การพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสโรคดวงขาว (WSSV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

PCR for Detection of White Spot Syndrome (WSSV) in *Penaeus monodon*

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์ [1,2] ปรีดา เลิศวัชระสารกุล[3]
วรวิทย์ วัชชวัลคุ[2,3]
Visanu Boonyawiwat[1,2], Preeda Lertwatcharasarakul[3]
and Worawidh Wajjwalku[2,3]

ABSTRACT

WSSV DNA was extracted from clinical field cases and used as a template for a polymerase chain reaction (PCR). The specific primers set (SMBV1 and SMBV4) for WSSV DNA were designed from a conserved region of the 12.3 kb. Segment of WSSV DNA (AF099142) which gave a 201 bp. of PCR product. The specific primer for shrimp genomic DNA (P16 and P17), used as an internal control for PCR reaction, were designed for *Penaeus monodon* 18S ribosomal RNA gene. This primer set gave a 400 bp. of PCR product. By PCR, infected shrimp gave 201 and 400 bp. Fragments. However, non-infected shrimp gave only a 400 bp. fragment and gave negative result for *Vibrio harveyi* and *Aeromonas hydrophila* DNA. This PCR assay can be used as a tool to solve the false negative problem of PCR technique. It will be useful for the detection of WSSV in post-larvae and broodstock of *P. monodon.*

Key words : PCR, WSSV, *Penaeus monodon*

[1] ภาควิชาอายุรศาสตร์ [2]งานชันสูตรโรคสัตว์กำแพงแสน [3]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

[1] Department of Medicine, [2]Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic Laboratory, [3]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphangsan Campus, Nakornphathom

บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) ที่แยกได้จากกุ้งป่วยในพื้นที่โดยวิธี PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อไวรัสดวงขาว (SMBV1 และ SMBV4) ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บน 12.3 kb. Segment of WSSV DNA (AF099142) ให้ผลผลิต PCR ขนาด 201 เบส และทำการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อกุ้งกุลาดำ (P16 และ P17) เพื่อใช้เป็น Internal control จากบริเวณลำดับอนุรักษ์ในยีน *Penaeus monodon* 18S ribosomal RNA gene ซึ่งให้ผลผลิต PCR ขนาด 400 เบส ทำการทดสอบหาเชื้อไวรัสดวงขาวในตัวอย่างกุ้งโดยใช้ primer ทั้ง 2 ชุดในหลอดทดสอบเดียวกันพบว่า กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวจะให้ผลผลิต PCR ทั้ง 2 ขนาด คือ 201 และ 400 เบส ในขณะที่กุ้งกุลาดำปกติ และกุ้งติดเชื้อไวรัส MBV จะให้ผลผลิต PCR ขนาด 400 เบส เท่านั้น และไม่ให้ผลผลิต PCR กับ เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila* วิธีการ PCR สามารถตรวจสอบการเกิดผลลบเทียมจากเทคนิค PCR และเทคนิคนี้สามารถใช้ในการหาเชื้อไวรัส ดวงขาวในลูกกุ้งกุลาดำ หรือพ่อแม่พันธุ์ได้อย่างได้ผล

คำสำคัญ : มัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ โรคดวงขาว กุ้งกุลาดำ

คำนำ

การวินิจฉัยโรคดวงขาว (White Spot Syndrome) ในกุ้งกุลาดำโดยเทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอกชัน (PCR) เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (วรรณสิกและคณะ, 2540., Takahashi, et al. 1996., Lo, et al. 1996) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ลูกกุ้ง ตรวจหาสัตว์อื่นๆที่เป็นพาหะนำโรค เช่น ปู กุ้งชนิดอื่นๆ (Lo, et al. 1996) และการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ (Supramattaya, et al.1997., Chou, et al.1998) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคดวงขาว อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR ก็อาจมีข้อผิดพลาดในการตรวจที่อาจจะเกิดขึ้นได้แก่ ผลบวกเทียม (false-positive) ซึ่งเกิดขึ้นได้ง่ายจากการปนเปื้อนโดยไม่ได้ตั้งใจ เนื่องจากวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก ในทางกลับกันการเกิดผลลบเทียม (false-negative) แม้จะเกิดขึ้นได้ยากกว่า แต่ก็สามารถเกิดขึ้นได้จากสาเหตุต่างๆ เหล่านี้ได้แก่ ปริมาณตัวอย่างไม่เพียงพอ การคงค้างของสารยับยั้งปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอในตัวอย่าง เป็นต้น (Griffin, et al. 1994) ความผิดพลาดในการเกิดผลลบเทียมเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้นอย่างยิ่งในการตรวจสอบการติดเชื้อในลูกกุ้ง และพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ เนื่องจากจะทำให้เชื้อไวรัสดวงขาวแพร่กระจายออกไปจากตัวอย่างที่ติดเชื้อแต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้จากความผิดพลาดทางเทคนิคการตรวจ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสดวงขาว และการออกแบบ Internal control primer ที่จำเพาะต่อ 18s ribosomal RNA ของกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นการตรวจสอบผลลบเทียมที่อาจเกิดขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อดวงขาว

ออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของโรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (SMBV1 และ SMBV4) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บน 12.3 kb. Segment of WSSV DNA (AF099142) (van Hulten et al, 2000) นำมาทดสอบกับดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวที่แยกได้จากกุ้งป่วยในพื้นที่ด้วยวิธี PCR จากการทดลองพบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาด 201 เบส ต่อมาได้ทำการโคลนผลผลิต PCR ดังกล่าวลงในพลาสมิด pCR II (Invitrogen) และเพิ่มจำนวนในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Autosequencing ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บน 12.3 kb. Segment of WSSV DNA (AF099142)

การออกแบบไพร์เมอร์ ที่จำเพาะต่อกุ้งกุลาดำ

ทำการค้นหาลำดับอนุรักษ์ของ *Penaeus monodon* 18s ribosomal RNA gene จาก Gene Bank และทำการออกแบบ primer 1 คู่ที่มีลำดับเบสดังนี้คือ p16: 5'TAG CCT GCC CAC TGA ATT ATT3' และ p17: 5'GAC TCT CAA ACG AAG ATT ACG3' ซึ่งให้ผลผลิต PCR ขนาด 400 เบสกับดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำ

การตรวจสอบไวรัสดวงขาวโดยใช้เนื้อเยื่อของกุ้งขนาดใหญ่ และลูกกุ้ง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำขนาดใหญ่ และลูกกุ้งกุลาดำถูกเก็บไว้ในเอธิลอัลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 70 % ทำการสกัด DNA ของไวรัสโดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก วรรณสิกาและคณะ (2540) โดยกุ้งขนาดใหญ่ใช้ส่วนของซี่เหงือกหรือขาว่ายน้ำ และใช้ลูกกุ้งทั้งตัว เพื่อสกัดดีเอ็นเอ มีขั้นตอนการทำดังนี้ นำตัวอย่างซี่เหงือกหรือขาว่ายน้ำของกุ้งใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 cc. โดยให้มีปริมาตร 0.1 cc. หรือลูกกุ้งพี 13-15 ทั้งตัวจำนวน 20–30 ตัว เปิดฝาหลอดทิ้งไว้ซักครู่ให้แอลกอฮอล์ระเหยออกหมด เติมสารละลาย 0.05 N NaOH และ 0.025% SDS อย่างละ 100 µl บดตัวอย่างกุ้งให้ละเอียด แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที เติม chloroform จำนวน 100 µl และ TE บัฟเฟอร์ จำนวน 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วย microcentrifuge 14,000 รอบ 1 นาที สารละลายส่วนใสใช้เป็น DNA template ต่อไป ใน PCR cocktail 90 µl. ประกอบด้วย dNTP 200 µM, 1 x PCR buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01 % (w/v) gelatin)

tagcctgccc	actgaattat	ttttaaaggg	ccgcggtata	ctgaccgtgc	gaaggtagca	60
taatcattag	tcttttaatt	gaaggcttgt	atgaatggtt	ggacaaaaag	taatctgtct	120
cagttataat	agttgaactt	aacttttaag	tgaaaaggct	taaatacttt	aaggggacga	180
taagacccta	taaaacttaa	caataatttg	attaaattat	aaattgttag	tataacttga	240
ttttaattaa	tgtttgttgc	gttggggcga	cgggaatata	attagtaact	gttcttaaat	300
attttattaa	caagtataat	tgaagaataa	ttgatccttt	attaaagatt	aaaagattaa	360
gttactttag	ggataacagc	gtaatcttcg	tttgagagtc	ctcatcgaca	agaaggtttg	420
cgacctcgat	gttgaattaa	ggtatcctta	taatgcagca	gttataaagg	a	471

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ *Penaeus monodon* 18S ribosomal RNA gene

primer SMBV1, SMBV4, p16 และ p17 จำนวนชนิดละ 1 μM และเอมไซม์ *Taq* polymerase 2 U นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 94°C 5 นาที 30 รอบของ 94°C 30 วินาที, 55 °C 30 วินาที, 72°C 30 วินาที และในรอบสุดท้ายต่อด้วย 72°C 5 นาที ผลผลิต PCR นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5 % agarose gel ย้อมสีดีเอ็นเอ ด้วย ethidium bromide

การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์

ทดสอบความจำเพาะของ primer ทั้ง 2 ชุดที่สังเคราะห์ขึ้นโดยการทดสอบด้วยวิธี PCR กับพลาสมิด pCR II ที่มีโคลนของ DNA ของไวัส ดวงขาวเชื่อมอยู่ (pCR KU 201) ดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส ดวงขาว ไวรัส MBV กุ้งกุลาดำที่ปลอดเชื้อ เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila*

การทดสอบความไวในการตรวจสอบ DNA ของไวรัสดวงขาว

นำพลาสมิด pCR KU 201 มาผสมกับ DNA ที่สกัดจากตัวกุ้งในลักษณะ 10 fold dilution โดยให้มีความเข้มข้นของพลาสมิดในตัวอย่างเท่ากับ 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 pg/ml ตามลำดับ ทดสอบด้วยวิธี PCR กับ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อดวงขาวที่ออกแบบขึ้นใหม่

การทดสอบการติดเชื้อในลูกกุ้งกุลาดำ

ตรวจสอบลูกกุ้งที่เกษตรกรนำมาส่งตรวจ ณ โรงพยาบาลสัตว์กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ระหว่างเดือนมกราคม–ธันวาคม พ.ศ. 2542

ผล

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer

จากการทดสอบได้ผลผลิต PCR ขนาด 201 เบส และ 400 เบส กับดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว ผลผลิต PCR ขนาด 400 เบส กับดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส MBV และกุ้งกุลาดำปกติ และไม่ให้ผลผลิต PCR ต่อดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila* ดังรูปที่ 2

ผลการทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาว

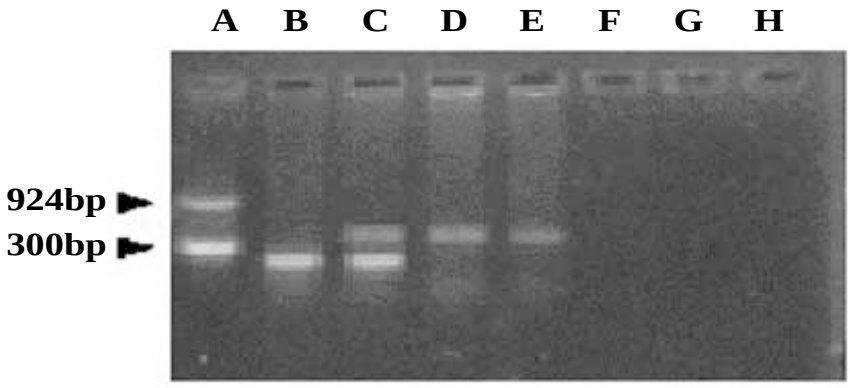
primer ที่ออกแบบขึ้นสามารถตรวจหา ดีเอ็นเอของไวรัสได้ในระดับ 0.1 pg ดังรูปที่ 3

ผลการตรวจสอบการติดเชื้อในลูกกุ้งกุลาดำ

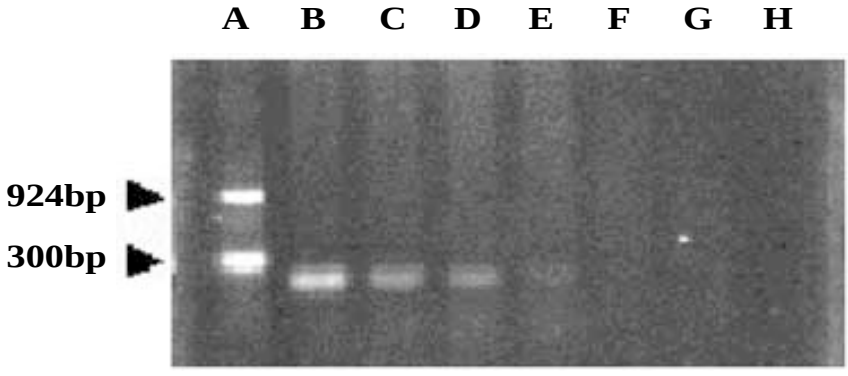
ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสดวงขาวของลูกกุ้งกุลาดำในช่วงเดือนต่างๆ ของปีพ.ศ. 2542 มีผลดังตารางที่ 1

วิจารณ์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของไวรัสโดยไม่ต้องแยกไวรัสให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว และลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษ เช่น ฟีนอล ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อม วิธีการดังกล่าวสามารถใช้ได้กับการตรวจ PCR ได้อย่างดีโดยเกิดผล false negative จากความไม่เหมาะสมของดีเอนเอต้นแบบเพียงเล็กน้อย การ



รูปที่ 2 แสดงความจำเพาะของ primer ช่อง A = Marker, ช่อง B = พลาสมิด pCR KU 201, ช่อง C = กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว, ช่องที่ D = กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส MBV, ช่อง E = กุ้งกุลาดำปกติ, ช่อง F = เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*, ช่อง G = *Aeromonas hydrophila,* ช่อง H = negative control



รูปที่ 3 แสดงความไวของ primer ชุดใหม่ในการตรวจสอบไวรัสดวงขาว ช่อง A = marker, ช่อง B-G = 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 pg, ช่อง H = negative control

ศึกษานี้ primer ที่ออกแบบขึ้นสามารถให้ผลผลิต PCR ขนาด 201 และ 400 เบส ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาว และ 18S ribosomal RNA ของกุ้งตามลำดับ primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวสามารถตรวจไวรัสได้ในระดับ 0.1 pg/ml และ primer ที่จำเพาะต่อ 18S ribosomal RNA ของกุ้ง *P. monodon* สามารถใช้เป็น Internal control ที่ดีสำหรับการตรวจสอบเชื้อไวรัสดวงขาวในกุ้งกลาดำ ทำให้สามารถทราบว่าเกิดความผิดพลาดชนิดผลลบเทียมขึ้นในการตรวจสอบหรือไม่ และทำการทดสอบซ้ำเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่เที่ยงตรงแน่นอน

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจโรคไวรัสดวงขาวของลูกกุ้งกุลาดำในช่วงเดือนต่างๆ ของปีพ.ศ. 2542

เดือน	จำนวนลูกกุ้งที่รับการตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวนลูกกุ้งที่ตรวจพบเชื้อ (ตัวอย่าง)	เปอร์เซนต์การติดเชื้อ
มกราคม	8	3	37.5
กุมภาพันธ์	14	5	35.7
มีนาคม	10	1	10.0
เมษายน	11	2	18.2
พฤษภาคม	34	2	5.9
มิถุนายน	33	6	18.2
กรกฎาคม	59	3	5.1
สิงหาคม	43	1	2.3
กันยายน	37	1	2.7
ตุลาคม	29	4	13.8
พฤศจิกายน	34	17	50.0
ธันวาคม	50	30	60.0
รวม	362	75	20.5

จากการตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ พบว่าช่วงเดือนกรกฎาคม – กันยายน ลูกกุ้งมีอัตราการติดเชื้อน้อยที่สุดคืออยู่ระหว่าง 2.3 – 5.1 % และช่วงเวลาที่มีการติดเชื้อมากที่สุดอยู่ในช่วงเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม โดยมีอัตราการติดเชื้ออยู่ที่ 50 – 60 % ของลูกกุ้งที่เข้ารับการตรวจ

เอกสารอ้างอิง

วรรณสิกา ทองเชื้อ. 2540. การพัฒนาชุดตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. สัมมนาวิชาการเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 133 หน้า

Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.F. Lo and G.H. Kou. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture 164: 263-276

Griffin, H.G. and A.M. Griffin. 1994. PCR Technology current Innovations. CRC Press, Inc. 370 p

Van Hulten, M. C.W., M.F. Tsai. C.A. Schipper., C.F. Lo., G.H. Kou and J.M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. J. Gen. Virol. 81: 307-316

Lo C.F., C.H. Ho., S.E. Peng., C.H. Chen., H.C. Hsu., Y.L. Chin., C.F. Chang., K.F. Liu., M.S. Su., C.H. Wang and G.H. Kou. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. of Aquat. Org. 27: 215-225

Lo C.F., J.H. Leu., C.H. Ho., C.H. Chen., S.E. Peng., Y.T. Chen., C.M. Chou., P.Y. Yen., C.J. Huang., H.Y. Chou., C.H. Wang and G.H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis. of Aquat. Org. 25: 133-141

Takahashi Y., T. Itami., M. Maeda., N. Suzuki., J. Kasornnchandra., K. Supamattaya., R. Khongpradit. S. Boonyaratpalin., M. Kondo., K. Kawai., R. Kusada., I. Hirono and T. Aoki. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and Systemic ectodermal and messodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Peneaus monodon Fabricius*. J. of Fish. Dis. 19: *399-403*