



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกสายพันธุ์ไวรัสหัวเหลือง
โดยวิธี High Resolution Melt

โดย ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น และคณะ

เดือนกันยายน พ.ศ. 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกสายพันธุ์ไวรัสหิวเหลือง โดยวิธี High Resolution Melt

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. นางสาวแสงจันทร์ เสนาปิน | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 2. นายสุดเขต มณฑาทอง | บริษัทนิวเวลด์ไบโอเทค จำกัด |
| 3. นางสาวเยาวลักษณ์ ท้าวบุตร | หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง |
| 4. นางสาวฉัตรลดา แจ่มสนอง | หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง |
| 5. ศ.ดร. ทิมโมที เฟลเกล | หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

โครงการ การจำแนกสายพันธุ์ไวรัสหัวเหลือง โดยวิธี High Resolution Melt

บทคัดย่อ

ไวรัสหัวเหลืองเป็นไวรัสก่อโรคที่พบในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งหลายประเทศทั่วโลก ปัจจุบันพบไวรัสหัวเหลือง 6 สายพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ลำดับเบสในจีโนม และความรุนแรงในการก่อโรค วิธีการตรวจวิเคราะห์และจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลืองตามข้อกำหนดขององค์กร OIE (World Organization of Animal Health) คือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองแบบ nested RT-PCR จากนั้นหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่ได้เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล วิธีการตรวจวิเคราะห์วิธีนี้มีข้อเสียคือ มีการทำงานหลายขั้นตอนเช่นการทำ Gel electrophoresis และการหาลำดับเบส งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาระบบการตรวจสอบการติดเชื้อและสามารถจำแนกสายพันธุ์ต่างๆของไวรัสหัวเหลืองได้อย่างพร้อมกัน ซึ่งอาศัยเทคโนโลยีที่เรียกว่า High resolution melt (HRM) ควบคู่กับการทำ PCR (PCR/HRM) โดยเราได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มี Inosine แทนการใช้ Degenerate primers พร้อมทั้งได้สร้าง พลาสมิดควบคุมของไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ 1, 2 และ 5 ส่วนอีกสามสายพันธุ์ได้ทำการสังเคราะห์จากหน่วยบริการชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า ผลผลิตดีเอ็นเอจากพลาสมิดควบคุมทั้ง 6 สายพันธุ์ให้ HRM profiles ที่มี Melting temperature (T_m) ต่างกัน ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้เป็นวิธีในการตรวจและจำแนกสายพันธุ์ไวรัสหัวเหลืองได้ เมื่อทำการตรวจตัวอย่างกุ้งด้วยวิธี PCR/HRM ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้เปรียบเทียบกับวิธี nested RT-PCR พบว่าวิธี PCR/HRM มีประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างกุ้งได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามผลการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี PCR/HRM นั้นไม่ตรงกับลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ อาจเป็นเพราะสถานะในปฏิกิริยาบางประการส่งผลให้ค่า T_m ของพลาสมิดควบคุมไม่ตรงกับ T_m ของตัวอย่างกุ้งจริง นอกจากนี้ระบบ PCR/HRM ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างที่มีไวรัสมากกว่าสองสายพันธุ์ได้

Abstract

Yellow head virus (YHV) is one of the most virulent RNA viruses in shrimp. Since the first report in Thailand in 1990, there have now been 6 YHV genotypes with sequence difference in their genomes up to 20%. Various detection methods cannot be used to distinguish every types of YHV. Until recently, an RT-PCR detection method using degenerate primers recommended by OIE (World Organization of Animal Health) has been established. However, it requires further step of sequencing in order to specify YHV genotypes. In this project, we thus propose an in-tube method using high resolution melt (HRM) analysis in conjunction with RT-PCR to detect and identify genotypes of YHV. Control plasmids represent genotype 1, 2, and 5 were successfully

constructed while those of genotype 3, 4, and 6 were synthesized from a commercial company. A pair of inosine-containing primer was designed based on the recommended typing region which targeted the ORF1b region of the YHV genome. PCR and HRM analysis (PCR/HRM) were performed using Rotor-Gene Q instrument. After the amplification process was completed, HRM function was performed by increasing the temperature in steps of 0.1°C . The HRM profiles revealed that the amplified products from each representative YHV genotype yielded distinguishable melting temperature values. Thus, our newly developed PCR/HRM system seems to have a potential to be a useful tool in YHV genotyping. Viral detection in field shrimp RNA samples were performed using conventional nested PCR detection and PCR/HRM assay. The results revealed that our newly developed PCR/HRM method was more efficient than the conventional detection. However, genotyping indicated by the HRM profiles was not corresponded to the sequencing results. In addition, the PCR/HRM method could not be used to distinguish genotypes when more than 2 genotypes present in the samples.

สรุปย่อ (Executive summary)

การตรวจหาไวรัสหัวเหลืองจากตัวอย่างกุ้งในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีตัวอย่างกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1, 2 และ 5 แล้ว จึงได้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 147 bp ของไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 3, 4 และ 6 เพื่อใช้เป็นพลาสมิดควบคุมในการทำปฏิกิริยา ตัวอย่างกุ้งที่นำมาทดสอบนั้นได้มีการเปลี่ยนจาก RNA เป็น cDNA เพราะมีความคงทนกว่า การทดลองเบื้องต้นพบว่าการตรวจไวรัสหัวเหลืองด้วยไพรเมอร์ 4 เส้นและมีลักษณะเป็น Degenerate primer ตามรายงานของ Wijegoonawardane และคณะ (2008) นั้น ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการทำ PCR/HRM เพราะส่งผลต่อค่า Melting temperature (T_m) ของผลผลิตดีเอ็นเอให้มีค่าไม่เท่ากันแม้ว่าจะมาจากไวรัสสายพันธุ์เดียวกันก็ตาม ดังนั้นเราจึงแก้ปัญหาโดยใช้ Inosine base (I) แทนการใช้ Degenerate base และใช้ไพรเมอร์เพียง 2 เส้นในปฏิกิริยา

การตรวจไวรัสหัวเหลืองจาก cDNA จำนวน 22 ตัวอย่างด้วยวิธี Nested RT-PCR ที่รายงานไว้ของ Wijegoonawardane และคณะ พบว่ามีกุ้งเพียง 3 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก แต่เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR/HRM ที่เราพัฒนาขึ้นพบตัวอย่างกุ้ง 19 ตัวอย่างให้ผลเป็นบวก โดยพบเป็นการติดไวรัสหัวเหลืองแบบสายพันธุ์เดียวจำนวน 8 ตัวอย่างและแบบสองสายพันธุ์จำนวน 11 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการยืนยันผลโดยการอ่านลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้และเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล พบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี PCR/HRM นั้นไม่ตรงกับผลของลำดับเบส อาจเนื่องมาจากสถานะที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR/HRM ยังไม่เหมาะสม ทำให้ค่า T_m ที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐานไม่ตรงกับ T_m ที่ได้จากตัวอย่างกุ้งจริง และพบว่าวิธี PCR/HRM มีข้อจำกัดหากตัวอย่างกุ้งมีไวรัสหัวเหลืองมากกว่า 2 สายพันธุ์

การทดลองนี้ต้องการสร้างอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ในการทดลองควบคุม เราจึงนำพลาสมิดทีเอ็นเอที่มี ดีเอ็นเอขนาด 147 bp ของไวรัสหัวเหลืองแต่ละสายพันธุ์มาทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ซึ่งอยู่ downstream ของซินดีเอ็นเอขนาด 147 bp) เพื่อให้เป็น Linearized DNA จากนั้นจึงนำไปใส่ในปฏิกิริยา *in vitro* transcription ซึ่งประกอบด้วย

Linearized DNA	~10 ug
5X buffer	30 ul
100 mM DTT	15 ul
25 mM rNTPs	5 ul
18 U/ul T7 RNA polymerase (Promega)	3 ul

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 150 ul

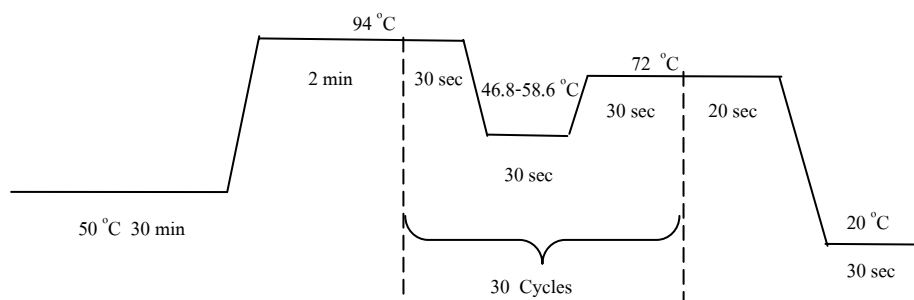
ทำการปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอตั้งต้นโดยการย่อยด้วย DNase I แล้วปมที่ 37°C 15 นาที ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Phenol/Chloroform และตกตะกอนด้วย Isopropanol แล้วจึงละลายอาร์เอ็นเอควบคู่ที่ได้ด้วย DEPC-water จากนั้นทำการวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Spectrophotometry ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 และ 280 nm และคำนวณ copy number ของอาร์เอ็นเอโดยใช้ ค่าคงที่ Avogadro number

3. การทดสอบ Annealing temperature ที่เหมาะสม

การทดลองนี้ต้องการทดสอบหา Annealing temperature (T_a) ที่เหมาะสมเพื่อการทำปฏิกิริยา RT-PCR/HRM ต่อไป จึงทดสอบโดยใช้ *in vitro* transcribed RNA ของไวรัสหัดเหลืองแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองข้างต้นเป็นอาร์เอ็นเอตั้งต้น โดยในปฏิกิริยา RT-PCR 20 ul ประกอบด้วย

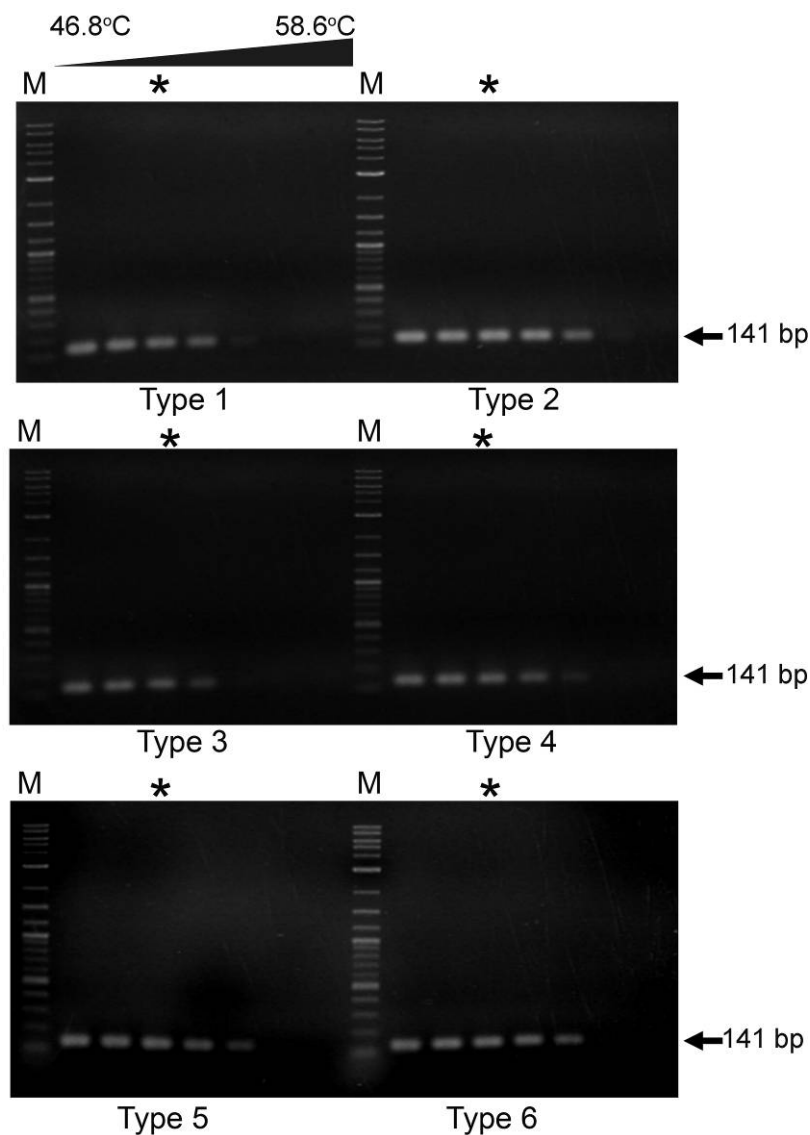
<i>in vitro</i> transcribed RNA (10^6 copies/ul)	2 ul
2X buffer	10 ul
10 uM YHV-inosine-F	0.5 ul
10 uM YHV-inosine-R	0.5 ul
RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)	0.5 ul
น้ำกลั่น	6.5 ul

ปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Biometra) ดังนี้



หลังจบปฏิกิริยา RT-PCR ได้นำสารละลาย 10 ul ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ผลการทดลองทดสอบ T_a ที่ 46.8, 48.9, 51.1, 53.2,

55.3, 57.3 และ 58.6°C พบว่า T_a ที่ 51.1°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยสามารถให้ผลผลิตดี เอ็นเอขนาด 141 bp จาก *vitro* transcribed RNA ของไวรัสหัวเหลืองทุกสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 2) ดังนั้นจะได้มีการทำปฏิกิริยา RT-PCR/HRM ที่มี T_a ที่ 51°C ต่อไป (ไม่สามารถตั้งค่า 51.1°C ในเครื่อง Rotor Gene-Q ได้)



รูปที่ 2 การหา Annealing temperature (T_a) ที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR จากอาร์เอ็นเอ ความคุมของไวรัสหัวเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์, * แสดงผลผลิตที่ได้จากการใช้ T_a ที่ 51.1°C

4. การสังเคราะห์ cDNA

ในระหว่างที่ทำการทดลอง พบว่าอาร์เอ็นเอตัวอย่างจากกุ่มมีการเสื่อมสภาพไป ดังนั้นเราจึงได้ทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอของตัวอย่างกุ่มไปเป็น cDNA เพื่อให้สารพันธุกรรมมีความเสถียรขึ้น โดยในปฏิบัติการการสังเคราะห์ cDNA 30 μ l ประกอบด้วย

RNA	5 μ l
5X cDNA Synthesis buffer (Invitrogen)	6 μ l
100 ng/ μ l Random hexamer (Invitrogen)	1.2 μ l
5 mM dNTPs	2 μ l
0.1 M DTT	1.5 μ l
ThermoScript RT (Invitrogen)	1 μ l
น้ำกลั่น	13.3 μ l

ปฏิกิริยาที่ 65°C 5 นาที ตามด้วย 25°C 10 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาที่ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 85°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

5. การทดสอบสถานะในการทำ PCR/HRM

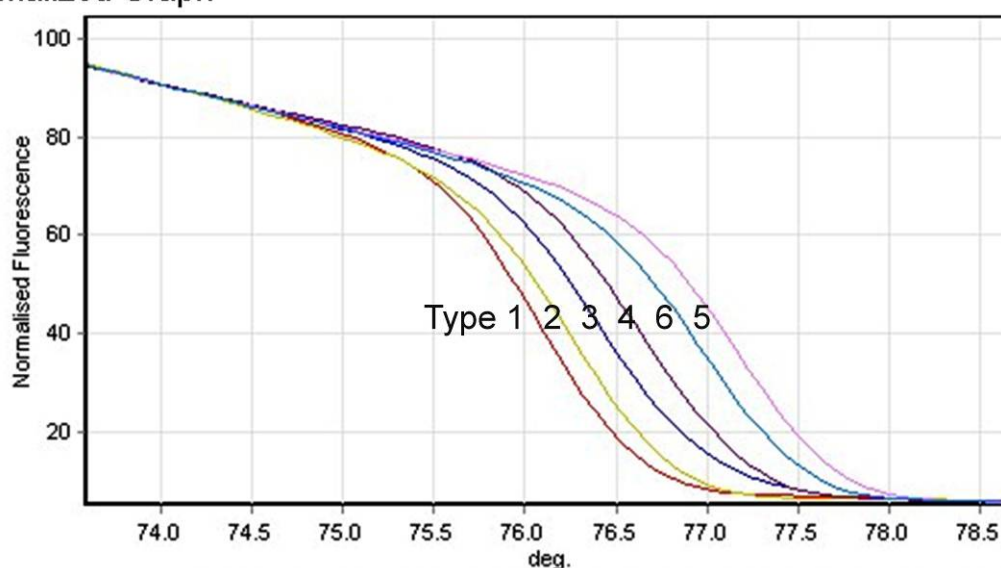
การทดลองนี้ต้องการทดสอบสถานะในการทำ PCR/HRM ว่าจะสามารถทำการแยกไวรัสหัวเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์ได้หรือไม่ จึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอควบคุมของไวรัสหัวเหลืองแต่ละสายพันธุ์มาทำการทดสอบ โดยในปฏิบัติการ PCR/HRM 25 μ l ประกอบด้วย

DNA	1 μ l
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)	12.5 μ l
10 μ M YHV-inosine-F	0.5 μ l
10 μ M YHV-inosine-R	0.5 μ l
น้ำกลั่น	10.5 μ l

นำปฏิกิริยาใส่ในเครื่อง Rotor Gene-Q แล้วตั้งอุณหภูมิที่ 95°C 15 นาที 1 รอบ 94°C 20 วินาที, 51°C 35 วินาที และ 72°C 35 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นปฏิกิริยาที่ 73 ถึง 79°C โดยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 0.07°C บันทึกอุณหภูมิและรูปแบบของ Melting temperature (T_m) ของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากไวรัสหัวเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถแสดงผลได้สองแบบ คือ แบบ Normalized Graph และแบบ Melting Curve ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลผลิตดีเอ็นเอของไวรัสหัวเหลืองแต่ละสายพันธุ์มีค่า T_m ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ผลผลิตของไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1 ถึง 6 มีค่า T_m เป็น 76.11, 76.29, 76.43, 76.65, 77.2 และ 76.99°C ตามลำดับ (รูปที่ 3) ดังนั้นสถานะที่ทดสอบนี้น่าจะมีความเหมาะสมในการตรวจและจำแนกสายพันธุ์ไวรัสหัวเหลืองได้

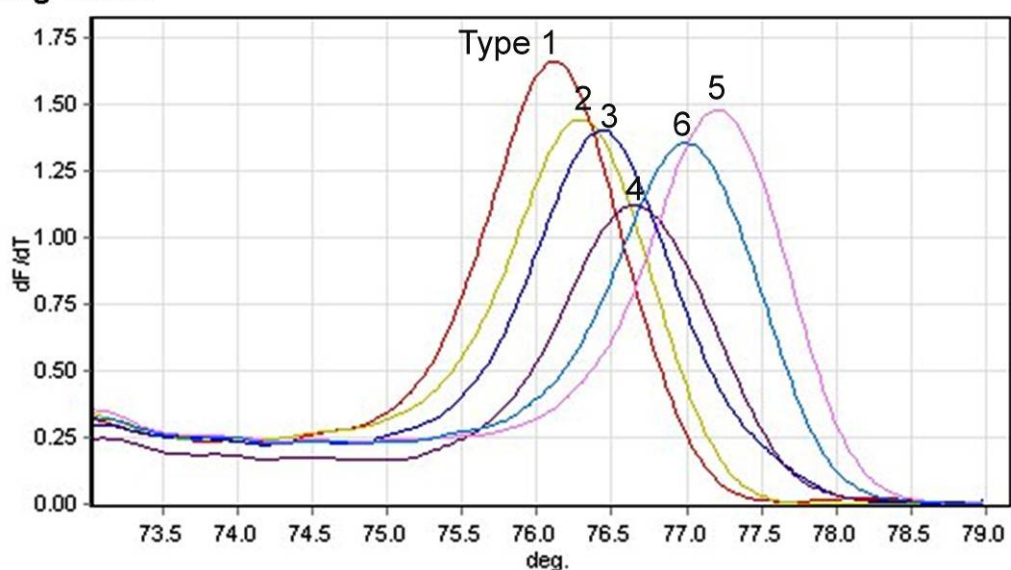
(a)

Normalized Graph



(b)

Melting Curve

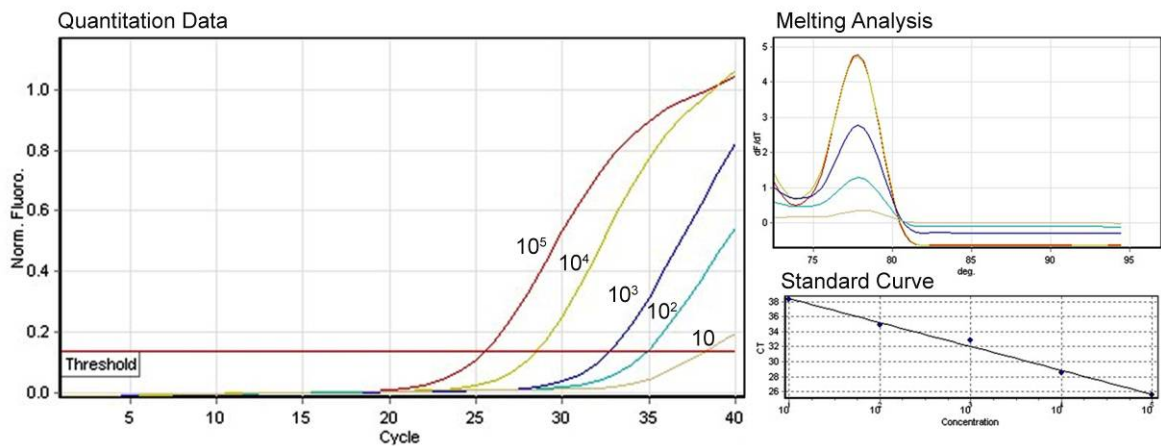


รูปที่ 3 รูปแบบของ Melting temperature (T_m) ของผลผลิตดีเอ็นเอจากไวรัสหัวเหลี่ยมทั้ง 6 สายพันธุ์ แสดงในรูปแบบของ (a) Normalized graph และแบบ (b) Melting curve

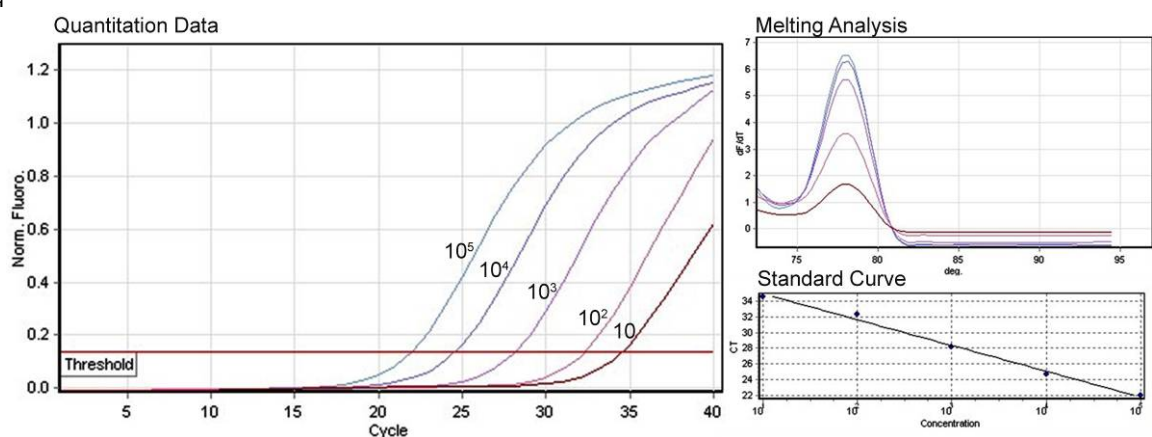
6. การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ของการตรวจไวรัสหัวเหลี่ยมแต่ละสายพันธุ์

การทดลองนี้ต้องการหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลี่ยมแต่ละสายพันธุ์ จึงทำ 10-fold serial dilution (10^6 หรือ 10^5 ถึง 1 copy/ul) ของพลาสมิดดีเอ็นเอควบคุมของไวรัสหัวเหลี่ยมแต่ละสายพันธุ์ แล้วใช้ 1ul ในปฏิกิริยา PCR จำนวน 40 รอบดังกล่าวข้างต้น จากนั้นยืนยันความจำเพาะของผลผลิตที่ได้ด้วยการทำ Melting

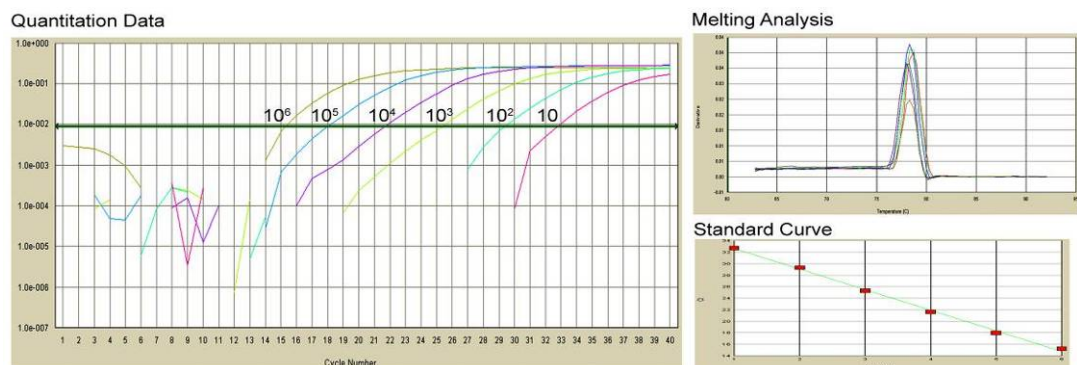
analysis ตั้งแต่ 72 ถึง 95°C ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1-4.6 และสรุปรวมในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์และสภาวะที่ทดสอบนั้นมีค่า Amplification efficiency ของการตรวจไวรัสหัวเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 1.86-2.06 และ Sensitivity อยู่ในช่วง 1-100 copies/reaction ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลือง



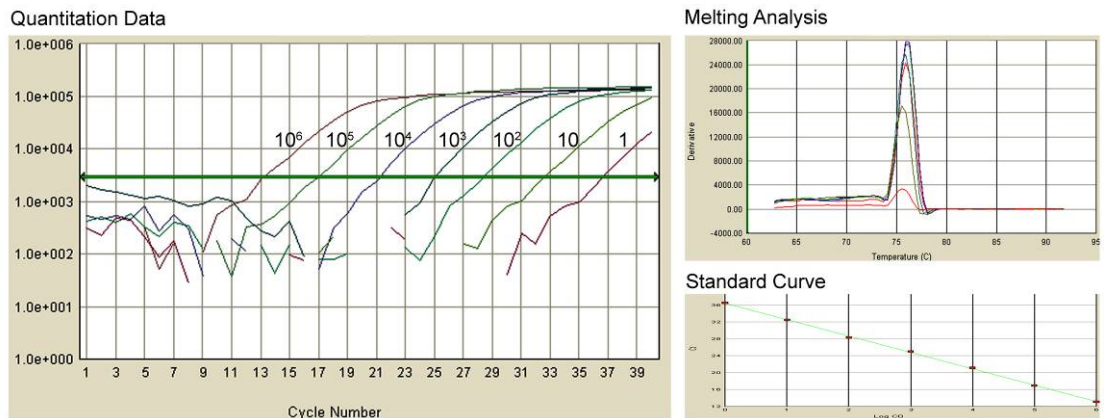
รูปที่ 4.1 การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1



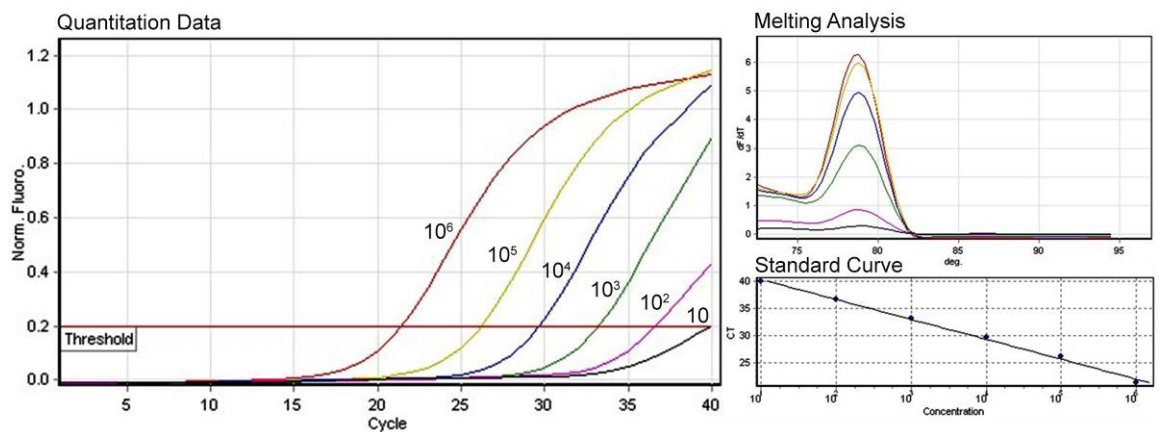
รูปที่ 4.2 การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 2



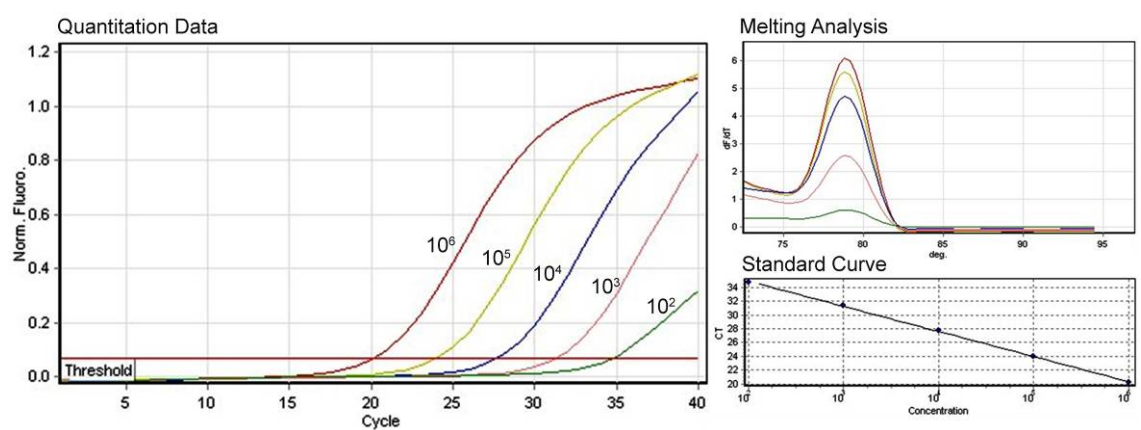
รูปที่ 4.3 การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 3



รูปที่ 4.4 การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลี่ยมสายพันธุ์ที่ 4



รูปที่ 4.5 การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลี่ยมสายพันธุ์ที่ 5



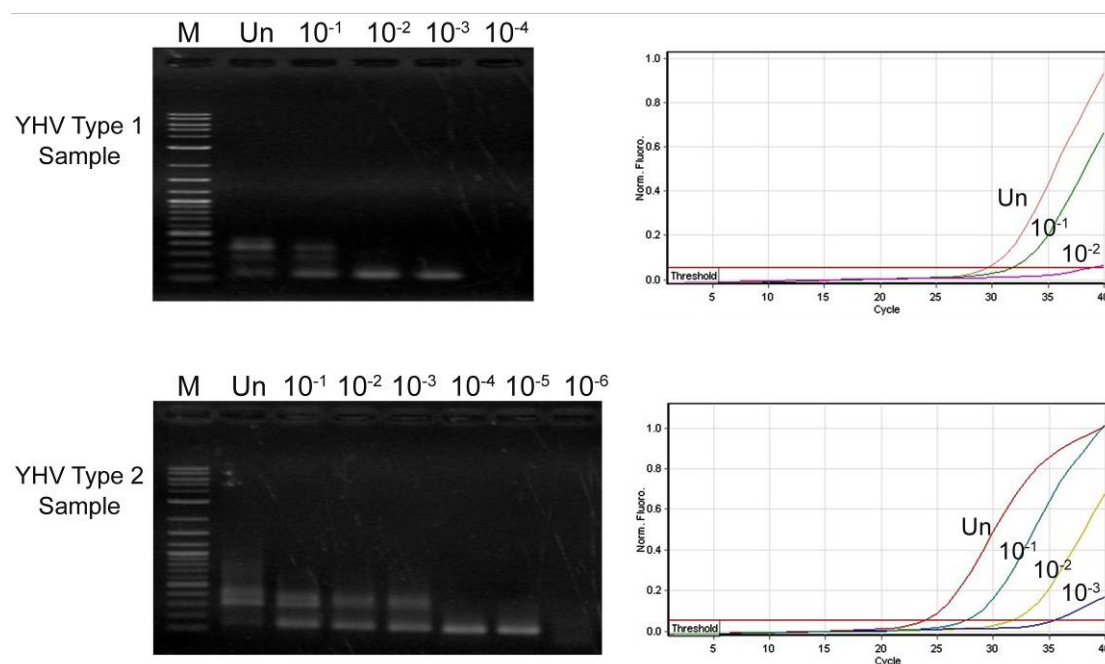
รูปที่ 4.6 การหาค่า Amplification efficiency และ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลี่ยมสายพันธุ์ที่ 6

ตารางที่ 1 Amplification efficiency และ Sensitivity ของการตรวจไวรัสหัวเหลืองแต่ละสายพันธุ์

ไวรัสหัวเหลือง	Amplification efficiency	Sensitivity (copy/reaction)
สายพันธุ์ที่ 1	2.06	10
สายพันธุ์ที่ 2	1.99	10
สายพันธุ์ที่ 3	1.91	10
สายพันธุ์ที่ 4	1.81	1
สายพันธุ์ที่ 5	1.88	10
สายพันธุ์ที่ 6	1.86	100

7. การเปรียบเทียบ Sensitivity ระหว่างวิธี PCR/HRM และ Nested PCR

การทดลองนี้ได้เริ่มตรวจหาไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างกุ้งจริง โดยใช้วิธี PCR/HRM ที่เราพัฒนาขึ้น และทำการเปรียบเทียบ Sensitivity กับวิธี Nested PCR ตามรายงานของ Wijegoonawardane และคณะ (2008) โดยมีการนำ cDNA ของตัวอย่างกุ้งที่ทราบมาก่อนว่าติดไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 2 มาทำการเจือจางทีละ 10 เท่า แล้วใช้ 1 μ l สำหรับการตรวจในแต่ละวิธี ผลการทดลองพบว่าในการตรวจตัวอย่างกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 2 วิธี Nested PCR มี Sensitivity ดีกว่าวิธี PCR/HRM อยู่ 10 และ 100 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 5)

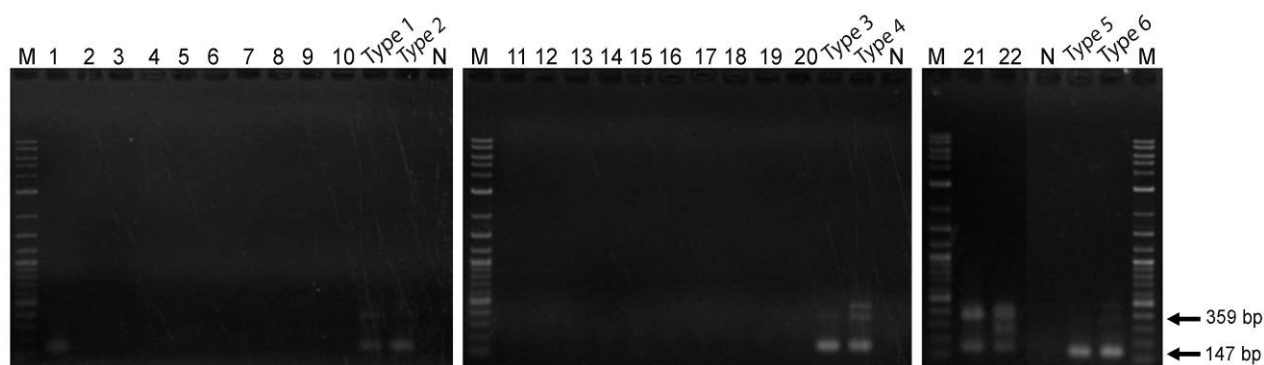


รูปที่ 5 การเปรียบเทียบ Sensitivity ในการตรวจไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 2 ด้วยวิธี PCR/HRM และ Nested PCR, Un คือ cDNA ที่ไม่ได้เจือจาง

8. การหาตรวจหาไวรัสหัวเหลือง

การทดลองนี้ทำการตรวจหาไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างกุ้งจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี Nested PCR (Wijegoonawardane et al 2008) เปรียบเทียบกับวิธี PCR/HRM โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA ของอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งตามวิธีข้างต้น จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้ 1 ul ในการตรวจด้วยวิธีทั้งสอง มีการใช้ Plasmid DNA ที่มีดีเอ็นเอขนาด 147 bp ของไวรัสทั้ง 6 สายพันธุ์เป็น Positive controls ส่วนหลอด Negative control ใส่แทน cDNA

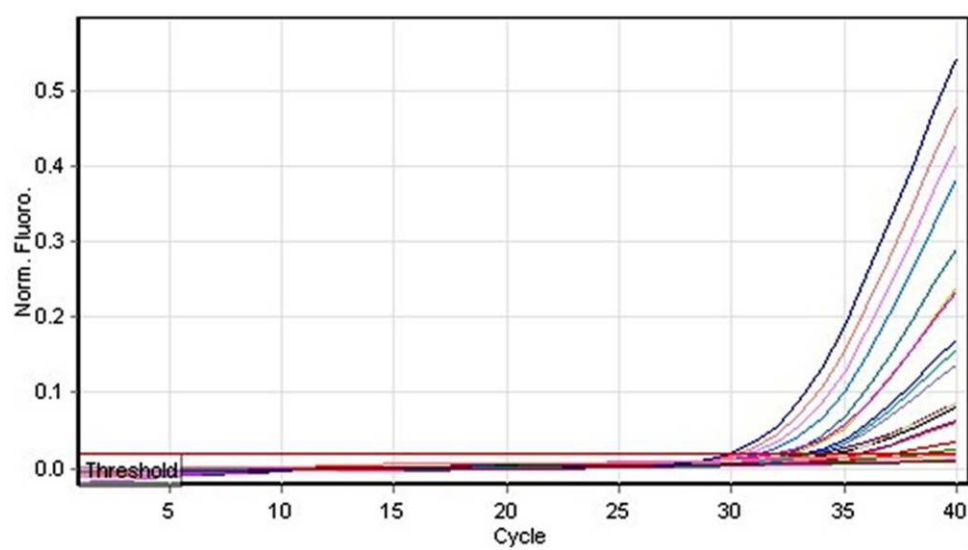
ผลการตรวจด้วยวิธี Nested PCR พบกึ่งติดไวรัสจำนวน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลขที่ 1, 21 และ 22) (รูปที่ 6) ส่วนการตรวจด้วยวิธี PCR/HRM พบกึ่งติดไวรัสจำนวน 19 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบไวรัสหัวเหลืองคือหมายเลข 15, 16 และ 20 ซึ่งมีค่า C_t ต่ำกว่าเส้น Threshold (รูปที่ 7a) มีการตรวจด้วยวิธี Nested PCR ซ้ำ โดยใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR รอบแรกเพิ่มขึ้น จาก 1 ul เป็น 8 ul ในปฏิกิริยา Nested PCR ซึ่งยังให้ผลเช่นเดิม (data not shown) อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธี Nested PCR ก็ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลืองได้ ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองในรูปที่ 7a เป็นแบบ High resolution melt curve แล้วเปรียบเทียบรูปแบบและค่า T_m ของผลผลิตจาก Plasmid DNA ควบคุมของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ ทำให้เราพบว่าจากตัวอย่างกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองจำนวน 19 ตัวอย่างนั้น มีการติดไวรัสหัวเหลืองแบบสายพันธุ์เดียวจำนวน 8 ตัวอย่าง (รูปที่ 7b) และติดไวรัสหัวเหลืองแบบสองสายพันธุ์จำนวน 11 ตัวอย่าง (รูปที่ 7c)



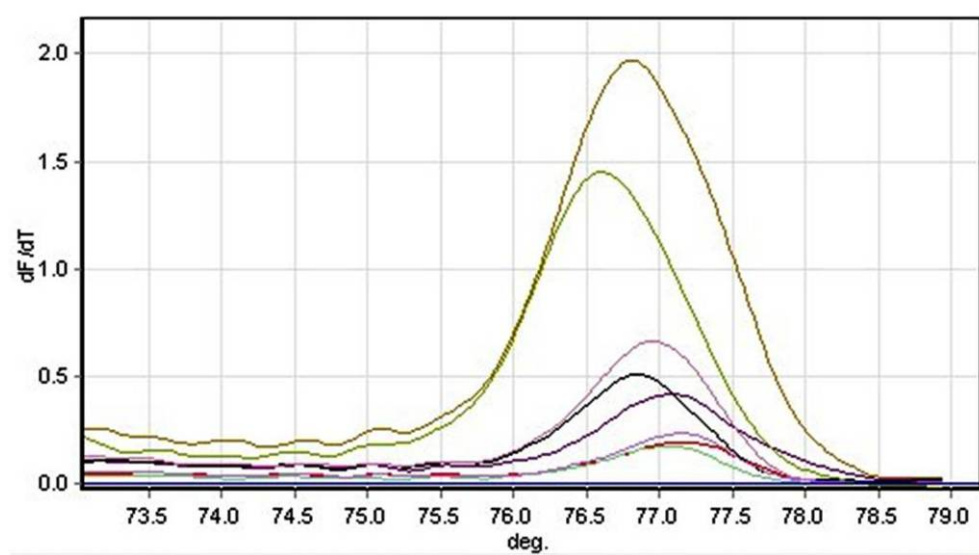
รูปที่ 6 การตรวจหาไวรัสหัวเหลืองจากตัวอย่างกุ้ง ด้วยวิธี Nested PCR

ลูกศรแสดงขนาดของขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากไวรัสหัวเหลือง, Type 1-6 คือ positive control ที่ใส่ cDNA ควบคุมของไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1-6 ตามลำดับ, N คือ negative control โดยใส่น้ำแทนการใส่ดีเอ็นเอ, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (New England Biolabs)

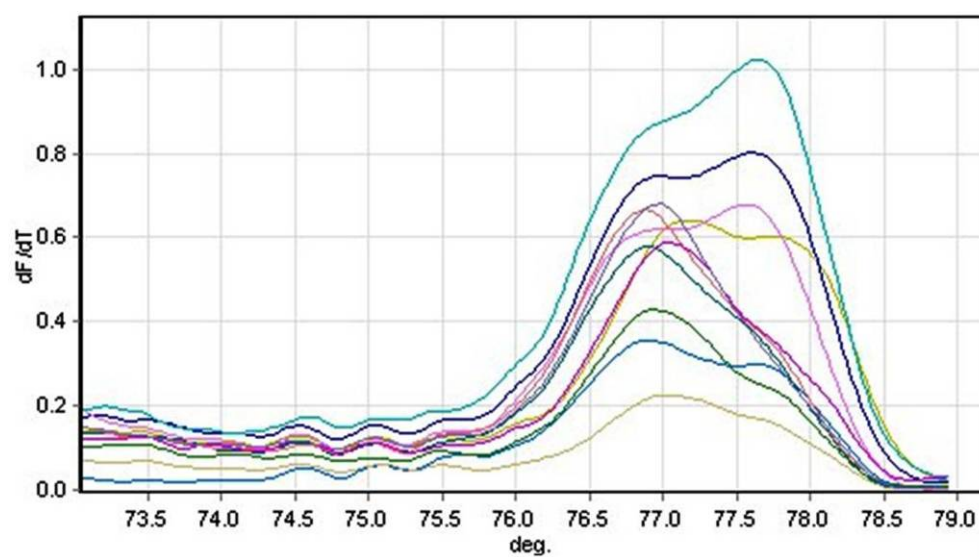
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 7 การตรวจหาไวรัสหัวเหลืองจากตัวอย่างกุ้ง ด้วยวิธี PCR/HRM. (a) Amplification plot ตัวอย่างที่ให้ค่า C_t เกินเส้น Threshold จัดเป็นตัวอย่างที่ติดไวรัสหัวเหลือง (b) High resolution melt curve ของตัวอย่างกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองแบบสายพันธุ์เดียว (c) High resolution melt curve ของตัวอย่างกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองแบบสองสายพันธุ์

9. การอ่านลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอ

ได้มีการทดลองนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR/HRM ของกุ้ง 19 ตัวอย่างไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive cloning vector (Qiagen) และส่ง Recombinant plasmid อย่างละ 3 clones ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) จากนั้นนำผลลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ผลการทดลองพบว่าลำดับเบสของผลผลิตดีเอ็นเอส่วนมากไม่ตรงกับผลที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี PCR/HRM ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 2 นอกจากนี้ผลการอ่านลำดับเบสพบว่าบางตัวอย่างมีไวรัสหัวเหลืองมากกว่า 2 สองพันธุ์แต่การทำ PCR/HRM ไม่สามารถระบุได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ในสภาวะการทดลองที่ได้ทำมานั้น วิธี PCR/HRM สามารถใช้ในการตรวจไวรัสหัวเหลืองได้ แต่ใช้จำแนกสายพันธุ์ไม่ได้

ตารางที่ 2 ผลการตรวจไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 22 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง กุ้ง	Nested PCR	PCR/HRM [Type]	Sequencing results
1	+	+ [Type 4, 6]	Type 2, 3
2	-	+ [Type 5, 6]	Type 1, 2, 3
3	-	+ [Type 4, 5]	Type 4, 5
4	-	+ [Type 4, 6]	Type 2, 5
5	-	+ [Type 4, 5]	Type 1, 5
6	-	+ [Type 4, 5]	Type 1, 5
7	-	+ [Type 4, 6]	Type 4, 5
8	-	+ [Type 4, 6]	Type 5, 6
9	-	+ [Type 4, 6]	Type 3
10	-	+ [Type 4, 5]	Type 4, 5, 6
11	-	+ [Type 3]	Type 3
12	-	+ [Type 4, 5]	Type 5, 6
13	-	+ [Type 4, 5]	Type 3, 5
14	-	+ [Type 4]	Type 4
15	-	-	-

16	-	-	-
17	-	+ [Type 4, 6]	Type 2, 6
18	-	+ [Type 4]	Type 3
19	-	+ [Type 4]	Type 3
20	-	-	-
21	+	+ [Type 4]	Type 2
22	+	+ [Type 2]	Type 1

เอกสารอ้างอิง

Cowley, J.A., Cadogan, L.C., Wongteerasupaya, C., Hodgson, R.A., Boonsaeng, V. and Walker, P.J., 2004. Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. J Virol Methods 117, 49-59.

Gangnonngiw, W., Anantasomboon, G., Sang-oum, W., Sriurairatana, S., Sritunyalucksana, K. and Flegel, T.W., 2009. Non-virulence of a recombinant shrimp nidovirus is associated with its non structural gene sequence and not a large structural gene deletion. Virology 385, 161-168.

Wijegoonawardane, P.K. 2008. Molecular epidemiology of yellow head-complex viruses of cultured prawns in the Asian region, University of Queensland, Brisbane, Australia.

Wijegoonawardane, P.K., Cowley, J.A. and Walker, P.J., 2008. Consensus RT-nested PCR detection of yellow head complex genotypes in penaeid shrimp. J Virol Methods 153, 168-75.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่องคือ

1. Senapin, S., Thaowbut, Y., Gangnonngiw, W., Chuchird, N., Sriurairatana, S., and Flegel, T.W. Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand (2010) J Fish Dis. 33: 421–430 (Impact 2009: 1.697)
2. Senapin, S., Molthathong, S., Phiwsaiya, K., Jaengsanong, C., Chuchird, N. Application of high resolution melt (HRM) analysis for duplex detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in shrimp (2010) Mol Cell Probe. 24: 291-297 (Impact 2009: 1.899)