

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาความแปรผันของยีน

สังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

Analysis of genetic diversity in gene encoding structural protein
of white spot syndrome virus

รศ.ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

e-mail: Chainarong_swu@yahoo.com

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Abstract

Project Code : RSA/17/2577
Project Title : Analysis of genetic diversity in gene encoding structural protein of white spot syndrome virus
Investigator : Assoc.Prof.Dr. Chainarong Wongteerasupaya,
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Srinakharinwirot University, Sukhumvit23, Bangkok 10110, Thailand
E-mail Address : Chainarong_swu@yahoo.com
Project Period : 1 January 2000 - 31 December 2003

White spot syndrome virus (WSSV) is currently the most serious viral pathogen of shrimp worldwide with estimated losses in production amounting to hundreds of millions of US dollars per year. Research results to date have indicated extremely high DNA sequence homology for WSSV isolates from widely separated geographical regions, suggesting that a single virus species of unknown origin has rapidly spread throughout the world since the first report of serious shrimp mortality caused by WSSV in China in 1993. By contrast, we have found surprisingly high variation in the number of 54 bp DNA repeats in the WSSV ribonuclease reductase gene from 55 shrimp ponds (65 samples) of WSSV infected shrimp from Thailand in 2000 and 2002. These were discovered by polymerase chain reaction (PCR) amplification using DNA template extracted from WSSV infected, cultivated shrimp and using primers (Wrb6r-F 5' TCT ACT CGA GGA GGT GAC GAC 3' and Wrb6r-R 5' AGC AGG TGT GTA CAC ATT TCA TG 3') located upstream and downstream of the repeat region. These were derived from data for 3 complete WSSV genome for the samples examined. The majority (about 32 %) had 8 tandem repeats but others had as few as 6 (about 14%, indicating substantial strain variation in terms of tandem repeat groups. Extracts prepared from individual shrimp in the same outbreak pond belonged to the same repeat group while those collected at the same time from separate WSSV outbreak ponds or from the same ponds at different times tended to belong to different repeat groups. This suggested that the outbreaks were caused by different WSSV isolates. The number of repeats and the sequence within the repeated region showed highly stable. The ORF 94 repeat region has potential for use in epidemiological work with WSSV and may help in tracing its origin and spread.

KEY WORDS: WSSV, DNA sequence variation, ribonuclease reductase, DNA repeat

ผลงานวิจัย

1. วัตถุประสงค์

- 1.1 ค้นหาลำดับเบสที่ใช้บ่งชี้การแปรผันของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่ระบาดในพื้นที่การเพาะเลี้ยงต่าง ๆ เพื่อการศึกษาระบาดวิทยา
- 1.2 ศึกษาคุณลักษณะของลำดับเบสที่ใช้บ่งชี้การแปรผันในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว
- 1.3 ศึกษา stability ของลำดับเบสที่ใช้บ่งชี้การแปรผันในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

2. การดำเนินงาน

2.1 เตรียมตัวอย่างกึ่งกลาดำ

ได้ทำการเตรียมตัวอย่างจากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อในพื้นที่ต่าง ๆ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี จะเขิงเทรา สมุทรสาคร และ จันทบุรี ดังแสดงในรายงานปีที่หนึ่ง เก็บตัวอย่างจากกึ่งกลาดำ โดยให้ 10 เท่าของ 95% ethanol

2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ

บดเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อใน TN buffer (20mM Tris-HCl, 400mM NaCl, pH 7.4) นำไปปั่นที่ 2000g นาน 10 นาที ทำการแยกดีเอ็นเอด้วย proteinase K (0.2mg/ml) และ sarkosyl (1%) ที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 2-4 ชั่วโมง ตามด้วยการสกัด phenol-chloroform

2.3 การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบภาคสนาม

เจาะเลือดกึ่งกลาดำ 10 ml ผสมในสารละลาย 5μM NaOH ปริมาณ 20ml นำสารละลายที่ได้ไปอุ่นที่ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นทำการปั่นที่ 2,000g นาน 2 นาที นำสารละลายส่วนใส ปริมาณ 5 μl ไปใช้เพื่อเป็น template ในการทำ PCR ต่อไป

2.4 ออกแบบไพรเมอร์และทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

2.4.1 ออกแบบ primer จากยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง

ได้ทำการออกแบบ primer จากลำดับเบสของยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างในส่วน coding protein VP28 (VP28F: ATGGATCTTTCTTCACTCTC, VP28R: TTACTCGGTCTC AGTGCCAG) และในส่วน non-coding nVP28 (nVP28F: ATTACGGTTACGA AAATTCC, nVP28R: AGAGTGAAAGAAAGATCCAT)

2.4.2 ออกแบบ primer จาก ORF94

ได้ทำการออกแบบ primer จากลำดับเบสของยีน ORF94 (ORF94F: AGCAGGT GTGTACACATTTTCATG, และ ORF94R: TCTACTCGAGGAGGTGACGAC) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ WSSV genome (WSSVTh, Van Hulten *et al* 2001) เป็น Primer ที่อยู่ upstream และ downstream ของเบสซ้ำ 6 ครั้ง (6 tandem repeats) ที่มีเบสแกน (core) ขนาด 54 เบส (ORF94-54)

2.5 ทำ PCR

ทำ PCR โดยใช้ 10 ng DNA template, 30 pmol ของแต่ละ primer ในสารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 μM each dATP, dTTP, dCTP และ dGTP, 2.5 U Taq PWO DNA polymerase (Gibco-BRL, Life Technologies) ในสาร

ละลาย 50 μ l โดยใช้ PCR thermal cycle ที่ 94 °C นาน 30 วินาที , 52 °C นาน 30 วินาที , 72 °C นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 °C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดย 1.2% agarose gel electrophoresis (Nusieve 3:1) ที่ 5Vcm⁻¹

สำหรับผลผลิต PCR ที่จะนำไปหาลำดับเบสได้ทำการ elute และ purified ผลผลิต PCR โดยใช้ QIAquick™ column (QIAGEN)

2.6 Sequence Analysis

ทำการหาลำดับเบสด้วย Sequenase (Amersham) โดยเครื่อง Automated ABI model 377 Sequencing system (Applied Biosystem) และได้ทำการเปรียบเทียบ (Alignment) ลำดับเบสโดยใช้ซอฟต์แวร์ Clustal W เพื่อการวิเคราะห์หาส่วน Conserve และ variable sequence ต่อไป

2.7 การศึกษา stability ของ base ซ้ำ

ทำการเตรียมเชื้อไวรัสโดยการนำเนื้อกุ้งติดเชื้อ 1 g. บดใน LHM 2.0 ml (ในน้ำแข็ง) เมื่อบดเข้ากันแล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วนำไปฉีดกุ้งปกติ 6-8 ตัว ตัวละ 100 μ l เลี้ยงไว้เป็นเวลา 3 วัน จึงนำกุ้งมาตรวจสอบ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากขำว้ยน้ำของกุ้ง 2-3 ขา ตามวิธี 2.2 แล้วทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดย 1.2% agarose gel electrophoresis เมื่อตรวจสอบแล้วว่ากุ้งที่ได้มีการติดเชื้อจริงก็นำกุ้งที่ได้มาฉีดเข้ากุ้งปกติอีก โดยวิธีข้างต้น ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดย 1.2% agarose gel electrophoresis

2.8 การศึกษาคุณลักษณะของเบสซ้ำ ORF 94 ในพาหะ

การศึกษาคุณลักษณะของเบสซ้ำ ORF 94 ในพาหะได้ทำเช่นเดียวกับการศึกษา stability ของ base ซ้ำในข้อ 2.7 แต่เป็นการฉีดเชื้อเข้าไปในปูแสมจำนวน 5 ตัว เลี้ยงปูแสมเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเนื้อปูแสมไปตรวจสอบลำดับเบสซ้ำ และเนื้อปูแสมอีกส่วนหนึ่งนำไปเตรียมเชื้อไวรัส ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง

3 ผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาความแปรผันของยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง VP28

ผลผลิต PCR จาก VP28 ในส่วน coding มีขนาด 608 bp และ VP28 ในส่วน non-coding (nVP28) มีขนาด 453 bp จากการศึกษาลำดับเบสของยีนสังเคราะห์โปรตีนของทั้งสอง Regions มีลักษณะ conserve (ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง, 5.3.4-5) ไม่สามารถนำมาใช้เพื่อศึกษาความแปรผัน (variation) เพื่อแยกความแตกต่างในแต่ละ isolate ของไวรัสตัวแดงจุดขาวได้

อย่างไรก็ดีได้นำบริเวณ conserve ของ nVP28 ไปประยุกต์เพื่อเป็น positive control ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว เพราะผลผลิต PCR ที่ได้ให้ความไว และความจำเพาะสูงมากและยังได้นำ conserve sequence ในส่วน nVP28 ไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจหาเชื้อแบบ multiplex RT-PCR ระหว่างเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ไวรัสหัวเหลือง และไวรัส HPV ซึ่งได้ผลการทดลองที่มีความไวในการตรวจสอบสูง (กำลังดำเนินการจดสิทธิบัตร) อย่างไรก็ดี ได้ตีพิมพ์ผลงานบางส่วนที่เป็นขั้นตอนการตรวจ Multiplex RT-PCR เพื่อการตรวจไวรัสหัวเหลืองและ GAV ในวารสาร

Journal of Virological Methods vol117, Issue1, April 2004 หน้า 49-59 (ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง, 5.3.1)และขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิต PCR บางส่วนในการตรวจเชื้อไวรัส HPVในวารสาร *Molecular and Cellular Probes* vol16,2002 หน้า 409-413 (ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง, 5.3.2)

3.2 การศึกษาความแปรผันของเบสซ้ำในส่วน ORF94

ได้ทำการศึกษาเบสซ้ำ (เบสที่เป็นแกน 54 bp) ในส่วน ORF94 (GenBank AF 369029) ในการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวตั้งแต่ปี 2000 ถึงปี 2003 พบว่าให้ผลอัลลิลแตกต่างกันจำนวน 6 ครั้งจนถึง 12 ครั้ง (รูปที่1) รายละเอียดในวารสาร *Disease of Aquatic Organisms*, Vol 54 April, 2003 หน้า 253-257 (ผลงานวิจัยตีพิมพ์, 5.1)

ผลการทดลองจะมีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์อุบัติการณ์ของเชื้อ ในงานระบาดวิทยา ดังตัวอย่างจากรูปที่ 1ก และ 1ข ซึ่งเป็นตัวอย่างการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ในช่วงปี พ.ศ. 2543 (รูป 1ก) และในช่วงปี พ.ศ. 2545 (รูป1ข) ซึ่งพบว่า Profile ของการระบาดในบ่อต่าง ๆ ที่จังหวัดเดียวกัน แต่ต่างช่วงเวลายังอาจมีความแตกต่างกันได้จากการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่จังหวัดฉะเชิงเทราในช่วงปี พ.ศ. 2543 พบว่าเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่ระบาดอยู่ ณ ขณะนั้นน่าจะมาจากเชื้อชนิดเดียวกัน (สายพันธุ์เดียวกัน) โดยที่ทุกบ่อจะมีขนาดผลผลิต PCR ขนาด 614 bp (จำนวนเบสซ้ำ 8 ครั้ง และพบมี mix infection บางส่วนในบ่อที่ 5,6,7 และ 9 ที่เบสซ้ำขนาด 1,208 เบสหรือที่จำนวนซ้ำ19ซ้ำ)ซึ่งแตกต่างจากการระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2545

จากการที่มีเบสซ้ำจำนวนที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ของการระบาดจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อ หรือการสืบหาต้นตอของเชื้อได้

3.3 การศึกษา Stability ของลำดับเบสซ้ำใน ORF94

ได้ทำการศึกษา Stability ของเบสซ้ำนี้ โดยการทำ Reinfection จำนวนทั้งสิ้น 3 รอบ จากนั้นตรวจสอบจำนวนเบสซ้ำและลำดับเบส (การทดลองนี้ใช้เบสซ้ำ 7 ครั้ง ซึ่งมีขนาด 560 เบส) ผลการทดลองพบว่ามี Stability 100% (รายงานปีที่ 2)

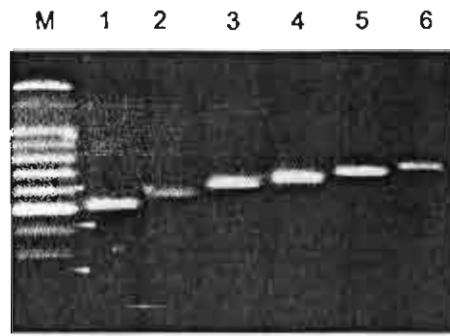
3.4 การศึกษาคุณลักษณะของลำดับเบสซ้ำ ORF94 ในพาหะ

ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของลำดับเบสซ้ำ ORF94 ในพาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว พาหะที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ปูแสม โดยการทำ Reinfection จำนวน 3 ครั้ง(การทดลองนี้ใช้เบสซ้ำมีขนาด 506 เบส)จากนั้นตรวจสอบจำนวนเบสซ้ำและลำดับเบส ผลการทดลองพบว่าจำนวนเบสซ้ำ และ ลำดับเบสของเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ และในพาหะเหมือนกันทุกประการ (รูปที่ 3)

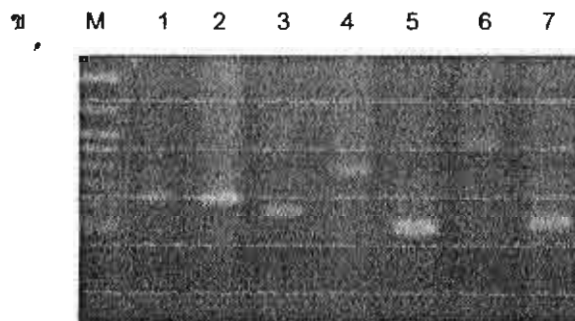
จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นเบสซ้ำ ORF94 เป็นบริเวณที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาสายพันธุ์ไวรัสตัวแดงจุดขาว เพราะมี stability สูงมาก

4.ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ศึกษาจำนวนอัลลิลของORF94 โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้นและศึกษาความสัมพันธ์ของ ORF94 ต่อการก่อโรค และสืบค้นยีนอื่นๆที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อWSSV ให้มากเพียงพอเพื่อให้เกิดความมั่นใจในการตรวจสอบสายพันธุ์ และเป็นการเพิ่มโอกาสการพบความสัมพันธ์ของยีนแปรผันนั้นๆต่อการก่อโรค



รูปที่1 การตรวจสอบความแปรผันของยีนในเชื้อไวรัสของยีนในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ตัวแดงจุดขาว ช่อง 1-6 = ความแตกต่างของดีเอ็นเอ ORF94 ในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่เตรียมจากบ่อต่างๆ โดยมีจำนวนเบสซ้ำ ตั้งแต่ 6-11 ครั้ง M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน



รูปที่2 เป็นเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่ระบาดในจังหวัดฉะเชิงเทราและเก็บตัวอย่างในช่วงวันที่29 กันยายน พ.ศ. 2543 (ก: ช่องที่1-9คือบ่อที่1-9) โดยที่ทุกบ่อจะมีขนาดผลผลิต PCR ขนาด 614 bp (จำนวนเบสซ้ำ 8 ครั้ง) และพบว่ามี mix infection(จำนวนเบสซ้ำ 19 ครั้ง) ในบ่อที่5,6,7และ9 และในช่วงวันที่1-30 มกราคม พ. ศ. 2545(ข: ช่องที่1-7คือบ่อที่ 1-7) พบว่าเป็นเชื้อWSSVที่ต่างชนิดกัน(ยกเว้นในบ่อที่1 และ2ที่พบว่ามีจำนวนเบสซ้ำเท่ากัน) M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน

Ref 1: 142667 tc tactcgagga ggtgacgacg acgacgacga tgac
 Ref 2: 127310 -----
 Chum4: -----

Ref 1: gatggaggaa ctttcgatac agtagggtct ggtatacttg gacgcaaaaa gcgt
 Ref 2: -----
 Chum4: -----

Ref 1-RR54-1: gccgcacctc cacctgagga tgaagaagag gatgatttct accgcaaaaa gcgt
 Ref 2-RR54-1: -----
 Chum4-RR54-1: -----
 P1: -----
 P2: -----
 P3: -----

Ref 1-RR54-2: gccgcacctc cacctgagga tgaagaagag gatgagttct accgcaaaaa gcgt
 Ref 2-RR54-2: -----
 Chum4-RR54-2: -----
 P1: -----
 P2: -----
 P3: -----

Ref 1-RR54-3: gccgcacctc cacctgagga tgaagaagag gatgagttct accgcaaaaa gcgt
 Ref 2-RR54-3: -----
 Chum4-RR54-3: -----
 P1: -----
 P2: -----
 P3: -----

Ref 1-RR54-4: gccgcacctc cacctgagga tgaagaagag gatgagttct accgcaaaaa gcgt
 Ref 2-RR54-4: -----
 Chum4-RR54-4: -----
 P1: -----
 P2: -----
 P3: -----

Ref 1-RR54-5: gccgcacctc cacctgagga tgaagaagag gatgatttct accgcaaaaa gcgt
 Ref 2-RR54-5: -----
 Chum4-RR54-5: -----
 P1: -----
 P2: -----
 P3: -----

Ref 1-RR54-6: gccgcacctc cacctgagga tgaagaagag gatgatttct accgcaaaaa gcgt
 Ref 2-RR54-6: -----
 Chum4-RR54-6: -----
 P1: -----
 P2: -----
 P3: -----

Ref 1: taaactacgc acgaaagtga cgggtggtga aaatagacta atattgttga tatg
 Ref 2: -----
 Chum4: -----

Ref 1: ttaaccocott tttttcatga aatgtgtaca cacctgct 143172
 Ref 2: ----- 127816
 Chum4: -----

รูปที่ 3. ลำดับเบสของORF94 ที่เตรียมได้จาก WSSV ที่จังหวัดชุมพร(Chum4) เปรียบเทียบกับ Ref1 (GenBank AF369029) และ Ref2 (GenBank AF 440570) โดยการทำinfection 3รอบ(P1-P3) ในปูแสม ผลการศึกษาพบว่าลำดับเบสเหมือนกันทุกประการยกเว้น1เบส(ตัวอักษรที่บ)ในตำแหน่งที่36 ที่ต่างไปจาก Ref1-2ใน GenBank

5 ผลงานวิจัย(out put)

5.1 ผลงานตีพิมพ์

Wongteerasupaya C., Pungchai P., Withyachumnrnkul B., Panyim S., and Vichai Boonsaeng. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Disease of Aquatic Organisms* volume 54 : April 2003, Pages 253 – 257

5.2 ประโยชน์ของผลงานวิจัย

5.2.1 เชิงพาณิชย์

ได้เริ่มมีการผลิตชุดตรวจไวรัสหัวเหลือง โดยมีบริษัทเอกชนบางแห่งได้ติดต่อและสั่งซื้อ เช่น บริษัท ชัชลี เป็นต้น แต่เป็นเพียงระยะแรกเท่านั้น จำเป็นต้องมีการพัฒนาชุดตรวจต่อไป เพื่อจะสามารถแข่งขันได้ และยังสามารถเจรจาอย่างไม่เป็นทางการกับ ศ.ดร. Tim Flegel ศูนย์ Centex Shrimp (Chalerm Prakit Building, faculty of Science . Mahidol University) ในการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปทำชุด Kits เพื่อจำหน่าย ซึ่งจะได้ดำเนินการยื่นตัสสัญญาต่อไป

5.2.2 เชิงสาธารณะ

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้เปิดให้มีการบริการวิชาการ ซึ่งเป็นการตรวจสอบสารพันธุกรรมต่าง ๆ รวมถึงการเปิดบริการการตรวจโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ โดยเทคนิค PCR โดยให้บริการแก่บุคคลทั่วไป และ ศูนย์หรือสถาบันต่าง ๆ

เป็นวิทยากรแถลงข่าวในโครงการ"จับดอกเตอร์ทำวิจัย...ต่อยอดปัญญาแก้ปัญหาชาติ"เรื่อง "พบทางพิชิตไวรัสจุดขาวในกุ้งกุลาดำ" วันศุกร์ที่ 21 มิถุนายน 2545 ณ โรงแรมสยามซิตี้ ถนนศรีอยุธยา กรุงเทพฯ จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ลงหนังสือพิมพ์ "เดลินิวส์" คอลัมน์เกษตรวิจัย เรื่องจำแนกสายพันธุ์ไวรัสตัวแดงขาวความสำเร็จเพื่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง ฉบับเดือนกรกฎาคม 2545

5.2.3 เชิงวิชาการ

ได้รับรางวัล "นักเทคโนโลยีดีเด่น" ปี2546กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรมผลิตกุ้งกุลาดำ จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์ และร่วมแถลงข่าวต่อสื่อมวลชนในวันที่ 17 กันยายน 2546 ณ โรงแรมสยามซิตี้ (ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง, 5.3.8)

เป็นวิทยากรจัดการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง " PCR กับการประยุกต์ใช้ " คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ อาคารกายวิภาคศาสตร์ วันที่ 19 – 20 มิถุนายน 2545

เป็นวิทยากรประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง " Molecular Diagnostics and Epidemiology for Shrimp Viruses in Asia " จัดโดย Australian Centre for International Agricultural Research และ Institute of Molecular Biology and Genetics Mahidol University, Salaya Campus Thailand วันที่ 21 – 24 มีนาคม 2545 (ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง, 5.3.6-7)

เป็นคณะกรรมการเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง กลุ่มสุขภาพกุ้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2545 - 2546

ได้สอนนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก ในสาขา อนุชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ รวมถึงการเป็นอาจารย์ควบคุมและสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

5.3 ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

5.3.1. Cowley JA., Codogan LC., Wongteerasupaya C., Hodgson RA., Boonsaeng V., Walker PJ. Multiplex RT – nested RCR differentiation of gill – associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. *Journal of virological Methods* Volume 117, Issue1, April 2004, Pages 49 – 59.

5.3.2 Sukumsirichart W., Kiatpathomchai W., Wongteerasupaya C., Withyachumnarnkul B., Flegel TW., Boongsaeng V., and Panyim S. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR – ELISA. *Molecular and Cellular Probes* volume 16, August 2002, Pages 409 – 413

5.3.3 Kiatpathomchai W., Boonsaeng V., Tassanakajon A., Wongteerasupaya C., Jitrapakdee S., Panyim, S. A non – stop, single -tube, Semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms* Vol 47 Dec. 2001, Pages 235- 239

5.3.4 Chainarong Wongteerasupaya, Studies of genetic variations Among geographic isolates of white spot syndrome virus using enveloped protein VP28 Sequence งานวิจัยด้านอนุชีววิทยา กลุ่มเมธีวิจัยอาวุโส สกว.14 กันยายน 2544 หน้า 3/1-5 ศ.ดร. สกต พันธุ์ยิ้ม

5.3.5 Chainarong Wongteerasupaya, Analysis of Genetic diversity in Ribonucleotide reductase gene of white spot syndrome virus งานวิจัยอนุชีววิทยา ในหนังสือ กลุ่ม เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. สกต พันธุ์ยิ้ม 19 กันยายน 2545 หน้า 9/1-6

5.3.6 Richard Hodgson and Chainarong Wongteerasupaya, Nucleic Acid Hybridization to detect YHV and WSSV Molecular Epidemiology and Diagnostics of Shrimp Viruses in the Asian Region . March 2000. P5/1-12

5.3.7 Boongsaeng V., Tongchuea W., Kanchanaphum P., Klingputsorn R., Wongteerasupaya C., Sittidilokratana N., Jittiwatana K., Tassanakajon A., and Panyim S. PCR-based detection of shrimp viral disease in Thailand in Molecular Diagnostics for shrimp viruses in the Asian Region (work shop II) March 2000, L8/1-5

5.3.8 ศ.ดร. วิชัย บุญแสง, ศ.ดร. สกต พันธุ์ยิ้ม, ศ.ดร. บุญเสริม วิทย ขำนาถกุล, ศ.ดร. ทิมโมที เฟลเกิล, รศ.ดร. อัญชลี ทัศนชาจร, รศ.ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และ ดร.ศิวาภรณ์ กลิ่นบุหงา ในหนังสือรางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่น ประจำปี 2546 กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยี เพื่ออุตสาหกรรมผลิตกุ้งกุลาดำ เรื่อง การใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอในการวินิจฉัยโรคและการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ หน้า 1-26

5 ผลงานวิจัย(out put)

5.1 ผลงานตีพิมพ์

Wongteerasupaya C., Pungchai P., Withyachumnrnkul B., Panyim S.,and Vichai Boonsaeng. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Disease of Aquatic Organisms* volume 54 : April 2003, Pages 253 – 257

NOTE

High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand

Chainarong Wongteerasupaya¹, Paranee Pungchai², Boonsirm Withyachumnarnkul³,
Vichai Boonsaeng³, Sakol Panyim³, T. W. Flegel^{3,*}, Peter J. Walker⁴

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and ²Department of Biology, Faculty of Science Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Road, Bangkok 10110, Thailand

³Centex Shrimp, Chalerm Prakiat Building, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

⁴CSIRO Livestock Industries, Long Pocket Laboratory, Indooroopilly, Brisbane, Queensland 4068, Australia

ABSTRACT: White spot syndrome virus (WSSV) presently causes the most serious losses to shrimp farmers worldwide. Earlier reports of high DNA sequence homology among isolates from widely separated geographical regions suggested that a single virus was the cause. However, we have found surprisingly high variation in the number of 54 bp DNA repeats in ORF94 (GenBank AF369029) from 55 shrimp ponds (65 shrimp samples) experiencing WSSV outbreaks in Thailand in 2000 and 2002. These were detected by PCR amplification using primers ORF94-F and ORF94-R flanking the repeat region. Altogether, 12 different repeat groups were found (from 6 to 20 repeats) with 8 repeats being most frequent (about 32%). Extracts prepared from individual shrimp in the same outbreak pond belonged to the same repeat group while those collected at the same time from separate WSSV outbreak ponds, or from the same ponds at different times, usually belonged to different repeat groups. This suggested that different outbreaks were caused by different WSSV isolates. In contrast to the highly variable numbers of repeats, sequence variation within the repeat region was confined to either T or G at Position 36. These variations may be useful for epidemiological studies on the local and global movement of WSSV, since there is high variation in the number of repeats (good for local studies) but little sequence change (good for global studies).

KEY WORDS: WSSV · DNA sequence variation · Tandem DNA repeat

Resale or republication not permitted
without written consent of the publisher

High losses from white spot syndrome virus (WSSV) were first reported from cultivated shrimp ponds in China, 1993, but these subsequently spread to most major shrimp cultivation areas globally in succeeding years (Flegel 1997, Lightner 1996). It is currently the most serious viral pathogen of shrimp worldwide, with estimated losses in production amounting to several

hundred million US dollars per year in Asia alone (Flegel & Alday-Sanz 1998). Characterization of WSSV has shown that it is a tailed, rod-shaped, double-stranded DNA virus (Wongteerasupaya et al. 1995, Lightner 1996) with a very large genome in the order of 300 kb (van Hulten et al. 2001). Since the genome has no significant homology to any known virus, it has been assigned to a new viral family (*Nimaviridae*) and a new viral genus (*Whispovirus*) (van Hulten et al. 2001; www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm).

Sequence comparison of relatively small regions of the total genome have shown very little variation in widely separated geographical isolates of WSSV (Lo et al. 1999, Wang et al. 2000). This high uniformity in DNA sequences suggests that a single virus species is responsible for the worldwide outbreaks caused by WSSV and has also made it difficult to trace movements of the virus with any degree of certainty. Recent publications (Tsai et al. 2000, van Hulten et al. 2000) and deposition of full WSSV genome sequences at GenBank (AF369029 from Thailand hereinafter called WSSV-Th, AF440570 from Taiwan hereinafter called WSSV-Tw, and AF332093 from China hereinafter called WSSV-Ch) have revealed the presence of several tandemly repeated DNA sequences. For example, ORF94 in WSSV-Th (van Hulten et al. 2001) contains 6 tandem repeats of a 54 bp sequence (hereinafter called ORF94-54) as does WSSV-Tw (ORF WSSV234). By contrast WSSV-Ch (ORF WSV178) has 12 repeats. The only sequence variation within the repeat region is alternation of G or T at Position 36 of the repeat. We considered that this repeat region might be useful for comparison of WSSV from shrimp culture ponds experiencing white spot disease outbreaks. Our strategy

*Corresponding author. Email: sctwf@mahidol.ac.th

Table 1. Source, date and number of samples collected for the study

Province	Location	Date	No. of ponds
Chantaburi	SE coast, Gulf of Thailand	25 to 29 Jan 2002	6
Chacheongsao	Central Thailand near Bangkok	29 Sep to 10 Oct 2000	8
		1 to 30 Jan 2002	17
Chumporn	Mid-SW coast, Gulf of Thailand	11 to 29 Nov 2000	4
		28 Nov 2002	1
Surat Thani	Lower SW coast, Gulf of Thailand	9 and 24 Oct 2000	11
		26 Nov to 13 Dec 2002	6
Nakornsrihumarat	Lower SW coast, Gulf of Thailand	5 Sep to 13 Oct 2000	2
Total			55

was to construct PCR primers bracketing the multiple repeat region of the ribonuclease reductase gene of WSSV, to use these with template DNA extracted from a variety of WSSV-infected Thai shrimp, and to sequence any PCR products for possible variation. We found wide variation in the number of tandem repeats but little change in sequence amongst the isolates tested.

Materials and methods. Shrimp specimens: A total of 65 specimens of shrimp were collected from 55 Thai shrimp ponds experiencing outbreaks of white spot disease (WSD) over the interval October 2000 to January 2002. Pleopods from live, moribund shrimp showing gross signs of WSD were clipped with scissors cleaned in alcohol and placed directly in 95% ethanol for transport to the laboratory (volume of ethanol 10 times more than tissue placed in it). Farming areas included in the study were Chantaburi Province on the east coast of the Gulf of Thailand, Chacheongsao Province in central Thailand and Surat Thani and Chumporn provinces in the mid-south on the west coast of the Gulf of Thailand (Table 1).

Nucleic acid purification: Infected tissues were homogenized in TN buffer (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4). After centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min, DNA was isolated by treatment with Proteinase K (0.2 mg ml⁻¹) and sarkosyl (1%) at 45°C for 2 to 4 h followed by phenol-chloroform extraction (Sambrook & Russel 2001).

PCR reactions: The primers used were derived from ORF94 of WSSV as part of the total genome of WSSV-Th (van Hulten et al. 2001) and designed to act as upstream and downstream brackets to 6 tandem repeats of a 54 bp sequence (ORF94-54). The primers were ORF94-F (5'-TCT ACT CGA GGA GGT GAC GAC-3') and ORF94-R (5'-AGC AGG TGT GTA CAC ATT TCA TG-3'). For the PCR, 10 ng DNA template and 30 pmol each primer were added to 50 µl reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM each dATP, dTTP, dCTP

Table 2. Number and frequency of ORF94 repeats found in PCR products from DNA extracts of 65 Thai shrimp samples taken from 55 white spot syndrome virus (WSSV) outbreak ponds

No. of repeats	Amplicon size (bp)	No. of shrimp	No. of ponds	Frequency for ponds
6	506	9	8	0.14
7	560	8	6	0.10
8	614	19	18	0.32
9	668	10	8	0.14
10	722	5	3	0.05
11	776	1	1	0.02
12	830	4	4	0.07
13		—	—	—
14	938	2	2	0.04
15	992	1	1	0.02
16		—	—	—
17	1100	2	2	0.04
18		—	—	—
19	1208	3	1	0.02
20	1262	1	1	0.02
Total		65	55	—

and dGTP, 2.5 U TaqDNA polymerase Gibco-BRL (Life Technologies). The mixture was incubated in a thermal cycler using 35 cycles of 94°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final elongation step at 72°C for 10 min. The PCR products were resolved by 1.2% agarose gel electrophoresis (Nusieve 3:1) at 5 V cm⁻¹.

Sequence analysis: PCR amplicons were purified from agarose gels using a QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) and were sequenced using Thermo Sequence™ (Amersham) and an Automated ABI model 377 Sequencing system (Applied Biosystem). Sequence alignment and estimation of sequence identity were conducted using Clustal W software.

Results and discussion. A preliminary test of 3 shrimp each from 4 outbreak ponds (not shown) indicated that multiple shrimp specimens from the same pond would give the same result for ORF94 repeat group, although larger samples would be needed to

Table 3. Pattern of ORF94 repeat groups for WSSV outbreak ponds sampled in 2000 and 2002

No of repeats	2000				2002				Total
	Surat Thani	Chum-porn	Chat-cheongsao	Nakorn-srithamarat	Surat Thani	Chum-porn	Chat-cheongsao	Chanta-buri	
6	4	1					3		8
7		1			1		4		6
8	2	1	8		2		5		18
9	5	1				1	1		8
10				2			1		3
11								1	1
12					1		2	1	4
14								2	2
15							1		1
17					1			1	2
19			5 ^a		1				1
20								1	1
Total	11	4	8	2	6	1	17	6	55

^aIn agarose gels, the band for 19 repeats was faint (except for 1 sample) and additional to the stronger band for 8 repeats. Two amplicons possibly indicated simultaneous infection by 2 different WSSV types

test this assumption rigorously. Based on this test, we assumed that each pond outbreak was caused by a single WSSV type, and only 1 to 3 individual shrimp were tested from each pond. The DNA extracts from 65 samples of WSSV-infected shrimp from 55 ponds gave a variety of amplicons using the primers ORF94-F and ORF94-R (Table 2), suggesting differences in the number of repeats from pond to pond. An example gel for fragments representing 6 to 11 repeats is shown in Fig. 1. The most frequently encountered number of ORF94-54 repeats was 8, but the range was 6 to 20. The GenBank records for WSSV-Th and WSSV-Tw (6 repeats) and WSSV-Ch (12 repeats) fell within this range. For the sake of explanation, we numbered these repeats regions ORF94-1 to ORF94-20, realizing that there were no ORF94-13, -16 and -18 repeats.

When comparing the number of ORF94 repeats found in samples from various shrimp farming areas (Table 3), there was no particular pattern, except in 2000 for Chacheongsao, where ORF94-8 dominated and Surat Thani, where ORF94-9 dominated. Also, the Chacheongsao samples gave 2 PCR amplicons, a strong one for ORF94-8 and a lighter one for ORF94-19, possibly indicating infections with 2 strains of WSSV. Alternatively, it could have been a non-specific amplification product, although that would appear to be unlikely considering that 2 amplicons occurred in only 5 of the 8 shrimp tested (i.e. not all) and that no double amplicons occurred only in this sample. However, PCR product sequencing would be necessary to resolve this issue. In addition to differences in repeat pattern between ponds and areas, the pattern of repeats for Chacheongsao in 2000 and 2002 also differed (Table 3).

Sequencing several of the fragments confirmed the presence of the 54 bp tandem repeat identical to that in WSSV-Th, WSSV-Tw and WSSV-Ch at GenBank, including variation in an alternate T or G at Position 36 (Table 4). In the initial repeat (ORF94-1), T at Position 36 was invariant in all the sequenced fragments and in WSSV-Th, WSSV-Tw and WSSV-Ch. T was also invariant for ORF94-2, except for G found in WSSV-Th (Table 4). Discounting ORF94-1 and ORF94-2, where T was overwhelmingly dominant, the number of T (24) and G (22) was almost equal for the remaining repeats, although distribution amongst the repeats varied (Table 4).

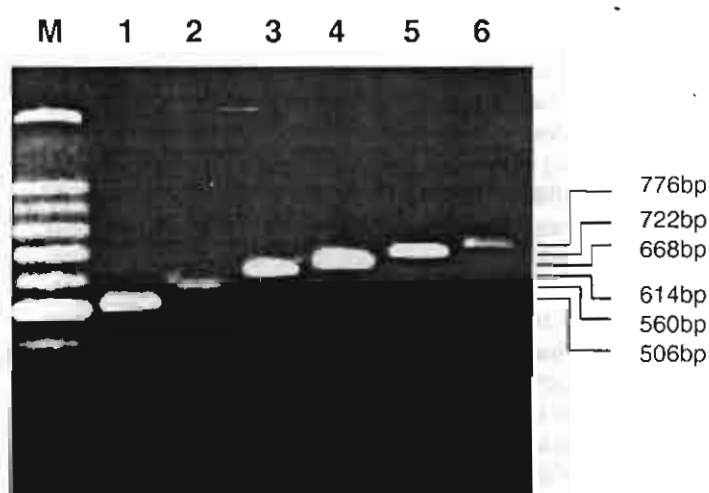


Fig. 1. Example agarose gel showing PCR amplification products for 6 (Lane 1) to 11 (Lane 6) ORF94 repeats

Table 4. Summary of substitutions found at Position 36 in sequenced ORF94 tandem repeat regions of selected amplicons from Thai shrimp samples from Surat Thani (Surat) and Chumphol (Chum), compared to GenBank references for white spot syndrome virus (WSSV) in Taiwan, China and Thailand (WSSV-Tw, -Ch and -Th) with 6 and 12 ORF94 repeats

Isolate	ORF94 repeat number											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Surat #1	T	T	T	T	G	T	T	G	T			
WSSV-Tw	T	T	T	G	T	T						
Chum #2	T	T	T	G	T	G	T					
Chum #4	T	T	T	G	G	G						
Surat #2	T	T	G	T	T	G	G	T				
Chum #3	T	T	G	T	T	G	G	T				
WSSV-Ch	T	T	G	G	G	G	G	G	T	T	T	T
WSSV-Th	T	G	G	G	T	T						

Only 2 of the sequenced PCR products had identical numbers of repeats and identical sequences. These were Surat #2 and Chum #3, both with 8 repeats and derived from outbreak ponds in the interval October to November of 2000 (Table 4). The result suggested that these outbreaks were caused by the same type of WSSV, even though they were separated by several hundred kilometers. This being the case, it is unlikely that the ponds became infected by cross contamination. On the other hand, these 2 provinces are adjacent to each other and it is possible that the owners obtained post-larvae (PL) for stocking the ponds from the same source. Indeed, it is considered that WSSV infected PL are the main cause of WSD outbreaks in Thailand (Withyachumnarnkul 1999). A similar argument might apply to the Chacheongsao 2000 samples that also gave identical results with PCR products for ORF94 repeats of 8 and 19. By contrast, repeat groups from Chacheongsao in 2002 mostly differed from pond to pond, and also differed from those in 2000. Similarly, samples from Chum #2, 3 and 4 collected at the same time in 2000 were all dissimilar in number of repeats and base pattern for Position 36. Perhaps these ponds used PL from different sources.

Other than Surat #2 and Chum #3, the variants in Table 4 show no obvious relationships. It is particularly interesting that WSSV-Th that originated from Thailand in 1996 (van Hulten et al. 2002) is markedly different from Chum #4 (also 6 repeats) and all the Thai isolates we sequenced from 2000 and 2002. Perhaps this was because we sequenced only 1 isolate with 6 ORF94 repeats. Alternatively, it may indicate that changes have occurred in WSSV over time.

Obviously, the number of samples employed in this study was too small and taken at too intermittent intervals to make firm conclusions. However, they do show that the ORF94 repeat region has potential for use in epidemiological work with WSSV and may help in tracing its origin and spread. For example, it would be possible to use the method described herein to exam-

ine captured broodstock to determine the prevalence of various WSSV types and to compare this with the prevalence of the types found in outbreak ponds. It would also be useful, if possible, to trace the sources of PL for the various ORF94 groups associated with outbreaks. This is generally not possible in Thailand due to fragmentation in the shrimp industry (i.e. unrelated broodstock suppliers, nauplius producers, PL producers and farmers), but it may be possible elsewhere or with a large integrated shrimp operation.

ORF94 lies together with other ORF of unknown function between genes for the large subunit (ORF92) and small subunit (ORF98) of WSSV ribonucleotide reductase (RR). In WSSV-Th, -Tw and -Ch, the open reading frames for ORF94 are maintained in the multiple repeats with the stop codon falling exactly at the end of the last repeat. There is no sequence variation amongst the 3 except for Position 36 of the repeat that leads to an alternate aspartic acid (D) or glutamic acid (E) in the putative protein sequences. The large variation in tandem repeats leads one to question whether ORF94 could produce a functional protein. Perhaps its function (if any) is related to DNA transcription or conformation. Given that all of the samples studied came from WSD outbreak ponds and showed variable ORF94 repeat length, it is not immediately obvious whether repeat length might be useful in identifying virulent strains of WSSV. However, the possibility should be explored.

Acknowledgements. The authors would like to thank the Thailand Research Fund, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology and the Australian Centre for International Agricultural Research for support to carry out this work.

LITERATURE CITED

Flegel TW (1997) Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol 13:433–442
Flegel T, Alday-Sanz V (1998) The crisis in Asian shrimp

- aquaculture: current status and future needs. *J Appl Ichthyol* 14:269–273
- Lightner DV (1996) A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, Lightner DV (1999) Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 35:175–185
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, Tzeng HF and 6 others (2000) Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277:92–9
- van Hulten MC, Tsai MF, Schipper CA, Lo CF, Kou GH, Vlak JM (2000) Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol* 81: 307–16
- van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N and 5 others (2001) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7–22
- van Hulten MC, Reijns M, Vermeesch AM, Zandbergen F, Vlak JM (2002) Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J Gen Virol* 83: 257–65
- Wang Q, Nunan LM, Lightner DV (2000) Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Dis Aquat Org* 43:175–81
- Withyachumnarnkul B (1999) Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Org* 39:21–27
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL and 6 others (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in the cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69–77

Editorial responsibility: Carey Cunningham,
Aberdeen, Scotland, UK

Submitted: August 21, 2002; Accepted: December 19, 2002
Proofs received from author(s): March 20, 2003

5.3 งานผลวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

5.3.1

Cowley JA., Codogan LC., Wongteerasupaya C., Hodgson RA., Boonsaeng V., Walker PJ. Multiplex RT – nested RCR differentiation of gill – associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of Penaeus monodon. *Journal of virological Methods* Volume 117, Issue1, April 2004, Pages 49 – 59.

Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*

Jeff A. Cowley^{a*}, Lee C. Cadogan^a, Chainarong Wongteerasupaya^b, Richard A.J. Hodgson^a,
Vichai Boonsaeng^c, Peter J. Walker^a

^a*CSIRO Livestock Industries, Queensland Bioscience Precinct, 306 Carmody Road,
St. Lucia 4067, Australia*

^b*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit
23, Bangkok 10110, Thailand*

^c*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road,
Bangkok 10400, Thailand*

*** Correspondence to:** Jeff A Cowley
CSIRO Livestock Industries
Queensland Bioscience Precinct
306 Carmody Road
St. Lucia 4067
Australia
, Tel: +61-7-3214-2527 Fax: +61-7-3214-2900
E-mail address: Jeff.Cowley@csiro.au

Total number of pages: 28

Total number of figures and tables: 7

Acknowledgments

We thank CSIRO Marine Research and Queensland prawn farm and hatchery operators for supplying prawns. This research was supported in part by the Australian Centre for International Agricultural Research, the National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology of Thailand and the Thailand Research Fund.

Abstract

A multiplex RT-nested PCR has been developed to detect and differentiate the closely related prawn viruses, gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand. RT-PCR using primers to conserved sequences in the ORF1b gene amplified a 794 bp region of either GAV or YHV. Nested PCR using a conserved sense primer and either a GAV- or YHV-specific antisense primer to a divergent sequence differentially amplified a 277 bp region of the primary PCR amplicon. Multiplexing the YHV antisense primer with a GAV-antisense primer to another divergent sequence allowed the viruses to be distinguished in a single nested PCR. Nested PCR enhanced detection sensitivity between 100-1000-fold and GAV or YHV RNA was detectable in ~10 fg lymphoid organ total RNA. The multiplex RT-nested PCR was also able to co-detect GAV and YHV RNA mixed over a wide range of concentrations to simulate potential dual-infection states. The robustness of the test was examined using RNA samples from *Penaeus monodon* prawns infected either chronically or acutely with GAV or YHV and collected at different locations in eastern Australia and Thailand between 1994 and 1998. GAV- (406 bp) or YHV-specific (277 bp) amplicons were differentially generated in all cases, including 5 YHV RNA samples in which no primary RT-PCR amplicon was detected. Sequence analysis of GAV and YHV PCR amplicons identified minor variations in the regions targeted by the virus-specific antisense primers. However, none occurred at positions that critically affected the PCR.

Keywords: Yellow head virus, Gill-associated virus, Multiplex RT-PCR, *Penaeus monodon*, Penaeid shrimp, Prawn

1. Introduction

Yellow head virus (YHV) from Thailand and gill-associated virus (GAV) from Australia have recently been classified in new taxa (genus *Okavirus*, family *Roniviridae*) within the *Nidovirales* (Cowley et al., 2000b, Cowley and Walker, 2002, Sittidilokratna et al., 2002, Mayo, 2003). The rod-shaped, enveloped virions of YHV and GAV are morphologically indistinguishable and each virus can be highly pathogenic for the black tiger prawns (*Penaeus monodon*) (Boonyaratpalin et al., 1993, Chantanachookin et al., 1993, Lu et al., 1995, Spann et al., 1997). They also cause similar histopathology in diseased prawns and *in situ* hybridisation (ISH) and transmission electron microscopy (TEM) have detected infection in lymphoid organ (LO), gills, haemocytes, cuticular epithelium, nerves, eyes and in connective tissues of head organs and abdominal muscle (Boonyaratpalin et al., 1993, Chantanachookin et al., 1993, Lu et al., 1995, Spann et al., 1997, Tang and Lightner, 1999, Tang et al., 2002, Smith, 2000, Callinan et al., 2003). A chronic GAV infection state also occurs in which virus, originally described as lymphoid organ virus (LOV), is primarily observed by ISH and TEM in foci of hypertrophied cells or 'spheroids' within the LO of apparently healthy prawns (Spann et al., 1995). Chronic infections are highly prevalent in *P. monodon* captured from the wild or farmed along the Pacific coast of Queensland, Australia (Spann et al., 1995, 2003, Cowley et al., 2000a, Walker et al., 2001). There is also evidence of chronic GAV infection in healthy *P. monodon* broodstock and postlarvae in some regions of South East Asia (Phan, 2001, TW Flegel, personal communication) and YHV infections have been described in healthy *P. monodon* farmed in Thailand (Pasharawipas et al., 1997).

Penaeid prawn species from Hawaii and the western hemisphere, including *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus* and *P. vannamei*, are susceptible to experimental infection with YHV (Lu et al., 1994, Lightner et al., 1998), and species farmed commercially in Australia, including *P. esculentus*, *P. merguensis* and *P. japonicus*, are susceptible to GAV (Spann et al., 2000). However, some age/size and species-related differences have been noted in their susceptibility to disease. Histopathology consistent with YHV infection has also been reported in *P. japonicus* cultured in Taiwan that displayed typical signs of severe white spot syndrome virus (WSSV) disease and appeared to be co-infected (Wang et al., 1996). In Australia, RT-nested PCR has detected GAV in low levels in healthy *P. esculentus* co-cultivated with *P. monodon* (Walker et al., 2001). There is no other

published evidence of natural YHV or GAV infection in prawn species other than *P. monodon* although there are reports that small shrimp such as *Palaemon styliferus* and krill (*Acetes* spp.) (Flegel et al., 1997) and crabs (eg. *Scylla serrata*) may carry these viruses. Nevertheless, the ability of YHV and GAV to cause disease experimentally suggests these viruses represent a significant threat to cultivated prawns.

Antibody (Lu et al., 1996, Nadala et al., 1997, 2000, Sithigorngul et al., 2000, 2002, Soowannayan et al., 2003), ISH (Tang and Lightner, 1999, Tang et al., 2002, Spann et al., 2003), conventional RT-PCR (Wongteerasupaya et al., 1997, Tang and Lightner, 1999, Cowley et al., 1999, 2000a) and real-time RT-PCR (Dhar et al., 2002) methods have been used to detect either YHV or GAV in clinical samples. Of the antibody-based diagnostic techniques, immuno-histochemistry using monoclonal antibodies to a surface glycoprotein and the nucleocapsid protein of YHV (Sithigorngul et al., 2000, 2002) has recently allowed the detection and distinction of YHV and GAV infections (Soowannayan et al., 2003). ISH methods using DNA probes targeted to regions in the ORF1b gene have also allow cross-detection of YHV and GAV (Tang et al., 2002). RT-PCR tests reported to date have not considered genotypic sequence differences but have cross-detected YHV and GAV by chance (Cowley et al., 1999, 2000a). To avoid the need for separate PCR tests to recognise YHV and GAV infections definitely, we describe here a sensitive multiplex RT-nested PCR that exploits genome sequence variations between reference Thai YHV and Australian GAV isolates to co-detect and distinguish these viruses.

2. Materials and methods

2.1. Prawn samples

Healthy *Penaeus monodon* infected chronically with GAV (Spann et al., 1995) and moribund prawns displaying characteristic clinical signs, histopathology and TEM evidence of acute GAV infection (Spann et al., 1997) were obtained from hatcheries and farms in northeast and southeast Queensland between February 1996 and March 1998. Experimental infections with the reference GAV isolate, which was derived from a farm disease outbreak in north-east Queensland in 1996, were conducted as described previously (Spann et al., 1997). Prawn tissues were collected at 5-7 d post-infection when cumulative mortalities had reached ~40%. *P. monodon* were also infected experimentally with a reference YHV isolate by

injecting the tail muscle with haemolymph containing YHV (Wongteerasupaya et al., 1995, 1997). Lymphoid organs and haemolymph were collected from YHV-infected prawns 3-5 d post-infection. Prawns from farm outbreaks of YHV disease were collected from different locations in Thailand between 1994 and 1998. The origins of prawns used as sources of GAV and YHV RNA samples are listed in Table 1.

2.2. RNA isolation

For RNA isolation, whole head homogenates (Spann et al., 1997), haemolymph, gill or LO tissue were collected using sterilised instruments and either processed immediately or snap frozen on dry ice and stored in liquid nitrogen until used. Gill or LO tissue was homogenised in TRIzol-LS™ (Invitrogen) using a pellet pestle. Haemolymph and 0.22 µm filtered head homogenates were dissolved directly in TRIzol-LS™ and RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA was resuspended in DEPC-water, heated at 55°C for 5 min, quantified by spectrophotometry ($A_{260\text{nm}}$) and stored at -70°C. All reagents and tissue samples were handled in a separate laboratory using a laminar flow cabinet and aerosol-resistant barrier pipette tips to prevent contamination with PCR products.

2.3. Primers

The sequences of primers used for generic RT-PCR amplification of GAV and YHV (GY) and specific nested PCR amplification of either GAV (G) or YHV (Y) are listed: GY1 (5'-GACATCACTCCAGACAACATCTG-3'); GY2 (5'-CATCTGTCCAGAAGGCGTCTATGA-3'); G3 (5'-GCGTTCCTTTGTGAGCATAAATGA-3'); Y3 (5'-ACGCTCTGTGACAAGCATGAAGTT-3'); GY4 (5'-GTGAAGTCCATGTGTGTGAGACG-3'); GY5 (5'-GAGCTGGAATTCAAGTGAAGACA-3'); and G6 (5'-GTAGTAGAGACGAGTGACACCTAT-3'). The length (23-24 nt) and melting temperatures ($T_m \pm 4^\circ\text{C}$) of all primers were closely matched. The generic GY2 nested PCR primer was designed with a slightly higher T_m to compensate for a single base mismatch with the reference GAV sequence (Cowley et al., 2000b). All oligonucleotides were synthesised using an Oligo-1000 DNA Synthesiser (Beckman). RT-PCR with primer pair GY1-GY4 was expected to generate a 794 bp amplicon. Semi-nested and nested PCRs were designed to generate amplicons of 293 bp (primer pair GY1-G3 or GY1-Y3), 277 bp (primer pair GY2-G3 or GY2-Y3) and 406 bp (primer pair GY2-G6).

2.4. RT-PCR

Total RNA (100 ng) and 35 pmol primer GY5 were incubated at 70°C for 10 min in 6 µl DEPC-water and chilled on ice. cDNA was synthesised by adding 2 µl Superscript II buffer x 5 (Invitrogen), 1 µl 100 mM DTT and 0.5 µl 10 mM dNTP mix and incubation at 42°C for 2 min prior to adding 0.5 µl 200 U/µl Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and further incubation at 42°C for 1 h. Reverse transcriptase was inactivated at 70°C for 15 min and the reaction quenched on ice. For RT-PCR, 1 µl cDNA reaction was amplified in 50 µl containing 1 x Taq buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 35 pmol each primer GY1 and GY4, 200 µM each dNTP and 2.5 U *Taq* polymerase (Promega). The reaction mixture was overlaid with 50 µl liquid paraffin and heated at 85°C for 3 min prior to adding cDNA (Chou et al., 1992). DNA was amplified by 35 cycles of 95°C/30 sec, 66°C/30 sec, 72°C/45 sec followed by 72°C/7 min final extension using either a FTS-960 (Corbett Research) or PCR Sprint (Hybaid) thermal cycler. All PCRs utilised 0.5 ml thin-walled tubes. PCR products (10 µl) were resolved in 2% agarose-TAE gels containing 0.5 µg/ml ethidium bromide (Sambrook et al., 1989).

2.5. Differential nested PCRs

An aliquot (typically 0.5 µl) of the RT-PCR was amplified by nested PCR using a 50 µl reaction volume and primer sets GY2-G3, GY2-Y3 or GY2-Y3/G6. Semi-nested PCR reactions utilising the primer pairs GY1-G3 or GY1-Y3 were also evaluated. Nested PCR conditions were as for the RT-PCR except that the extension time was reduced to 30 sec. To increase sensitivity in cases when the nested PCR was negative, the amplification was repeated using up to 10 µl of the RT-PCR. Aliquots (10 µl) of the nested PCR were resolved in 2% agarose-TAE gels as above.

To determine the detection sensitivity of the RT-nested PCR, serial 10-fold dilutions of GAV or YHV LO total RNA were prepared in DEPC-water containing 10 ng/µl LO total RNA from an uninfected *Penaeus japonicus* to maintain a constant amount of RNA in the cDNA synthesis reaction. Aliquots (1 µl) of diluted RNA were reverse transcribed using primer GY5 and amplified by PCR (primer pair GY1-GY4) and nested PCR using various primer sets (ie. GY1-G3, GY1-Y3, GY2-G3, GY2-Y3 or GY2-Y3/G6). To simulate dual GAV/YHV infections, 10-fold dilutions of one virus RNA were prepared using a diluent comprising either 100 ng/µl or 1 ng/µl of LO total RNA from prawns infected with the other

virus. To avoid cross-contamination, all PCR mixes were prepared in a laminar flow cabinet using aerosol-resistant tips and in a different laboratory to that used to analyse PCR products.

2.6. Sequencing

Sequences in the G3/Y3 and G6 differential primer regions were determined for RT-PCR products amplified from all 10 GAV and the 8 YHV field RNA samples. PCR products (794 bp) amplified with primer pair GY1-GY4 were purified using QIAquick™ columns (Qiagen). Both DNA strands of GAV and YHV PCR amplicons were sequenced using primers GY1, GY4, Y3 or G6, Big Dye™ V2 reagent (Applied Biosystems Inc., ABI) and automated ABI Model-377 apparatus (ABI) at the Australian Genome Research Facility, University of Queensland. The sequence in the GY4 and GY5 primer regions of YHV RNA samples was determined using PCR amplicons generated with other primers (R.A.J. Hodgson et al., unpubl.). Nucleotide sequence chromatograms were analysed using SeqEd 3.1 (ABI).

3. Results

3.1. Selection of generic and specific GAV and YHV primers

Overall, the nucleotide sequences of the ORF1b genes of reference isolates of GAV from Australia and YHV from Thailand (Tang and Lightner, 1999, Cowley et al., 1999, Sittidilokratna et al., 2002) display 19.5% divergence and the majority of differences occur in codon 'wobble' positions not altering the pp1ab coding sequence. However, some localized regions display higher levels of variation and virus-specific primers used in the differential RT-nested PCR were targeted to 2 of these sites. Regions targeted by the generic and specific primers are shown in Fig. 1. The site targeted by cDNA primer GY5 was conserved in 3 reported YHV sequences (Wongteerasupaya et al., 1997, Tang and Lightner, 1999, Sittidilokratna et al., 2002) and GAV (Cowley et al., 1999). GAV and YHV sequences at the site targeted by virus-specific primers G3 and Y3 varied at 12/24 nt positions associated with 3 aa changes, including one at the primer 3'-end that was divergent at all 3 codon positions. GAV-specific primer G6 was targeted to a sequence that diverged at 10/24 nt positions, of which 3 occurred at the primer 3'-end and were associated with 1 aa change. The extent of sequence variation was expected to restrict annealing of these primers to the non-homologous DNA template and mismatching at their 3' termini was included as 2 or more mismatches at this position severely abrogates PCR amplification (Kwok et al., 1990).

3.2. RT-PCR to detect GAV or YHV

From cDNA synthesised using antisense primer GY5, PCR using the conserved primer pair GY1-GY4 amplified a 794 bp product from both the GAV and YHV (Fig. 2a). The PCR was tested at 3 annealing temperatures (64°C, 66°C, 68°C) and 66°C was selected for subsequent amplifications, as the amplicon yield was slightly greater than at 68°C. At the selected temperature there was also an absence of very minor products seen at 64°C when higher viral RNA template levels were amplified (data not shown).

3.3. Nested PCRs to differentiate GAV from YHV

Initially, separate nested PCRs were tested using a conserved sense primer (GY2) in conjunction with an antisense primer specific to either GAV (G3) or YHV (Y3) (see Fig. 1). Primer pairs GY2-G3 and GY2-Y3 amplified only a 277 bp fragment of the 794 bp RT-PCR amplicons of GAV and YHV, respectively (Fig. 2a, b). Nested PCR using primer GY2 in combination with GAV-specific antisense primer G6 similarly amplified only a 406 bp fragment of GAV (Fig. 2b). When the virus-specific nested PCR did not proceed due to mismatching of the antisense primer to the template, elevated levels of the 794 bp GY1-GY4 amplicon and a ~400 bp non-specific product were detected (Fig. 2b, lanes 1, 5, 6). Semi-nested PCRs in which primer GY1 was substituted for GY2 produced comparable results to those shown in Fig. 2b except the amplicon (293 bp) was longer (data not shown).

A multiplexed nested PCR using primer GY2 in combination with both YHV- (Y3) and GAV-specific (G6) antisense primers was tested for its ability to differentiate the viruses in a single reaction. Nested PCR amplicons of a size expected for YHV (277 bp) or GAV (406 bp) were generated only from primary PCR amplicons derived from YHV or GAV, respectively (Fig. 2c). Minor amounts of the primary 794 bp amplicon and of 2 other products that differed in size between GAV and YHV were also detected.

3.4. Sensitivity of the RT-nested PCR

The sensitivity limits of the RT-PCR and nested PCR were examined using serial 10-fold dilutions of LO total RNA from *P. monodon* experimentally infected with GAV or YHV at levels sufficient to give good yields of the primary 794 bp PCR amplicon (Fig. 3). The RT-PCR sensitivity limit was ~1 pg RNA (amplicon barely visible) for either GAV or YHV. The

sensitivity limits of nested PCRs using primer pairs GY2-G3 or GY2-G6 for GAV and GY2-Y3 for YHV were identical (10 fg RNA) and at least 100-fold greater than that of the primary PCR. Semi-nested PCRs employing primer GY1 instead of GY2 increased sensitivity to the same extent (data not shown).

To determine whether the presence of the two virus-specific antisense primers (Y3 and G6) might affect the detection sensitivity, the multiplex nested PCR (primer set GY2-Y3/G6) was tested using 1:1 mixtures of the primary PCRs of the GAV and YHV RNA dilution series (Fig. 3). YHV-specific (277 bp) and GAV-specific (406 bp) products were co-amplified to the same detection limit (10 fg RNA) obtained in the nested PCRs (GY2-Y3 or GY2-G6) employing each antisense primer alone.

3.5. RT-nested PCR differentiation of field samples of GAV and YHV

Five RNA samples from healthy, wild *P. monodon* broodstock chronically infected with GAV, 5 samples from moribund farmed prawns acutely infected with GAV and 9 samples from moribund farmed prawns acutely infected with YHV were tested using the multiplex RT-nested PCR (Fig. 4). The RNA originated from tissues of either individual prawns or pools of 2 to 10 prawns. Prawns were collected at different locations in eastern Australia or Thailand between 1994 and 1998 (Table 1). Among the GAV samples, less primary (794 bp) PCR amplicon was generated from the 2 cephalothorax homogenates than from LO tissue (Fig. 4a). In contrast, a high yield of 794 bp amplicon occurred only in sample YHV#1 and none was detected in 5 of the YHV RNA samples. Multiplex nested PCR (primer set GY2-Y3/G6) generated a 406 bp amplicon in all 10 GAV samples and a 277 bp amplicon from all YHV samples except YHV#8 (Fig. 4b). Moreover, comparable yields of the 277 bp amplicon were generated from the former YHV samples irrespective of whether a primary PCR amplicon was detected. For the 5 YHV samples (#3, #5, #6, #7, #8) in which little or no primary PCR amplicon was detected, the PCR was repeated using 2 µl instead of 1 µl cDNA. Increasing the input cDNA enhanced the 794 bp amplicon yield only for sample YHV#6 (data not shown). However, 277 bp nested PCR amplicon yields were visibly enhanced for most samples and an amplicon was detected for the previously negative YHV#8 (Fig 4c). The yield of YHV#8 amplicon increased further when either 5 µl or 10 µl of the primary PCR was employed in the nested PCR.

3.6. *PCR co-detection of GAV and YHV RNA mixed at various ratios*

To simulate prawn co-infections with GAV and YHV at various infection levels, a 10-fold dilution series of reference YHV RNA was prepared in a diluent comprising 100 ng/μl of the reference GAV RNA. A reciprocal GAV RNA dilution series was prepared similarly in a diluent comprising YHV RNA and thus all samples contained at least 100 ng/μl RNA. Using cDNA prepared from selected dilutions, comparable yields of primary PCR amplicon (794 bp) were generated (data not shown). However, GAV-specific (406 bp) and YHV-specific (277 bp) amplicons were co-detected in the multiplex nested PCR only to a limit equal to a major:minor viral RNA ratio of $1:10^{-2}$ (100 : 1 ng/μl) when either GAV or YHV represented the minor RNA species (Fig. 5a, lanes 4-6). Overexposure of the gel image detected very low levels of amplicon of the minor RNA in the YHV and GAV dilutions containing 10 pg/μl of the minor RNA (data not shown). In any case, this was equivalent to a 10^3 to 10^5 -fold reduction in the detection limit of either virus RNA compared to that obtained (ie. 10 fg/μl) when diluted in uninfected *P. japonicus* RNA (see Fig. 3). The test was repeated using 10-fold RNA dilutions prepared as above in a diluent containing 1 ng/μl rather than 100 ng/μl of either YHV or GAV RNA (Fig. 5b). Barely detectable but comparable amounts of the 794 bp RT-PCR amplicon were generated from all samples (data not show). Compared to Fig. 5a, the nested PCR detection limit of the minor GAV or YHV RNAs increased significantly to include dilutions containing a major:minor RNA species ratio of $1:10^{-4}$ (ie. 1 ng/μl : 100 fg/μl).

3.7. *Sequence differences among GAV and YHV RNA samples*

Primary PCR amplicons from all 10 GAV isolates including the reference isolate were sequenced to identify any nucleotide variations in the G3/Y3 and G6 nested-PCR primer regions (Fig. 6). In the 682 nt region immediately downstream of primer GY1, a maximum of 1.8% (12/682 nt) divergence was detected among the different GAV isolates. All 9 field samples varied from the reference GAV#6 isolate (Cowley et al., 1999, 2000b) at a silent position (U → C) 6 nt from the 3'-end of primer G3 and at a silent position (U → C) 15 nt from the 3'-end of primer G6. Six GAV isolates also varied at a silent position (U → C) 12 nt from the end of G6. Sample GAV#4 varied at a position (U → C) 1 nt from the 3'-end of primer G6 that would cause an amino acid substitution. The sequences also provided information in the GY2 primer target downstream of the region that overlapped primer GY1.

Six of the GAV samples varied at a silent position (A → G) 15 nt from the 3'-end of GY2 (data not shown).

For 7 of the 8 YHV field samples, sequence analysis of RT-PCR amplicons (0.7 kb) generated for other purposes (R.A.J. Hodgson et al., unpubl.) identified no nucleotide variations, compared to the reference YHV#1 (Tang and Lightner, 1998, Sittidilokratna et al., 2002), in regions targeted by primers GY4 and GY5. For all 8 YHV field samples, similar analysis of semi-nested PCR amplicons generated using the primer pair GY2-GY4 identified a maximum divergence of 2.1% (15/730 nt) compared to the reference sequence. In each amplicon, most variations were due the coexistence of 2 nucleotides (most commonly U/C = Y or A/G = R) in relatively equal amounts. Variations from the reference YHV isolate in the G3/Y3 and G6 primer targets were only detected in 4 field samples. In samples YHV#3 and #7, a U/C double nucleotide occurred at a silent position either 14 nt from the 3'-end of primer G3/Y3 while a U/C also occurred 12 nt from the 3'-end of primer G6 in samples YHV#4 and #5.

4. Discussion

GAV from Australia and YHV from Thailand are viral pathogens of that pose significant disease threats to the culture of *Penaeus monodon* in countries that primarily farm this species. The viruses are morphologically identical, induce similar histopathology (Boonyaratpalin et al., 1993, Chantanachookin et al., 1993, Spann et al., 1997), have similar tissue tropism (Tang and Lightner, 1999, Tang et al., 2002, Spann et al., 2003) and are readily cross-detected by ISH (Tang et al., 2002). However, the level of nucleotide sequence variation in the ORF1b (19.5%) (Cowley et al., 1999, Sittidilokratna et al., 2002) and ORF3 (25%) genes (Jitapakdee et al., 2003) and antigenic variations detected with monoclonal antibodies (Soowannayan et al., 2003) indicate that GAV and YHV represent distinct geographic topotypes. Moreover, mortalities accumulate more rapidly in *P. monodon* infected experimentally with YHV (Boonyaratpalin et al., 1993, Spann et al., 1997) and, while YHV can induce cephalothorax yellowing in diseased *P. monodon*, whole body reddening has been reported for GAV (Spann et al., 1997). Nevertheless, these differences are subjective and/or inconsistently observed and would be unreliable in distinguishing between infections with the two viruses.

Here, we report development and assessment of an RT-nested PCR to co-detect and distinguish GAV from YHV. The RT and primary PCR steps employ primers to conserved ORF1b gene sequences to amplify either virus, while the nested PCR employs multiplexed virus-specific primers to distinguish the viruses based on amplicon size. The two virus-specific primers incorporated 10-12/24 mismatches, including 3 at their 3'-termini associated with amino acids shifts. The number and positioning of the mismatches precluded amplification of the non-homologous sequence as 2 or more substitutions at the 3'-end of a primer have been shown previously to severely inhibit PCR (Sommer and Tautz, 1989, Kwok et al., 1990). In addition, the 23-24 mer PCR primers were used at an annealing temperature (66°C) that would ensure specificity but accommodate minor sequence variations known to occur among different GAV and YHV isolates. As these crustacean okaviruses encode an RNA-dependent RNA polymerase (Cowley et al., 2000b, Sittidilokratna et al., 2002, Cowley and Walker, 2002) most closely related to those of coronaviruses and arteriviruses, it is likely that it will lack proofreading ability and establish virus quasispecies populations that are a source of genetic drift (see reviews Steinhauer and Holland, 1987, Holland et al., 1992).

Initial tests using non-multiplexed nested PCRs showed that amplicons were generated only when the GAV-specific (G3 or G6) or YHV-specific (Y3) antisense primer matched the virus template. However, in tests in which these did not match, the primary PCR (794 bp) amplicon was more evident, probably as the result of carry over of the GY1-GY4 primers. A non-specific product (~400 bp) of similar size to the 406 bp GY2-G6 primer amplicon was also apparent in these nested PCRs. However, this DNA did not occur in the multiplexed nested PCR incorporating both YHV- (Y3) and GAV-specific (G6) antisense primers in which its production was quenched by the preferential amplification of virus template. Multiplexing of the antisense primers targeted to different divergent sequences also readily distinguished GAV (406 bp) from YHV (277 bp) in a single nested PCR on the basis of amplicon size.

Nested PCR extended the RT-PCR detection limit 100- to 1000-fold. Although we made no attempt to relate this directly to template copies, viral RNA was detectable in ~10 fg LO total RNA isolated from heavily infected *P. monodon*. Moreover, the detection limit was unaffected by primer multiplexing and was comparable to that of a GAV RT-nested PCR targeting a downstream region of the ORF1b gene (Cowley et al., 2000a). For diagnostic

purposes, this additional sensitivity is extremely useful in detecting unapparent infections in healthy prawns when virus levels are often below the detection threshold of 1-step RT-PCR (Cowley et al., 2000a, Walker et al., 2001).

The multiplex RT-nested PCR allowed co-detection of GAV and YHV in LO total RNA mixed at various ratios to simulate dual-infection states. This was examined as chronic GAV infection is highly prevalent in healthy wild and farmed *P. monodon* in eastern Australia (Spann et al., 1995, Cowley et al., 2000a, Walker et al., 2001) and so any introduction of exotic YHV into this population would likely involve superinfection of GAV-infected prawns. However, when GAV RNA was diluted in 100 ng/ μ l YHV RNA and *visa versa*, the nested PCR detection limit of the minor viral RNA species (10 pg – 1 ng) was found to be quenched 10^3 to 10^5 -fold compared to that (10 fg) observed in the absence of competitor. We do not know to what extent the RT and/or PCR steps contributed to this anomaly. However, the effect was concentration-dependent. When 1 ng/ μ l rather than 100 ng/ μ l competitor RNA was used, the detection limit of the minor viral RNAs (100 fg) approached that obtained without competitor. Although there is obviously some dependence on virus loads, the nested PCR theoretically has the capability to co-detect and distinguish GAV from YHV in dual-infected prawns when relative RNA template numbers range between 1:1 and 1:10⁴.

GAV and YHV samples from *P. monodon* collected at different locations in eastern Australia and Thailand over a 2-4 year period were distinguished using the multiplex RT-PCR. All YHV samples were from diseased prawns while GAV samples were obtained from both healthy and diseased animals. There was some variability in amplicon yields among the YHV samples compared to GAV and these appear to be due primarily to the tissue type selected for RNA isolation. YHV RNA samples were mainly from haemolymph while LO was mostly used for GAV. YHV was not detected in one sample using the standard conditions. However, by increasing the cDNA quantity used in the primary PCR, and primary PCR quantity used in the nested PCR, a YHV amplicon was detected. The use of a previously published RT-nested PCR method has shown that nested PCR is often required to detect low levels of GAV in the LO of healthy, chronically-infected *P. monodon* (Cowley et al., 2000a and unpubl, Walker et al., 2001). Moreover, LO and gills appear to be a better source of GAV than haemocytes when infection levels are low (Cowley et al., 2000a). Unfortunately we were

unable to determine whether this is also the case in the YHV-infected prawns as LO or separate gill tissues were not available for testing.

PCR amplicons from the GAV and YHV samples were sequenced to identify any nucleotide variations in the genome regions targeted by virus-specific nested PCR primers G3/Y3 and G6. Variations of up to 1.8% for GAV and 2.1% for YHV were detected between the reference (Cowley et al., 1999, 2000b, Sittidilokratna et al., 2002) and field samples. These primarily occurred at codon wobble positions and, among the YHV samples, many were due to the presence of 2 different nucleotides in relatively equal amounts. This was not unexpected as most YHV RNA samples came from tissues pooled from 5-10 prawns and it is likely that individuals contained minor genotypic variants. In all YHV samples, sequences targeted by primers GY4 and GY5 were conserved. However, single variations due to co-infections occurred in either the Y3 or G6 nested PCR primer targets in 4 samples. Among the GAV samples, 1 to 3 nt variations were detected in sequences targeted by these nested PCR primers. However, these variations, including one which caused an A:C mismatch 1 nt from the 3'-end of primer G6, did not adversely affect the performance of the PCR. This is consistent with data demonstrating that single primer-template mismatches (other than A:G, G:A, C:C or A:A mismatches at the primer 3' terminus) are unlikely to be deleterious to PCR (Sommer and Tautz, 1989, Kwok et al., 1990). In all, the absence of substantial sequence variations in the ORF1b gene region targeted by the multiplex RT-nested PCR suggests the test should be quite robust in distinguishing the Thailand YHV genotype from the GAV genotype that occurs commonly in healthy and diseased *P. monodon* from eastern Australia.

Potential mechanisms for the inadvertent introduction of major prawn viral pathogens such as YHV, WSSV and Taura syndrome virus (TSV) into regions previously free of these agents are well documented (Lightner et al., 1997, Nunan et al., 1998). Of primary concern is the translocation of frozen uncooked prawns or live broodstock and seed carrying unapparent virus infections. The sequence divergence between Thai YHV and Australian GAV isolates suggests that introductions of these, or genetically related viruses, could be detected and traced to the source of the introduction. The multiplex RT-nested PCR described here provides a rapid and sensitive initial tool to co-detect and differentiate these viruses. However, we are currently obtaining *P. monodon* samples from other locations in Australia and Asia to determine the extent of genetic diversity among YH-complex viruses present in different

prawn populations (Walker et al., 2001, Soowannayan et al., 2003). Such epidemiological data will help establish whether these viruses are endemic or have been recently introduced through movements of brooders or postlarvae. Moreover, sequence information on different YH-complex viruses may allow development of a modified multiplexed RT-PCR test to co-detect and distinguish other genotypic variants of YHV/GAV.

Acknowledgments

We thank CSIRO Marine Research and Queensland prawn farm and hatchery operators for supplying prawns. This research was supported in part by the Australian Centre for International Agricultural Research, the National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology of Thailand and the Thailand Research Fund.

References

- Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Aekpanithanpong, U., Cantanachookin, C., 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish. Pathol. 128, 103-109.
- Callinan, R.B., Jiang, L., Smith, P.T., Soowannayan, C., 2003. Fatal, virus-associated peripheral neuropathy and retinopathy in farmed *Penaeus monodon* in eastern Australia. I. Pathology. Dis. Aquat. Org. 53, 181-193.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Sataporn, D., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S., Flegel, T.W., 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulomas-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat. Org. 17, 145-157.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W., 1992. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerisation improves low-copy number amplifications. Nucl. Acids. Res. 20, 1717-1723.

- Cowley, J.A., Walker, P.J., 2002. The complete genome sequence of gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns indicates a gene organisation unique among nidoviruses. Arch. Virol. 147, 1977-1987.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M., Walker, P.J., 2000a. Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. Dis. Aquat. Org. 39, 159-167.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M., Walker, P.J., 2000b. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen. Virol. 81, 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Walker, P.J., 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct viruses. Dis. Aquat. Org. 36, 153-175.
- De Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., De Groot, R.J., 1997. The genome organization of the *Nidovirales*: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. Semin. Virol. 8, 33-47.
- Dhar, A.K., Roux, M.M., Klimpel, K.R., 2002. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. J. Virol. Meth. 104, 69-82.
- Flegel, T.W., Sriurairatana, S., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Withyachumnarnkul, B., 1997. Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In T.W. Flegel, P. Menasveta and S. Paisarnrat (eds.), Shrimp biotechnology in Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 71-78.
- Holland, J.J., De La Torre, J.C., Steinhauer, D.A., 1992. RNA virus populations as quasispecies. Current Top. Microbiol. Immunol. 176, 1-20.

- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P.J., Panyim, S. & Boonsaeng, V. (2003). Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84, 863-873.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucl. Acids Res. 18, 999-1005.
- Lightner, D.V., Hasson, K.W., White, B.L., Redman, R.M., 1998. Experimental infection of western hemisphere Penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. J. Aquat. Animal Health 10, 271-281.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L., Hasson, K.W., 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. 16, 146-160.
- Lu, Y., Tapay, L.M., Brock, J.A., Loh, P.C., 1994. Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish Dis. 17, 649-656.
- Lu, Y., Tapay, L.M., Loh, P.C., 1996. Development of a nitrocellulose-enzyme immunoassay for the detection of yellow-head from penaeid shrimp. J. Fish Dis. 19, 9-13.
- Lu, Y., Tapay, L.M., Loh, P.C., Brock, J.A., Gose, R.B., 1995. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 23, 67-70.
- Mayo, M.A., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by the ICTV. Arch. Virol. 147, 1655-1656.
- Nadala, E.C.B. Jr, Tapay, L.M., Loh, P.C., 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 31, 141-146.

- Nadala, E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S., Loh, P.C., 1997. Detection of yellowhead virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. *J. Virol. Methods* 69, 39-44.
- Nadala, E.C.B., Loh, P.C., 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *J. Virol. Methods* 84, 175-179.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T., Lightner, D.V., 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture* 160, 19-30.
- Phan, T.T.N. 2001. Prevalence and co-prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head complex viruses (YHV-complex) in cultured giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Vietnam. MSc Thesis, University of Queensland.
- Pasharawipas, T., Flegel, T.W., Sriurairatana, S., Morrison, D.J., 1997. Latent yellow-head infections in *Penaeus monodon* and implications regarding tolerance. In T.W. Flegel, P. Menasveta and S. Paisarnrat (eds.), *Shrimp biotechnology in Thailand*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 45-53
- Sambrook, J., Fritsch, E .F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Menasveta, P., 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42, 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Menasveta, P., 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49,71-76.

- Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Jitrapakdee, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Walker, P.J., 2002. Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis. Aquat. Org.* 50, 87-93.
- Smith, P.T., 2000. Diseases of the eye of farmed shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.* 43, 159-173.
- Sommer, R., Tautz, D., 1989. Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucl. Acids Res.* 17, 6749.
- Soowannayan, C., Flegel, T.W., Sithigorngul, P., Slater, J., Hyatt, A., Wise, T., Crane, M. J., Cowley, J.A., McCulloch, R.J., Walker, P.J. Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.* (in press).
- Spann, K.M., Vickers, J.E., Lester, R.J.G., 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis. Aquat. Org.* 23, 127-134.
- Spann, K.M., Cowley, J.A., Walker, P.J., Lester, R.J.G., 1997. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 31, 169-179.
- Spann, K.M., Donaldson, R.A., Cowley, J.A., Walker, P.J., 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.* 42, 221-225.
- Spann, K.M., McCulloch, R.J., Cowley, J.A., East, I.J., Walker, P.J., 2003. Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridization during acute and chronic infections of *Penaeus monodon* and *P. esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 56, 1-10.
- Steinhauer, D.A., Holland, J.J., 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 409-433.

- Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application to *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 35, 165-173.
- Tang, K.F.J., Spann, K.M., Owens, L., Lightner, D.V., 2002. *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture* 205, 1-5.
- Walker, P.J., Cowley, J.A., Spann, K.M., Hodgson, R.A.J., Hall, M.R., Withyachumnarnkul, B., 2001. Yellow head complex viruses: transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 227-237.
- Wang, Y.C., Chang, P.S., 2000. Yellow head virus infection in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* cultured in Taiwan. *Fish Path.* 35, 1-10.
- Wang, C.S., Tang, K.F.J., Kou, G.H., Chen, S.N., 1996. Yellow head disease-like virus infection in Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in Taiwan. *Fish Path.* 31, 177-182.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Akrajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22, 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Tongcheua, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1997. Detection of yellow-head virus of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31, 181-186.

Figure Captions

Fig. 1. GAV and YHV nucleotide and amino acid sequences in the ORF1b gene region targeted by primers used in the multiplex RT-nested PCR. YHV sequence differences are indicated above and below the GAV sequences and the primer targets are highlighted (arrows). Numbering is taken from a GAV-YHV sequence comparison reported previously (Cowley et al., 1999).

Fig. 2. Amplification of GAV and YHV RNA by RT-PCR followed by nested PCR with various primer combinations. (a) PCR amplification (primer pair GY1-GY4) of a 794 bp product from cDNA synthesised from reference GAV (lane 1) and YHV (lane 2) RNA using primer GY5. (b) Nested PCR amplification of RT-PCR products from GAV (lanes 1 - 3) and YHV (lanes 4 - 6) using primer pairs GY2-Y3 (lanes 1 and 4), GY2-G3 (lanes 2 and 5) and GY2-G6 (lanes 3 and 6). (c) Nested PCR amplification of a 406 bp GAV-specific product (lane 1) or 277 bp YHV-specific product (lane 2) using the multiplexed primer set GY2-Y3/G6. PCR products (10 µl) were resolved in a 2% agarose-TAE gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide. M = 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 3. Detection limits of the RT-PCR and nested PCR primer combinations using titrations of LO total RNA from *P. monodon* infected with the reference GAV or YHV isolates. cDNA synthesised using primer GY5 and serial 10-fold RNA dilutions (100 ng/µl to 1 fg/µl, lanes 1-9, respectively) diluted in 10 ng/µl *P. japonicus* LO RNA, which was also used as a negative control (lane 10), was amplified by PCR using primer pair GY1-GY4. Nested PCRs were performed using primer pairs GY2-G3 and GY2-G6 for GAV and GY2-Y3 for YHV. Multiplex nested PCR (primer set GY2-Y3/G6) was also performed using 1:1 mixtures of the GAV and YHV RT-PCRs. PCR products (10 µl) were resolved as in Fig. 2. M = 1 kb DNA ladder.

Fig. 4. Detection of RNA from different GAV and YHV samples using the multiplex RT-nested PCR. The origin of *P. monodon* from which RNA was isolated is described in Table 1. Isolates GAV#1 to GAV#10 correspond to GAV lanes 1 to 10, respectively, and isolates YHV#1 to YHV#9 correspond to YHV lanes 1 to 9, respectively. GAV lane 11 and YHV lane 10 were negative controls comprising LO RNA from uninfected *P. japonicus*. (a) cDNA

synthesised from 100 ng RNA using primer GY5 amplified by PCR using the primer pair GY1-GY4. (b) RT-PCR products amplified by nested PCR using the multiplex primer set GY2-Y3/G6. (c) For selected YHV samples [#3 (lane 1), #5 (lane 2), #6 (lane 3), #7 (lane 4) and #8 (lanes 5 - 7)] which generated little or no 794 bp PCR amplicon, the multiplex nested PCR was repeated using RT-PCRs performed using 2 μ l instead of 1 μ l input cDNA. cDNA from *P. japonicus* RNA was used as a negative control (lane 8). For isolate YHV#8, 5 μ l (lane 6) and 10 μ l (lane 7) of the primary PCR were also amplified by nested PCR. PCR products (10 μ l) were resolved as in Fig. 2. M = 1 kb or 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 5. Multiplex RT-nested PCR amplification of GAV and YHV RNA mixed at various ratios to simulate dual-infection states. RNA was mixed 1:1 at concentrations of either (a) 100 ng/ μ l (lane 5) or (b) 1 ng/ μ l (lane 6) and serial 10-fold dilutions of virus RNA were prepared in a diluent of reciprocal virus RNA at these two concentrations. (a) YHV RNA amounts 100 fg, 10 pg, 100 pg, 1 ng (lanes 1-4, respectively) and 100 ng (lanes 5-9), GAV RNA amounts 100 ng (lanes 1-5) and 1 ng, 100 pg, 10 pg, 100 fg, (lanes 6-9, respectively) and *P. japonicus* negative control RNA (lane 10). (b) YHV RNA amounts 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg (lanes 1-5, respectively) and 1 ng (lanes 6-11), GAV RNA amounts 1 ng (lanes 1-6) and 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg (lanes 7-11, respectively). In both tests, cDNA synthesised using primer GY5 was amplified by PCR (primer pair GY2-GY4) followed by nested PCR with the multiplex primer set GY2-Y3/G6. PCR products (10 μ l) were resolved as in Fig. 2. M = 1 kb DNA ladder.

Fig. 6. Nucleotide sequences of genome regions targeted by primers G3/Y3 and G6 in the 9 GAV and 8 YHV field samples compared to the reference isolates (GAV#6 and YHV#1). The GAV#6 amino acid sequence is shown, as are differences between this sequence and that of YHV#1. Nucleotide variations to the GAV#6 sequence are shown (bold), as are variations (bold) to the YHV#1 sequence.

Table 1Origin of GAV- and YHV-infected *Penaeus monodon* tested in the multiplex RT-nested PCR

No:	Date	Location	Source	Description	Tissue
GAV#1	14-10-97	Jacobs Well, SEQ	Cairns	H,I,B,N	LO
GAV#2	13-10-97	Jacobs Well, SEQ	Innisfail	H,I,B,N	LO
GAV#3	25-09-97	Cleveland, SEQ	Innisfail	R,I,B,N	LO
GAV#4	05-03-98	Innisfail, NQ	Innisfail	W,I,B,N	LO
GAV#5	27-03-98	Cardwell, NQ	Townsville	F,B,I,N	LO
GAV#6	12-02-96	Mourilyan, NQ	NQ	F,P,M	LO
GAV#7	06-03-97	Bundaberg, SEQ	NQ	F,P,M	LO
GAV#8	18-03-97	Jacobs Well, SEQ	NQ	F,P,M	LO
GAV#9	17-04-96	Jacobs Well, SEQ	NQ	F,P,M	ceph
GAV#10	16-04-96	Jacobs Well, SEQ	NQ	F,P,M	ceph
YHV#1	NK-96	NK	CP	F,P,M	hae
YHV#2	13-10-95	Rayong	AAHRI	R,F,P,M	gill/hae
YHV#3	01-02-95	Surattanee	NK	R,F,I,M	gill/hae
YHV#4	29-10-94	Songkhla	CP	R,F,P	gill/hae
YHV#5	18-01-96	Chachuengsao	AAHRI	R,F,P,M	gill/hae
YHV#6	NK-97	Bangpakong	CP	R,F,P,M	gill/hae
YHV#7	16-12-97	NK	CP	F,I,M	hae
YHV#8	17-03-98	Banpo	CP	H,P	ceph
YHV#9	17-03-98	Klongsuan	CP	H,P	ceph

All GAV-infected prawns were derived from wild broodstock sourced from Cairns, Innisfail or Townsville in north Queensland, Australia

All YHV-infected prawns were collected from locations in Thailand

Description: codes are F = farm stock, H = hatchery stocks of wild broodstock, W = wild broodstock collected directly from a trawler, R = research facility stock, B = broodstock, I = individual, P = pool of 2-10 prawns, M = mortalities in stock at time of collection, N = no obvious disease symptoms

GAV#6; YHV#1 = reference isolates; NQ = North Queensland; SEQ = South-east Queensland; NK = not known

Tissues: gill, lymphoid organ (LO), haemolymph (hae), whole cephalothorax (ceph)

CP = Shrimp Culture Research Centre of Charoen Pokphand Co. Ltd., Thailand

AAHRI = The Aquatic Animal Health Research Institute, Thailand

Fig. 1

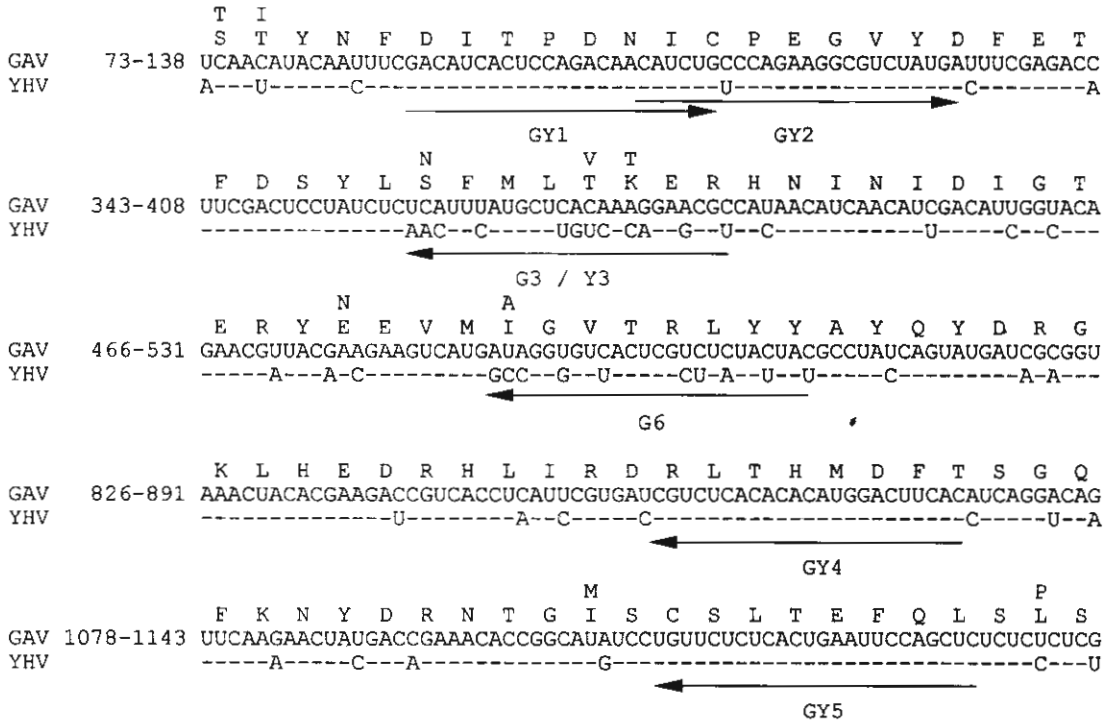


Fig. 6

	G3/Y3										G6									
	S	F	M	L	T	K	E	R			I	G	V	T	R	L	Y	Y		
GAV#6	UCA	UUU	AUG	CUC	ACA	AAG	GAA	CGC	-105-	AUA	GGU	GUC	ACU	CGU	CUC	UAC	UAC			
GAV#7	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#8	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#9	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#10	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#1	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#2	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#3	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#4	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
GAV#5	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..C	...	...	...	...		
	N V T A																			
YHV#1	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U	-105-	GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			
YHV#2	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			
YHV#3	AAC	..C	...	..U	GUY	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			
YHV#4	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	..Y	..C	U.A	..U	..U			
YHV#5	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	..Y	..C	U.A	..U	..U			
YHV#6	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			
YHV#7	AAC	..C	...	..U	GUY	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			
YHV#8	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			
YHV#9	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U			

Figure 2

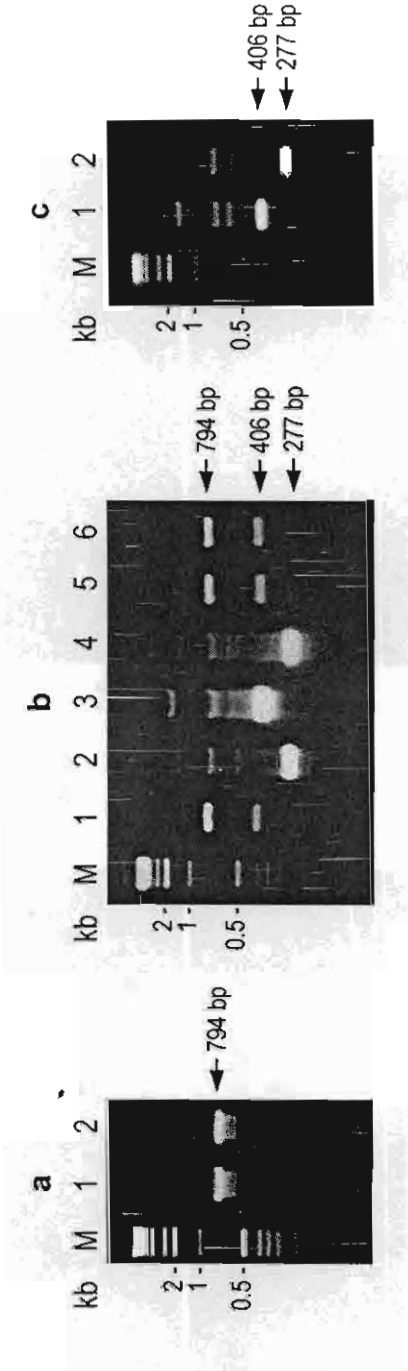


Figure 3

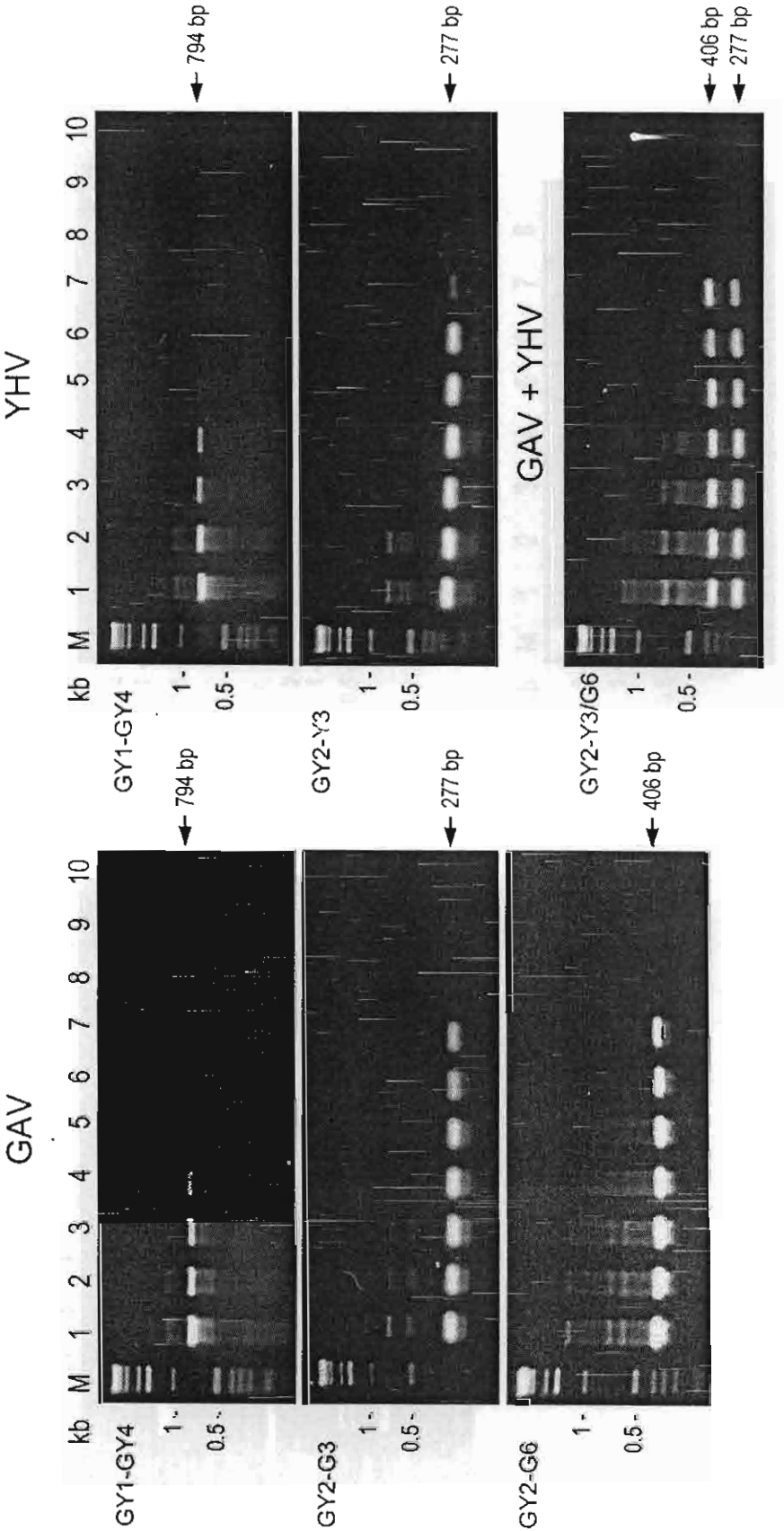


Figure 4

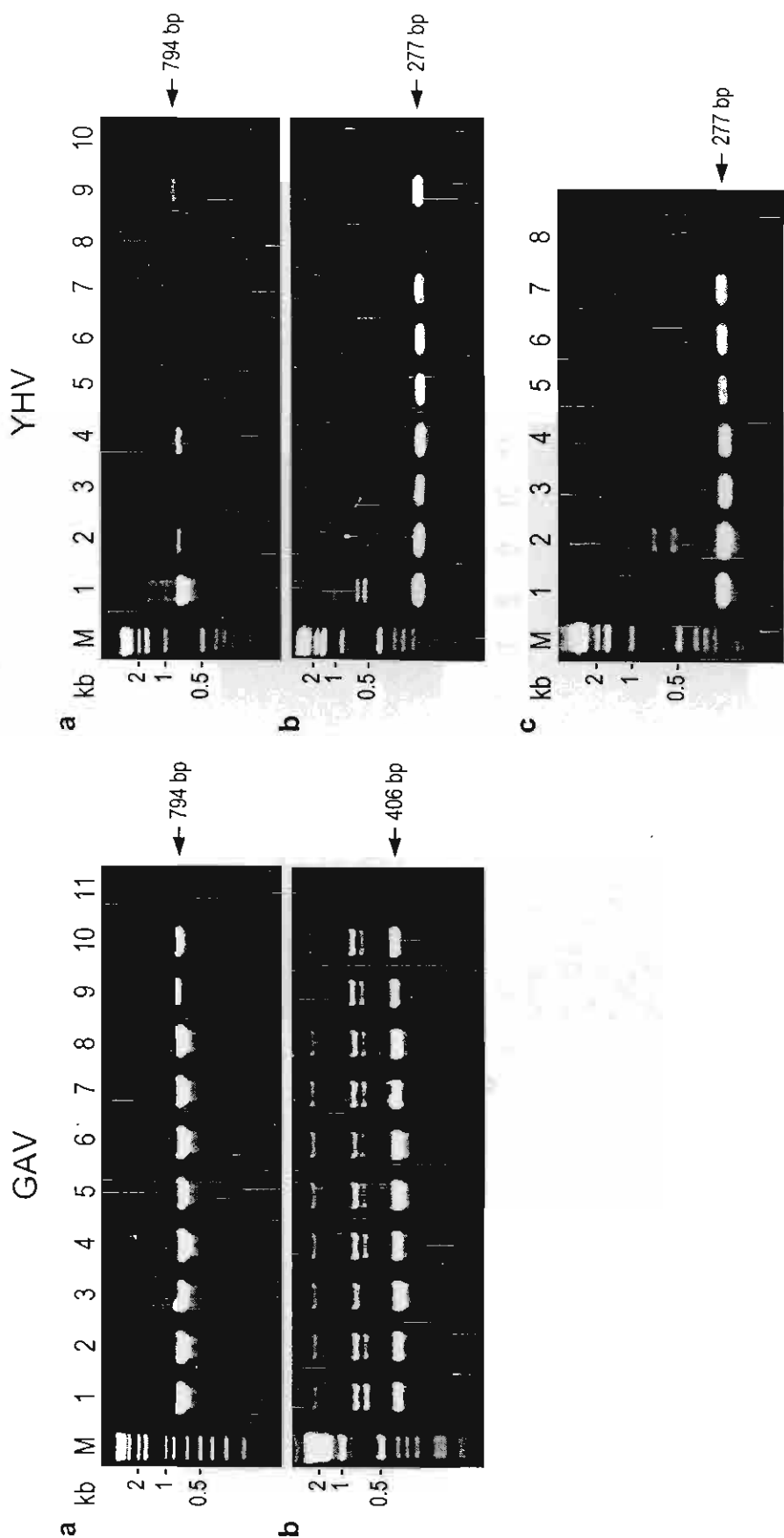
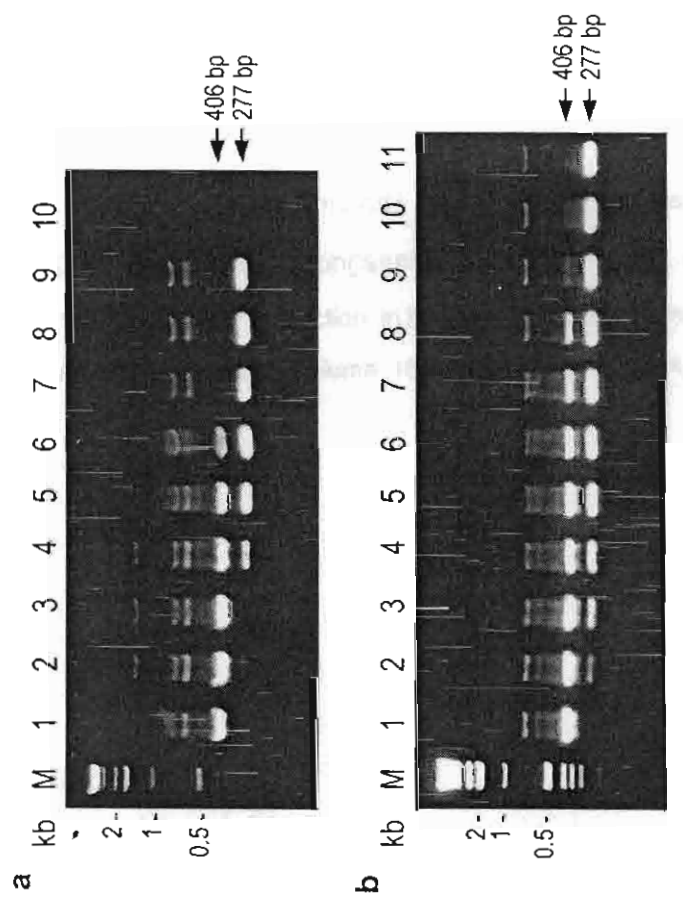


Figure 5



5.3.2

Sukumsirichart W., Kiatpathomchai W., Wongteerasupaya C.,
Withyachumnarnkul B., Flegel TW., Boongsaeng V., and Panyim S. Detection
of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in Penaeus monodon using PCR –
ELISA. *Molecular and Cellular Probes* volume 16 , August 2002 , Pages 409 – 413



Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA

W. Sukhumsirichart,^{*1} W. Kiatpathomchai,² C. Wongteerasupaya,¹
B. Withyachumnarnkul,² T. W. Flegel,² V. Boonseang² and S. Panyim³

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok, 10110, Thailand, ²Department of Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand, ³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

(Received 5 June 2002; accepted 8 August 2002)

A rapid and sensitive PCR-ELISA has been developed for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Penaeus monodon*. The specific primer set amplified 156 bp fragment and could detect as little as 0.01 fg of purified HPV DNA which equivalent to three viral particles. No cross-reactivity was observed when nucleic acid templates from white spot syndrome virus, yellow-head virus, monodon baculovirus and shrimp were tested. The crude DNA sample prepared from hepatopancreas can be used as DNA template and provide a favorable result. Using this technique for detection of HPV infection in 87 carrier shrimps revealed the higher sensitivity and efficiency of detection when compared to histological examination and conventional PCR. Sixty-two percent infection was detected by PCR-ELISA from samples with HPV negative diagnosed by histological examination. Therefore, this sensitive and specific method is promisingly useful for early detection of HPV infection in broodstock, carriers and for *ex situ* application where large numbers of samples can be analyzed simultaneously.

© 2002 Published by Elsevier Science Ltd

KEYWORDS: hepatopancreatic parvovirus, PCR-ELISA, *Penaeus monodon*, polymerase chain reaction.

INTRODUCTION

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) causing disease in several species of penaeid shrimps including *Penaeus monodon*.¹ The heavy infected shrimp demonstrated of stunting which affected shrimp production of farmers.²

A number of diagnostic methods were developed for detection of this virus including histological examination (H&E staining),³ Transmission electron microscopy (TEM),¹ *in situ* hybridization,⁴ and polymerase chain reaction (PCR).^{5,6} The classical H&E staining and TEM are reliable techniques but require an experienced and skilful technician. *In situ*

hybridization is specific but low sensitivity and the commercial available probe was strain-specific.⁴ Polymerase chain reaction (PCR) was highly sensitive but the analysis by agarose gel electrophoresis make it is not suitable for field application which several samples need simultaneously examine.

The PCR-ELISA assay offers an alternative method for detection of PCR products with highly accurate results. The protocol does not require hazardous substances such as ethidium bromide. It has been reported as a sensitive and specific method for detection of bacterial and viral DNA or RNA.^{7–11} This methods with a microtiter plate has been used for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*.⁷

* Author to whom all correspondence should be addressed at: Wasana Sukhumsirichart, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand. Tel: +66-2-2602950 ext. 4607; Fax: +66-2-2600125; E-mail: wasanas@psm.swu.ac.th

human cytomegalovirus,⁸ Dengue virus,⁹ human papillomavirus,¹⁰ herpesvirus 6,¹¹ Plum pox poly-virus (PPV),¹² Rabies viruses,¹³ *Coxiella burnetii*,¹⁴ bacteria in cow's milk,¹⁵ *Escherichia coli*,¹⁶ and parvovirus B19.¹⁷

The technique involves the combination of amplification of viral DNA by PCR using specific primers, hybridization with a specific probe and finally the detection of the hybridized product by the ELISA technique. Besides the safety of non-radioisotopic detection, the method of microtiter plate hybridization has advantages of speed, suitability for a large number of samples and applicability to automation.^{10,17} Therefore in this study, we demonstrated that the PCR-ELISA assay is sensitive and specific to use as a diagnostic method for detection HPV infection in *P. monodon*.

MATERIALS AND METHODS

Shrimp samples

Eighty-seven shrimp samples were collected from ponds in the central and southern parts of Thailand including Samut Prakarn, Ratchaburi, Pattanee, and Phuket. The hepatopancreases were removed and transferred immediately to liquid nitrogen and then stored at -80°C . For post-larvae, the whole fry were fixed in 70% ethanol.

HPV DNA preparation

The viral particle was purified from hepatopancreases and DNA was extracted (Sukhumsirichart *et al.*, 1999).⁵ For crude DNA preparation, the hepatopancreases or whole post larvae were homogenized in lysis solution containing 0.5 N NaOH–0.025% SDS, boiled for 10 min and then centrifuge at 10,000 rpm for 2 min. The crude lysate (1–5 μl) was then used in PCR amplification.

PCR amplification and DIG-labelling

The HPV DNA was specifically amplified and labeled by Digoxigenin-dUTP. The PCR reaction was carried out in 50 μl reaction mixture containing, 5 μl crude DNA template, 1 $\times$ PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl-pH 8.0, 50 mM KCl and 1% w/v gelatin), 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP, 10 μM Digoxigenin-dUTP (DIG) (Boehringer Mannheim), 0.1 μM each of primer 121F (5'...GCA CTT ATC ACT GTC TCT AC...3') and 276R (5'...GTG AAC TTT GTA AAT

ACC TTG...3'), 2 unit *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer). The reaction mixtures were pre-heated at 94°C for 3 min and then performing PCR amplification for 40 cycles as the following condition; denature at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s. The final extension was carried out at 72°C for 5 min. PCR negative controls containing no template DNA were performed for each PCR reaction.

Detection of DIG-labeled HPV DNA using ELISA assay

The DIG-labeled DNA was further detected using ELISA detection kit (Boehringer Mannheim). The labeled PCR product (5 μl) was denatured in 40 μl denaturing solution at room temperature for 10 min. Five hundred μl of hybridization solution containing 7.5 $\mu\text{mol/ml}$ biotin-labeled specific internal sequence probe (5'...Biotin-AATCCTCCT-CCTTCA TGGTTA...3') was added and well mixed. Aliquots of 200 μl of the mixtures were pipetted into avidin-coated microtiter plate and incubated at 37°C for 2 h. At the end of the incubation period, the solution of a given well was discarded and washed for 3 times with 250 μl of washing solution. After the last washing step, 200 μl of the anti-digoxigenin peroxidase (Anti-DIG-POD) solution was added and further incubated for 30 min in a 37°C shaker. The solution was then discarded and washed for three times. The microtiter plate was air-dried on a piece of paper. The color was developed by adding 200 μl of ATBS[®] (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) substrate solution and incubated in the dark for 30 min. The optical density of color product was measured at 405 nm using ELISA photometric measurement apparatus. The intrinsic extinction value of ABTS was evaluated by measuring this solution alone (reagent blank).

Sensitivity and specificity of detection

To determine the sensitivity of PCR-ELISA for detection of HPV DNA, ten fold dilution (1 pg–0.01 fg) of purified HPV DNA was prepared and employed as the DNA templates for PCR-ELISA assay.

Purified or crude DNA prepared from shrimp tissue and other viral pathogens that infect *P. monodon* were tested by PCR-ELISA assay including yellow-head virus (YHV), white-spot syndrome virus (WSSV) and monodon baculovirus (MBV)-infected hepatopancreases.

Southern hybridization

Ten-fold serially dilution of purified HPV DNA ranging from 100 to 0.01 fg was subjected to PCR amplification for 40 cycles as described above. The PCR products (15 µl) were analyzed by agarose gel electrophoresis, transferred onto nylon membrane and hybridized with DIG-labeled 156 bp DNA fragment as a probe.¹⁸

RESULTS

Sensitivity and specificity of PCR-ELISA for detection of HPV

The sensitivity of PCR-ELISA for the detection of HPV DNA was determined in comparison to agarose gel electrophoretic analysis and Southern blot hybridization. A ten-fold serial dilution of HPV

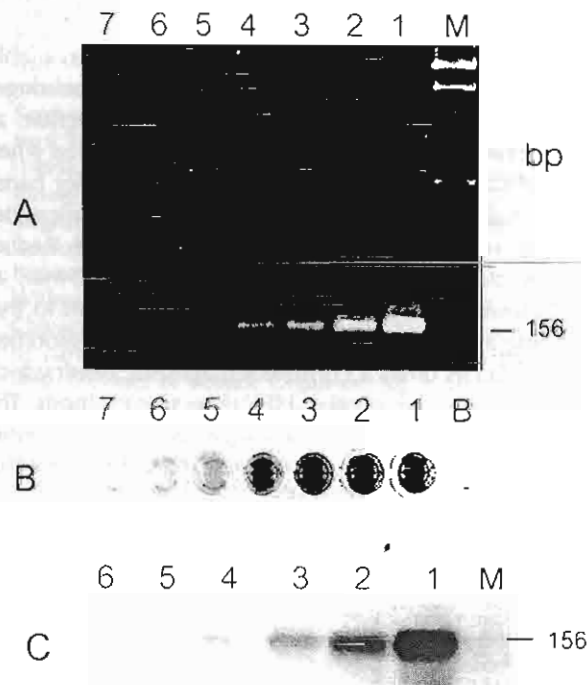


Fig. 1. Comparison of sensitivity for detection of HPV DNA by agarose gel electrophoresis, PCR-ELISA and southern blot hybridization. Ten-fold serial dilution of HPV DNA ranging from 1 pg to 0.01 fg (lanes 1–6) was individually subjected to PCR amplification. The 156 bp PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis (A) and ELISA assay (B). Southern blot hybridization of serial dilution of HPV DNA ranging from 100 to 0.01 fg (lanes 1–6) using DIG-labeled 156 bp fragment as probe was determined (C). Lane M represent DNA marker. Lanes 7 and B were negative control and reagent blank, respectively.

DNA was prepared and subjected to PCR amplification. The DIG-labeled 156 bp DNA fragment was then analyzed by agarose gel electrophoresis and ELISA. Results in Figures 1A and B showed that the sensitivity of detection by agarose gel electrophoresis was 1 fg, whereas 100 times higher sensitivity (0.01 fg) was obtained by ELISA. This sensitivity was 10 times higher than Southern blot hybridization (C).

The amount of HPV DNA in samples were also determined by measuring optical density of the color product at 405 nm (OD_{405}). The result obtained in Figure 2 demonstrates the ability of detecting as a little as 0.01 fg of purified HPV DNA which equivalent to three viral particles and agree with the sensitivity of detection in Figure 1B when the color was detected by naked eyes.

The specificity of the primer and internal sequence probe used in the PCR-ELISA reaction were tested using nucleic acid of white syndrome virus (WSSV), shrimp, yellow-head virus (YEV), monodon baculovirus (MBV) and shrimp. The result in Figure 2 revealed that the primers and probe were specific only for HPV infection, the optical density at 405 nm of other viruses and shrimp were less than the mean absorbance of negative control ($0.026 \pm 3SD$).

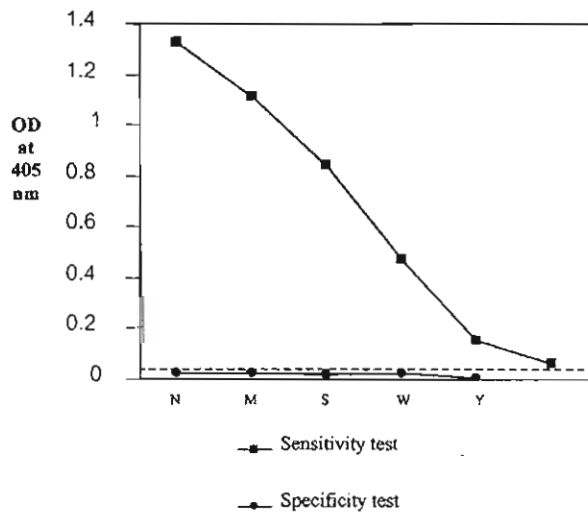


Fig. 2. Graphical illustration of sensitivity and specificity of the PCR-ELISA. The absorbance of the color products were measured at 405 nm using ELISA photometric measurement apparatus. The upper line (—■—) shows the sensitivity for detection of HPV DNA at the concentration of 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 fg, respectively. The lower line (—●—) demonstrates the specificity. The dotted line represents the mean value of negative control. The letters N, W, Y, M, and S represent negative control, monodon baculovirus (MBV) white-spot syndrome virus (WSV), shrimp (S), and yellow-head virus (YHV) nucleic acids, respectively.

Detection of HPV in crude sample in comparison to histological examination

The reliability of detection using PCR-ELISA assay was compared directly to histological examination which used as a gold standard method. Hepatopancreas of infected and healthy individual shrimps was divided into two parts for histological examination (H&E staining) and PCR-ELISA assay. Crude DNA templates were simple prepared and analyzed by PCR-ELISA. A total of 12 samples examined, 10 samples were positive by PCR-ELISA assay and 9 samples were positive by H&E staining. This result (Table 1) show the ability of detection by both methods with 92% agreement and 100% efficiency of detection by PCR-ELISA.

Detection of HPV in carrier shrimps by conventional PCR and PCR-ELISA

To determine the efficiency of PCR-ELISA assay for detection of HPV in carrier shrimp in field, a total of 87 hepatopancreases of shrimp samples collected from ponds in the central and southern part of Thailand, were analyzed by PCR-ELISA in comparing to conventional PCR. There were two set of samples, the first set containing 42 samples which were HPV negative detected by H&E staining and the second set composed of 45 hepatopancreases derived from stunted shrimp. The results in Table 2 shows that 65 samples gave positive detection by PCR-ELISA but only 53 samples by conventional PCR. Twenty-six out of 42 (62%) of the first set of samples were tested positive by PCR-ELISA. It also found that 87% of the stunted shrimps were infected with HPV.

DISCUSSION AND CONCLUSION

PCR-ELISA developed in this study is an alternative approach to diagnose HPV infection in shrimp and carriers. The detection method is simpler than both histological techniques, as tissues must be subsequently processed and conventional PCR, in which the amplified product needs to be electrophoretically examined. The protocol does not require hazardous substances such as ethidium bromide. In terms of sensitivity, the lowest amount of purified HPV DNA detected by this technique was 0.01 fg (approximately three viral particles) which was 10 and 100 times more sensitive than that of the Southern hybridization and conventional PCR, respectively.

For filed application, PCR-ELISA also showed more sensitive than conventional PCR and histological examination. Several shrimp samples which gave negative detection by H&E staining but positive by PCR-ELISA, this implied that these shrimps were the carrier of the virus. Therefore, the PCR-ELISA may be a suitable technique for detecting HPV infection in carriers and broodstock.

At present, the PCR-ELISA techniques is available commercially in a microtiter plate format (Boehringer Mannheim), allowing flexibility of the detection, as positive HPV signals can be directly visualized when qualitative results are sufficient. On the other hand, quantitative results can be gotten using a microtiter plate reader when detailed data are needed. Reduction of the hybridization period to only 30 min, as illustrated in this study, gave a similar result to that using a standard hybridization time so that modified PCR-ELISA offers a consistent diagnostic result which is more rapid than other HPV detection methods. The disadvantage of this technique is that it is more expensive than the conventional PCR assay, but this

Table 1. Comparison of PCR-ELISA and histological examination (H&E staining) for detection of 12 hepatopancreases samples tested

PCR-ELISA+ H&E+	PCR-ELISA+ H&E-	PCR-ELISA- H&E+	PCR-ELISA- H&E-	Sensitivity	Specificity
9	1	0	2	100%	8.33%

Table 2. The detection HPV infection from 87 carrier shrimps by conventional PCR and PCR-ELISA

Shrimp samples	PCR-ELISA+ PCR+	PCR-ELISA+ PCR-	PCR-ELISA- PCR+	PCR-ELISA- PCR-
HPV negative by H&E	15	11	0	16
Stunted characteristic	38	1	0	6

disadvantage is mitigated by its convenience and sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Thailand Research Fund (TRF) for support to carry out this work. Thank also to staff of Charoen Pokaphand Culture Research Center for supplied the samples and examined by H&E staining, Dr Charoe Limsuwan and the owner of shrimp farms for field shrimp specimens.

REFERENCES

1. Lightner, D. A. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
2. Flegel, T. W., Thamavit, V., Parsharawipas, T. & Alay-Sanz, V. (1997). Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* **174**, 197–206.
3. Lightner, D. V., Redman, R. M., Poulos, B. T., Mari, J., Banami, J. R. & Shariff, M. (1994). Distinction of HPV-type viruses in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. *Asian Fisheries Sciences* **7**, 267–72.
4. Mari, J., Lightner, D. V., Poulos, B. T. & Bonami, J. R. (1995). Partial cloning of the genome of unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probe in disease diagnosis. *Diseases of Aquatic Organisms* **22**, 129–34.
5. Sukhumsirichart, W., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Sriurairatana, S., Withyachumnarnkul, B. & Flegel, T. W. (1999). Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* **38**, 1–10.
6. Pantoja, C. & Lightner, D. V. (2000). A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* **39**, 177–82.
7. Zambardi, J., Druetta, A., Roure, C. *et al.* (1995). Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by an ELISA-link detection of polymerase chain reaction products. *Molecular and Cellular Probes* **9**, 91–9.
8. Allen, R. D., Pellett, E. P., Stewart, J. A. & Koopman, M. (1995). Nonradioactive PCR-enzyme linked immunosorbent assay method for detection human cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 725–8.
9. Chow, V. T. (1997). Molecular diagnosis and epidemiology of dengue virus infection. *Annual Academic Medicine of Singapore* **26**, 820–6.
10. Lungu, O., Sun, X. W., Wright, T. C., Ferenczy, Jr. A., Richard, R. M. & Silverstein, S. (1995). A polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay method for detecting human papillomavirus in cervical carcinomas and high-grade cervical cancer precursors. *Obstetrical Gynecology* **85**, 337–42.
11. Osiovy, C., Prud'homme, I., Monette, M. & Zou, S. (1998). Detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by microplate PCR-hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 68–72.
12. Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T., Asensio, M. (1997). Simultaneous detection and typing of plum pox polyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virology Methods* **68**, 127–37.
13. Whitby, J. E., Heaton, P. R., Whitby, H. E., O'Sullivan, E. & Johnstone, P. (1997). Rapid detection of rabies and rabies related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virology Methods* **69**, 63–72.
14. Muramatsu, Y., Yanase, T., Okabayashi, T., Ueno, H. & Morita, C. (1997). Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 2142–6.
15. Gutierrez, R., Garcia, T., Gonzalez, I., Sang, B., Hernandez, P. E. & Martin, R. (1997). A quantitative PCR-ELISA for rapid enumeration of bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 518–23.
16. Gonzalez, I., Garcia, T., Fernandez, P. E. & Martin, R. (1999). Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 231–6.
17. Zerbini, M., Gallinella, G., Manaresi, E., Musiani, M., Gentilomi, G. & Venturoli, S. (1999). Standardization of a PCR-ELISA in serum samples: diagnosis of active parvovirus B19 infection. *Journal of Medical Virology* **59**, 239–44.
18. Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.

5.3.3

Kiatpathomchai W.,Boonsaeng V.,Tassanakajon A.,Wongteerasupaya C.,
Jitrapakdee S., Panyim, S. A non – stop , single -tube, Semi-nested PCR technique for
grading the severity of white spot syndrome virus infections in Penaues monodon .
Disease of Aquatic Organisms Vol 47 Dec. 2001,Pages 235- 239

NOTE

A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*

Wansika Kiatpathomchai¹, Vichai Boonsaeng^{2,*}, Anchalee Tassanakajon³,
Chainarong Wongteerasupaya⁴, Sarawut Jitrapakdee², Sakol Panyim²

¹National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok 10400, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand

ABSTRACT: A single-tube, non-stop, semi-nested polymerase chain reaction (PCR) technique was developed for simultaneous detection and severity grading of white spot syndrome virus (WSSV) infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. The test uses 1 sense primer and 3 anti-sense primers that produce up to 3 PCR products (1100, 526 and 250 base pairs [bp]) depending upon the severity of infection. Specifically, heavy infections ($\geq 2 \times 10^4$ viral particles) of WSSV produce all 3 fragments, while moderate infections (around 2×10^3 viral particles) produce 2 (526 and 250 bp) and light infections (20 to 200 viral particles) produce 1 (250 bp). In addition, the technique uses internal control primers that yield a shrimp characteristic fragment for non-infected samples and samples with a low quantity of viral target in order to assure integrity and reproducibility of the PCR assays. The non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique is simple and convenient and can detect as little as 5 fg WSSV DNA (20 viral particles) in crude extracts of postlarval samples or extracts of pleopods and haemolymph from larger shrimp.

KEY WORDS: White spot syndrome virus · WSSV · Single-tube nested PCR · *Penaeus monodon*

Resale or republication not permitted
without written consent of the publisher

White spot syndrome virus (WSSV) is a viral disease that affects most of the commercially cultivated marine shrimp species, not just in Asia but globally (Wongteerasupaya et al. 1996, Flegel 1997, Lu et al. 1997, Lo et al. 1999, van Hulten et al. 2000). In Thailand, it was first reported as an accidental infection in laboratory-reared shrimp in early 1994 (Wongteerasupaya et al. 1995) although a virus with similar morphology had been reported earlier from farmed specimens of

Penaeus japonicus in Japan (Nakano et al. 1994, Takahashi et al. 1994) and *P. japonicus*, *P. monodon* and *P. penicillatus* in Taiwan (Chen & Kou 1994).

WSSV is an enveloped, rod-shaped virus, containing double-stranded DNA (Wang et al. 1995, Wongteerasupaya et al. 1995). Contrary to initial speculation (Wongteerasupaya et al. 1995), it is unrelated to baculoviruses (Tsai et al. 2000, van Hulten et al. 2001) and it has been recommended that it be included in a new family tentatively called *Whispoviridae* or *Nimaviridae* (van Hulten et al. 2000, 2001). For transmission electron microscopy, negative staining from hemolymph samples revealed that intact virions were 121 ± 9 nm in width at the widest point and 276 ± 26 nm in length, excluding a multifilament appendage that was often seen attached at the narrow end (Wongteerasupaya et al. 1995). Acutely infected shrimp often show white spots of 0.5 to several mm in diameter in the cuticle (which are abnormal deposits of calcium) and sometimes also a pink to reddish-brown coloration due to expansion of sub-cuticular chromatophores (Lightner 1996).

WSSV can be detected by histological and molecular techniques, of which PCR is the most sensitive. Currently reported PCR techniques for WSSV detection use either a conventional amplification with a single sense/antisense primer set (Lo et al. 1996a, Kanchanaphum et al. 1998, Withyachumnarnkul 1999) or a nested amplification (Lo et al. 1996b, 1998). Nested PCR provides an increased level of sensitivity compared with conventional single primer-pair PCR. Real-time PCR is more sensitive and has been reported for the quantification of infectious hypodermal and hema-

*Corresponding author. E-mail: scvbs@mahidol.ac.th

topoietic necrosis virus in infected penaeid shrimp (Tang & Lightner 2001) but not for WSSV.

One of the major drawbacks with 2-step nested PCR is the risk of introducing contamination when a second PCR reaction is initiated using a portion of the mixture from the first reaction vial. This problem can be circumvented by designing a 1-tube, non-stop, semi-nested PCR where 2 or 3 primer pairs with different melting points are simultaneously added with all reaction components and the test sample in a single tube (Rolfs et al. 1992). The aim of this work was to develop a semi-quantitative PCR detection method for WSSV that can be carried out as a single-tube, non-stop, semi-nested PCR amplification.

Methods and results. WSSV was isolated from experimentally infected juvenile shrimp *Penaeus monodon*, and the WSSV DNA was extracted from purified virions using phenol-chloroform extraction as described by Wongteerasupaya et al. (1995).

Twenty *Penaeus monodon* postlarvae or 1 pleopod stored in ethanol were homogenized with a mixture of 200 µl of 0.025 N NaOH and 0.0125% sodium dodecyl sulphate in a 1.5 ml microcentrifuge tube, followed by incubation in boiling water for 5 min before immediate incubation on ice. After a brief centrifugation at 10 000 rpm in a benchtop microcentrifuge, 5 µl of the supernatant was used as the template for PCR amplification.

Ten microliters of hemolymph from *Penaeus monodon* was mixed with 20 µl of 0.005 N NaOH, incubated at 95°C for 5 min then transferred to ice for 5 min before brief centrifugation. Five microliters of the supernatant was used as the template for PCR amplification.

Using primer analysis software (Oligo 4.0s, National Biosciences, Inc., Plymouth, MN, USA), 1 sense primer (F1) and 3 antisense primers (R1, R2 and R3) were designed from the nucleotide sequence of a 4.2 kb WSSV clone (Wongteerasupaya et al. 1995). The sequences of these primers are shown in Table 1. The F1 and R1 primers were used as external primers to generate a primary PCR product of 1100 base pairs

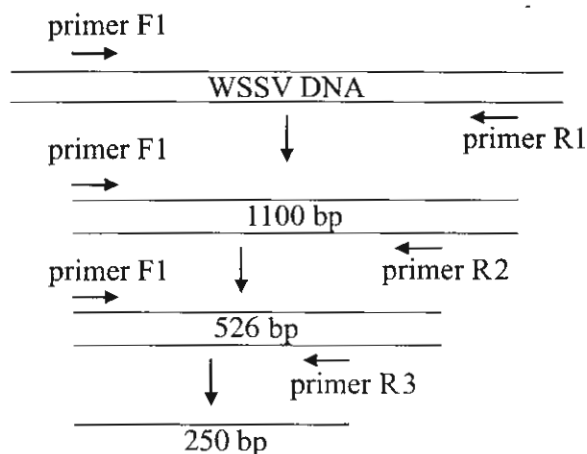


Fig. 1. Diagram showing the products of the non-stop, single-tube, semi-nested polymerase chain reaction for detection of WSSV. bp: Base pairs

(bp) while R2 and R3 primers were used as internal primers along with F1 to generate nested PCR products of 526 bp and 250 bp, respectively, as shown in Fig. 1.

Primers for the shrimp-specific PCR product comprised primers PMN1 and PMN2 (Table 1) designed from the actin gene of *Penaeus monodon* (Boonyawan 1998). They produced a fragment of 143 bp.

The 50 µl PCR reaction contained 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each of deoxy (d) ATP, dCTP, dGTP and dTTP, 1 µM F1, 0.2 µM R1, 0.3 µM R2, 0.5 µM R3, and 0.8 µM each of PMN1 and PMN2. The PCR reaction was initiated by heating the mixture to 93°C for 5 min followed by addition of 6 U of *Taq* polymerase at 75°C. This was followed by 3 successive cycling protocols of (1) 5 cycles of 93°C for 20 s, 70°C for 20 s and 72°C for 20 s, followed by (2) 20 cycles of 93°C for 20 s, 55°C for 20 s and 72°C for 20 s, followed by (3) 25 cycles of 93°C for 20 s, 50°C for 20 s and 72°C 20 s. Following PCR, 10 µl of the reaction solution was examined following electrophoresis through a 2% w/v agarose gel and ethidium bromide staining.

To determine the sensitivity of the non-stop, semi-nested PCR assay, purified WSSV DNA was serially diluted in 10-fold steps from 50 pg to 0.5 fg and added to normal homogenized postlarval shrimp (i.e., free of WSSV as determined by PCR assay) for use as a template in 1-step nested PCR. By agarose gel electrophoresis, non-stop, semi-nested PCR amplification of these templates produced from 1 to 3 PCR products in a manner dependent upon the quantity of WSSV

Table 1. Sequences of the primers used. These were designed based on the sequence of a 4.2 kb cloned fragment derived from purified WSSV and from the sequence of the actin gene of *Penaeus monodon*

Primer	Sequence	T _m (°C)	Target DNA	Product size (bp)
F1	5'AGAGCCCGAATAGTGTTCCTCAGC 3'	76	WSSV DNA	–
R1	5'CAGGCAATATAGCCCGTTTGGG 3'	68	WSSV DNA	1100
R2	5'ATTGCCAATGTGACTAAGCGG 3'	62	WSSV DNA	526
R3	5'AACACAGCTAACCTTTATGAG 3'	58	WSSV DNA	250
PMN1	5'CATGATTATTTGTATATATTATCG 3'	60	Shrimp DNA	143
PMN2	5'CAAGTGCTTCTAAGGATACTG 3'	60	Shrimp DNA	

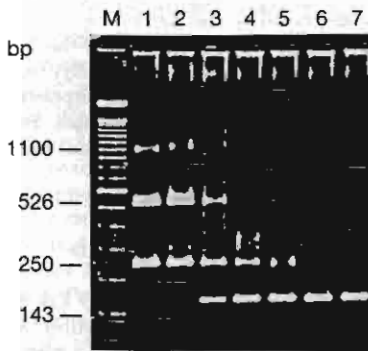


Fig. 2. Sensitivity of the non-stop, single-tube, semi-nested PCR for the detection of WSSV. The PCR products were amplified from purified WSSV DNA serially diluted (1:10) in the range of 50 pg to 0.5 fg, added to a homogenate of shrimp postlarvae and extracted as a PCR template (Lanes 1 to 6, respectively). Lane 7 shows the PCR product from a template crude extract of normal postlarvae without added WSSV DNA. The highest dilution still giving a positive reaction was 5 fg of WSSV DNA in crude postlarval homogenate (Lane 5). Lane M is a 100 bp DNA ladder

added to the homogenates (Fig. 2). Quantities of WSSV DNA at 5 pg (2×10^4 viral particles) and greater gave 3 PCR products of 1100, 526 and 250 bp (Fig. 2, Lanes 1 and 2). A moderate concentration of WSSV DNA, around 500 fg (2×10^3 viral particles), gave 2 products of 526 and 250 bp (Fig. 2, Lane 3) and a low concentration or 5 to 50 fg (20 to 200 viral particles) gave only 1 product of 250 bp (Fig. 2, Lanes 4 and 5). The limit of detection was 5 fg or approximately 20 viral particles

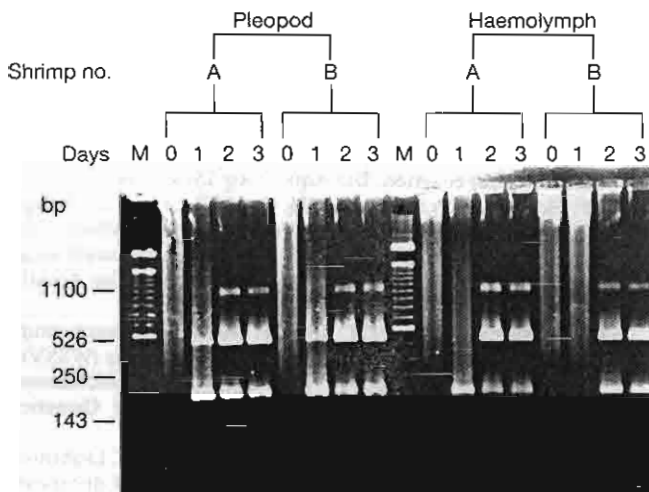


Fig. 3. Ethidium bromide staining of non-stop, single-tube, semi-nested PCR products derived from pleopods and haemolymph of 2 juvenile shrimp (A and B) 1, 2 and 3 days after injection with WSSV (Lanes 1, 2 and 3, respectively). Lane 0 is an extract derived before injection of the virus. Lane M is a 100 bp DNA ladder

(Fig. 2, Lane 5). In addition, a shrimp-specific product at 143 bp was observed for the samples when no or low quantities of WSSV DNA were added (Fig. 2, Lanes 3, 4, 5, 6 and 7). When the concentration of the WSSV target was in the range of approximately 500 fg or more, the shrimp-specific, internal control product was not observed.

Detection of WSSV infection in experimentally infected shrimp was tested using tissue and hemolymph derived from 2 juvenile shrimp experimentally infected with WSSV and reared in an aquarium. Hemolymph (10 μ l) and 1 pleopod were removed daily for testing using the non-stop, semi-nested technique. At 1 d post injection, 2 PCR products (526 and 250 bp) were seen from the pleopods of both shrimp (A & B in Fig. 3) and this increased to 3 fragments (1100, 526 and 250 bp) at Days 2 and 3. With hemolymph from both shrimp, only 1 fragment (250 bp) was observed at Day 1 and 3 fragments at Days 2 and 3. The 143 bp fragment specific for shrimp was seen only in the samples taken at time zero, before WSSV injection.

To test that the non-stop, semi-nested PCR protocol could detect WSSV in field samples of postlarvae, 20 batches were stored in 95% ethanol and delivered to the laboratory by shrimp farmers. These were typical of the samples usually supplied to commercial test laboratories in Thailand. The postlarvae were removed from alcohol, touched on a paper towel to remove excess alcohol and then processed (i.e., homogenized and extracted as described above) before being tested. A range of results was obtained from 0 to 3 WSSV characteristic fragments. The shrimp-specific marker fragment of 143 bp was seen only with samples that gave either no fragments for WSSV or patterns that indicated low to medium quantities of WSSV.

Discussion. Nested PCR reactions are now used widely in the detection of a number of viruses such as hepatitis C virus (Svoboda-Newman et al. 1996), bovine herpesvirus (Ashbaugh et al. 1997) and fish rhabdoviruses (Miller et al. 1998). They are also used routinely for detection of penaeid shrimp viruses including WSSV (Lo et al. 1996b), monodon baculovirus (Belcher & Young 1998), gill-associated virus and lymphoid organ virus (Cowley et al. 2000). However, most of these currently described nested PCR methods use conventional steps where a portion of the PCR reaction from the first step is transferred to a second PCR reaction tube for the second (nested) amplification. There is a high contamination risk at this transfer step. By placing all of the reagents for the nested reaction in a single tube and using a 3-phase amplification program, we have attempted to circumvent this potential problem. To our knowledge, the details of a such a semi-quantitative, non-stop, semi-nested PCR detec-

tion method have not yet been described for any virus of penaeid shrimp.

With respect to sensitivity, we estimate that the lowest detection level of 5 fg of WSSV DNA is equivalent to approximately 20 viral particles based on the estimated length of the total WSSV genome being in the range of 300 kb (Yang et al. 1997) and assuming only a single copy of the target sequence for the primers. This estimated level of sensitivity is comparable with that of the 2-step nested PCR technique reported by Lo et al. (1998). However, our method is an improvement because it is an uninterrupted, single-tube reaction with reduced risks for contamination. A commercial application of the method of Lo et al. (1998) (Farming Intelligence Tech. Co., Taipei, Taiwan) uses a single PCR tube but it must be opened after completion of the first PCR step for addition of a reagent premix containing a pair of internal primers for the second PCR step. These tube openings and transfers create additional risks of contamination. One very important advantage of our method is its ability to grade the severity of viral infections to 3 levels. Commercial products that achieve a similar grading are available but information regarding the primers and reagents used are proprietary. Grading of infections has been reported to be important for the management of WSSV in culture systems (Lo et al. 1998, Peng et al. in press), and our technique should provide an open alternative to commercial systems currently offered for the purpose.

Tan et al. (2001) have reported a method for WSSV quantification based on competitive PCR. This may be useful when precise measurements of WSSV quantity are required. However, the method was not suitable for detection of very low viral loads, as is required when shrimp farmers screen potential WSSV carriers and test postlarvae before stocking shrimp ponds. Our method would be more suitable for such routine assays where precise quantification of viral load is not critical.

Various protocols of sample preparation for WSSV detection have been developed using cetyltrimethylammonium bromide followed by chloroform extraction and precipitation of nucleic acids with 2 volumes of absolute ethanol (Lo et al. 1996a) or DNAzol® Reagent (Gibco Life Technologies; Magbanua et al. 2000). These methods are complicated, time consuming, and risk contamination and loss of DNA during the extraction process. We have successfully circumvented the need for this by using a simplified, crude extraction procedure that gives satisfactory results under the conditions of our assay. Using the protocol described in this paper, we have not found evidence of PCR inhibitors since we always obtain either PCR amplicons of expected sizes or the internal control amplicon in test samples. On the other hand, we cannot exclude the possibility that some partial inhibitors might reduce the sensitivity of the assay for WSSV.

Acknowledgements. The authors thank the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology and the Thailand Research Fund for grants funding to support this research. They would also like to thank Professors Timothy William Flegel and Boonsirm Withyachumnarnkul for valuable comments and suggestions.

LITERATURE CITED

- Ashbaugh SE, Thompson KE, Belknap EB, Schultheiss PO (1997) Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 9:387–394
- Belcher CR, Young PR (1998) Colourimetric PCR based detection of monodon baculovirus (MBV) in whole *Penaeus monodon* postlarvae. *J Virol Methods* 74:21–28
- Boonyawan B (1998) Sequence characterization of randomly isolated cDNA from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). MSc thesis. Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, Thailand
- Chen SN, Kou GH (1994) Viral infection and mass mortality of cultured shrimps in Taiwan. International Symposium on Biotechnology Applications in Aquaculture, 5–10 Dec 1994, Taipei, Taiwan, Asian Fisheries Society, p A2 (Abstract)
- Cowley JA, Dimmock CM, Spann KM, Walker PJ (2000) Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Dis Aquat Org* 39:159–167
- Flegel TW (1997) Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol* 13:433–442
- Kanchanaphum P, Wongteerasupaya C, Sitidilokratana N, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1998) Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 34:1–7
- Lightner DV (ed) (1996) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT, Chou CM, Yeh PY, Huang CJ, Chou HY, Wang CH, Kou GH (1996a) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25:133–141
- Lo CF, Ho CH, Peng SE, Chen CH, Hsu HC, Chiu YL, Chang CF, Liu KF, Su MS, Wang CH, Kou GH (1996b) White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org* 27:215–225
- Lo CF, Chang YS, Cheng CT, Kou GH (1998) PCR monitoring of cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection in growout ponds. In: Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok
- Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, Lightner DV (1999) Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 35:175–185
- Lu Y, Tapay LM, Loh PC, Brock JA, Gose R (1997) The pathogenicity of a baculo-like virus isolate from diseased penaeid shrimp obtained from China for cultureu penaeid species in Hawaii. *Aquacult Int* 5:277–282
- Magbanua FO, Natividad KT, Migo VP, Alfara CG, da la Pena FO, Miranda RO, Albaladejo JD, Nadala ECB, Loh

- PC, Tapay LM (2000) White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis Aquat Org* 42:77–82
- Miller TA, Rapp J, Wasthuber U, Hoffmann RW, Enzmann PJ (1998) Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and culture cells. *Dis Aquat Org* 34:13–20
- Nakano H, Koube H, Umezawa S, Momoyama K, Hiraoka M, Inouye K, Oseko N (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Gyobo Kenkyu (Fish Pathol)* 29:135–139
- Peng SE, Lo CF, Lin SC, Chen LL, Chang YS, Liu KF, Su MS, Kou GH (2001) Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Dis Aquat Org* 46:165–172
- Rolfs A, Scholler I, Finckh U, Rolfs IW (1992) General applications of PCR. In: Rolfs A (ed) *PCR: clinical diagnostics and research*. Springer-Verlag, Berlin, p 34–50
- Svoboda-Newman SM, Greenson JK, Singleton TP, Sun R, Frank TS (1996) Detection of hepatitis C in paraffin fixed liver using RT-PCR. *Modern Pathol* 9:137A
- Takahashi Y, Itami T, Kondo M, Maeda M, Fuji R, Tomonaka S, Supamattaya K, Boonyaratpalin S (1994) Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol* 29:121–125
- Tan LT, Soon S, Lee KL, Shariff M, Hassan MD, Omar AR (2001) Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricus using competitive polymerase chain reaction. *J Fish Dis* 24:315–323
- Tang KFJ, Lightner DV (2001) Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis Aquat Org* 44: 79–85
- Tsai MF, Yu HT, Tzeng HF, Leu JH, Chou CM, Hung CJ, Wang CH, Lin JY, Vlak JM, Kou GH, Lo CF (2000) Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology* 277:100–110
- van Hulten MCW, Tsai MF, Schipper CA, Lo CF, Kou GH, Vlak JM (2000) Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol* 81: 307–316
- van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM (2001) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7–22
- Wang CH, Lo CF, Lou JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239–242
- Withyachumnarnkul B (1999) Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Org* 39:21–27
- Wongteerasupaya C, Vicker JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajarmorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1995) 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*. *Dis Aquat Org* 21:69–77
- Wongteerasupaya C, Wongwisansri S, Boonsaeng V, Panyim S, Pratanpipat P, Nash GL, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1996) DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive *in situ* hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143:23–32
- Yang F, Wang W, Chen RZ, Xu X (1997) A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. *J Virol Methods* 67:1–4

Editorial responsibility: Carey Cunningham,
Aberdeen, Scotland, UK

Submitted: April 30, 2001; Accepted: September 3, 2001
Proofs received from author(s): November 19, 2001

5.3.4

Chainarong Wongteerasupaya , Studies of genetic variation Among geographic isolates of white spot syndrome virus using enveloped protein VP28 Sequence งานวิจัยด้านอนุพันธุวิทยา กลุ่มงานวิจัยอ่าวไทย 14 เมษายน 2544 หน้า 3/1-5 ศ.ดร.สกล พันธ์เงิน

Studies of genetic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using enveloped protein VP28 sequence.

Chainarong Wongteerasupaya

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Soi 23 Sukhumvit Road, Bangkok 10110, Thailand

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is a major viral disease agent distributed in Thailand where penaeid shrimp are cultured. Six isolated of WSSV from Surathane, Chumporn and Chachaoengshao were compared by analysing the viral envelope protein VP28 sequence. No distinctive difference among the WSSV isolates from penaeid shrimp were detected. The results indicate that some viral protein components of WSSV from different geographic regions share a very high degree of homology.

Introduction

White spot syndrome virus (WSSV) is a major viral disease agent in shrimp culture. Electron microscopy studies showed that the virions are enveloped and have a bacilliform shaped of 275 nm in length and 120 nm in width with a tail-like appendage of one end (Wongteerasupaya et al.,1995). Nucleocapsids, which have lost their envelope, has a cross-hatched appearance and a size of 300 x 70 nm (Wongteerasupaya et al.,1995). This viral morphology, its nuclear localization, and its morphogenesis are reminiscent of baculoviruses in insects (Durand et al.,1997). The phylogenetic analysis of ribonucleotide reductase gene indicated that WSSV belongs to the eukaryotic branch of an unrooted parsimonious tree and suggest to be a number of a new genus (Whispovirus) within the baculoviridae or a number of an entirely new virus family (Van Hulten et al.,1999). Other genes that are highly conserved in related virus are those coding for viral capsid and envelope protein (Morphy et al.,1995). This two WSSV virion protein showed no homology to known baculovirus protein in databases.

The virus has a wide host range among crustaceans (Flegel,1997) and distinctive clinical signs in penaeid shrimp. There is little genetic variation among WSSV isolates from around the world using combining the method of restriction analysis and southern blot hybridization. In this paper, we study the relationships between WSSV isolates based on sequence analysis of viral enveloped protein VP28 gene.

Material and Method

The virions were isolated from infected *penaeus monodon* shrimp from Thailand. Infected tissue was homogenized in TN buffer (20mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4) after centrifugation at 1700 g for 10 min, the viral DNA was isolated by treatment with proteinase K (0.2mg/ml) and sarkosyl (1%) at 45°C for 2-4 hr. followed by phenol-chloroform extraction.

Primer and PCR reaction

PCR primer of VP28 coding regions

VP28F	ATGGATCTTTCTTTCACTCTC
VP28R	TTACTCGGTCTCAGTGCCAG

PCR primer of nVP28 for non coding regions

nVP28F	ATTACGGTTACGAAAATTCC
nVP28R	AGAGTGAAAGAAAGATCCAT

The PCR reaction,10 ng DNA and 30 pmol each primer were added to a reaction mixture comprising 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2mM MgCl₂,200μM each dATP,dTTP,dCTP and dGTP, 25U Taq Pwo DNA polymerase (Gibco-BRL). The mixture was incubated in a thermal cycler using 30 cycle of 94°C for 30s, 52°C for 30s,and 72°C for 1 min and a final elongation step of 72°C for 10 min. PCR products 608 bp of VP28 coding region and 453 bp of noncoding region were purified using a QIA quick™ column(QIAGEN).

Sequence analysis

The 608 bp PCR products of VP28 coding region from 4 WSSV isolates and 453 bp PCR product of VP28 noncoding region from 6 WSSV isolates were sequence using thermo Sequence™ (Amersham) and Automated ABI model 377 Sequencing system (Applied biosystem Inc.). Sequence alignment and estimation of sequence identity were conducted using Clustal W software.

Results and discussion

The relationship between the WSSV isolates were determined by sequence comparison of VP28 coding gene (Fig 1.) and VP28 noncoding gene (Fig 2). The results indicate that WSSV isolates of these studies share a vary high degree of homology. Sequence analysis of WSSV from various region in Australia, India, and the Americans will be required to determined the extent of molecular diversity among WSSV isolates.

Sur2vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTATAGGTATCACAA
Sur7vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTATAGGTATCACAA
Chu1vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTATAGGTATCACAA
Chu2vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTATAGGTATCACAA
Vp28	CTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTATAGGTATCACAA

Sur2vp28	CACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGG
Sur7vp28	CACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGG
Chu1vp28	CACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGG
Chu2vp28	CACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGG
Vp28	CACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGG

Sur2vp28	ATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAG
Sur7vp28	ATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAG
Chu1vp28	ATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAG
Chu2vp28	ATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAG
Vp28	ATGAAAACCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAG

Sur2vp28	ATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAA
Sur7vp28	ATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAA
Chu1vp28	ATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAA
Chu2vp28	ATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAA
Vp28	ATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAA

Sur2vp28	TGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCA
Sur7vp28	TGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCA
Chu1vp28	TGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCA
Chu2vp28	TGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCA
Vp28	TGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCA

Sur2vp28	CTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACC
Sur7vp28	CTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACC
Chu1vp28	CTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACC
Chu2vp28	CTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACC
Vp28	CTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACC

Sur2vp28	TTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
Sur7vp28	TTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
Chu1vp28	TTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
Chu2vp28	TTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
Vp28	TTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT

Sur2vp28	CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCTG
Sur7vp28	CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCTG
Chu1vp28	CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCTG
Chu2vp28	CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCTG
Vp28	CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCTG

Sur2vp28	GTAGCTCCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTNTATTGATGAGGATGAA
Sur7vp28	GTAGCTNCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTTTATTGATGAGGATGAA
Chu1vp28	GTAGCTCCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTNTATTGATGAGGATGAA
Chu2vp28	GTAGCTCCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTNTATTGATGAGGATGAA
Vp28	GTAGCTCCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAA

Sur2vp28	GTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTCC
Sur7vp28	GTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTCC
Chu1vp28	GTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTCC
Chu2vp28	GTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTCC
Vp28	GTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTCC

Sur2vp28	GCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTAC
Sur7vp28	GCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTAC
Chu1vp28	GCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTAC
Chu2vp28	GCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTAC
Vp28	GCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTAC

Fig.1 Multiple Sequence Alingment of VP28 coding gene of WSSV
 Sur= Surathanee Chu= Chumporn
 Ref= a reference VP28 coding sequence reported by van Hulten et al 2000

Sur2nvp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
Sur7nvp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
Chu1nvp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
Chu2nvp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
Pad1nvp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
Pad2nvp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
vnp28	AACTAAAAAATTCAATACTGGCACTGGATGATTGGGGTTCATTTTATTT
- - - - -	
Sur2nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Sur7nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Chu1nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Chu2nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Pad1nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Pad2nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
Nvp28	ATTTTATTAATCATCGGAATTTGGGGTTTATTTAGATCTCGAAATGCAAC
- - - - -	
Sur2nvp28	CACCCAAGAGANCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
Sur7nvp28	CACCCAAGAGAGCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
Chu1nvp28	CACCCAAGAGANCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
Chu2nvp28	CACCCAAGAGAGCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
Pad1nvp28	CACCCAAGAGAGCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
Pad2nvp28	CACCCAAGAGAGCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
Nvp28	CACCCAAGAGAGCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTA
- - - - -* - - - - -	
Sur2nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
Sur7nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
Chu1nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
Chu2nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
Pad1nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
Pad2nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
Nvp28	CATATTCTGGCAGCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAAC
- - - - -	
Sur2nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
Sur7nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
Chu1nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
Chu2nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
Pad1nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
Pad2nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
Nvp28	AAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAATAGACCCTGGCTTACTGTA
- - - - -	
Sur2nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
Sur7nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
Chu1nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
Chu2nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
Pad1nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
Pad2nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
Nvp28	ACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTAC
- - - - -	
Sur2nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
Sur7nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
Chu1nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
Chu2nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
Pad1nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
Pad2nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
Nvp28	GTACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTT
- - - - -	

Sur2nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA
Sur7nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA
Chu1nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA
Chu2nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA
Pad1nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA
Pad2nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA
Nvp28	TGTCCTCGCCGACAAAACGACATCTTAATAACCAAGCAACGTTTCGATAAA

Fig.2 Multiple Sequence Alingment VP28 noncoding gene of WSSV
 Sur= Surathanee Chu= Chumporn Cha=Chachaoengshao
 Ref= a reference VP28 noncoding sequence reported by van Hulten et al 2000

Acknowledgments

This research was supported by Thailand Research Fund.

References

1. Durand,S., Lightner,D.V.,Rwdman,R.M.,and Bonami,J.R.(1997).Ultrastructure and morphogenesis of White spot syndrome Baculovirus (WSSV). Dis. Aquat.Org.29,205-211.
2. Flegel, T.W. (1997) Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J.Microbiol. 13 433-442.
3. Marielle C.W. van Hulten, Marcel Westenberg, Stephen D. Goodall,and just m.Vlak. Identification of two major Virion protein genes of White spot syndrome virus of shrimp.Virology 266, 227-236 (2000).
4. Murphy,F.A. Fauquet, C.M. Bishop,D.H.L., Ghabrial,S.A.,Jarvis, A.W.,Martilli,G.P.,Mayo,M.A.,and summers, M.D.(1995) "classification and Nomenclature of viruses : Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses." Springer-Verlag, New York.
5. Van Hulten,M.C.W.,Tsai,M.F.,schipper, C.A.,Lo,C.F.,Kou,G.H., and Vlak,J.M., (2000). Analysis of a genomic segment of White spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase gene and repeat regions. J.Gen.Virol.81, 307-316.
6. Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E.,Sriurairatana, S.,Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., withyachumnarnkul, B., and Flegel,T.W. (1995). 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*. Dis. Aquat. Org.21, 69-77.

5.3.5

Chainarong Wongteerasupaya , Analsis of Genelic diversity in Ribonucleotide reductase gene of white spot sndrome virus งานวิจัยอนุชีววิทยา ในหนังสือ กลุ่ม เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ. ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม 19 กันยายน 2545 หน้า 9/1-6

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENE OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

Chainarong Wongteerasupaya

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand

Abstract

The genetic variations among WSSV isolates were study by comparing the direct repeat DNA sequence of coding in ribonucleotide reductase genes. We have found high variation in the number of 54 bp DNA repeats in the WSSV ribonuclease reductase gene. The sequence within the repeated region was highly stable showing sequence variation for some repeats at position 36 of the 54 bp repeat only and even then for an alternate T or G only. This method of comparison may be useful for epidemiological studies on the local to global movement of WSSV since it shows high variation in the number. This direct repeat sequence probably be the candidate gene to distinguish between the WSSV isolates of penaeid shrimp. The sequence of difference PCR repeating patterns are understudies.

Introduction

White spot syndrome virus (WSSV) is a major viral disease agent in shrimp culture. Electron microscopy studies showed that the virions are enveloped and have a bacilliform shaped of 275 nm in length and 120 nm in width with a tail-like appendage of one end (Wongteerasupaya et al., 1995). Nucleocapsids, which have lost their envelope, has a cross-hatched appearance and a size of 300 x 70 nm (Wongteerasupaya et al., 1995). This viral morphology, its nuclear localization, and its morphogenesis are reminiscent of baculoviruses in insects (Durand et al., 1997). The phylogenetic analysis of ribonucleotide reductase gene indicated that WSSV belongs to the eukaryotic branch of an unrooted parsimonious tree and suggest to be a member of a new genus (Whispovirus) within the baculoviridae or a member of an entirely new virus family (Van Hulten et al., 1999). Other genes that are highly conserved in related virus are those coding for viral capsid and envelope protein (Morphy et al., 1995). This two WSSV virion protein showed no homology to known baculovirus protein in databases.

The 12.3 kb ribonucleotide reductase gene was reported by van Hulten et al., 2000. This segment contained eight open reading frames (ORFs), including two encoding the large (RR1) and small (RR2) subunits. The rr1 and rr2 genes were separated by 5760 bp, containing several putative ORFs and two domains with multiple sequence repeats. The first domain contained six direct repeats of 54 bp and is part of a coding region. The second domain had one partial and two complete direct repeats of 235 bp at an intergenic region. The phylogenetic analysis of rr1 and rr2 indicated that WSSV belongs to the eukaryotic branch of an unrooted parsimonious tree.

The virus has a wide host range among crustaceans (Flegel,1997) and distinctive clinical signs in penaeid shrimp. There is little genetic variation among WSSV isolates from around the world using combining the method of restriction analysis and southern blot hybridization. In this paper, we study the relationships between WSSV isolates based on sequence analysis of viral enveloped protein VP28 gene, and the segment of six direct repeats in coding regions of ribonucleotide reductase gene.

Material and Method

The virions were isolated from infected *penaeus monodon* shrimp from Thailand. Infected tissue was homogenized in TN buffer (20mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4) after centrifugation at 1700 g for 10 min, the viral DNA was isolated by treatment with proteinase K (0.2mg/ml) and sarkosyl (1%) at 45°C for 2-4 hr. followed by phenol-chloroform extraction.

Primer and PCR reaction

PCR primer of segment of six direct repeats of ribonucleotide reductase gene

Wrb6r-F	AGCAGGTGTGTACACATTTCATG
Wrb6r-R	TCTACTCGAGGAGGTGACGAC

The PCR reaction, 10 ng DNA and 30 pmol each primer were added to a reaction Mixture comprising 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2mM MgCl₂, 200µM each dATP, dTTP, dCTP and dGTP, 25U Taq Pwo DNA polymerase (Gibco-BRL). The mixture was incubated in a thermal cycler using 30 cycle of 94°C for 30s, 52°C for 30s, and 72°C for 1 min and a final elongation step of 72°C for 10 min. PCR products were purified using a QIA quickTM column (QIAGEN).

Sequence analysis

PCR amplicons were purified from agarose gels using a QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) and were sequenced using thermo SequenceTM (Amersham) and an Automated ABI model 377 Sequencing system (Applied biosystem Inc.). Sequence alignment and estimation of sequence identity were conducted using Clustal W software.

Results and discussion

The DNA extracts from WSSV infected shrimp gave a variety of amplicons using the primers Wrb6r-F and Wrb6r-R, suggesting differences in the number of repeats from sample to sample. An example gel for fragments representing 6 to 11 repeats is shown in Fig. 1. In GenBank records of for complete WSSV genome sequences, one originating from China shows 12 repeats (AF332093) and two show 6 repeats, one from Thailand (AF369029) and one from China (AF440570). This supports our results regarding variability in the number of RR54 repeats for WSSV.

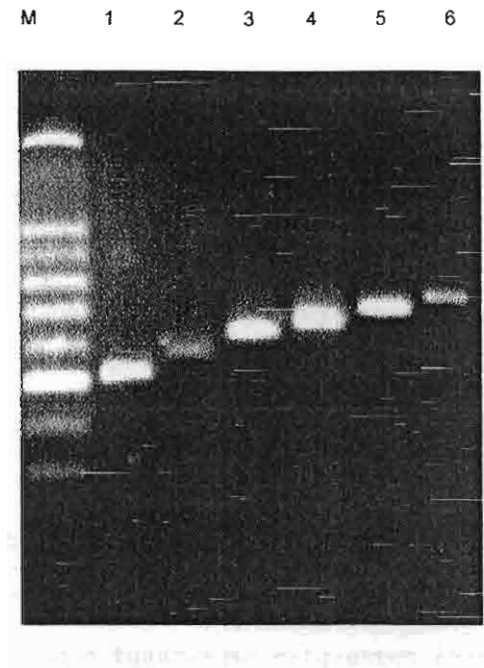


Figure 1. Example agarose gel showing PCR amplification products for 6 (lane 1) to 11 (lane 6) RR54 repeats.

Sequencing of several of the fragments confirmed that they comprised variable stretches of tandemly repeated RR54 with almost unvarying homology to RR54 in the original WSSV sequences deposited at GenBank (Figs. 2). Sequence variations, when found, consisted of a single alternate T or G at position 36 of the 54 bp repeat. This was also characteristic of the GenBank sequences. In the initial repeat (RR54-1), T at position 36 was invariant in all the sequenced fragments and for the full WSSV sequences at GenBank. T was also invariant for RR54-2 except for G found in GenBank AF369029 originating from Thailand (Table 1).

Analysis of genetic diversity in ribonucleotide reductase gene of white spot syndrome virus

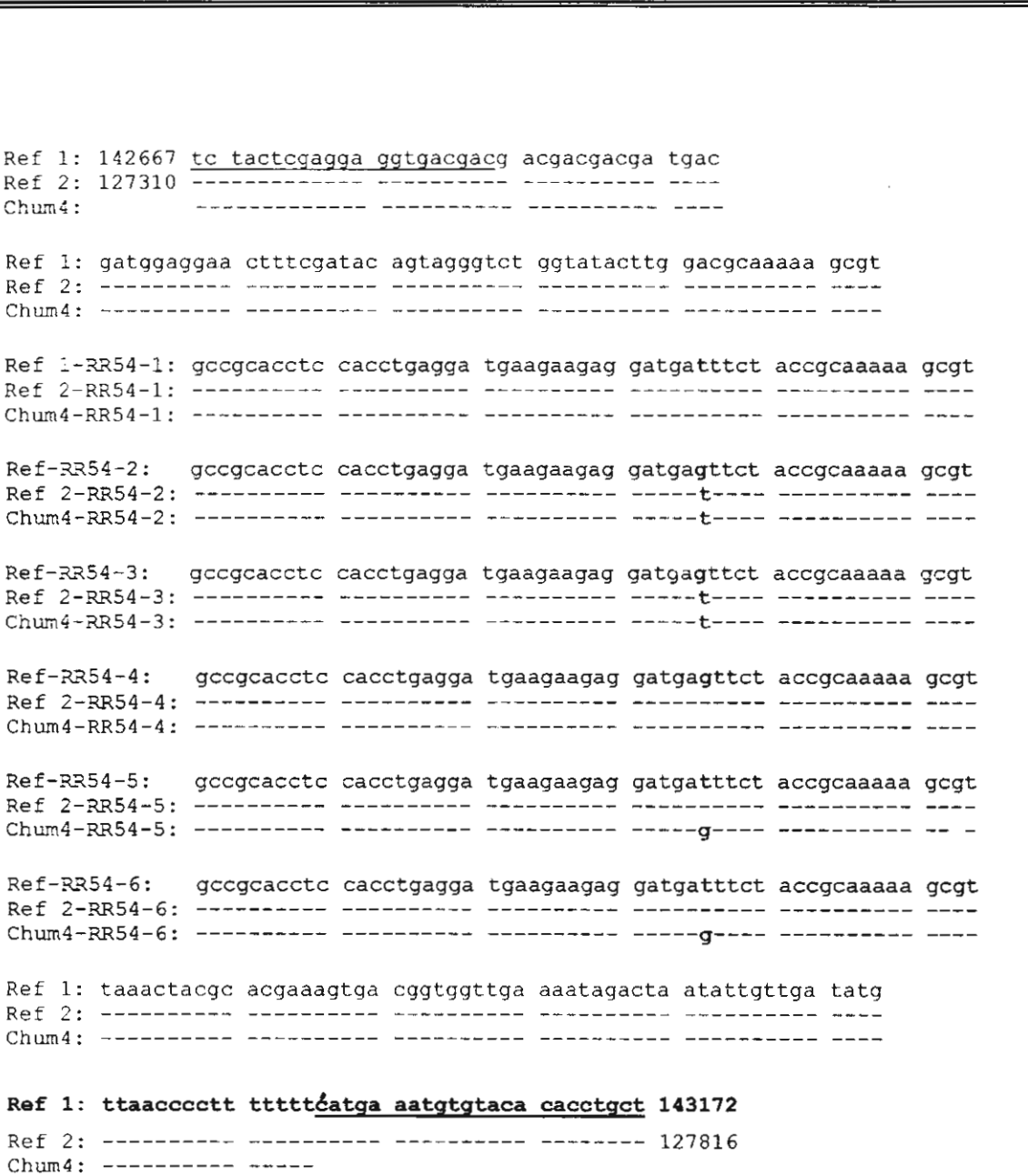


Figure 2. Example of sequence for the amplicon for Chum4 showing identical repeat sequences to the reference strain (GenBank AF369029 = Ref 1 and AF440570 = Ref 2) except for the bases indicated in bold at position 36 of RR54. Matching bases are indicated with a dash and the primers are underlined.

Table 1. Summary of substitutions found at position 36 in sequenced RR54 tandem repeat regions of selected amplicons from Thai shrimp samples from Surat Thani (Surat) and Chumpol (Chum) compared to GenBank references with 6 and 12 RR54 repeats.

Isolate	RR54 repeat number											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Surat #1	T	T	T	T	G	T	T	G	T			
AF440570	T	T	T	G	T	T						
Chum #2	T	T	T	G	T	G	T					
Chum #4	T	T	T	G	G	G						
Surat #2	T	T	G	T	T	G	G	T				
Chum #3	T	T	G	T	T	G	G	T				
AF332093	T	T	G	G	G	G	G	G	T	T	T	T
AF369029	T	G	G	G	T	T						

Obviously, the number of samples employed in this study was too small and taken at too intermittent intervals to make firm conclusions. However, they do show that the RR54 repeat region has potential for use in epidemiological work with WSSV and may help in tracing its origin and spread.

Acknowledgements.

The authors would like to thank the Thailand Research Fund, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

References

1. Flegel T, Alday-Sanz V (1998) The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. *J Appl Ichthyol* 14: 269-273
2. Flegel TW (1997) Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol Biotechnol* 13: 433-442
3. Lightner DV (1996) A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, World Aquaculture Society
4. Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, Lightner DV (1999) Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 35: 175-185
5. Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, Tzeng HF, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Vlak JM, Kou GH (2000) Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277: 92-9.
6. van Hulten MC, Tsai MF, Schipper CA, Lo CF, Kou GH, Vlak JM (2000) Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol* 81 Pt 2: 307-16.
7. van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM (2001) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22

8. Wang Q, Nunan LM, Lightner DV (2000) Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Dis Aquat Organ* 43: 175-81.
9. Withyachumnarnkul B (1999) Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat Org* 39: 21-27
10. Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Bonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in the cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21: 69-77

5.3.6

Richard Hodgson and Chainarong Wongteerasapaya , Nucleic Acid Hybridization to detect YHV and WSSV Molecular Epidemiology and Diagnostics of Shrimp Viruses in the Asian Region . March 2000. P5/1-12

NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION TO DETECT YHV AND WSSV

Richard Hodgson
Chainarong Wongteerasupaya

CSIRO, Tropical Agriculture, Australia
Mahidol University, Department of Biochemistry, Thailand

SECTION 1

INTRODUCTION

Preface

Dot blots, Southern and Northern blotting involve the adsorption and permanent binding of nucleic acid onto a membrane support prior to an hybridization assay. In dot blots an unfractionated nucleic acid sample is permanently cross-linked to the membrane. In the Southern and Northern blots fractionated DNA and RNA respectively are transferred and cross-linked to a membrane after fractionation through a gel.

A nucleic acid sample that is permanently immobilised onto a membrane support can be probed for the presence of specific nucleic acid target sequence. Probes are made to complement the sequence of the target. In this way the probe will bind (hybridize) to the target. Probes are labeled with a reporter molecule, such as DIG, biotin, ^{32}P or a fluorophore for detection of the hybridization.

Blotting

Dot blots use small sample volumes as low as 1 μl to test whether the sample contains the target sequence of interest. Crude or purified samples can be examined and the system is applicable for detection of DNA and RNA targets. Southern blots examine DNA, while Northern blots examine RNAs.

One of the main advantages of the dot blot method is the ability to examine a large number of samples in a short time and on a small membrane area. This is an ideal method for initial screening of sample and for diagnostic screening of samples when the specificity of the probe for the target has been established.

The dot blot assay will only provide presence/absence information about a sequence. No information on the size or structure of the target in a positive sample can be obtained. This additional information is gained after blotting nucleic acid fractionated by gel electrophoresis.

DNA is transferred after alkaline denaturation or in an alkaline solution to disrupt the H^+ bonds which hold strands together in the DNA duplex. It is necessary to dissociate DNA strands to allow the probe to hybridize to one of the strands. The alkaline conditions used for DNA transfers cause random cleavage in RNAs. So RNA is generally transferred using a high salt solution buffered to neutrality and containing a denaturing agent. The bound single stranded RNA can then be detected.

The type of membrane used as the support is important. There are three groups of membranes; nitrocellulose, uncharged nylon and (+ve) charged nylon. For each different membrane there is a slightly different procedure required for preparing the samples and the membrane.

Hybridization of probe to samples in a gel is generally not efficient. So nucleic acid is transferred to a membrane support for efficient hybridization. The profile of the

fractionated nucleic acid bands in the gel is maintained during the transfer to membrane.

Transfer and binding of RNA onto membranes from gels is termed Northern transfer. The equivalent for DNA is a Southern transfer.

Hybridization

Molecular hybridization of a probe to a target nucleic acid species is a powerful technique to 'find' whether the target species is in a sample. Hybridization is the basis of nearly every procedure in molecular biology. So understanding how hybridization conditions work provides an understanding of the probe-target interaction.

In an hybridization assay the target can be RNA or DNA and the probe is a nucleic acid. The hybridization can occur on fixed membrane supports, on glass or magnetic beads, in microtitre plates, or in solution or in a gel matrix. In most circumstances the probe is labelled with a reporter group for detection following hybridization. Many different reporters are available, each with their advantages. The choice of reporter depends on each laboratory situation.

The efficiency of hybridization is controlled through the interaction of many variables such as, probe base composition (G+C% plus A+T%), mismatch percentage, concentration, size of the probe and whether the hybridization involves RNA/RNA, DNA/RNA or DNA/DNA duplexes. Also of importance are the ionic concentration, solution viscosity and presence of destabilising agents in the reaction solutions, and the hybridization and washing temperatures. All these features combine to vary the stringency of the hybridization and can be related together for comparison between probes through the T_m (melting temperature) for hybridization of the probe/target.

Stringency is the specificity and strength of probe-target hybridization. High stringency allows only complete base pairing but at low stringency a level of base pair mismatch is tolerated. T_m is the temperature where 50% of the probe is expected to be hybridized to target.

Large probes made but random priming, by PCR, by nick translation or by transcription typically produce probes of 100 to 500 nt and they can be DNA or RNA. Because of their size Large probes have very high T_m , which generally requires formamide in the hybridization to lower the effective T_m to a manageable temperature. Full-length probes require an extended hybridization period and they can tolerate considerable base-mismatch without markedly affecting the hybridization outcome. It is difficult for full length probes to distinguish closely related individuals or groups. They are therefore best used as a general probe.

Oligonucleotide (oligo) probes are small (25 to 45 nt) and they have a sequence defined by the user. Thus, they hybridize to a defined target sequence, which can be a motif unique to a pathogen species. If this sequence motif is unique and the oligo-probe is used under high stringency conditions then the probe is specific for its target pathogen species or strain. These are the *diagnostic probes*. In comparison, if the target sequence is found among a family of pathogens, then an oligo-probe can be developed which universally detects any member of the family, but does not detect unrelated families. These are the *general probes*. Oligo-probes rapidly diffuse in solution, so they allow for rapid hybridization conditions. They are easily synthesised in large quantity, they are a stable and very economical.

Often when total nucleic acids are fractionated through an agarose gel they often show a staining smear which may or may not contain visible fragment bands. Nucleic acid (bands) of interest are difficult to visualise because of the high total nucleic acid concentration or because the bands of interest occur at a low concentration below the detection by staining. To overcome this problem the particular target sequences are detected by hybridizing a probe which is labelled with a detectable marker. Markers can be a radiolabel (^{32}P , ^{35}S), biotin, digoxigenin, a fluorophore or even directly coupled enzymes. With each marker the sensitivity of detection is much greater than gel staining. However, hybridization of probe to samples in a gel is generally not efficient. So nucleic acid is transferred to a membrane support for efficient hybridization. The profile of the fractionated nucleic acid bands in the gel is maintained during the transfer to membrane.

Transfer and binding of RNA onto membranes from gels is termed Northern transfer. The equivalent for DNA is a Southern transfer.

Hybridization probes can usually be designed to detect a specific target sequence. Alternatively there are the broad spectrum probes, which are used to detect different but related targets. That is they share a region of homology. This

is the difference between diagnostic and general probes. Thus, the selection of the probe and the assay conditions must be carefully considered and controlled before performing a dot blot hybridization.

Reporter molecules attached to probes

The reporter molecules, or labels, are either radioactive or non-radioactive. Radioactive labels are widely used and have many advantages. They are not dangerous if used correctly, which is how all laboratory chemicals need to be used. The labeling and detection systems outlined below can be done using commercially available kits.

The non-radioactive labels can be fluorescent groups, which are detected directly in specialised equipment, or the labels can be reactive chemical groups. The two most common chemical labels are biotin and DIG (digoxigenin). These groups are detected after the hybridization in an additional sandwich assay involving attachment of an enzyme which catalyses the final detection signal. Biotin and DIG detection involving colourimetric development is relatively simple but it is less sensitive than a chemiluminescent detection system.

Reporter Molecules For Labelling Nucleic Acid

Radioactive

- ^{32}P , ^{33}P and ^{35}S

Non-radioactive

- DIG (digoxigenin)
- biotin
- fluorophores (many available)
- conjugated enzymes

Radiolabels

The commonly use radioactive labels contain ^{32}P (phosphorous (^{32}P) or ^{33}P , or to a much lesser extent now ^{35}S .

^{32}P has very high energy emission which provides a fast exposure times to film and screens. But a limitation is that developing bands can lose resolution. Generally this is not a problem. As an alternative, ^{33}P can be used in all the same applications. It has less energy emission so development times have to be increased, but resolution is improved. The lower energy emission is also safer for handling.

Each of the deoxyribo-nucleotides and the ribo-nucleotides can have ^{32}P incorporated into their structure. However, the most common labels are (dATP, dCTP, ATP and UTP).

DIG (Digoxigenin)

DIG is a highly antigenic steroid from Foxglove plants (*Digitalis purpurea*). As a label DIG is attached to a spacer arm which is attached to a uridine residue. The uridine is enzymatically incorporated into the probe. DIG can also be chemically attached to molecules. The chemistry of DIG together with labelling procedures and uses of DIG-probes are extensively reviewed in Boehringer Mannheim User's Guides. DIG labelling is generally easy and the probes are

stable for a long period. It is also possible to purchase oligonucleotide probes with the DIG already attached. An advantage with DIG is that it is only reported to occur in the Foxgloves. So unless extracts from these plants are being examined there is little problem with background contamination due extraneous label.

Biotin

Biotin can be incorporated into probes in the same manner as DIG. Biotin can also be incorporated by direct cross-linking under UV-light. Some plants have an intrinsic level of biotin which can lead to high background.

Fluorophores

Fluorophore	Emission
Cascade Blue	blue-420
AMCA	blue-448
Oregon Green 488	green-514
Fluorescein	green-520
FAM	green-535
Bodipy	green-533
JOE	yellow-557
HEX	yellow-560
Cy 3	orange-570
Tetramethylrhodamine	orange-580
TAMRA	orange-580
Rhodamine Red, ROX	red-590
Texas Red	red-615
Cy 5	far-red-670

These are molecules which absorb light, but are metastable and re-emit light at a longer wavelength as they regain their stable state. Application of fluorophores is becoming increasingly common. They offer particular advantages because multiple fluorophores can be examined simultaneously in a sample. This means several probes can be used simultaneously in the one reaction to detect different targets.

Conjugated enzymes

The enzymes alkaline phosphatase (AP) or horseradish peroxidase (HRP) can be directly conjugated onto probes or primers. Although this is not common. They are extensively used in protein probes (antibodies) where they can be easily attached.

Detection Of Reporter Molecules

Reporter molecules are detected either directly or indirectly through a secondary reaction, which often amplifies the detection. Radiolabels, fluorophores and the coupled

enzymes are detected directly. DIG and Biotin are detected indirectly by binding an antibody-enzyme conjugate. The enzyme catalyses a colourimetric or luminescent reaction which is recorded.

The radio-labels are detected by exposure to X-ray film or to fine grain photographic film followed by photographic development of the films. More sophisticated detection involves exposure to specialised luminescent phosphor screens with development in a phosphorimager. Other specialised equipment such as liquid scintillation counters can be used in some instances. Using ^{32}P and X-ray film exposure is a reliable, sensitive and economical detection strategy for most application.

DIG provides a high level of sensitivity, which is achieved by an additional sandwich assay involving an anti-DIG antibody coupled with an enzyme which catalyses the final detection signal. The enzyme induced signal can provide a colourimetric development from BCIP/NBT or the enzyme induced signal can stimulate a chemiluminescent detection which is very sensitive and rapid.

The colourimetric development or chemiluminescent detection as described for DIG is also applicable for biotin. Fluorophores are detected directly in plate readers, in flat bed readers which examine plates, membranes and gels, or they can be detected by microscopy under UV-light excitation.

The directly coupled enzymes are not a common labelling technique. They are detected by colour development or chemiluminescence.

Molecular detection techniques for viruses are based on the identification of a specific molecular component(s) of the virus of interest. This could be virus specific protein or nucleic acid. The sensitive methods for detection of virus specific proteins are achieved using immunological techniques. For example by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), DIBA (dot immunobinding assay) and immunofluorescence. Proteins are highly immunogenic which makes them very suitable to immuno-based detection procedures.

The genetic material of all life forms (nucleic acid) is a poor antigen, so the direct immuno-based methods used for protein detection of viral specific nucleic acid are not appropriate for the detection of nucleic acid. Traditional procedures used for detection of nucleic acid, e.g. those involving nucleic acid hybridization and PCR can however be converted into an immuno-based detection procedure by incorporating an antigen into the nucleic acid probe.

Nucleic acid probes can be labelled with digoxigenin (DIG), biotin or enzymes directly. These are all antigenic and allow the labelled probes to be incorporated into an immuno-based detection strategy.

DIG is a commonly used label for incorporation into nucleic acid. Its detection is by and anti-DIG antibody coupled to a reactive enzyme, such as alkaline phosphatase. The phosphatase can be used to react with different substrates.

When chromogenic substances like BCIP/NBT are used a colour precipitate develops, which is the final product detected to indicate the presence of a positive reaction.

SECTION 2

REAGENTS AND MATERIALS

Sample preparation

- 2X, 6X and 10X SSC: diluted from stock 20X SSC solution (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7)
- 0.4 M Tris-HCl pH 7.5: diluted from stock 10 N solution
- 0.25 N HCl: diluted from stock 10 N solution
- 0.2 N and 0.4 N NaOH: diluted from stock 10 N solution
- Formamide: deionised 95% formamide
- Formaldehyde: stock solution is usually 37% (= 12.3 M)
- 5X MOPS buffer: 0.1 M MOPS (3-(N-morpholino) propane-sulphonic acid) pH 7.0, 40 mM sodium acetate, 5 mM EDTA
- DSW: DEPC-treated Sterile double distilled Water

Hybridization with random-primed probes

- PHB: 5X SSC, 1% (w/v) blocking reagent, 0.1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, Na-salt, 0.02% (w/v) SDS
- Membrane wash solution 1: 2X SSC, 0.1% (w/v) SDS
- Membrane wash solution 2: 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS
- Buffer I: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5
- Buffer II: 1% (w/v) blocking reagent in buffer I
- Buffer III: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5
- Colour solution: 45 $\square$ l NBT solution, 35 $\square$ l X-phosphate solution in Buffer III
- NBT: 75 mg/ml nitro blue tetrazolium in 70% (v/v) dimethylformamide
- X-Phosphate: 50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt in 100% dimethylformamide

Hybridization with oligonucleotide-probes

- 20X SSC buffer: 3M NaCl, 0.3M trisodium citrate
- Prewash solution: 0.1X SSC, 0.5% SDS
- Prehybridization solution: 5X SSC, 20mM NaH₂PO₄-pH7.0, 2.5% SDS, 5X modified Denhardt's, 100 μ g/ml denatured DNA (RNase free)

- 100X Modified Denhardt's solution: 2% polyvinylpyrrolidone 40, 2% Ficoll 400, 2% polyethylene glycol 8000
- Denatured DNA: 10mg/ml herring or salmon sperm DNA, 0.1M NaCl. Sheared and free of protein. (NOTE, substitution with 10mg/ml yeast tRNA is acceptable for Northern's)
- Wash solution one (1): 3X SSC, 2.5% SDS
- Wash solution two (2): 0.5X SSC, 2.5% SDS
- Wash solution three (3): 0.2X SSC, 1% SDS
- Membrane stripping solution: 1mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.2X modified Denhardt's

Colour development to detect DIG and Biotin probes

- Phosphate buffered saline (PBS): 8g/l NaCl, 0.2g/l KH₂PO₄, 1.15g/l Na₂HPO₄, 0.2g/l KCl pH 7.4
- Blocking buffer A: to PBS add skim milk powder to a concentration of 2.6% w/v
- Blocking buffer B: to 9 ml of blocking buffer A add 1ml of slurry from a healthy *animal*. Centrifuge at 3000rpm x 5min to sediment debris
- Washing buffer AP 7.5: 0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.1M NaCl, 2mM MgCl₂, 0.05% v/v Triton X100
- Washing buffer AP 9.5: 0.1M Tris-HCl pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂
- Stop buffer: 10mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA
- Antiserum to reporter: diluted to 1/250 in blocking buffer B
- Alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit gamma-globulin: diluted to appropriate working concentration (1/1000) in PBS + 1% w/v bovine serum albumin (BSA)
- Phosphatase substrate stock solutions: Immediately before use add 44 μ l of NBT and 33 μ l of BCIP to 10ml of AP 9.5.
- NBT = Nitroblue tetrazolium (75mg/ml in 70% dimethylformamide)
- BCIP= Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (50mg/ml in 100% dimethylformamide)

SECTION 3

PROCEDURES

NOTES

Dot blot membrane templates

Use positively charged nylon membranes, nitrocellulose is not recommended

- 2 ALWAYS WEAR GLOVES WHEN HANDLING MEMBRANES. It is essential to keep the membranes clean and free of finger moisture and oils, which inhibit nucleic acid binding

- 3 For large sample numbers a template based on a 100 dot design is used
- 4 A 100 dot blot template is given below
- 5 Copy the template below onto the membrane with a pen (e.g., 045 Reynolds Fine Carbure, made in France), soft pencil or stamp which will not fade out during the hybridization washes. It is advisable to mark out duplicate membranes to prepare replicate membranes
- 6 For each membrane cut out 2 pieces of absorbent paper, which are slightly larger than the membrane (to cover the membrane) and a piece of clean filter paper
- 7 Membrane template for 100 place Dot blot. The first column (-1) is used for a dilution series of the positive standard and for negative controls.

0	1	2	3	4	5
A					

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											
I											
J											

Map and description of samples on dot blot membrane

-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	A										
	B										
	C										
	D										
	E										
	F										
	G										
	H										
	I										
	J										

Preparation of the sample**Loading membranes**

- Isolate a shrimp total nucleic acid (TNA) fraction by a standard procedure or obtain a nucleic acid fraction from purified virus

DNA Dot Blot

1. Wet the membrane in 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5 and soak for 5 min
2. Denature DNA for 5 min at 95°C
3. Immediately transfer the DNA to ice and quick chill
4. Spot 2 to 5 µl of sample onto positive nylon membrane and allowed to air dry
5. Denature the DNA using 0.2 N NaOH for 5 min
6. Cross-linked the samples to the membrane by exposure to UV light (254 nm, 125 mJ total) or by fixation at 80°C x 2h under vacuum. Store membranes dry
7. Soak the membrane in 6X SSC for 1 min. before hybridization

RNA Dot Blot

1. Wet the membrane in SW for 15 min.
2. In a microfuge tube prepare the sample as follows:

Deionized formamide	17.5 µl
37% (w/v) formaldehyde	6.0 µl
5X MOPS, pH.7.0	3.5 µl
RNA	variable
DSW to a final volume of	35 µl
3. Spot 2 to 5 µl of sample onto positive nylon membrane and allowed to air dry
8. Cross-linked the samples to the membrane by exposure to UV light (254nm, 125mJ total) or by fixation at 80°C x 2 h. under vacuum. Store membranes dry
4. Soak in 6X SSC for 1 min. before hybridization

Southern and Northern blot transfer**Preparing the gel**

- Note: Wear gloves during this procedure to stop ethidium bromide getting on fingers and to stop grease transferring from hands onto membranes.
1. The following is based on mini gels (6.5 x 10cm) but is directly applicable to larger gel formats
 2. Remove the prestained gel from the gel tray and observe under UV light to ensure good gel fractionation has occurred and that no sample bands are more than 60mm from the origin.
 3. Photograph the gel
 4. Slice the gel just above the wells and discard this small top piece
 5. Trim the gel to 70 mm from the new top just above the wells
 6. Slice off the bottom right corner for gel orientation

The capillary transfer process

- Completely wet a sponge (size about 3cm thick by 10x15cm) with small pores in clean water

7. Squeeze out all water then soak the sponge in 20mM NaOH solution in a container so that the solution is just below the top of the sponge. Squeeze out all air bubbles
8. Take a piece of thin but firm plastic, which is slightly larger than the sponge, and neatly cut a hole 66 x 70mm for one gel (or 135 x 70mm for two gels) to make the gel template
9. Cut four clean pieces of Whatman filter paper, or equivalent, to 66 x 70 mm (or double size if transferring two gels)
10. Cut a piece of nylon membrane (Zeta Probe™) the same size, then along the bottom edge on one side write the gel number and date and trim off the bottom left corner. The non-written side will be the nucleic acid side after transfer
11. Cut some absorbent paper to a size marginally larger than the filter paper

Note : It is essential not to have any air bubbles trapped between any layers in the capillary transfer setup (except perhaps in the gel wells)

12. Carefully make the gel sandwich for nucleic acid transfer
13. Place a dry plastic gel template in the centre on the sponge, be sure not to wet the top of the template
14. Wet a piece of filter paper in the transfer solution and lay it in the hole of the plastic gel template
15. Repeat with another piece of wet filter paper
16. Place the gel on the filter paper so the cut corner is now on the bottom left side (i.e. the original upper surface of the gel faces down and is in contact with the filter papers)
17. With a pipette gently apply transfer solution under the gel to remove all air bubbles
18. DO NOT PROCEED UNTIL ALL AIR BUBBLES ARE REMOVED
19. Gently lower the membrane into the transfer solution until the membrane is completely wet
20. Lay the wet membrane over the gel so cut corners align and you can read the writing
21. Wet one piece of filter paper and lay over the membrane
22. Repeat with another piece of filter paper
23. Carefully place the absorbent paper on the filter paper to a height of about 8cm
24. Finally place a weight on the absorbent paper to facilitate good contact for capillary movement, but do not unduly squash the sandwich
25. Proceed with the transfer for 4 - 16h when examining low molecular weight samples, or transfer overnight (~16-20h) if examining high molecular weight samples
26. After the transfer period remove all wet papers, remove the membrane and place it on dry paper so the side with writing faces down and the nucleic acid side therefore faces up
27. Covalently attach the nucleic acid to the membrane by exposure to 125mJ of UV light (254nm) or by baking at 80°C for 2h

7. Squeeze out all water then soak the sponge in 20mM NaOH solution in a container so that the solution is just below the top of the sponge. Squeeze out all air bubbles
8. Take a piece of thin but firm plastic, which is slightly larger than the sponge, and neatly cut a hole 66 x 70mm for one gel (or 135 x 70mm for two gels) to make the gel template
9. Cut four clean pieces of Whatman filter paper, or equivalent, to 66 x 70 mm (or double size if transferring two gels)
10. Cut a piece of nylon membrane (Zeta Probe™) the same size, then along the bottom edge on one side write the gel number and date and trim off the bottom left corner. The non-written side will be the nucleic acid side after transfer
11. Cut some absorbent paper to a size marginally larger than the filter paper

Note : It is essential not to have any air bubbles trapped between any layers in the capillary transfer setup (except perhaps in the gel wells)

12. Carefully make the gel sandwich for nucleic acid transfer
13. Place a dry plastic gel template in the centre on the sponge, be sure not to wet the top of the template
14. Wet a piece of filter paper in the transfer solution and lay it in the hole of the plastic gel template
15. Repeat with another piece of wet filter paper
16. Place the gel on the filter paper so the cut corner is now on the bottom left side (i.e. the original upper surface of the gel faces down and is in contact with the filter papers)
17. With a pipette gently apply transfer solution under the gel to remove all air bubbles
18. DO NOT PROCEED UNTIL ALL AIR BUBBLES ARE REMOVED
19. Gently lower the membrane into the transfer solution until the membrane is completely wet
20. Lay the wet membrane over the gel so cut corners align and you can read the writing
21. Wet one piece of filter paper and lay over the membrane
22. Repeat with another piece of filter paper
23. Carefully place the absorbent paper on the filter paper to a height of about 8cm
24. Finally place a weight on the absorbent paper to facilitate good contact for capillary movement, but do not unduly squash the sandwich
25. Proceed with the transfer for 4 - 16h when examining low molecular weight samples, or transfer overnight (~16-20h) if examining high molecular weight samples
26. After the transfer period remove all wet papers, remove the membrane and place it on dry paper so the side with writing faces down and the nucleic acid side therefore faces up
27. Covalently attach the nucleic acid to the membrane by exposure to 125mJ of UV light (254nm) or by baking at 80°C for 2h

28. Air dry the membrane and store dry until use

Southern blot transfer of DNA

- Southern blots are for transfer of gel fractionated DNA onto membranes and Northern blots are for equivalent transfer of RNA. This transfer can be passive by capillary movement or active by electro-elution.
- 1. Cut the membrane to exactly the same size as the gel
- 2. Pre-wet the membrane in SW for a few seconds
- 3. Equilibrate the membrane in 0.4 N NaOH for 10 to 15 min.
- 4. Agitate the gel in 0.25 N HCl for approximately 10 min.
- 5. Denature the DNA by soaking the gel in 0.4 N NaOH for 30 min.
- 6. Set up a capillary blot using 0.4 N NaOH as the transfer solution
- 7. Allow the buffer to flow through the gel and membrane for 3 to 18 h.
- 8. Cross-linked the samples to the membrane by exposure to UV light (254nm, 125mJ total) or by fixation at 80°C x 2 h. under vacuum. Store membranes dry
- 9. After transfer, wash the membrane in 2X SSC for 2 min. and soaked in 6X SSC for 1 min. before hybridization

Northern blot transfer of RNA

- 1. Fractionate the RNA sample in a formaldehyde agarose gel
- 2. Soak the gel in 5 vol. of SW for 5 min. to remove formaldehyde from the gel
- 3. Cut the membrane to the exact size of the gel
- 4. Pre-wet the membrane in SW for a few seconds
- 5. Soak membrane in 10X SSC for 15 min.
- 6. Set up a capillary blot using 10X SSC as the transfer solution
- 7. Allow the buffer to flow through the gel and membrane for 16 to 24 h.
- 8. Cross-linked the samples to the membrane by exposure to UV light (254nm, 125mJ total) or by fixation at 80°C x 2 h. under vacuum. Store membranes dry
- 9. Soak in 6X SSC for 1 min. before hybridization

Hybridization using random-primed probes

DNA labelling by the multiprime labelling technique

- 1. The reaction mixture contained the 1 µg of YHV fragment (clone pMUY416) or 1 µg of WSSV (clone pMUW4.2), 2 µl of hexanucleotide mixture, 2 µl of dNTP labelling mixture (1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0.65 mM of dTTP and 0.35 mM of dig-11-dUTP, pH 7-5), and sterile distilled water (make final volume to 19 µl)
- 2. Denature the mixture by heating at 100°C for 10 min and immediately chilled on ice for 5 min
- 3. Add 1 µl of 2 units/µl large fragment DNA polymerase I and incubated at 37°C for 20 hr.

4. Stop the reaction mixture by adding 2 µl of 500 mM EDTA, pH 8.0
5. Precipitated the labelled DNA with 2.5 µl of mM LiCl and 75 µl of ethanol, then left for 30 min at -70°C
6. Centrifuge the solution at 10,000 rpm for 10 min, wash the pellet with 70% cold ethanol, air-dried and dissolve in 50 µl TE buffer

Hybridization and membrane washing

7. Prehybridize the membrane in PHB (containing 5XSSC, 1% (w/v) blocking reagent, 0.1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, Na-salt, 0.02% (w/v) SDS at volume 20 ml/100 cm² of membrane) at 68°C for 1 hr.
8. Denature the labelled DNA at 100°C for 10 min, quickly cooled in ice for 5 min and added to the prehybridization solution.
9. Incubate the membrane at 68°C with shaking for at least 3 hrs.
10. Wash the membrane twice with 2XSSC, 0.1% (w/v) SDS at room temperature for 5 min and wash twice with 0.1XSSC, 0.1% (w/v) SDS at 68°C for 15 min

Immunological detection

11. Wash the membrane briefly in buffer I (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) for 1 min
12. Block the membrane in buffer II (1% (w/v) blocking reagent in buffer I) for 30 min with shaking
13. Add the diluted antibody-conjugate to alkaline phosphate and incubate at room temperature for 30 min on shaker
14. Wash the membrane twice with buffer I for 15 min with shaking
15. Incubate the membrane in buffer III (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) for 5 min
16. Incubate the membrane in 10 ml of colour solution (45 µl NBT solution and 35 µl X-phosphate solution in buffer III) in the dark
17. Stop the reaction by soaking in distilled water, air dried and photographed

Removing Probes and Colour reagent

Oligonucleotide-probe hybridization

Probe labelling

Incorporation during synthesis – DIG, Biotin, Fluorophores most common

Incorporation after synthesis – as above but not as efficient and economical, 32P

FILL OUT ABOVE

- There is a difference in the stability of nucleic acid duplexes hybridized under the same conditions, such that DNA:DNA < DNA:RNA <<< RNA:RNA. For this reason different equations are used to estimate probe T_m and the annealing temperature for hybridization (T_a).

As a general principle for oligos, for high stringency $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$
and for low stringency $T_a = T_m - 20^\circ\text{C}$

The T_m for oligonucleotide hybridization is based on using the equation;
 $T_m = 2 \times (\text{number A+T nt}) + 4 \times (\text{number G+C nt})$.

Use this equation for oligos of $< \sim 35$ mers.

- In the described hybridization procedure most steps are performed in glass bottles which are incubated in a Hybaid oven. Other oven types are available, or the hybridization can be performed in sealed plastic bags incubated in a water bath. However, the use of bottles is highly recommended for safety, for convenience and for improved hybridization and washing efficiency.

1. Wash the membranes in an excess of prewash buffer for 1 - 4h at 37°C . Many membranes can be washed together
2. During this time put empty hybridization bottles into the oven to warm along with prehybridization solution
3. Remove individual membranes from the prewashed and sandwich between sheets of fine nylon (or similar) mesh. For small hybridization bottles you can load 5 or 6 (12 x 8cm) membranes or equivalent area
4. Roll the sandwich into a rod and place in a warmed bottle
5. Add 10 to 30ml of prewarmed prehybridization buffer depending on the total membrane area
6. Prehybridize the membranes at $60^\circ\text{C} \times 1 - 4\text{h}$ (can be overnight). Check that the bottles are not leaking
7. During this time add 500 μl of prehybridization solution to a microfuge tube and add labelled probe, which will be provided
8. Denature the probe at $85^\circ\text{C} \times 2\text{min}$, then immediately chill on ice
9. Discard the prehybridization solution and keep the bottles warm
10. Add 10 to 20ml of fresh warmed prehyridization solution to the bottle, then quickly add all of the chilled probe solution to the centre of the solution (not down the side of the tube)
11. Swirl to mix, seal the lid securely then incubate for hybridization.
12. For high stringency (HS) hybridization and wash:

Hybridize	$65^\circ\text{C} \times 4 - 16\text{h}$
Rinse in wash solution 1,	$35^\circ\text{C} \times 15\text{min}$
Rinse in wash solution 2,	$35^\circ\text{C} \times 15\text{min}$
Rinse in wash solution 3,	$35^\circ\text{C} \times 15\text{min}$
Rinse in wash solution 3,	$60^\circ\text{C} \times 15\text{min}$

 Retain membranes for colour development to detect the probe

OR

13. For low stringency (LS) hybridization, wash and exposure, followed by an additional high stringency wash:

Hybridize	$65^\circ\text{C} \times 1 - 4\text{h}$
-----------	---

then gradually cool 45°C x 4 - 16h
Rinse in wash solution 1, 35°C x 15min
Rinse in wash solution 2, 35°C x 15min
Seal membranes in a plastic bag
Retain membranes for colour development to detect the probe

14. After the hybridization carefully remove the first used solution and keep in a sealed tube. This probe solution can be used again within about 30 days, but may require the addition of more concentrated probe
15. Remove the membranes from the bottle
16. Membranes can be stored damp at 4°C prior to colour development for detection of bound probe. However, it is recommended to perform the colour development as soon as possible

Removing oligonucleotide probes from membranes

- Note: Membranes containing fixed nucleic acid can be reused several times for hybridization with other probes, provided old probes are removed from the membrane. If membranes are going to be reused they should be kept moist sealed in plastic.
 - This procedure removes the oligo probe, but it does not always remove the developed colour from the previous hybridization analysis.
1. Rinse the membranes twice in distilled water at 25°C. Discard the water in an appropriate radioactivity waste site
 2. Incubate the membranes (many in the same solution if necessary) in a large volume of membrane stripping solution at 75°C for 2h with gentle shaking
 3. Rinse membranes for 5min at c.25°C in 0.1X SSC
 4. Remove the membranes and seal in plastic bags
 5. Keep membranes moist in a sealed plastic bag

5.3.7

Boongsaeng V., Tongchuea W., Kanchanaphum P., Klingputsorn R., Wongteerasupaya C., Sittidilokratana N., Jittiwatana K., Tassanakajon A., and Panyim S. PCR-based detection of shrimp viral disease in Thailand in Molecular Diagnostics for shrimp viruses in the Asian Region (work shop II) March 2000 , L8/1-5

PCR-BASED DETECTION OF SHRIMP VIRAL DISEASES IN THAILAND

Vichai Boonsaeng¹, Wansika Tongchuea², Panan Karnchanaphum¹, Ratchanee Klinputsorn¹, Chainarong Wongteerasupaya³, Nusra Sittidilokratana², Karnyupha Jittiwatana¹, Anchalee Tassanakajon⁴ and Sakol Panyim¹

¹Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, ²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, ³Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirote University, ⁴Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

1 ABSTRACT

Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) culture in Thailand has expanded greatly in the past few years and the country has become the world's leading producer of cultivated shrimp. Although the shrimp aquaculture industry is undergoing rapid development in a number of Asian countries, successful production is increasingly hampered by many factors, including environmental pollution, poor management and disease. Of the infectious diseases, bacterial and viral agents, either as single or mix infections, have caused most of the production losses.

For viral pathogens, the major viruses of concern are white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus (YHV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV). Polymerase chain reaction (PCR) is used for early detection of WSSV, YHV and also HPV. The highly specific and sensitive techniques for detection these viral diseases are already helping shrimp farmers. The aim of this work is development of PCR techniques to study tissue distribution of the viruses in *P. monodon* and to study the transmission of the viruses from carrier species to shrimp.

2 INTRODUCTION

White-spot syndrome virus (WSSV) is a viral disease which affects most of the commercially cultivated marine shrimp species, not just in Asia but globally. It was first reported as an accidental infection in laboratory reared shrimp in early 1994 (Wongteerasupaya et al., 1995a). However, a virus with similar morphology was reported from farmed specimens of *Penaeus japonicus* in Japan (Takahashi et al., 1994; Nakano et al., 1994) and *P. japonicus*, *P. monodon* and *P. penicillatus* in Taiwan (Chen and Kou, 1994). The field signs of the disease were rapid and massive mortality with diseased shrimp showing a general reddish coloration together with white spots of 1-2 mm embedded in the cuticle. Recently WSSV has been shown to be a serious pathogenic virus in Asia (Wongteerasupaya et al., 1996, Lo et al., 1997).

Yellow-head virus (YHV) of the black tiger prawn *P. monodon* was first discovered in Thailand in 1992. Shrimp infected with YHV often show light yellow coloration of the dorsal cephalothorax area and have a pale or bleached appearance (Limsuwan 1991). Morphological examination of shrimp tissue and viral particles as well as molecular analysis of extracted nucleic acid indicated that yellow head disease had a strong association with an RNA virus, rather than a DNA virus (Wongteerasupaya et al. 1995). Two viruses from Australia, which morphologically resemble YHV, have also been reported by Cowley and Walker (personal comm.) as lymphoid organ virus (LOV) and gill-associated virus (GAV). They also indicate that GAV and YHV are closely related but distinct viruses for which differential diagnostic probes can be applied.

Polymerase chain reaction (PCR) is used for early detection of WSSV and YHV outbreaks or for detection of asymptomatic carriers. Nested PCR provides an increased level of sensitive detection when compare to conventional single primer-pair PCR. However, one of the major drawbacks with nested PCR is the risk of introducing contamination. This problem can be circumvented by designing a "one-step nested PCR" where two or three primer pairs with different melting points (T_m) are simultaneously added with all reaction components and the test sample in one tube. The aim being to develop a rapid, simple and highly sensitive detection of WSSV and YHV in *P. monodon*.

3 WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

WSSV of *P. monodon* is currently the cause of very serious and wide-spread losses in the shrimp industry in Thailand, elsewhere in Asia and in the Americas. The original PCR-based method used for WSSV detection amplifies a 232 bp product using a primer set designed from a 4.2 kb WSSV clone generated in Thailand (Wongteerasupaya et al. 1996).

The sensitivity of detection, as assessed by fractionation and staining of PCR products in agarose gels was 100 fg of WSSV DNA in crude postlarvae samples (Fig.1). This could be increased to 1 fg in a Southern hybridization analysis

One-step nested PCR technique for the detection of WSSV in *P. monodon* has been developed. This new nested PCR protocol is performed in a single tube containing one (1)

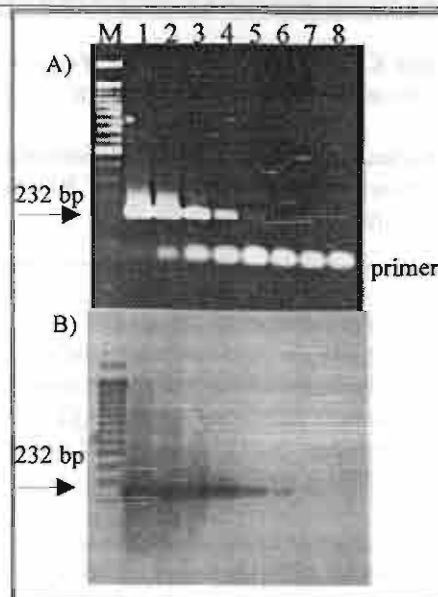


Fig.1 Sensitivity of the PCR assay for the detection of WSSV. A) Ethidium bromide staining of PCR product amplified from serially diluted (1:10, range of 1000 pg to 0.1 fg) WSSV genomic DNA as the template for PCR (lanes 1 to 8). The limit was 100 fg of WSSV DNA in crude postlarvae samples (lane 5). Lane M is 100 bp size marker. B) Southern hybridization with DIG-dUTP labeled WSSV probe increased detection down to 1 fg WSSV (lane 6).

sense primer and three (3) antisense primers designed from the same 4.2 kb WSSV clone as used previously (Wongteerasupaya et al. 1996). The primers produced either 3, 2 or 1 nested PCR products (1,100 bp, 526 bp and 250 bp) depending on the concentration of WSSV in the sample. High levels gave the three PCR products, as shown after fractionation on agarose gel electrophoresis (Fig.2), while a moderate concentration gave 2 products (1,100 and 526 bp)

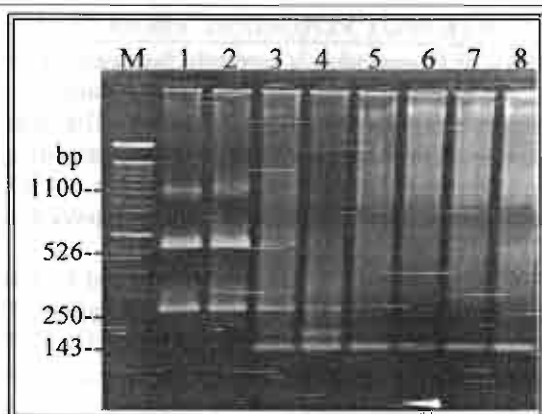


Fig.2 Sensitivity of one-step nested PCR for the detection of WSSV. The PCR products for purified WSSV DNA serially diluted (1:10) in the range 10 pg to 0.001 fg (lanes 1-8 respectively) mixed with crude DNA extraction from post larvae. This technique can detect as little as 1 fg (lane 5) WSSV DNA in crude postlarval samples.

and low concentration produced only the 250 bp fragment. In addition, internal control primers designed for actin gene of *P.monodon* were included to amplify a shrimp characteristic product (143 bp) for both infected and non-infected samples to assure integrity and reproducibility of the PCR assays.

With this system, where the concentration of WSSV target was above about 100 fg the internal control cannot be observed (lanes 1, 2, Fig.2). The nested PCR technique could detect as little as 1 fg WSSV DNA in crude postlarval samples. Furthermore, this nested PCR assay is more convenient than conventional two-step nested PCR assays and it gives additional information for grading the relative concentration of WSSV infections.

In the experimental transmission of WSSV from crabs to the shrimp *P. monodon*, three suspected crab carriers commonly found in shrimp-rearing areas were investigated (*Sesarma sp.*, *Scylla serrata* and *Uca pugilator*). All these crabs could be artificially infected with WSSV by injection and they sustained heavy viral infections as assessed by PCR (data not shown) for up to 45 d without visible signs of disease or mortality. The three crabs species also transferred the white spot disease to *P. monodon* via water while physically separated in aquarium cohabitation tests. Transfer of the virus to the shrimp was monitored using *in situ* hybridization and PCR assay at 12 h intervals after cohabitation began. With *Uca pugilator*, WSSV could be detected in the shrimp cohabitants after 36 h using PCR amplification and after 60 h using *in situ* hybridization. With *S. serrata*, the shrimp were positive for WSSV after 48 h using PCR and after 60 h using *in situ* hybridization. With *Sesarma sp.* they were positive after 48 h using PCR and after 72 h using *in situ* hybridization (Table 1). These laboratory studies demonstrated that crab carriers of WSSV may pose a real threat to cultivated shrimp.

Table 1. Time to first detection of WSSV and time to mortality for *P. monodon* reared with various WSSV infected crab species. Ten shrimp were placed in each aquarium with 3 of each test crab species. Haemolymph from shrimp was sampled and tested every 12 h.

Primary-infected Crab species	Time to first detection of WSSV in shrimp (h)	
	PCR	<i>In situ</i>
<i>Uca pugilator</i>	36	60
<i>Scylla serrata</i>	48	60
<i>Sesarma sp.</i>	48	72

To determine the best tissue source for detection of WSSV between haemolymph and pleopod, experimentally infected *P. monodon* were tested by one-step nested PCR which produced 2 PCR products (526 bp and 250 bp) with pleopod after 1 d of injection and produced 3 fragments after 2 d. With haemolymph, one-step nested PCR showed only 1 fragment (250 bp) after 1 d and 3 fragments after 2 d (Fig. 3). These laboratory studies demonstrated that pleopod was

the better source of WSSV for PCR template for screening of brooder shrimp to detect asymptomatic carriers.

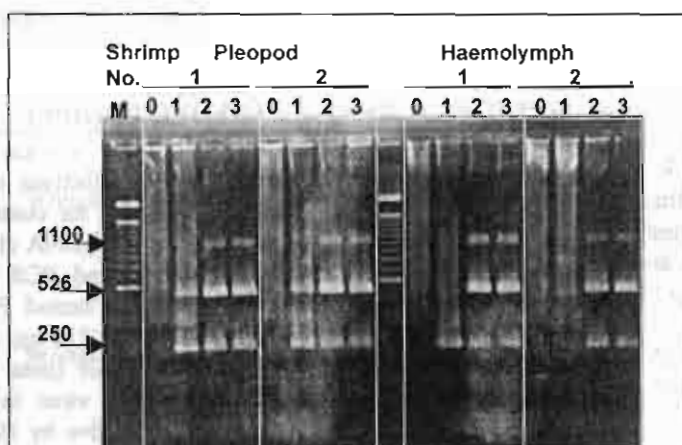


Fig. 3 Ethidium bromide staining of one-step nested PCR products derived from pleopod and haemolymph after 1, 2 and 3 days of WSSV infection. Pleopod samples showed 2 PCR products (526 bp and 250 bp) after 1 day and showed 3 fragments (1,100 bp, 526 bp and 250 bp) after 2 and 3 days. While haemolymph samples showed only 1 fragment (250 bp) after 1 day and 3 bands after 2 and 3 days. Unexpected PCR product or smear bands occurred at 0 day of artificially infection (before injection the virus to the shrimps).

3 YELLOW HEAD VIRUS (YHV)

Yellow head virus (YHV) is an important disease of *P. monodon* that causes serious economic losses in Thailand. Based on the sequence of a YHV cDNA clone (Wongteerasupaya et al 1997), YHV specific primers for one-step RT-PCR were designed for detection of the virus. When applied to purified YHV or nucleic acid samples containing YHV, an expected amplification product of 135 bp was obtained. RT-PCR based detection demonstrated high sensitivity, in that it could detect to about 10 fg of purified YHV-RNA and to about 1 fg in a Southern blot analysis of the RT-PCR samples (Fig.4).

A one-step nested RT-PCR was developed using the same principal as for development of the nested PCR for WSSV. For YHV, positives produced a 188 bp fragment and the 135 bp fragment as the nested PCR product. This technique had greater sensitivity and could detect 0.01 fg of purified YHV-RNA (Fig.5).

In the experimentally infected *P. monodon* with YHV injection, one-step nested RT-PCR demonstrated evidence of 2 fragments (188 bp and 135 bp) RT-PCR products in haemolymph after 6 h of infection, whereas in lymphoid organ, gill, pleopod and eyestalk gave only 1 fragment (135 bp) (Fig. 6). From this result, the most appropriate source for one-step nested RT-PCR template for screening of brooder shrimp to detect asymptomatic carriers was haemolymph. In addition, sample collection from haemolymph does not require sacrificing the shrimp.

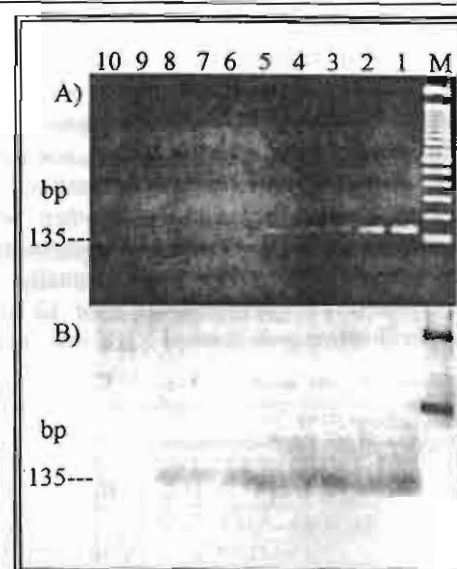


Fig.4 Sensitivity of the RT-PCR for the detection of YHV. A) Ethidium bromide staining of products using serially diluted (1:10, range of 1 ng to 0.01 fg) YHV genomic RNA as the template (lanes 1 to 10 respectively). No product was obtained with 10 ng of healthy shrimp DNA as template (lane 10). Lane M contained a 100 bp marker. B) Southern hybridization analysis DIG-dUTP labeled YHV probe.

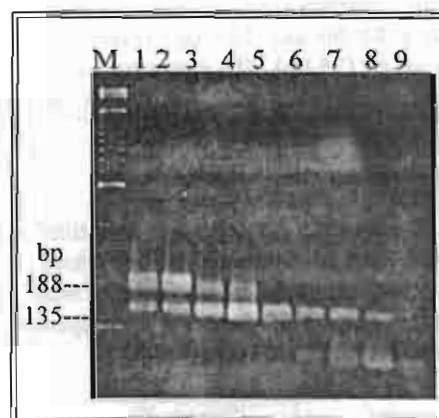


Fig.5 Sensitivity of one-step nested RT-PCR assay for the detection of YHV. One-step nested RT-PCR products (188 bp and 135 bp) were generated using serially diluted (1:10) YHV genomic RNA in the range of 100 pg to 0.001 fg (lanes 1-9 respectively). Lane M contained a 100 bp size marker.

An examination of possible YHV carriers crab species was conducted similar to the tests for WSSV carrier. The suspected carriers crabs; *Sesarma sp.*, *Uca spinata*, *Scylla serrata* and *Portunus pelaginus* could all be artificially infected with YHV by injection. To learn more about that YHV-infected crabs carriers could transfer the virus to the shrimp via water. The transmission were conducted each

with 2 groups. In the first group we cohabitated healthy shrimps with crab carriers by physically separated in aquarium. In the other group, we cohabitated healthy shrimps with healthy crabs. Each crab carrier could transferred the disease to shrimp via water while physically separated in aquarium cohabitation tests. Transfer of YHV to the shrimp was assayed using one-step nested RT-PCR amplification and *in situ* hybridization at 12 h intervals after cohabitation began. By one-step nested RT-PCR, negative results were detected in control group while the shrimp cohabitat with experimentally crab carries demonstrated YHV-transmission after 12 h (Table 2). *In situ* hybridization tests showed YHV was present in shrimp

cohabitat with *Sesarma ap.*, *Uca pugilator*, *Scylla serrata* and *Portunus pelagicus* after 36 h to 48 h (Table 2). Based on these results, it was concluded that crabs carriers can transfer virus to healthy shrimp under experimental condition.

4 HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS (HPV)

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) causes disease in several species of penaeid shrimp. Heavy infections may result in poor growth and reduced production for cultured shrimp farmers. Based on the sequence of HPV DNA clone (Sukhumsirichart et al. 1999), one-step nested PCR for detection of HPV has been developed. The nested PCR produced two or one PCR product (375 bp and 212 bp) and could detect 0.001 fg of purified HPV DNA (data not shown). To study tissue distribution of the virus in *P. monodon*, ten shrimps which were HPV positive by H&E staining of hepatopancreas samples were kept from Samutsakorn province in Thailand and reared in isolated aquariums. The animals were tested by one-step nested PCR using hepatopancreas, eye stalk, pereopod, pleopod, haemolymph and feces. All tissues and feces of the shrimps gave two PCR products (375 bp and 262 bp) (fig. 3). These laboratory studies demonstrated that any tissue of the shrimps could be used for PCR template to detect HPV infection but, the most appropriate source for PCR was feces since sample collection does not require sacrificing the shrimp.

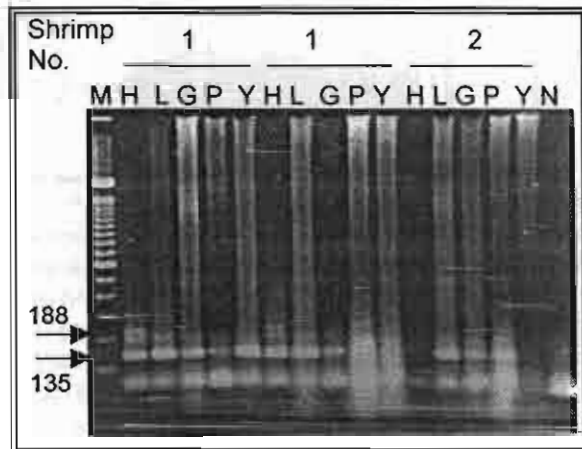


Fig.6 Ethidium bromide staining of nested RT-PCR products derived from H (haemolymph), L (lymphoid organ), G (gill), P (pleopod), Y (eyestalk) after 6 h of YHV infection. Haemolymph samples showed 2 bands of PCR product (188 bp and 135 bp) whereas the others showed only 1 band (135 bp). The smear bands were observed when using crude extracted tissue samples. N, negative control.

Table 2. Time to detect YHV and time to mortality for *Penaeus monodon* reared with various YHV primary-infected crab species. Thirty shrimp were placed in each aquarium with 10 of each test crab species. Haemolymph was sampled and tested every 12 h.

Primary-infected Crab species	Time to first detection of YHV (h)	
	one-step nested RT-PCR	<i>In situ</i>
<i>Sesarma sp.</i>	12	36
<i>U. spinata</i>	12	36
<i>S. serrata</i>	12	36
<i>P. pelagicus</i>	12	48

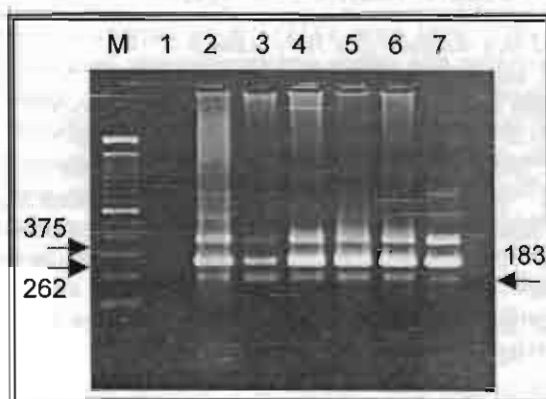


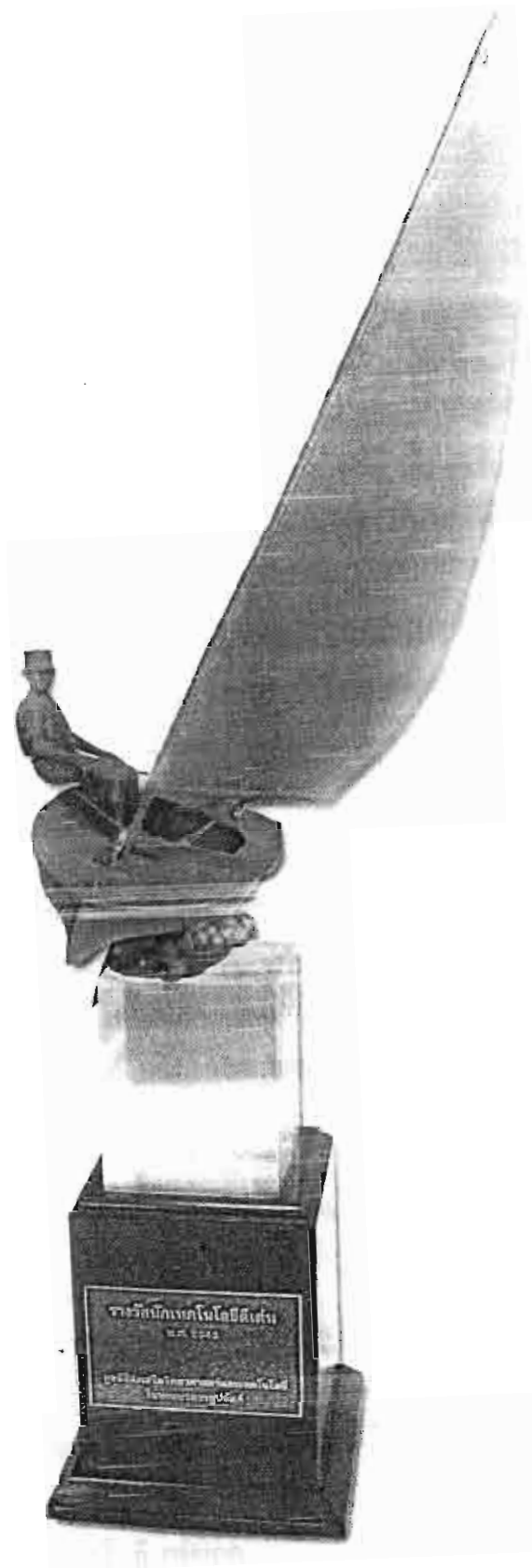
Fig. 3 Ethidium bromide staining of nested PCR products derived from hepatopancreas (lane 2), haemolymph (lane 3), eyestalk (lane 4), pereopod (lane 5), pleopod (lane 6) and feces (lane 7). The all tissues and feces of the shrimp showed 2 bands of PCR products (375 bp and 262 bp) of HPV naturally infection. In addition, when the sample contained much of DNA template, the nonspecific bands occurred. Internal control (183 bp) from host *P. monodon* were observed on the gel.

REFERENCES

- Kanchanaphum, P., Boonsaeng, V., Panyim, S., Wongteerasupaya, C., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, 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.
- Sukhumsirichart, W., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Sriurairatana, S., Withyachumnarnkul, B and Flegel, T.W. (1999). Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. Diseases of Aquatic Organisms. 38, 1-10.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, 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., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Akrajamorn, 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., Withayachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. (1996). DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive *in situ* hybridization with white-spot viral infections 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 amplification. Diseases of Aquatic Organism 31, 181-186.

5.3.8

ศ.ดร. วิชัย บุญแสง, ศ.ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม, ศ.ดร. บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล, ศ.ดร. ทิมโมที เฟลเกล, รศ.ดร. อัญชลี ทัศนากจร, รศ.ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และ ดร.ศิวาวุธ กลิ่นบุหงา ในหนังสือรางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่น ประจำปี 2546 กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรมผลิตกังกลาดำ เรื่อง การใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอในการวินิจฉัยโรคและการพัฒนาสายพันธุ์กังกลาดำ หน้า 1-26



มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์
 Foundation for the Promotion of Science and Technology under the Patronage of His Majesty the King
 รางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่นและรางวัลนักเทคโนโลยีรุ่นใหม่ สนับสนุนโดย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
 มูลนิธิฯ เป็นองค์กรหรือสถานสาธารณกุศล ลำดับที่ 481 ของประกาศกระทรวงการคลังฯ

รางวัลเกียรติยศที่กลุ่มผู้วิจัยได้รับ

ศาสตราจารย์ ดร. วิชัย บุญแสง

1. รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง การสร้างและประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคน จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. รางวัลผลงานการประดิษฐ์คิดค้นประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง ชุดตรวจสอบหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลกึ่งกุลาทองเกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2541 จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดสุราษฎร์ธานี
4. รางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2543 จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. รางวัลวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มุลนิธิโทเร ประเทศไทย ประเภททีมวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2543
6. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโตโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

ศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่นแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2528 จากสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
2. รางวัลผลงานการประดิษฐ์คิดค้นประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง ชุดตรวจสอบหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลผลงานวิจัยเกียรติยศ สกว. ประจำปี พ.ศ. 2542
4. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโตโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

ศาสตราจารย์ ดร. บุญเสริม วิทยชำนาญกุล

1. รางวัลกึ่งกุลาทองเกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2540 จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดสุราษฎร์ธานี
2. รางวัลผลงานการประดิษฐ์คิดค้นประจำปี พ.ศ. 2540 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มุลนิธิโทเร ประเทศไทย ประเภททีมวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2543

ศาสตราจารย์ ดร. ทิมโมที เฟลเกล

1. รางวัลอายโนะโมโตะ ประจำปี พ.ศ. 2540
2. รางวัลกึ่งกุลาทองเกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2542 จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดสุราษฎร์ธานี

3. รางวัลวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มูลนิธิโทร ประเทศไทย ประเภททีมวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2543

รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทศนาขจร

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ ประจำปี 2537 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่ง ประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
2. รางวัลผลงานวิจัยดีเยี่ยม (ผู้ร่วมวิจัย) สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง การสร้างและประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคน จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลทฤษฎี ประเภทนักวิจัยดีเด่น ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปี พ.ศ. 2543 จากมูลนิธิทฤษฎี และสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย
4. รางวัลชมเชยผลงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2544 เรื่อง การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายและการศึกษาพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโตโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

1. รางวัลผลงานวิจัยดีเยี่ยม (ผู้ร่วมวิจัย) สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง การสร้างและประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคน จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. รางวัลการเสนอผลงานวิจัยดีเด่นทุนหลังปริญญาเอก จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี พ.ศ. 2544
3. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโตโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ ประจำปี 2543 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่ง ประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
2. รางวัลชมเชยผลงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2544 เรื่อง การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายและการศึกษาพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

การใช้เทคโนโลยีเอ็นเอในการวินิจฉัยโรค และการพัฒนาสายพันธุ์กึ่งกลาดำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาดำนับว่ามีศักยภาพมากกว่าอุตสาหกรรมทางการเกษตรอื่นๆ ทั้งหมด โดยจะเห็นได้จากช่วงสามทศวรรษที่ผ่านมา อัตราการเจริญเติบโตของการเลี้ยงกึ่งกลาดำในประเทศไทยได้มีการขยายตัวมาโดยตลอด การส่งออกกึ่งกลาดำของประเทศไทยนับเป็นอันดับหนึ่งของโลก คิดเป็นมูลค่ากว่า 110,000 ล้านบาท ในปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2544) และยังก่อให้เกิดการจ้างแรงงานมากกว่า 150,000 คน อย่างไรก็ตามเชื่อว่าอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกลาดำในปีต่างๆที่ผ่านมาจะเป็นไปด้วยความราบรื่น ในช่วงปี พ.ศ. 2536 เป็นต้นมาได้เกิดโรคระบาดของเชื้อไวรัส ซึ่งทำให้กึ่งตายเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเกษตรกรไม่สามารถตั้งตัวรับมือ หรือหาทางป้องกันและแก้ไขได้ทันทั่วทั้งที่ จากการเก็บสถิติพบว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสนี้สามารถเกิดได้ในกึ่งทุกระดับอายุ ถ้าเป็นการติดเชื้อในระดับกึ่งอนุบาลหรือที่เรียกกันติดปากในหมู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งว่า กึ่งพี จะก่อความเสียหายไม่มากนักเนื่องจากใช้วัตถุดิบเช่นอาหาร ในปริมาณที่น้อย แต่หากเป็นการติดเชื้อที่เกิดกับกึ่งที่ใกล้ได้เวลาเก็บแล้วนับว่าเป็นการเสียหายอย่างมาก เพราะเท่ากับว่าเกษตรกรต้องเสียเวลาและวัตถุดิบต่างๆ ในการเลี้ยงกึ่ง ยิ่งในภาวะปัจจุบันพบว่าต่างชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่มีการเลี้ยงกึ่งได้เองอย่างออสเตรเลียหรือประเทศในแถบยุโรป จะจำกัดการนำเข้ากึ่งที่มีการติดเชื้อไวรัส เนื่องจากกลัวว่ากึ่งเหล่านั้นจะเป็นตัวนำเชื้อไวรัสเข้าประเทศ ดังนั้นการศึกษาในระดับยีนของเชื้อจุลชีพเหล่านั้นสามารถนำไปสู่ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอย่างหนึ่งซึ่งเรียกว่าเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งจะขอกล่าวรายละเอียดในลำดับต่อไป

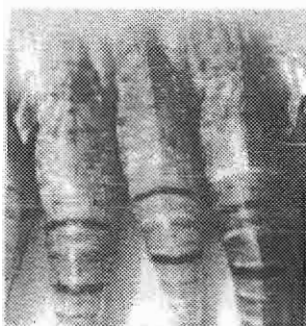
เทคนิคพีซีอาร์เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัส

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบวงจรรวมในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการให้เป็นล้านๆ เท่าภายในระยะเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวในการตรวจสูง โดยเทคนิคพีซีอาร์นี้สามารถใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียในกรณีที่มีไวรัสหรือแบคทีเรียปริมาณน้อยๆ ในขณะที่กึ่งยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งเท่ากับเป็นการเพิ่มทางเลือกให้กับ

เกษตรกรอีกทางหนึ่งในการป้องกันโรคนอกเหนือไปจากการจัดการบ่อที่ดีและถูกต้อง เทคนิคพีซีอาร์ช่วยให้เกษตรกรสามารถคัดเลือกลูกกุ้งหรือพ่อแม่พันธุ์แม่พันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรคไปเพาะเลี้ยงหรือขยายพันธุ์ เพื่อหยุดยั้งปัญหาหรือช่วยในการป้องกันโรคระบาดเหล่านี้ให้เร็วที่สุดได้ก่อนนำลูกกุ้งลงบ่อ หรือก่อนนำพ่อแม่พันธุ์แม่พันธุ์ไปขยายพันธุ์ ทำให้ลดความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งได้มากกว่าการไม่รู้อะไรเลย ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งมีอยู่ด้วยกันหลายตัว เช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัส HPV เป็นต้น

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการแพร่ระบาดไปทั่วภูมิภาคเอเชีย ไม่ว่าจะเป็นอินเดีย อินโดนีเซีย จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น รวมทั้งประเทศในแถบอเมริกาใต้ สำหรับประเทศไทยนั้นโรคนี้ได้แพร่ระบาดอย่างมากในทั่วพื้นที่ชายฝั่งทะเลรอบอ่าวไทย ชายฝั่งทะเลอันดามัน และบางพื้นที่ทางด้านตะวันออกของประเทศ โดยไวรัสชนิดนี้จะทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว ลำตัวของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีสีค่อนข้างแดงและมีดวงขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม. ติดอยู่บริเวณเปลือกหุ้มส่วนหัวของกุ้ง (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นที่มาของชื่อไวรัสตัวแดงดวงขาวนั่นเอง

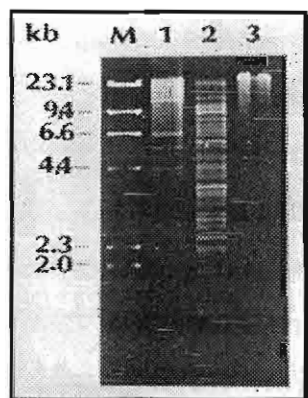


รูปที่ 1 กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาวก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ไวรัสชนิดนี้ทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว โดยมีสารพันธุกรรมเป็น DNA เส้นคู่ (รูปที่ 2)

ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (รูปที่ 3) เพราะเป็นเทคโนโลยีที่บุคลากรในห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถนำไปปฏิบัติได้ง่ายและรวดเร็ว การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว เริ่มจากการศึกษาลำดับเบสของเชื้อไวรัส เพื่อทำ

การออกแบบไพรเมอร์ (ตัวเริ่มต้น) ที่จำเพาะต่อไวรัส เมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 232 คู่เบส (bp) โดยผลการตรวจเชื้อไวรัสสามารถดูได้จากการนำผลผลิตดังกล่าวไปแยกบนแผ่นวุ้นอะกาโรส และย้อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต



รูปที่ 2 ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวแยกโดย

agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ช่องที่ 1 = ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่ถูกตัดด้วย

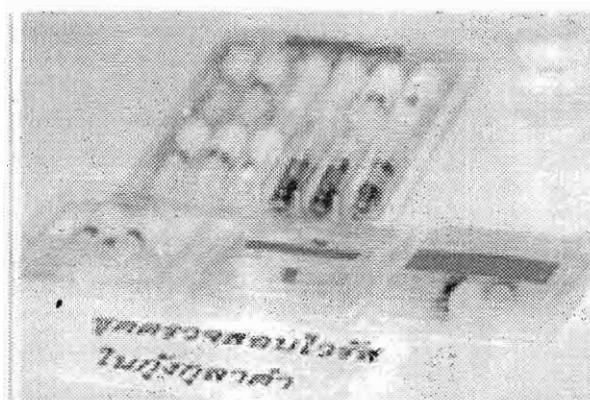
เอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI

ช่องที่ 2 = ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่ถูกตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI

ช่องที่ 3 = ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่ไม่ถูกตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ



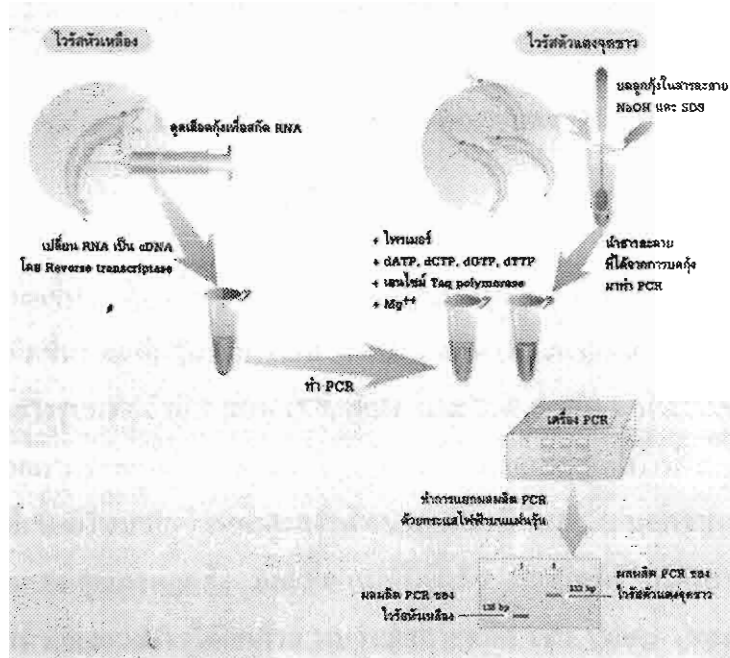
รูปที่ 3 ชุดตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำโดยวิธีพีซีอาร์

จากการศึกษาสารพันธุกรรมของไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ ขั้นตอนการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีพีซีอาร์ (รูปที่ 4) เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง ถ้าเป็นลูกกุ้งจะใช้ลูกกุ้งทั้งตัวจำนวน 10-20 ตัว แต่ถ้าเป็นกุ้งขนาดใหญ่สามารถใช้ขาว่ายน้ำเพียง 1 ขา นำมาบดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) แล้วนำไปต้มในน้ำ

เดือดนาน 5 นาที นำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งสักครู่ แล้วนำสารละลายเฉพาะส่วนโสมมาทำพีซีอาร์ โดยเติมน้ำยาที่มีส่วนผสมของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส และสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยา เช่น คีอ็อกซินิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นต้น ต่อจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยอาศัยการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ ซึ่งการทำงานในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมโดยอุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ

1. ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ถูกแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ที่อุณหภูมิ $90^{\circ}C$
2. ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจับคู่กับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อุณหภูมิ $60^{\circ}C$
3. เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลายด้านหนึ่งของไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ $72^{\circ}C$

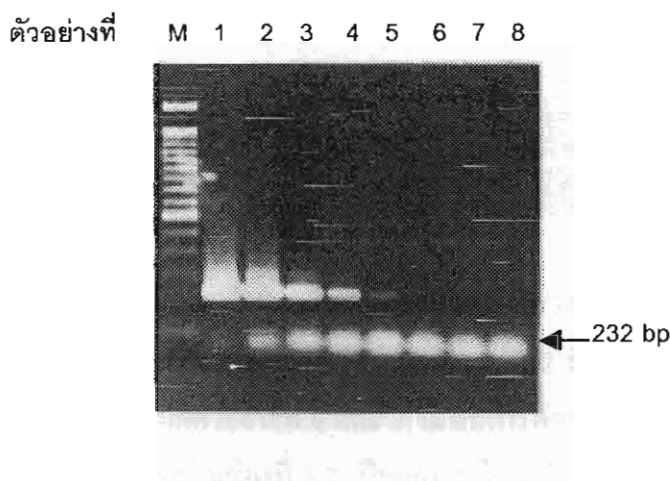
การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนข้างต้นจำนวน 35 รอบ จึงทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ หรือชิ้นส่วน ดีเอ็นเอขนาด 232 คู่เบส เพิ่มขึ้นเป็น 2^{35} โมเลกุล หรือ ประมาณ 3 หมื่นล้านเท่าของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งอธิบายว่าทำไมเทคนิคดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อไวรัสได้ ถึงแม้ว่าจะเป็นเพียงการติดเชื้อในวันแรกๆ ซึ่งมีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่น้อยมากก็ตาม



รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการตรวจโรคไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์

หลังจากปฏิกิริยาถูกไซโพลิเมอเรสเสร็จสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกบน

วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 - 2 % ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 10 โวลต์/ซม. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที จึงนำแผ่นวุ้นมาข้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปบันทึกผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ โดยถ้าวัดอย่างใดให้แถบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 232 คู่เบส แสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 5)

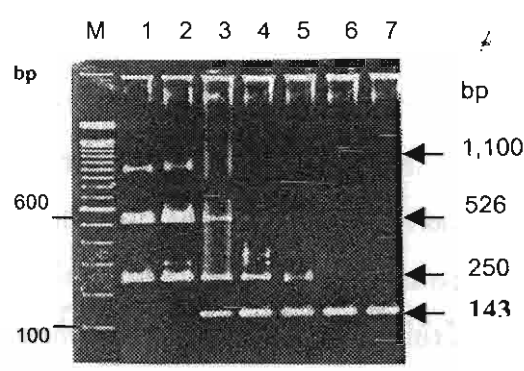


รูปที่ 5 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 232 คู่เบส ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอของไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากภาพแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 แต่ไม่มีการติดเชื้อในตัวอย่างที่ 6, 7, 8 และ M = เครื่องหมายแสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน

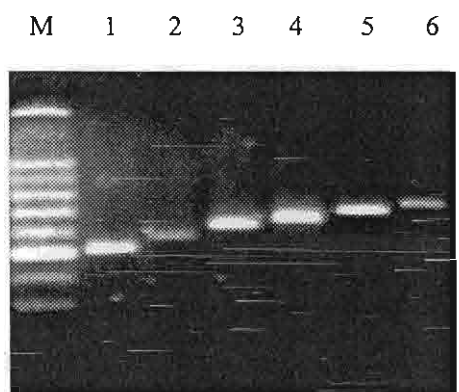
นอกจากนี้การตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ่มกลาคั่วด้วยวิธีพีซีอาร์ยังได้ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ,เพื่อให้สามารถบอกความรุนแรงของการติดเชื้อได้ โดยดูจากจำนวนแถบของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นบนแผ่นวุ้น อะกาโรส ถ้าพบ 3 แถบ (1,100 คู่เบส, 526 คู่เบส และ 250 คู่เบส) แสดงว่ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรง ถ้ามี 2 แถบ (526 คู่เบส และ 250 คู่เบส) แสดงว่ามีการติดเชื้อปานกลาง และถ้ามีการติดเชื้อน้อยมากจะพบแถบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 แถบ (250 คู่เบส) เท่านั้น (รูปที่)

การศึกษายีนโนมของไวรัสและการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์นั้น นอกจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบคุณภาพลูกกุ่ม และพ่อ-แม่พันธุ์แล้ว เทคนิคพีซีอาร์ยังสามารถนำไปใช้ตรวจหาพาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้อีกด้วย พบว่าปูหลายชนิด เช่น ปูแสม ปูทะเล และปูเปี้ยว ที่พบบริเวณฟาร์มเลี้ยงกุ่ม ล้วนแล้วแต่เป็นพาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้งสิ้น ความรู้ที่ได้นี้จึงเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ่มที่ต้องทำการกำจัดปูเหล่านี้ออกจากบ่อเลี้ยงก่อนนำลูกกุ่มลงบ่อ



รูปที่ 6 การตรวจความรุนแรงในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยสังเกตจากจำนวนแถบของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น จากภาพแสดงว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 มีการติดเชื้อไวรัสมากกว่าตัวอย่างที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แต่ตัวอย่างที่ 6 และ 7 ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเลย (แถบดีเอ็นเอขนาด 143 คู่เบสที่เห็นในช่องที่ 3-7 เป็นแถบดีเอ็นเอที่จะพบเมื่อติดเชื้อของไวรัสมีปริมาณน้อยหรือไม่มีเลย)

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังประสบความสำเร็จในการศึกษาความแปรผันของยีนในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวในส่วน ORF94 (GenBankAF369029) พบเบสซ้ำ(Variable number of tandem repeats) โดยพบเบสที่เป็นแกน(core) 54เบส(รูปที่ 7) ซึ่งคาดว่าจะยังประโยชน์ในเชิงระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสนี้

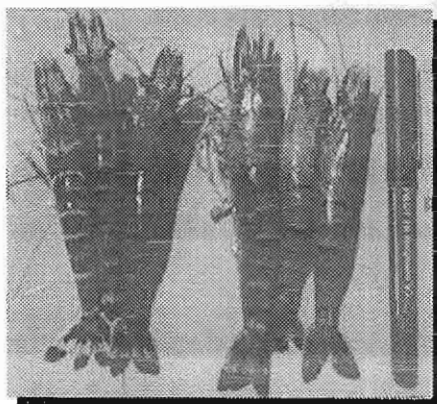


รูปที่ 7 การตรวจสอบความแปรผันของยีนในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว
ช่อง 1-6 = ความแตกต่างของดีเอ็นเอ ORF94 ในส่วนของในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่เตรียมจากที่ต่างๆ โดยมีจำนวนเบสซ้ำ 6-11 ครั้งตามลำดับ

ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus ; YHV)

โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำเป็นโรคร้ายแรงและเกิดการระบาดอย่างมากเช่นเดียวกับโรคตัวแดงจุดขาว โรคนี้เกิดขึ้นในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อกลางปี พ.ศ. 2534 ที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในแถบจังหวัดสมุทรสาครและสมุทรสงคราม ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก และได้มีระบาดอย่างรุนแรงอีกครั้งเมื่อปลายปี พ.ศ. 2540 จนกระทั่งบางพื้นที่ เช่น สมุทรสาครและสมุทรสงคราม ไม่สามารถทำการเลี้ยงกุ้งได้อีกต่อไป ต่อมาโรคนี้ยังได้ระบาดสร้างความเสียหายต่อไปยังจังหวัดในภาคตะวันออกอีกด้วย เช่น ฉะเชิงเทรา จันทบุรี และจังหวัดทางภาคใต้ เช่น นครศรีธรรมราช

กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองนั้นจะสังเกตได้ว่าหัวของกุ้งจะมีสีเหลืองอ่อนแตกต่างจากกุ้งปกติอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งบางครั้งเหงือกจะกลายเป็นสีเหลืองด้วย(รูปที่ 8) กุ้งจะกินอาหารน้อยลงจนกระทั่งตายภายในเวลาเพียง 2-3 วัน ฟาร์มที่ประสบกับโรคนี้จะเห็นได้ในวันแรกว่า กุ้งจะว่ายอยู่ที่ผิวน้ำและมีการตายให้เห็นบางเป็นประปราย แต่ต่อมาจำนวนกุ้งที่ตายจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด จนกระทั่งตายหมดบ่อในวันต่อมา

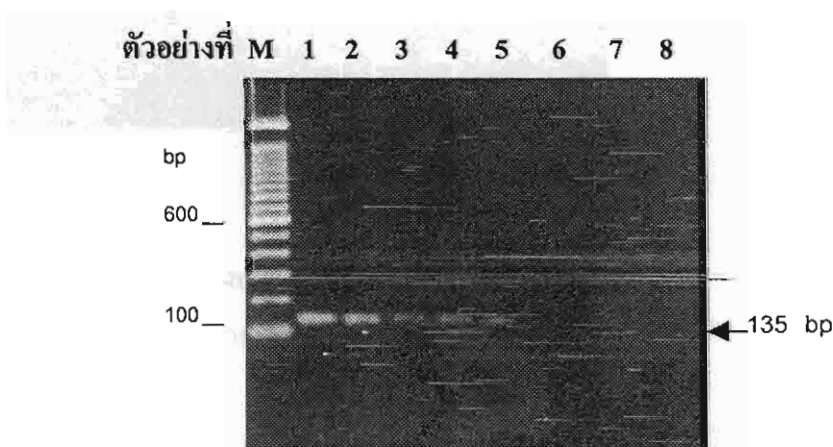


รูปที่ 8 ลักษณะกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะพบหัวหรือในบางครั้งอาจบริเวณเหงือกของกุ้งมีสีเหลืองอ่อนแตกต่างจากกุ้งปกติอย่างเห็นได้ชัด

ไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างเป็นแท่งขนาด 160–186x38–50 nm. ในระยะแรกมีรายงานว่า

ไวรัสหัวเหลืองมีสารพันธุกรรมเป็น DNA แต่หลังจากการวิจัยอย่างละเอียดจากคณะผู้วิจัยในกลุ่มได้พบว่าสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็น RNA

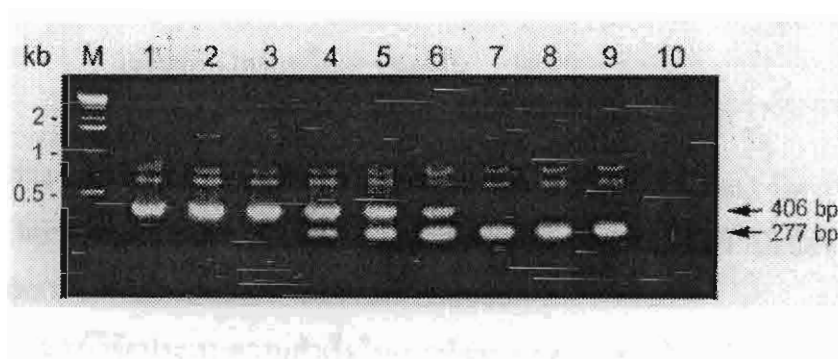
จากการศึกษาในระดับยีนของไวรัสหัวเหลือง พบว่ามีสารพันธุกรรมเป็น RNA ดังนั้นวิธีการตรวจไวรัสหัวเหลืองจะแตกต่างจากการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวเล็กน้อย กล่าวคือ จะต้องเพิ่มขั้นตอนการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เสียก่อนแล้วจึงจะทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามปกติ วิธีนี้เรียกว่าวิธี RT-PCR (Reverse transcription-PCR) การพัฒนาเทคนิค RT-PCR ในการตรวจไวรัส เริ่มจากการศึกษาลำดับเบสของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ (ตัวเริ่มต้น) ที่จำเพาะต่อไวรัส โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับไวรัสหัวเหลืองจะให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 135 คู่เบส (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลผลิต RT-PCR ขนาด 135 คู่เบส จาก RNA ของไวรัสหัวเหลือง จากภาพแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 แต่ไม่มีการติดเชื้อในตัวอย่างที่ 6, 7 และ 8

กระบวนการตรวจไวรัสหัวเหลืองโดยเทคนิค RT-PCR เริ่มจากการสกัด RNA จากตัวอย่างเลือด (haemolymph) หรือเหงือกกุ้งด้วยสารละลาย Trizol นำ RNA ที่สกัดได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงทำการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 135 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 40 รอบ โดยอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนจะเหมือนกับการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่มีความแตกต่างของอุณหภูมิของการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวในขั้นตอนที่ 2 โดยของไวรัสหัวเหลืองจะเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 52 °C แทน

นอกจากไวรัสหัวเหลืองแล้วยังมีรายงานการพบไวรัสอีกชนิดหนึ่งในประเทศออสเตรเลียที่มีลักษณะคล้ายไวรัสหัวเหลืองมากชื่อ GAV (gill-associated virus) ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำในประเทศออสเตรเลีย แต่กุ้งที่ติดเชื้อ GAV จะมีความรุนแรงของโรคน้อยกว่า และเมื่อทำการศึกษาลงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาก คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการตรวจแยกเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดโดยวิธี Multiplex RT-PCR (รูปที่ 10)



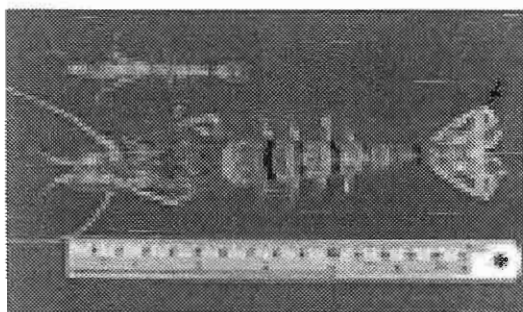
รูปที่ 10 Multiplex RT-PCR ระหว่างเชื้อไวรัสหัวเหลือง(YHV)และไวรัสGAV

ผลผลิตPCRขนาด 277bp จำเพาะกับYHV และผลผลิตPCRขนาด 406 bpจำเพาะต่อGAV

นอกจากไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลืองแล้ว ยังมีเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ อีก ที่แม้ว่าอาจจะไม่ก่อให้เกิดการตายอย่างรุนแรง แต่ก็ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งได้เช่นกัน การศึกษาเอนิโมของไวรัสเหล่านี้จึงมีความจำเป็นเช่นเดียวกับการศึกษาเอนิโมของไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง,

ไวรัส HPV (Hepatopancreatic Parvo Virus)

เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA จากการศึกษพบว่าไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดโรคในกุ้งหลายชนิด และมีการติดต่อผ่านจากแม่กุ้งเข้าสู่ลูกกุ้งโดยเชื้อไวรัสสามารถผ่านเข้าไปในไข่กุ้ง ซึ่งถือว่าเป็นการติดต่อโรคในแนวตั้ง (vertical transmission) เชื้อไวรัส HPV จะทำให้กุ้งอ่อนแอ เนื่องจากตับซึ่งทำหน้าที่สร้างน้ำย่อย และดูดซึมอาหาร ทำงานไม่เต็มที่ ส่งผลให้ตับจะมีสีค่อนข้างซีดและขนาดเล็กลง การติดเชืไวรัสชนิดนี้อย่างรุนแรงอาจมีผลทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือแคะแกรน (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ลักษณะกึ่งติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อย่างรุนแรงจะมีผลทำให้กึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือแคระแกร็น

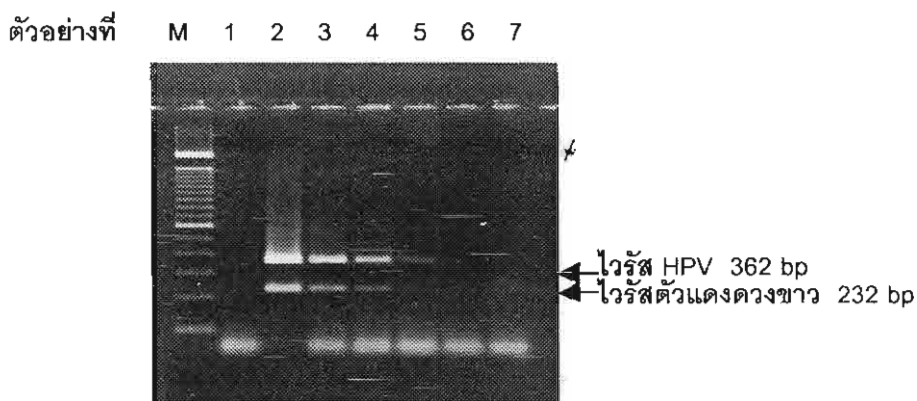
ไวรัส HPV มีรูปร่าง icosahedral เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กมาก (ประมาณ 24 nm.) มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ขนาด 6 kb HPV ติดเชื้อเฉพาะบริเวณต้นของกึ่งกุลาดำ การวินิจฉัยจากลักษณะพยาธิสภาพทำได้ยากเพราะไม่พบลักษณะเฉพาะตัวของการติดเชื้อ

คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส (รูปที่ 12) นอกจากนี้ยังได้พัฒนาให้มีการตรวจเชื้อไวรัส HPV และไวรัสตัวแดงดวงขาวได้พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยเรียกวิธีนี้ว่า เทคนิค multiplex PCR (รูปที่ 13) ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายด้วย

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



รูปที่ 12 ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากการขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 156 คู่เบสจากภาพแสดงการติดเชื้อ HPV ในตัวอย่างที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7



รูปที่ 13 Multiplex PCR สำหรับการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัส HPV พร้อมกัน ถ้าพบผลผลิตพีซีอาร์บนแผ่นวุ้นทั้งสองแถบ (ตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4) แสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัส HPV ถ้าพบเพียง 1 แถบ ขนาด 362 คู่เบส (ตัวอย่างที่ 5) แสดงว่าติดเชื้อไวรัส HPV

ไวรัส MBV (Monodon Baculovirus)

ไวรัส MBV ถูกพบครั้งแรกในประเทศไต้หวันเมื่อ พ.ศ. 2533 และปัจจุบันพบไวรัสชนิดนี้ได้ทั่วไปในฟาร์มกุ้งของประเทศไทย ไวรัส MBV ไม่ทำให้กุ้งตายอย่างเฉียบพลันเหมือนกับไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง แต่มีรายงานว่ากุ้งมีอัตราการกินอาหาร และการเจริญเติบโตลดลงเช่นเดียวกับไวรัส HPV กุ้งที่ติดเชื้อจะพบไวรัส MBV จำนวนมากที่บริเวณตับ ไวรัสนี้มีการติดต่อในลักษณะของการติดต่อโรคโดยการปนเปื้อน โดยเชื้อไวรัสจะปนเปื้อนมากับขี้ของแม่กุ้ง และติดต่อไปยังลูกกุ้งอีกต่อหนึ่ง

จากการศึกษาอีโนมของไวรัส MBV พบว่ามีสารพันธุกรรมเป็น DNA ในตระกูล baculovirus ปัจจุบันกลุ่มนักวิจัยชาวออสเตรเลีย ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ MBV ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อตรวจลูกกุ้งก่อนนำไปเลี้ยงในบ่อ

ไวรัส IHNV (Infectious Hypodermal and Hepatopoietic Necrosis Virus)

โรคเจริญเติบโตช้าในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* และ *Penaeus stylirostris* ที่เลี้ยงกันในแถบอเมริกากลาง เช่น ประเทศเอกวาดอร์ ถูกพบว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดหนึ่ง ชื่อว่า Infectious Hypodermal and Hepatopoietic Necrosis Virus หรือ IHNV ไวรัสจะทำให้เกิดการทำลายของ

เซลล์ผิวหนัง เซลล์เม็ดเลือด และทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ที่เรียกว่า runt-deformity syndrome จากการศึกษาในระดับยีนของกลุ่มนักวิจัยชาวอเมริกันพบว่า เชื้อไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ซึ่งผลของการวิจัยทำให้มีการพัฒนาได้เป็นชุดตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคพีซีอาร์เช่นเดียวกับไวรัสชนิดอื่นๆ

Taura syndrome virus (TSV)

ไวรัสนี้ถูกพบครั้งแรกในแถบอเมริกาในปี พ.ศ. 2535 จากการศึกษาอีโนมของไวรัสชนิดนี้พบว่ามีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว ในตระกูล Picornaviridae ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* โดยหางของกุ้งที่ติดเชื้อในระยะเนียบปล้นจะมีสีแดง ที่เกิดจากการตายของ epithelial tissue แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อในแบบเรื้อรังจะพบรอยโรคสีดำบริเวณเปลือกกุ้ง ปัจจุบันได้มีผู้ที่ได้พัฒนาการตรวจไวรัสชนิดนี้ด้วยวิธี RT-PCR โดยผลผลิต RT-PCR ที่ได้จะมีขนาด 231 เบส

ในปัจจุบันวิธีพีซีอาร์ ได้รับความนิยมจากเกษตรกรและผู้ประกอบการโรงเพาะฟักกุ้งอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ และลูกกุ้งกุลาดำที่ปลอดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และพาราสิตมาเพาะเลี้ยง จากตัวอย่างการศึกษาในภาคสนามจำนวน 43 บ่อดิน พบว่าถ้านำลูกกุ้งที่มีผลพีซีอาร์เป็นบวกไปเลี้ยง กุ้งจะป่วยเป็นโรคตัวแดงดวงขาวตายจำนวน 41 บ่อ จาก 43 บ่อ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งมีอายุโดยเฉลี่ย 39 วัน และมีเพียง 2 บ่อจาก 43 บ่อเท่านั้นที่เลี้ยงได้เกิน 100 วัน แต่ก็ยังเป็นโรคตัวแดงดวงขาวตายในที่สุด ในทางกลับกันพบว่าหากผลการตรวจ พีซีอาร์เป็นลบ ซึ่งอาจหมายความว่าตรวจไม่พบเชื้อไวรัส เมื่อนำไปเลี้ยงในบ่อดิน พบว่าส่วนใหญ่สามารถเลี้ยงต่อไปจนถึงเวลาจับขายได้ซึ่งประมาณ 3-4 เดือน จากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นข้อพิสูจน์อย่างดีว่า การใช้ประโยชน์จากการศึกษาอีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ สามารถนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคที่มีคุณประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งได้อย่างมหาศาล

การพัฒนาวัคซีน

นับจนถึงขณะนี้ไวรัส 2 ชนิดที่มีบทบาทในการสร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยได้แก่ ไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสหัวเหลือง สำหรับไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นมีการศึกษาหลายกลุ่มด้วยกัน ซึ่งรวมทั้งนักวิจัยจากประเทศไทยด้วย โดยการศึกษาได้มุ่งเน้นไปสู่หน่วยย่อยที่สุดของไวรัสซึ่งนั่นคือ นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่มีการเรียงตัวต่อกันได้เป็นยีน ยีนจะทำหน้าที่กำหนดลักษณะพันธุกรรมของไวรัส และสามารถทำให้ไวรัสนั้น

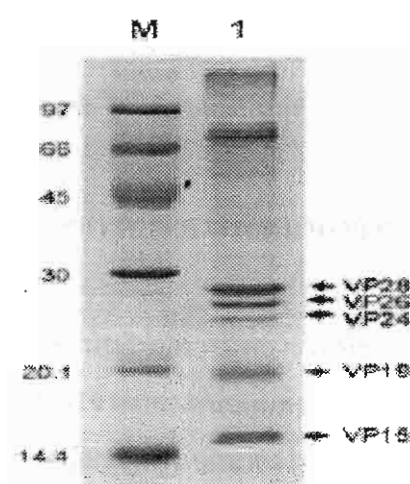
เป็นสายพันธุ์ก่อโรคที่มีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน การศึกษานี้จะนำไปสู่ความรู้และเข้าใจว่ายีนใดทำหน้าที่ผลิตโปรตีนอะไร และโปรตีนเหล่านั้นมีกระบวนการ หรือความสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้กุ้งเป็นโรคได้อย่างไร จากนั้นเมื่อทราบถึงกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพในกุ้งแล้ว เราจึงสามารถหาวิธีการป้องกันการเกิดโรคในกุ้งได้

จากการรวบรวมผลงานวิจัยในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวมีขนาดของจีโนมที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 292 – 300 กิโลเบส ส่วนไวรัสหัวเหลืองประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 26 กิโลเบส ทำให้ไวรัสหัวเหลืองมีขนาดเล็กกว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวถึงประมาณ 12 เท่าตัว ความรุนแรงของการก่อโรคในกุ้งไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม หากแต่ขึ้นอยู่กับเวลาที่ไวรัสเข้าไปมีบทบาทอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง นอกจากนี้ไวรัสหัวเหลืองแล้วยังมีรายงานการพบไวรัสอีกชนิดหนึ่งในประเทศออสเตรเลียที่มีลักษณะคล้ายไวรัสหัวเหลืองมากชื่อ GAV (gill-associated virus) ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำในประเทศออสเตรเลีย แต่กุ้งที่ติดเชื้อ GAV จะมีความรุนแรงของโรคน้อยกว่า และเมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาก จึงเป็นที่น่าสนใจมากกว่า เหตุใดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส GAV จึงมีอัตราการรอดที่มากกว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพราะฉะนั้นการศึกษาในรายละเอียดถึงระดับยีน และโปรตีนจากไวรัส อาจทำให้เราเกิดแนวความคิดในการยับยั้งการก่อโรคจากไวรัสหัวเหลืองได้

ไวรัสตัวแดงดวงขาว ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลักจำนวน 5 ชนิด และโปรตีนที่ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ได้อีกจำนวนหนึ่ง โดยโปรตีนโครงสร้างหลัก 5 ชนิดมีชื่อเรียกตามขนาดของโปรตีนเมื่อนำมาแยกบนแผ่นวุ้น (รูปที่ 14) ว่า VP28, VP26, VP24, VP19 และ VP15 เช่น VP28 หมายถึงโปรตีนจากไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 28 กิโลดาลตัน เป็นต้น จากการศึกษาอย่างต่อเนื่อง พบว่าโปรตีน VP28 และ VP19 เป็นโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเปลือกหุ้มไวรัส (envelope) ส่วนโปรตีน VP26, VP24 และ VP15 เป็นโปรตีนในส่วน nucleocapsid การศึกษาในลำดับต่อมาประกอบกับข้อมูลที่มีอยู่แล้วทำให้เชื่อว่าโปรตีน VP28 และ VP19 อาจจะหน้าที่ในการช่วยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ในตัวกุ้งและสามารถเข้าสู่ตัวกุ้งจนทำให้กุ้งป่วยและตายในที่สุด รวมทั้งอาจจะมียาหรือสารที่เกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำได้อีกด้วย

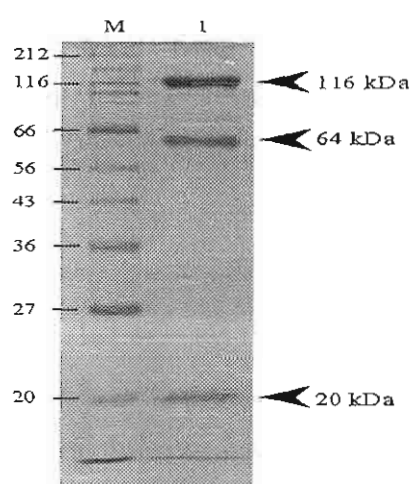
ผลการวิจัยโปรตีนต่างๆ ของไวรัสหัวเหลืองพบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง และโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเกิด replication และ transcription โปรตีนโครงสร้างมีจำนวน 3 ชนิด เรียกชื่อตามขนาดของโปรตีนบนแผ่นวุ้น(รูปที่ 15) เช่นเดียวกับไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ gp116, gp 64 และ p22 โดยที่โปรตีน gp116 และ gp64 เป็นโปรตีนที่มีการเติมหมู่น้ำตาล (glycoprotein) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่ในส่วนของเปลือกหุ้มไวรัส (envelope) ซึ่งเชื่อกันว่าโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้จะมียาหรือสารที่สำคัญในการช่วยให้ไวรัสเข้าสู่ตัวกุ้ง และในขณะเดียวกันโปรตีนนี้อาจมี

ส่วนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งได้ สำหรับโปรตีน p22 ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดแต่คาดว่า อาจจะไม่มีส่วนในการเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้ง การศึกษาวิจัยไวรัสหัวเหลืองโดยกลุ่มนักวิจัยไทยในขณะนี้ได้ทำการตัดต่อยีนที่ผลิตโปรตีนโครงสร้าง gp116 และ gp 64 โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อให้แบคทีเรียทำการผลิตโปรตีนขนาด 116 และ 64 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ข้อเสียที่เกิดจากการผลิตโปรตีนโดยใช้เซลล์แบคทีเรียคือจะได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากการผลิตโปรตีนตามธรรมชาติในเซลล์กุ้ง อย่างไรก็ตามก็ได้มีรายงานเกี่ยวกับการนำโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรียไปใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา Trout ผลการทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ฉีดเข้าไป และสามารถป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสได้ กลุ่มนักวิจัยไทยจึงเกิดแนวความคิดที่จะผลิตโปรตีน gp116 และ gp64ให้ได้ปริมาณมากและนำไปผสมกับอาหารกุ้ง หรืออาจให้ในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง เมื่อกุ้งได้รับการกระตุ้นแล้ว โปรตีนดังกล่าวอาจช่วยเหนี่ยวนำให้กุ้งมีการสร้างสารบางอย่างขึ้นมาต่อต้านเมื่อเกิดการรุกรานของไวรัสหัวเหลืองได้ หรือสามารถอธิบายเปรียบเทียบกับกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในคนขึ้นมาโดยการฉีดแอนติเจนซึ่งเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งของไวรัสนั้นเช่นเดียวกันนอกเหนือจากการศึกษาถึงคุณสมบัติและลักษณะของเชื้อไวรัสที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว การศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของกุ้งก็มีส่วนช่วยในการพัฒนาเพื่อหากุ้งกุลาดำสายพันธุ์ที่มีความสามารถต้านทานโรค รวมถึงมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกุลาดำและไวรัสชนิดต่างๆ เพื่อหาแนวทางป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง



รูปที่ 14 โปรตีนโครงสร้างของ WSSV

5 ชนิด ขนาด 28, 26, 24, 19 และ 15 Kd



รูปที่ 15 โปรตีนโครงสร้างของเชื้อ YHV

3 ชนิด ขนาด 116, 64 และ 20 Kd

การผลิตและการพัฒนาสายพันธุ์กึ่งกุลาคำในประเทศไทย

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและพัฒนาการตรวจสอบสายพันธุ์กึ่งกุลาคำเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่โตไว ปลอดภัยและต้านทานโรค และให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปขยายจำนวนพ่อแม่พันธุ์กึ่งกุลาคำ เพื่อบำบัดให้แก่โรงเพาะฟักทั่วประเทศไทย ในราคาที่เป็นธรรม ซึ่งขณะนี้แม่พันธุ์กึ่งกุลาคำมีราคาถึงตัวละ 5,000-10,000 บาท สำหรับพ่อพันธุ์ราคาตัวละประมาณ 300-500 บาท

โครงการนี้ได้รับริเริ่มและพัฒนาขึ้นโดยหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกึ่งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเริ่มจากการสร้างสายพันธุ์จากสายพันธุ์กึ่งกุลาคำที่มีอยู่แล้ว และทำการเพิ่มฐานของจำนวนสายพันธุ์ขึ้นมาให้ได้ 50 สายพันธุ์ ในแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีความแตกต่างกันในลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งสามารถทดสอบได้ด้วยการตรวจดีเอ็นเอ มีการทดลองผสมข้ามสายพันธุ์และเลี้ยงลูกกึ่งที่ออกมาว่าจะมีลักษณะตามที่ต้องการหรือไม่ กล่าวคือเป็นการทำ Selective Breeding Program โดยอาศัยครอบครัวเป็นหลัก ลูกกึ่งที่ได้นี้จะจำหน่ายให้แก่เกษตรกรเพื่อนำไปเลี้ยง โดยหวังผลว่าจะได้ข้อมูลในด้านการเจริญเติบโตและการต้านทานโรคกลับคืนมา ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นไปตามความเป็นจริงในการเพาะเลี้ยงในระดับเกษตรกร นอกจากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมแล้ว ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อสนับสนุนให้การเพาะพันธุ์เป็นไปอย่างรวดเร็ว ได้แก่การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กึ่งกุลาคำโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย การศึกษาด้านการติดเชื้อและการป้องกันโรคที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่พันธุ์ไปสู่ลูกกึ่ง การศึกษาเรื่องสภาพแวดล้อมในบ่อพ่อแม่พันธุ์ที่จะทำให้ผลผลิตมากขึ้น การศึกษาด้านฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ และสุดท้ายคือการศึกษาด้านอาหารพ่อแม่พันธุ์กึ่งกุลาคำ การศึกษาทั้งหมดนี้จะดำเนินการไปพร้อมๆ กัน เพื่อให้ได้พ่อแม่พันธุ์กึ่งกุลาคำที่ดีที่สุดและมีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการ

การใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอในการพัฒนาสายพันธุ์กึ่งกุลาคำ

ปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะผลิตพ่อแม่พันธุ์จากกึ่งในบ่อเลี้ยงแทนการจับจากธรรมชาติ เพื่อลดปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ และได้สายพันธุ์ที่มีการปรับตัวในสภาพบ่อเลี้ยงได้ดี ซึ่งโครงการผลิตพ่อแม่พันธุ์กึ่งกุลาคำนอกจากจะต้องการเพิ่มปริมาณพ่อแม่พันธุ์ให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงแล้วยังต้องคำนึงถึงคุณภาพของพ่อแม่พันธุ์ซึ่งจะส่งผลต่อความสำเร็จของการเลี้ยงกึ่ง โดยโครงการเริ่มจากการสร้างสายพันธุ์ใหม่จากสายพันธุ์เดิมที่มีอยู่แล้ว และมีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อให้ได้กึ่งคุณภาพดีที่มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง เช่น มีความต้านทานต่อโรคและมีอัตราการ

เจริญเติบโตสูง ซึ่งในโครงการจะทำการเพิ่มฐานของสายพันธุ์ขึ้นมาให้ได้ 50 สายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีความแตกต่างในลักษณะทางพันธุกรรม ที่สามารถทดสอบได้ด้วยการตรวจดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีการคัดพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง และไม่ขึ้นกับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การตรวจดีเอ็นเอยังช่วยประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่มีอยู่ และช่วยกำหนดการผสมพันธุ์ให้เหมาะสมเพื่อให้ได้พ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพ

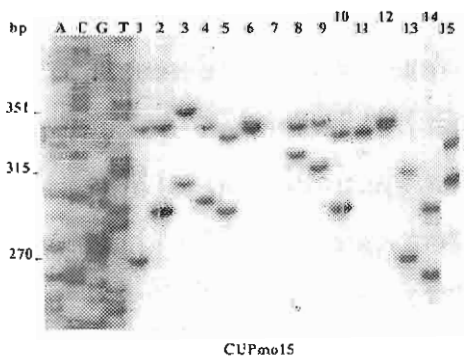
ในงานวิจัยได้พัฒนาการตรวจดีเอ็นเอของกุ้ง จากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลต์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี แม้ในสปีชีส์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับต่ำก็สามารถแยกได้ ไมโครแซเทลไลต์เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นช่วงสั้นๆ โดยหน่วยซ้ำส่วนใหญ่เล็กกว่า 6 คู่เบส เช่น (GT) n , (CAT) n , (GATA) n เมื่อ n คือจำนวนซ้ำ ไมโครแซเทลไลต์มีความหลากหลายสูง เนื่องมาจากจำนวน n ที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่ง เรียกว่ามีหลายรูปแบบหรือหลายอัลลีล (allele) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้พบกระจายอยู่ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต จึงสามารถเลือกใช้ตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมได้หลายตำแหน่ง ทำให้การตรวจมีความละเอียดและถูกต้องมากขึ้น และเป็นเครื่องหมายที่ถ่ายทอดจากพ่อ-แม่ไปสู่ลูกได้

การตรวจความแตกต่างของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ตำแหน่งต่างๆ ทำได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณไมโครแซเทลไลต์ ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสขนานข้าง (flanking regions) ของไมโครแซเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาแยกความแตกต่างของขนาดด้วยอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส วิธีการตรวจจึงทำได้ง่ายและรวดเร็ว และใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยจากส่วนปลายของขาว่ายน้ำหรือจากเลือด (hemolymph) ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งที่นำมาตรวจ และไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอคุณภาพดีเนื่องจากดีเอ็นเอบริเวณที่ตรวจความแตกต่างมักเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ ไม่เกิน 200-300 นิวคลีโอไทด์ ผลการวิจัยสามารถแยกเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ได้ถึง 234 ตำแหน่งในกุ้งกุลาดำ และได้พัฒนาไปใช้ในการตรวจพันธุกรรมแล้ว 28 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายที่มีความผันแปรสูงที่สุดคือ เครื่องหมายที่ตำแหน่ง CUPmo9 ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างหรือมีรูปแบบของความแตกต่างซึ่งเรียกว่า อัลลีล มากถึง 33 อัลลีล และมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี 0.90 (ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีอยู่ระหว่าง 0-1.0 โดยค่าที่เข้าใกล้ 1.0 แสดงว่ามีความแตกต่างมาก) เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์มีความผันแปรแตกต่างกันสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการศึกษาที่แตกต่างกัน เครื่องหมายที่มีจำนวนอัลลีล >10 อัลลีล เหมาะสำหรับใช้จำแนกครอบครัวในการคัดพันธุ์ ส่วนเครื่องหมายบางตำแหน่งที่มีความผันแปรต่ำ (<5 อัลลีล) นำไปใช้ได้ดีในการจำแนกกลุ่มประชากรหรือแยก สปีชีส์

ตัวอย่างลักษณะเบสซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกิ้งกูดาคำ ขนาดและจำนวนอัลลีลและค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการตรวจสอบตัวอย่างกิ้งจากจังหวัดชุมพร(ตารางที่1)

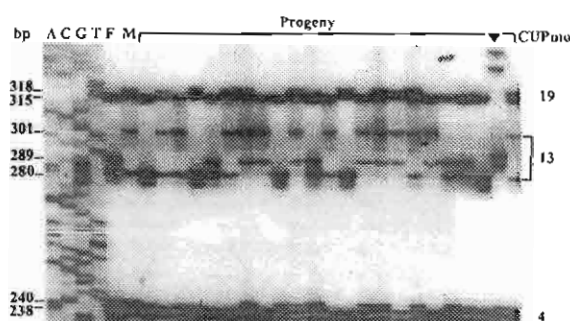
ตารางที่1 ลักษณะเบสซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกิ้งกูดาคำ

เครื่องหมาย	ลักษณะเบสซ้ำ	ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)	จำนวนอัลลีล (จำนวนตัวอย่าง)	ค่า เฮเทอโรไซโกซิตี
CUPmo 1	(GAA) ₄₃	224-326	29(51)	0.73
CUPmo 2	(ATCT) ₁₂ (TA) ₁₀	137-217	28(51)	0.78
CUPmo 3	(TAGA) ₃	135-223	27(49)	0.63
CUPmo 4	(ATCT) ₁₂ (AT) ₉ (GT) ₉	206-256	21(45)	0.89
CUPmo 5	(CT) ₁₀ TG(CT) ₁₇ (ATCT) ₁₀	120	1(10)	0
CUPmo 6	(GATA) ₄ ...	166-242	27(49)	0.69
CUPmo 7	(GATA) ₄ ...(GATA) ₄	172-234	21(43)	0.16
CUPmo 9	(GATA) ₆ (GA) ₁₆	274-380	33(40)	0.90
CUPmo 11	(CT) ₁₅ (ATCT) ₉ (TA) ₄₉ (TAA) ₉ TGA(TAA) ₃	132-162	10(47)	0.81



รูปที่16 แบบความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในกิ้งกูดาคำแต่ละตัว (แถวที่ 1-15) จากการตรวจด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

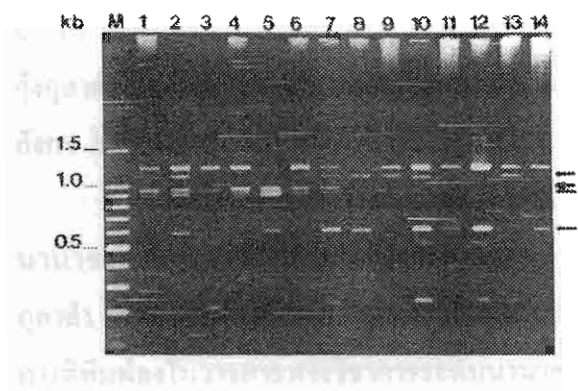
นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบแบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของกุ้งได้พร้อมกันที่หลายตำแหน่ง และได้นำไปใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในโครงการผลิตพ่อแม่พันธุ์จากบ่อเลี้ยง(รูปที่ 17) ขณะนี้อยู่ในรุ่นที่ 6 (F6) ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอมาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง โดยมีการติดตามและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งในรุ่นต่างๆ เพื่อกำหนดการผสมพันธุ์กุ้งในรุ่นต่อไปให้คงความหลากหลายทางพันธุกรรมและคัดเลือกรอบครว้ที่มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง หลีกเลี่ยงการผสมพันธุ์ภายในครอบครัว (inbreeding) และยังสามารถนำไปตรวจหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับอัตราการเติบโตและความสามารถในการทนโรค เพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถใช้คัดพันธุ์กุ้งที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและทนโรคเพื่อการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 17 การจำแนกครอบครัวกุ้งกุลาดำโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ 3 ตำแหน่ง $F = \text{พ่อ} \cdot \text{แม่}$ ▼ แสดงลูกกุ้งที่ไม่ได้มาจากครอบครัว

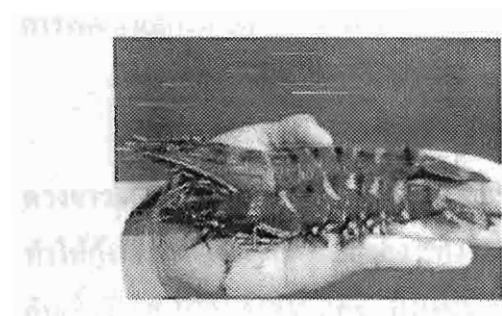
คณะผู้วิจัยยังได้มีความร่วมมือกับ CSIRO Molecular Animal Genetic Centre และ Australian Institute of Marine Science (AIMS) ที่ประเทศออสเตรเลีย นำเครื่องหมายดีเอ็นเอจากงานวิจัยนี้ไปใช้ทำแผนที่ยีน (Genetic Linkage Map) เพื่อศึกษาและค้นหายีนที่มีความสำคัญในกุ้งในโครงการ International Shrimp Map ซึ่งสามารถติดตามข้อมูลได้จาก website <http://www/shrimpmmap.tag.csiro.au>

นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่นๆ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโครคอนเดรีย เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดี (RAPD ย่อมาจาก Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers) (รูปที่ 18) เพื่อใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ ได้แก่ การใช้แยกกุ้งกุลาดำจากอันดามันและอ่าวไทย(รูปที่ 19) โดยที่ปัจจุบันแหล่งพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมาจากฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย แต่เกษตรกรนิยมพ่อแม่พันธุ์ที่มาจากฝั่งอันดามันเพราะเชื่อว่าให้ลูกที่แข็งแรงและมีอัตราการรอดสูงกว่า ทำให้ราคาพ่อแม่พันธุ์จากอันดามันสูงกว่าอ่าวไทยประมาณ 4-5 เท่า จึงอาจมีการปลอมปนของพ่อแม่พันธุ์ได้



รูปที่ 18 การจำแนกกุ้งกุลาดำอันดามันและอ่าวไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

แถวที่ 1-7 = กุ้งกุลาดำจากอันดามัน แถวที่ 8-14 = กุ้งกุลาดำจากตราด ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสที่พบเฉพาะในกุ้งกุลาดำจากอันดามัน



รูปที่ 19 กุ้งกุลาดำจากฝั่งอันดามันและอ่าวไทย ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างกัน

ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้

จากก้าวแรกจนถึงวันนี้ นับเป็นเวลาเกือบสิบปีแล้วที่โครงการวิจัยนี้ได้เกิดขึ้นมาและนับเป็นปีที่ห้าที่ได้มีการนำไปใช้ปฏิบัติงานจริง ซึ่งถือเป็นความภาคภูมิใจของผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการนี้ เมื่อความรู้จากงานวิจัยโดยเฉพาะการตรวจโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำด้วยวิธีพีซีอาร์สามารถสร้างประโยชน์ที่แท้จริงให้แก่เหล่าเกษตรกรได้และได้รับความนิยมนอกจากเกษตรกรและผู้ประกอบกิจการโรงเพาะฟักกุ้งอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์และลูกกุ้งกุลาดำที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมาเพาะเลี้ยง ทั้งนี้บริษัทเอกชนและองค์กรหลายแห่งก็ได้ส่งบุคลากรมาฝึกการทำเทคนิคพีซีอาร์กับคณะผู้วิจัยและนำไปใช้ตรวจหาไวรัสให้แก่เกษตรกรทั่วประเทศ เช่น บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด ชุมรมผู้เลี้ยงกุ้งสุราษฎร์ธานี บริษัท ภูเก็ต PCR จำกัด บริษัท PCRมหาสาร จำกัด บริษัท สยามเจนเนอรัลริชชี จำกัด บริษัท อินเตอร์แปซิฟิคมารีน จำกัด บริษัท ยูเนียนโฟรเซนโปรดักส์ จำกัด บริษัท แพ็คฟู้ด จำกัด บริษัท โกรเบสท์คอร์โพเรชั่น จำกัด บริษัท เอเชียสตาร์แลป จำกัด บริษัท ไบโอเทคแลป ห.จ.ก. ตะวันออกสง

เสริมอาหารสัตว์ เป็นต้น และบริษัทจากต่างประเทศ เช่น บริษัท National Prawn ประเทศซาอุดีอาระเบีย บริษัท Black Tiger Aquaculture ประเทศมาเลเซีย บริษัท Padmanabha Labs ประเทศอินเดีย และบริษัท Tan Union Trading ประเทศมาเลเซีย นอกจากนี้ยังได้เปิดกว้างให้บุคลากรที่สนใจจากประเทศต่างๆ เข้ามาศึกษาเทคนิคการทำฟาร์มกับคณะผู้วิจัยของไทย ในโครงการอบรมเทคโนโลยีในการตรวจไวรัสในกุ้งกุลาดำให้แก่นักวิจัยจากแถบเอเชียอาคเนย์ อาทิ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และศรีลังกา โดยได้รับการสนับสนุนด้านการเงินจากหน่วยงานต่างประเทศ

โดยการวิจัยนี้ได้สร้างชื่อเสียงไม่เฉพาะแต่ในประเทศไทย แต่ยังได้รับการยอมรับจากนานาชาติในฐานะที่เป็นผู้บุกเบิกในการพัฒนาหาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งและพัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งนอกจากตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการในประเทศและบทความเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติไม่น้อยกว่า 200 เรื่อง ทั้งยังได้รับเชิญให้เป็นวิทยากรบรรยายในที่ประชุมเกี่ยวกับเรื่องกุ้งทั้งในประเทศและต่างประเทศไม่น้อยกว่า 250 ครั้ง

การพัฒนาเทคโนโลยี เพื่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอนาคต

ปัญหาที่พบในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในปัจจุบันไม่เพียงแต่เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น ที่เป็นปัญหาของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง แต่ยังมีเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่ทำให้กุ้งโตช้า ในความหมายของ “กุ้งโตช้า” นี้ ไม่ใช่เป็นความหมายของการโตช้าเพียงเล็กน้อยเหมือนกับเชื้อไวรัส HPV MBV และ IHNV ที่รู้จักมานานแล้ว แต่เป็นการโตช้าอย่างมากและพบอย่างกว้างขวางในทุกภาคการเลี้ยงกุ้งทั่วประเทศไทย ที่ว่าโตช้า นั่นคืออัตราการเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยเป็น 50% ของที่ควรจะเป็น สมมุติว่าในกุ้งที่เลี้ยงแล้วโตเป็นปกติ เมื่อครบเวลาสี่เดือนแล้ว น้ำหนักตัวกุ้งควรจะอยู่ที่ 30 ตัวต่อกิโลกรัม คือตัวละประมาณ 35-40 กรัม แต่กุ้งที่โตช้านี้จะมีน้ำหนักเฉลี่ยที่ตัวละ 15-17 กรัมเท่านั้น และยังสามารถมีกุ้งในบ่อเลี้ยง 20-30% ที่น้ำหนักตัวเพียง 5-10 กรัม ทำให้ค่าเบี่ยงเบนของน้ำหนักจากค่าเฉลี่ย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\times 100$ / ค่าน้ำหนักเฉลี่ย) นั้นสูงมาก เช่น 60-70% แทนที่จะเป็น 10-15% อย่างที่ควรเป็น การโตช้าเร็วต่างกันอย่างมากของกุ้งในบ่อเดียวกันนี้ เกษตรกรเรียกว่าการแตกไซส์

คณะผู้วิจัยในกลุ่มได้ประยุกต์ใช้ความรู้พื้นฐานจากการศึกษาวิจัยและเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาเพื่อการจัดการกับปัญหาการโตช้าและการแตกไซส์นี้ โดยได้มีการศึกษามาเป็นเวลานานกว่าหกเดือนโดยกลุ่มนักวิจัยในทีม จากการศึกษาประวัติการเกิดโรค คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง คุณภาพพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้ง การจัดการภายในโรงเพาะฟัก การจัดการในบ่อเลี้ยง ได้ผลสรุปว่าสาเหตุน่าจะเกิดจากลูกพันธุ์กุ้งมากกว่าอย่างอื่น และน่าจะเกิดจากการติดเชื้อมากกว่าสาเหตุอื่น นั่นคือการติดเชื้อของลูกกุ้งตั้งแต่อยู่ในโรงเพาะฟัก ได้ทดลองตรวจเชื้อไวรัสทุกชนิดที่สามารถตรวจได้ในปัจจุบัน ด้วยเทคนิค

PCR คือ WSSV, YHV, MBV, HPV, gill-associate virus (GAV), spawning-mortality virus (SMV), infectious hypodermal and haematopoietic virus (IHHNV), Taura syndrome virus (TSV) และ Banyan virus (BV) ในกุ้งที่โตช้า พบว่ามีที่ติดเชื่ออยู่คือ MBV, HPV และ IHHNV แต่ทั้งสามไวรัสนี้ไม่ควรเป็นสาเหตุของการโตช้า เพราะว่ามีกุ้งโตช้าประมาณ 25% ที่ไม่มีเชื้อดังกล่าวอยู่เลย และกุ้งที่ตัวโตปกติก็ยังไม่พบว่ามีเชื้อไวรัสทั้งสามไม่น้อยไปกว่ากุ้งที่โตช้าเลย ได้ศึกษาต่อไปด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่านอกจากจะมีเชื้อไวรัสที่พบโดยวิธีการพีซีอาร์แล้ว ก็ยังพบการติดเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวอีกหลายชนิด แต่ก็พบเช่นเดียวกันว่ากุ้งที่โตช้าประมาณ 17% ไม่ติดเชื้อเหล่านั้น และกุ้งที่โตปกติก็มีเชื้อเหล่านั้นได้เช่นกัน โดยสรุป จะเห็นว่าเชื้อโรคทั้งหลายที่รู้จักกันในวงการติดเชื้อของกุ้งนั้น ไม่น่าเป็นสาเหตุของการโตช้าในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกุ้งที่โตช้าหลายตัวมีไวรัสขนาดเล็กๆอยู่ อย่างน้อยสี่ชนิด ได้สกัดเชื้อไวรัสเหล่านี้แยกอย่างหยาบๆ โดยเพียงแค่แยกเชื้อแบคทีเรียออกไป และนำสิ่งที่สกัดได้นี้ไปฉีดในกุ้งกุลาดำที่มีขนาดประมาณ 1 กรัม หลังจากเลี้ยงต่ออีกสามเดือน พบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีดสารสกัดนี้มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมและมีค่าเบี่ยงเบนของน้ำหนักจากค่าเฉลี่ยสูงมาก ทำให้แน่ใจว่าสิ่งที่ทำให้กุ้งโตช้านี้อยู่ใน lymphoid organ หลังจากนั้น จึงได้สกัดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดออกมาเพื่อศึกษาหาลำดับเบสของ RNA และได้พัฒนา primers เพื่อตรวจจับเชื้อไวรัสชนิดใหม่นี้ ซึ่งตั้งชื่อว่า monodon stunt growth virus (MSGV) และได้เริ่มพบแล้วว่ากุ้งที่โตช้าในบ่อเพาะเลี้ยงหลายบ่อมีการติดเชื้อ MSGV แต่ปัญหายังอยู่ที่ primers ที่หามาได้นี้ยังอาจจะไม่เป็น primers ที่เหมาะสมที่สุด จึงต้องทำการสกัดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดออกไปบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธีการของ sucrose gradient ultracentrifugation และนำไปฉีดกุ้งอีกครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อไวรัสชนิดใหม่นี้เป็นตัวโคที่เห็นในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกันแน่ คาดว่าจะได้ primers ที่ดีขึ้นอีกในเร็วนี้

นอกจากการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ได้แล้ว การพัฒนาการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่สามารถนำไปสู่การแก้ปัญหาโรคโตช้าได้อีกขนาดของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยจึงน่าจะอยู่ที่การเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ปลอดเชื้อและโตเร็ว ควบคู่ไปกับการหาวิธีวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยที่ได้ดำเนินมาจนถึงปัจจุบันจะไม่สามารถประสบความสำเร็จได้หากปราศจากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหน่วยงานที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ได้แก่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ

เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) มหาวิทยาลัยมหิดล บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด มหาชน และ ACIAR ของประเทศออสเตรเลีย

ขอขอบคุณคณะกรรมการรางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่นประจำปี พ.ศ. ๒๕๔๖ มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์

ขอขอบคุณนักวิจัยอีกจำนวนมากที่ร่วมกันทำงานเป็นทีมอย่างยาวนานและได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในงานวิจัยอย่างเต็มที่ตลอดมา

ตัวอย่างผลงานของกลุ่มวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Wongteerasapaya, C., Vickers, J. E., Sriurawatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occur in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Dis. aquat. Org.*, 21: 69-77.
2. Wongteerasapaya, C., Sriurawatana, S., Vickers, J. E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. aquat. Org.* 22 : 45-60.
3. Wongteerasupaya, C. , S. Wongwisansri , V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G.L. Nash, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive *in situ* hybridization with viral ifections in 6 penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143: 23-32.
4. Wongteerasupaya, C., Tongcheua, 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 amplification. *Dis. aquat. Org.* 31 : 181-186.
5. Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7 : 55-61.

6. Kanchanaphum, P., Boonsaeng, V., Wongteerasapaya, C., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1998) Experimental transmission of white-spot baculo-like virus (WSBV) from crabs to shrimp *Dis. aquat. Org.* **34**: 1-7.
7. Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, S. Sriurairatana, V. Boonsaeng, S. Panyim, B. Withyachumnarnkul, V. Thamavit and T.W. Flegel. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* **38**: 1-10.
8. Pongsoomboon, S., Whan, V., Moore, S., and Tassanakajon, A. (2000) Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellite in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Sci. Asia* **26**: 1-8.
9. Supangul, P, Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., and Tassanakajon, A. (2000) Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* **2**: 339-347.
10. Kiatpathomchai, W., Boonsaeng, V., Tassanakajon, A., Wongteerasupaya, C., Jitrapakdee, S. and Panyim, S. (2001) A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* **47**: 235-239.
11. Flegel TW, Fegan DF (2002) Strategies for preventing the spread of fish and shellfish diseases. *Fisheries Sci.* **68** Supplement 1: 776-788.
12. Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, Withyachumnarnkul B, Flegel TW, Boonsaeng V, Panyim S (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol. Cell. Probes* **16**: 409-413.
13. Phromjai J, Boonsaeng V, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (2002) Detection of HPV in Thai *Penaeus monodon* by in situ hybridization, dot-blot hybridization and PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* **51**: 227-232.

14. Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Chomsoong R, Flegel TW, Muangsin S, Nash GL (2003) Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 53: 167-171.
15. Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Panyim S, Flegel TW, Walker PJ (2003) High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 54: 253-257

ผลงานตีพิมพ์ในเอกสารในประเทศ

1. วรณสิกา ทองเชื้อ ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และวิชัย บุญแสง การตรวจหาระดับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี PCR วารสารรมบี ฉบับที่ 24 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2542 หน้า 38-40.
2. เทคนิคใหม่ในการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ วารสารสัตว์น้ำ ฉบับที่ 127 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2543.
3. อัญชลี ทัศนชาจร "การใช้ PCR ในการคัดสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ" ในหนังสือ การสัมมนาวิชาการเชิงปฏิบัติการเรื่อง "เทคนิค PCR กับการเพาะเลี้ยง กุ้ง" จัดโดย บริษัทวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้ง ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล 21 มกราคม 2541 หน้า 4/1 ถึง 4/6.
4. อัญชลี ทัศนชาจร เปรมฤทัย สุพรรณกุล เติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และวิชัย บุญแสง "The application of Microsatellite Markers in Shrimp Breeding Program" ในหนังสือการสัมมนาวิชาการ "เทคโนโลยี ชีวภาพกุ้ง" จัดโดยศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ 13 ธันวาคม 2540. หน้า 28 ถึง 34.
5. อัญชลี ทัศนชาจร, ศิราวุธ กลิ่นบุหงา เติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ สิริพร พงษ์สมบุญ และ เปรมฤทัย สุพรรณกุล การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายและการศึกษาพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำ วารสารจุฬารวิจัย ปีที่ 20 ฉบับที่ 5 กันยายน-ตุลาคม 2544 หน้า 14 ถึง 20.

หนังสือ

1. บทความในหนังสือ จีโนมิกส์ภาษาแห่งชีวิต เรื่องจีโนมกุ้ง บทที่ 6 โดยมูลนิธิบัณฑิตยสภาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พิมพ์เมื่อเดือน ธันวาคม 2545 หน้า 125-144.
2. แผ่นพับเรื่อง การตรวจโรคไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงจุดขาว ด้วยวิธี PCR