Abstract

Shrimp industry in Thailand with export value over 80 billion baths per year had suffered as much as 25% loss from viral diseases. Effective prevention or treatment of viral infected shrimps is not available. This research group aims to develop an effective means to prevent and protect *Peneaus monodon* shrimps from yellow head virus (YHV) infection which usually causes high mortality within 3-7 days. In addition, the group aims to create an infrastructure to study RNA interference (RNAi) in shrimp and to apply siRNA technology for prevention of shrimp mortality from YHV infection.

This research group found RNAi functioning in shrimp lymphoid cells. The ability of dsRNA to inhibit YHV replication was further investigated and found that dsRNA targeting non-structural genes (protease, polymerase, helicase) were clearly more effective than the structural genes (gp116, gp64). Among the nonstructural genes dsRNA protease was the most effective and able to inhibit YHV replication when injecting into shrimp haemolymp. Injection of dSRNA protease not only inhibited YHV replication but also prevented shrimp mortality. This constitutes the first evidence that shrimp mortality from YHV infection may be prevented by the specific dsRNA through RNAi pathway.

The research group cloned essential genes in RNAi pathway (i.e. Argonaute and Dicer). The Argonaute gene encodes 943 a.a. protein whose knock-down impaired RNAi pathway. Two more Argonaute genes whose function is not clear were identified. The cloning and identification of Dicer gene is more complex due to a much larger size. A Dicer gene encoding a minimal 1,786 amino acids was achieved. The gene contained RNA helicase, PAZ, CAT1 and CAT2 RNase III domains and dsRNA binding domain.

Development of viral vector for siRNA delivery employed HPV (Hepato pancreatic virus) whose genome sequence was elucidated. Its single-stranded RNA of 6,321 bases has inverted repeats at both 5′ and 3′ temini which presented difficulties to elucidate the structure. To develop HPV infectious clone we faced an obstacle to find an appropriate host for HPV infection in the laboratory. HPV infectious clone has not been achieved.

This research group produced 14 international publications with high impact factor and 3 manuscripts. There were 22 reseachers; 5 principal investigators, 4 young investigators, 2 Ph.D. students, 9 M.Sc. students and 2 research assistants.

Key words : RNAi, siRNA, *P.monodon*, YHV, dsRNA-protease, Pem-ago, RISC, DICER, mortality, HPV.

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งซึ่งมีคุณค่าปีละประมาณแปดหมื่นล้านบาท อาจมีการสูญเสียมากถึง 25% จากการติดเชื้อไวรัส ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ การศึกษาวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อพัฒนาการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ซึ่งโรคดังกล่าวจะทำให้กุ้งติดเชื้อตายภายใน 3-7 วัน จุดประสงค์รองเป็นการสร้างกลุ่มวิจัย นักวิจัยรุ่นใหม่ และนักศึกษาปริญญาโทและเอก ให้มีความรู้ความสามารถในงานวิจัยการใช้ siRNA เพื่อหยุดยั้งไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

กลุ่มวิจัยเลือกใช้เทคโนโลยี siRNA ในการป้องกันและรักษาโรคไวรัส เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีใหม่ซึ่งน่าจะหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส RNA ที่มีการเปลี่ยนแปลงเร็ว เช่น ไวรัสหัวเหลือง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และน่าจะให้ประสิทธิผลในการป้องกันและรักษา

เทคโนโลยี siRNA ดังกล่าวจะบังเกิดผลเมื่อกุ้งมีระบบ RNA interference ซึ่งในตอนเริ่มต้นปี 2546 ยังไม่มีความชัดเจน จึงได้ทำการทดสอบจนเป็นที่ชัดเจนว่ากุ้งมีระบบ RNA interference ซึ่งจะทำให้เทคโนโลยี siRNA ใช้หยุดยั้งไวรัสหัวเหลืองในกุ้งได้

ได้มีการออกแบบ double-stranded RNA (dsRNA) ให้มีคุณสมบัติปลดปล่อย siRNA ในเซลกุ้งและหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัส เช่น dsRNA helicase dsRNA protease dsRNA polymerase และ dsRNA gp116 dsRNA gp64 โดยพบชนิดที่ดีที่สุด คือ dsRNA protease ซึ่งนอกจากให้ผลดีในเซลกุ้งแล้วยังสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้เมื่อใช้ฉีดเข้า haemolymp นับเป็นผลงานวิจัยชิ้นแรกซึ่งป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำได้อย่างชัดเจน โดยได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยดังกล่าวแล้ว 2 ฉบับ

นอกจากนี้กลุ่มวิจัยได้ clone ยีน Argonaute ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ RNA interference ในกุ้ง โดยได้ศึกษาคุณสมบัติเคมีและชีวภาพพบเป็นโปรตีนขนาด 943 กรดอะมิโน ซึ่งยีน Argonaute ดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนของกลไก RNA-interference ในกุ้งซึ่งยังไม่มีผู้รายงานการค้นพบมาก่อน และกลุ่มวิจัยได้ clone ยีน Dicer ซึ่งตัด dsRNA ในการปลดปล่อย siRNA ภายในเซลกุ้งได้เกือบเสร็จสมบูรณ์ เนื่องจากยีน Dicer มีขนาดใหญ่มากทำให้ยีนที่ clone ได้ขนาด 1,786 กรดอะมิโน ยังขาดความชัดเจนอยู่

การพัฒนาไวรัสพาหะเพื่อพา siRNA เข้าสู่เซลกุ้งอย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ไวรัสที่พบในกุ้งแต่ไม่แสดงอาการบ่มโรค เช่น ไวรัส HPV (Hepatopancreatic virus) ได้ดำเนินการค้นหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีโนมไวรัสขนาด 6,321 bases ซึ่งมีโครงสร้างด้านปลายซับซ้อน จนเป็นผลสำเร็จ และได้พยายามพัฒนา HPV ดังกล่าวให้เป็น infectious clone ยังไม่ประสบความสำเร็จสมบูรณ์ ทำให้การพัฒนาไวรัสพาหะเพื่อพา siRNA ยังต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์

โครงการนี้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ จำนวน 14 ฉบับ พร้อมส่งตีพิมพ์ จำนวน 3 ฉบับ คณะผู้ร่วมวิจัย จำนวน 22 คน เป็นคณะนักวิจัยหลัก จำนวน 5 คน นักวิจัยรุ่นใหม่ จำนวน 4 คน นักศึกษาระดับปริญญาเอก จำนวน 2 คน นักศึกษาระดับปริญญาโท จำนวน 9 คน และผู้ช่วยนักวิจัย จำนวน 2 คน