inactivate 72^{0}C = 15 min

hold 20^{0}C ∞

Setting for PCR assay (25 µl)

Denature 94^{0}C = 5 min

Denature 94^{0}C = 30 sec

Annealing 55^{0}C = 30 sec } **35 cycles**

Extension 72^{0}C = 50 sec

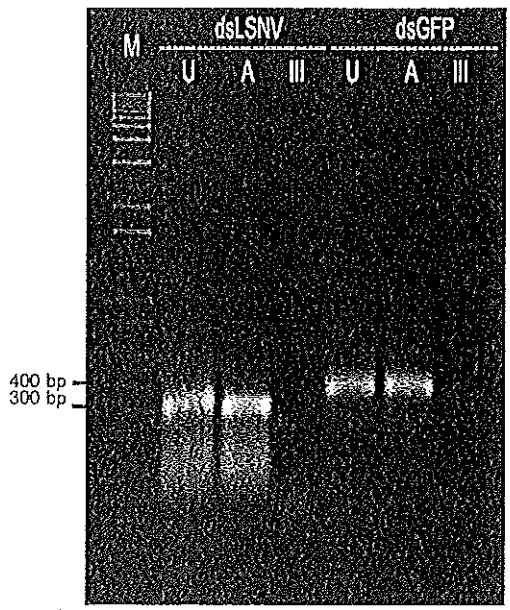
Inactivate 72^{0}C = 10 min

Hold 20^{0}C ∞

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์คุณภาพของ dsRNA โดยการทดสอบด้วย RNase A และ RNase III digestion analysis

ในการผลิต RNA สายคู่ ของ dsRNA-LSNV บริเวณ RdRp gene และ dsRNA-GFP ด้วยเทคนิค *in vivo* ที่มีการ expression ในโฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ HT115 พบ dsRNA-LSNV ขนาดประมาณ 326 bp และพบ dsRNA-GFP ขนาดประมาณ 400 bp เมื่อเทียบกับขนาดน้ำหนักมาตรฐานของ DNA (M) ในการตรวจสอบคุณภาพของ dsRNAs ที่ผลิตได้ โดยนำ dsRNAs มาตัดด้วย RNase A ที่จะตัดเฉพาะ RNA สายเดี่ยว และตัดด้วยเอนไซม์ RNase III ที่จะตัดเฉพาะ RNA สายคู่ พบว่า dsRNAs ทั้งสองชนิดสามารถถูกตัดโดย RNase III ได้ แต่ไม่ถูกตัดโดย RNase A **(รูปที่ 1)** แสดงว่า dsRNAs ที่ผลิตได้นี้ มีคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปศึกษาต่อไปได้



<u>รูปที่ 1</u> การตรวจสอบคุณภาพของ dsRNAs ที่ผลิตด้วยวิธี *in vivo* bacterial expression พบ dsRNA-LSNV ขนาดประมาณ 326 bp และ dsRNA-GFP ขนาดประมาณ 400 bp และผลการตัดด้วยเอนไซม์ RNase A และ RNase III

(M = 1 kb plus marker, U = dsRNAs ที่ไม่ถูกตัด, A = dsRNAs ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase A, III = dsRNAs ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase III, dsLSNV = dsRNA-LSNV, dsGFP = dsRNA-GFP)

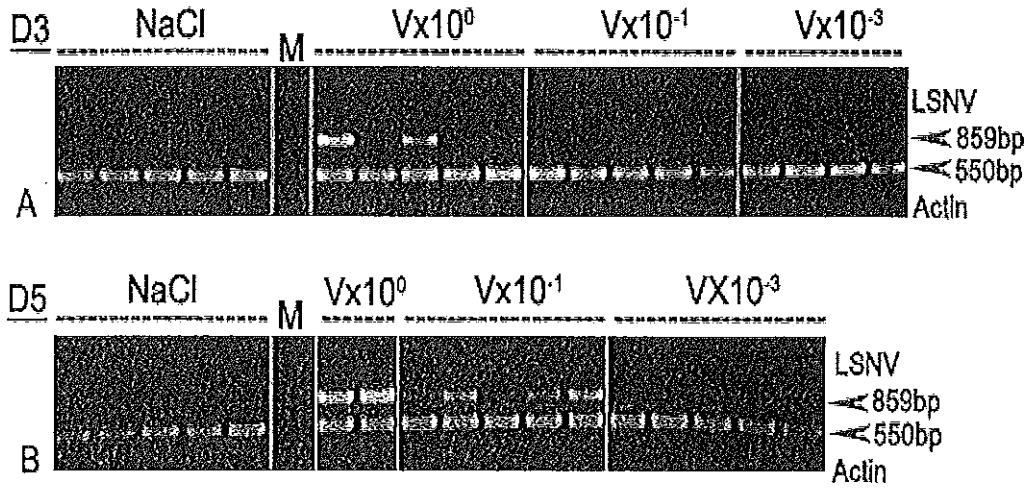
2. Infectivity assay using crude extract of shrimp lymphoid organ-containing LSNV

ในการทดลอง Infectivity assay เพื่อศึกษาขนาดของไวรัสที่ใช้และระยะเวลาที่กุ้งกุลาดำจะติดเชื้อไวรัส โดยใช้กุ้งกุลาดำขนาด 500-700 mg ที่ไม่เคยติดไวรัส LSNV มาก่อน มาฉีดด้วย crude extract LSNV ที่สกัดมาจาก lymphoid organ ของกุ้งแม่พันธุ์ที่ติดไวรัสนี้ โดยในการทดลองนี้จะแบ่งกุ้งกุลาดำเป็น 4 กลุ่ม (n=10 shrimp/group) ฉีดไวรัสเข้า abdominal muscle ของกุ้งด้วย virus titer ขนาดต่าง ๆ คือ 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-3} จากนั้นเก็บกุ้งหลังจากฉีดไวรัสครบแล้ว 3 วัน (D3, n=5 shrimp/group) และ 5 วัน (D5, n=5 shrimp/group) นำส่วนเหงือกกุ้งมาสกัด RNA และวิเคราะห์ผลด้วย RT-PCR โดยใช้ duplex primers ที่จำเพาะต่อไวรัส LSNV ขนาด 859 bp และ Actin ขนาด 550 bp เปรียบเทียบผลการติดเชื้อกับกุ้งกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย NaCl และวิเคราะห์ผลด้วยวิธีเดียวกัน

จากผลการทดลอง **(รูปที่ 2)** ในตัวอย่างกุ้งหลังฉีดไวรัสครบ 3 วัน (D3) พบว่ากุ้งที่ฉีดไวรัสด้วยขนาด 10^{0} ($Vx10^{0}$) พบการติดไวรัสเห็นแถบ DNA ของ LSNV ขนาด 859 bp เข้มมาก จำนวน 2 ตัว และติดไวรัสเห็นแถบ DNA จางกว่า จำนวน 2 ตัว และไม่เห็นแถบ DNA ของ LSNV จำนวน 1 ตัว ส่วนในกุ้งที่ฉีดด้วยไวรัสขนาด 10^{-1} ($Vx10^{-1}$) และกุ้งที่ฉีดด้วยไวรัสขนาด 10^{-3} ($Vx10^{-3}$) ไม่เห็นแถบ DNA ของ LSNV เลย เช่นเดียวกับกุ้งในกลุ่ม control (NaCl)

สำหรับในตัวอย่างกุ้งหลังฉีดไวรัสครบ 5 วัน (D5) พบว่ากุ้งที่ฉีดไวรัสด้วยขนาด 10^{0} พบการติดไวรัส LSNV เห็นแถบ DNA ของ LSNV ขนาด 859 bp เข้มมากและหนามาก จำนวน 2 ตัว* ในกุ้งที่ฉีดด้วยไวรัสขนาด 10^{-1} พบการติดไวรัสเห็นแถบ DNA ของ LSNV เข้มมาก จำนวน 3 ตัว และติดไวรัสเห็นแถบ DNA จางกว่า จำนวน 2 ตัว ส่วนในกุ้งที่ฉีดด้วยไวรัสขนาด 10^{-3} ไม่เห็นแถบ DNA ของ LSNV เลย เช่นเดียวกับกุ้งในกลุ่ม NaCl ซึ่งเป็นกลุ่ม control

(*หมายเหตุ: กุ้งในกลุ่ม $Vx10^{0}$ ตาย 3 ตัวในวันที่ 4 หลังการฉีด จึงเหลือกุ้งรอดที่สามารถนำมาสกัด RNA เพียง 2 ตัว)



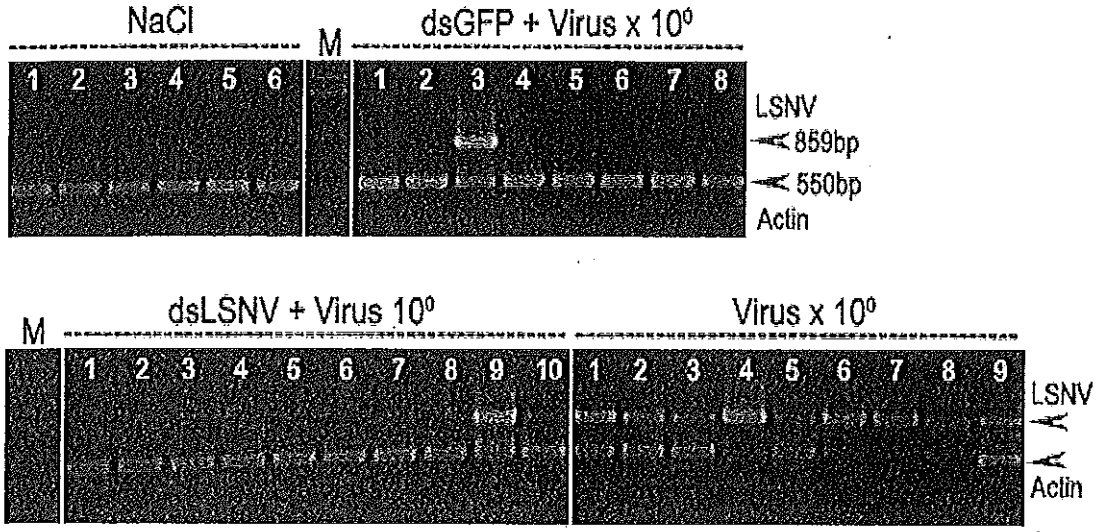
<u>รูปที่ 2</u> ผล infectivity assay แสดงการติดไวรัส LSNV โดยการฉีดไวรัสเข้าบริเวณ abdominal muscle ของกุ้งกุลาดำขนาด 500-700 mg ที่ไม่เคยติดไวรัส LSNV มาก่อนด้วย virus titer ขนาด 10^0, 10^{-1} and 10^{-3} ผลการวิเคราะห์ด้วย duplex PCR พบว่าในกุ้งที่ติดไวรัส LSNV จะแสดงแถบ DNA ขนาด 859 bp โดยการติดไวรัสจะเกิดในกุ้งครบทุกตัวในวันที่ 5 (D5) หลังการฉีด เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งในกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย NaCl

(M = 1 kb plus marker, D3 = กลุ่มกุ้งฉีดไวรัสครบ 3 วัน, D5 = กลุ่มกุ้งฉีดไวรัสครบ 5 วัน, $Vx10^0$ = กุ้งฉีดไวรัสขนาด 10^0, $Vx10^{-1}$ = กุ้งฉีดไวรัสขนาด 10^{-1}, $Vx10^{-3}$ = กุ้งฉีดไวรัสขนาด 10^{-3}, NaCl = กลุ่ม control, Actin ขนาด 550 bp)

3. Inhibitory assay of crude extract LSNV infection by dsRNA-LSNV in prevention mode

ในการทดลองแบบป้องกันการติดเชื้อไวรัส (prevention mode) เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัส LSNV ในกุ้งกุลาดำขนาด 500-700 mg ที่ไม่เคยติดไวรัส LSNV มาก่อน โดยวิธี coinjection ด้วย crude extract LSNV กับ dsRNA-LSNV หรือกับ dsRNA-GFP เริ่มจากแบ่งกุ้งเป็น 4 กลุ่ม ให้กลุ่มที่ 1 ฉีดด้วย NaCl เป็น negative control; กลุ่มที่ 2 ฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV (Virus x 10^0) กับ dsRNA-GFP (ความเข้มข้น 2.5 µg/1g shrimp); กลุ่มที่ 3 ฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV (Virus x 10^0) กับ dsRNA-LSNV (ความเข้มข้น 2.5 µg/1g shrimp); กลุ่มที่ 4 ฉีดด้วย crude extract LSNV (Virus x 10^0) เป็น positive control เก็บตัวอย่างเหงือกกุ้งจากทุกกลุ่มหลังฉีดครบ 5 วัน จากนั้นสกัด RNA จากเหงือกกุ้ง และวิเคราะห์ผลด้วย RT-PCR โดยใช้ duplex primers ที่จำเพาะต่อไวรัส LSNV ขนาด 859 bp และ Actin ขนาด 550 bp เปรียบเทียบผลการติดไวรัสกับกุ้งกลุ่ม negative และ positive controls

จากผลการทดลอง **(รูปที่ 3)** ในกุ้งที่ไม่ตายหลังฉีดครบ 5 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV กับ dsRNA-LSNV สามารถให้ผลยับยั้งการติด LSNV ได้บางส่วน โดยไม่พบแถบ DNA ของ LSNV ขนาด 859 bp ในกุ้ง 6 จาก 10 ตัว (คิดเป็นประมาณ 60%) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ฉีดด้วย crude extract LSNV (positive control) ที่เห็นแถบ DNA ของ LSNV ในกุ้งทุกตัว (คิดเป็น 100%) อย่างไรก็ตามในกุ้งกลุ่มที่ฉีด coinjection ด้วย crude extract LSNV กับ dsRNA-GFP พบผลการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสได้มากกว่า โดยไม่พบแถบ DNA ของ LSNV ในกุ้ง 7 จาก 8 ตัว (คิดเป็นประมาณ 87.5%) และไม่พบแถบ DNA ของ LSNV ในกุ้งกลุ่มที่ฉีดด้วย NaCl (negative control) เลย



<u>รูปที่ 3</u> ผล inhibitory assay ของการติดไวรัส LSNV ในกุ้งกุลาดำแบบ prevention mode โดยในวันที่ 5 หลังการฉีด coinjection ด้วย LSNV x 10^0 กับ dsLSNV พบผลสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้บางส่วน (ประมาณ 60%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม controls ที่ฉีดด้วย NaCl และกลุ่มที่ฉีด Virus x 10^0 อย่างเดียว และพบผลการยับยั้งที่มากกว่าในการฉีด coinjection ด้วย LSNV x 10^0 กับ dsGFP (ประมาณ 87.5%)

(M = 1 kb plus marker, LSNV ขนาด 859 bp, Actin ขนาด 550 bp)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส LSNV ในกุ้งกุลาดำแบบ prevention mode ด้วยวิธี coinjection พบว่าในกุ้งกุลาดำที่ไม่เคยติดไวรัส LSNV มาก่อน เมื่อถูกฉีดด้วย dsRNA-LSNV บริเวณ RdRp region เข้าไปพร้อมกับไวรัส LSNV แล้ว สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งกุลาดำได้บางส่วน คิดเป็นประมาณ 60% เมื่อเทียบกับผลในกลุ่ม controls ที่ฉีดด้วย NaCl เพียงอย่างเดียว หรือกลุ่มที่ฉีดไวรัส LSNV วิเคราะห์ผลจาก duplex PCR ในขณะที่ผลการฉีด coinjection ด้วย dsRNA-GFP พร้อมกับ LSNV แสดงผลการยับยั้งที่มากกว่า โดยคิดเป็นประมาณ 87.5% นั้น น่าจะเกิดจากผลของ off-target ของ dsRNAs ที่สามารถชักนำการตอบสนองของ dsRNAs ที่ไม่จำเพาะเจาะจงในลักษณะ broad spectrum และสอดคล้องกับหลักฐานที่ว่าในพวก invertebrate ชั้นต่ำ มักมีการตอบสนองต่อ dsRNAs แบบ sequence-independent ที่สามารถเหนี่ยวนำการป้องกันแบบ innate immunity ได้ ดังนั้นจึงควรให้ความสนใจในปริมาณของ dsRNA-LSNV กับ dsRNA-GFP ที่ถูกต้องจำเพาะ เพื่อให้การใช้ dsRNA ของ on-target gene มีผลของ antiviral response อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ยังไม่มี

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ: (manuscript in preparation)
2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ:

   Apisawetakan S, Ongvarrasopone C, Panyim S. The construction of dsRNA-LSNV and its use for prevention of LSNV infection in *Penaeus Monodon*. บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี P.435.