RESEARCH ARTICLE

Single Nucleotide Polymorphisms on ORF125 Tandem Repetitive DNA Sequences of Shrimp White Spot Syndrome Virus in Thailand

Visanu Boonyawiwat[1,2,3], Jinpanee Na nakorn[2,3], T.W. Flegel[4], Pornlerd Chanratchakool[5], Worawidh Wajjwalku[1*]

Abstract

Objective — To develop single nucleotide polymorphisms (SNPs) marker on ORF125 tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) for further use in epidemiological study.

Materials and Methods — We used 4 samples of WSSV DNA extracts (1 from Surat Thani, 2 from Nakorn Pathom, and 1 from Phuket). PCR products of WSSV DNA on ORF125 tandem repetitive DNA sequences were amplified by previously reported primers (ORF125F and R); then, the products were measured and sequenced. The repeat units and SNPs of the DNA samples were compared with the three complete WSSV genomes from GenBank by using Tandem Repeat Finder (TRF), BLAST, and ClustalW programs.

Results — Numbers of repeated units of 69 bp tandem repetitive DNA of samples (1 form Surat Thani, 2 form Nakorn Pathom and 1 from Phuket) were 5, 7, 7 and 6 repeat units, respectively. SNPs were found at the positions 2, 9, 50, 53, and 61 bases.

Conclusion — The ORF125 minisattelite marker could be used for genotyping WSSV among different geographical regions, and SNPs could be used for categorizing the virus into subgenotype levels.

KKU Vet J. 2009;19(2):139-149 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords : Single nucleotide polymorphisms (SNPs); Tandem repetitive DNA sequences; ORF125; White spot syndrome virus; Shrimp

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphang Saen Campus, Nakorn Pathom, Thailand 73140

[2]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphang Saen Campus, Nakorn Pathom, Thailand 73140

[3]Center for Agricultural Biotechnology (AG-Bio/PERDO-CHE)

[4]Centex Shrimp, Chalerm Prakiat Building, Faculty of science, Mahidol University, Rama 6, Bangkok, Thailand

[5]Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Bangkaen, Bangkok, Thailand

*__Corresponding author__ E-mail: fvetwww@ku.ac.th

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนลำดับดีเอ็นเอที่มีการซ้ำเป็นชุด ๆบนตำแหน่งของ ORF125 ของไวรัสดวงขาวในกุ้ง ในประเทศไทย

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์[1,2,3], จินตภาณี ณ นคร[2,3], ที ดับเบิลยู ฟรีเกล[4], พรเลิศ จันทร์รัชชกุล[5], วรวิทย์ วัชชวัลคุ[1*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมแบบ SNPs ที่ปรากฏบน minisatellite บนจีโนมของไวรัสดวงขาวในตำแหน่งของ ORF125 เพื่อใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ใช้ตัวอย่างในการศึกษาจำนวน 4 ตัวอย่าง (จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี 1 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 2 ตัวอย่าง และจังหวัดภูเก็ต 1 ตัวอย่าง) ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวในตำแหน่งของ ORF125 ด้วยไพร์เมอร์ที่มีการรายงานมาก่อน (ORF125F และ R) วัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้และนำไปหาลำดับเบส เปรียบเทียบจำนวนซ้ำของ tandem repeat และตำแหน่ง SNPs กับลำดับเบสอ้างอิงของไวรัสดวงขาวที่มีการรายงานบน GenBank ด้วยโปรแกรม Tandem Repeat Finder (TRF), BLAST และ ClustalW

ผลการศึกษา จำนวนซ้ำของ tandem repeat ที่มีความยาว 69 เบสบนตำแหน่ง ORF125 ของไวรัสดวงขาวที่พบในตัวอย่างจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครปฐมทั้งสองตัวอย่าง และภูเก็ต มีจำนวนเท่ากับ 5, 7, 7 และ 6 ซ้ำ ตามลำดับ และพบ SNPs ที่ตำแหน่งเบสที่ 2, 9, 50, 53 และ 61 ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ซ้ำเป็นชุด

ข้อสรุป ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า minisatellite marker บนตำแหน่ง ORF125 สามารถใช้จำแนกจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสดวงขาวที่มีการระบาดในกุ้งต่างพื้นที่กัน และ SNPs บนตำแหน่งนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างระดับซับจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสดังกล่าวได้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(2):139-149 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) ลำดับดีเอ็นเอที่มีการซ้ำเป็นชุด ORF125 ไวรัสดวงขาว กุ้ง

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
[2]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
[3]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
[4]หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง อาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพ
[5]สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ
*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: fvetwww@ku.ac.th

บทนำ

โรคดวงขาว (white spot disease, WSD) ในกุ้งมีสาเหตุจากไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ซึ่งก่อโรคในกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทุกชนิด [1] นอกจากนั้นไวรัสนี้ยังสามารถติดต่อเข้าสู่กุ้งธรรมชาติทั้งในตระกูล penaeidae และ caridean หลายชนิด [2,3] กุ้งลอปสเตอร์ [4] crayfish [5] ปู [6,7] non-decapod crustacean [8] และ polychaete worms [9] ในปัจจุบันโรคติดเชื้อไวรัสชนิดนี้นับว่าเป็นไวรัสที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตการเลี้ยงกุ้งมากที่สุด [10] ไวรัสดวงขาวเป็นไวรัสที่มีรูปร่างแบบแท่ง มีเปลือกหุ้ม มีความกว้างระหว่าง 70 - 167 นาโนเมตร และยาวระหว่าง 210 - 380 นาโนเมตร [11] นอกจากนั้นยังมีรยางค์คล้ายหางที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสชนิดนี้ [12] ไวรัสดวงขาวมีสารพันธุกรรมเป็นแบบ double stranded DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันตามแต่แหล่งที่แยกเชื้อนั้นได้ โดยไวรัสดวงขาวที่แยกได้จากประเทศไต้หวัน ประเทศไทย และประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน มีขนาดเท่ากับ 307, 293 และ 305 กิโลเบส ตามลำดับ จากการศึกษาจีโนมของไวรัสทำให้เราทราบว่าโปรตีนของไวรัส เช่น DNA polymerase และโปรตีนโครงสร้างของไวรัสดวงขาวไม่เหมือนกับไวรัสในกลุ่ม baculovirus และไม่เหมือนกับไวรัสที่เคยตรวจพบมาก่อน จากการจัดจำแนกชนิดของไวรัสโดย International Committee on taxonomy of Viruses (ICTV) จึงได้จัดให้ไวรัสดวงขาวอยู่ในวงศ์ (family) ใหม่คือ Nimaviridae และสกุล (genus) Whispovirus [13]

ในช่วงแรกของการศึกษาเปรียบเทียบจีโนมของไวรัสดวงขาวพบว่าไวรัสดวงขาวที่แยกได้จากต่างสถานที่หรือต่างชนิดของเจ้าบ้านนั้น มีความคล้ายคลึงกันอย่างมากและยากที่จะแยกความแตกต่างได้ [14] ภายหลังจากที่มีการรายงานของลำดับเบสที่สมบูรณ์ของไวรัสดวงขาวที่แยกได้จากต่างสถานที่กันคือ ประเทศไต้หวัน (AF332093; [15]) ประเทศไทย (AF369029; [16]) และประเทศจีน (AF440570; [17]) ทำให้ทราบว่ามีความแตกต่างอยู่ 5 จุดสำคัญระหว่างจีโนมของไวรัสเหล่านั้น ซึ่งประกอบไปด้วย การหายไปของชิ้นส่วนขนาดประมาณ 13.2 และ1.2 กิโลเบสของจีโนมของไวรัสที่แยกได้จาก ประเทศไทย และประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนมของไวรัสที่แยกได้จากไต้หวัน การปรากฏขึ้นของ variable region ที่มีแนวโน้มจะทำให้เกิดการ recombination และ transposase เฉพาะบนจีโนมของไวรัสที่แยกจากไต้หวัน ความแตกต่างกันของจำนวน tandem repeats ลักษณะของ single nucleotide indels และ single nucleotide polymorphisms (SNPs) [18]

จากการศึกษาการขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ major variable region ORF23/24 และ minor variable region ORF14/15 ในประเทศเวียดนาม ทำให้เราทราบว่าไวรัสดวงขาวที่พบในประเทศไทยและประเทศเวียดนามมีความสัมพันธ์กันมาก และเป็นไวรัสสายพันธุ์ที่แพร่มาจากบรรพบุรุษเดียวกันคือจากประเทศไต้หวันและสาธารณรัฐประชาชนจีน [19] ความแตกต่างของจำนวน tandem repeat บนตำแหน่งของ ORF94 ORF75 และ ORF125 และ SNPs บนตำแหน่งเหล่านั้น

ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด minisatellite ในการศึกษาแยกจีโนไทป์ของไวรัสดวงขาวที่พบในประเทศเวียดนาม และ อินเดีย [19-21] ในขณะที่ไวรัสที่แยกได้จากประเทศไทยมีเพียงการศึกษาจำแนกจีโนไทป์ของไวรัสดวงขาวด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด minisatellite และ SNPs บนตำแหน่งของ ORF94 เท่านั้น [22]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ หาตำแหน่ง SNPs ที่ปรากฏบนเครื่องหมายพันธุกรรมแบบ minisatellite บนจีโนมของไวรัสดวงขาวในตำแหน่งของ ORF125 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาจีโนไทป์ของไวรัสดวงขาวในประเทศไทยต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่างไวรัส

ตัวอย่างไวรัสดวงขาวที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบไปด้วย ตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวจำนวน 1 ตัวอย่างที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในปี พ.ศ. 2543 ได้รับมาจาก ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ ตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว ที่เก็บได้จากจังหวัดนครปฐมจำนวน 2 ตัวอย่างในปี พ.ศ. 2542 และอีกหนึ่งตัวอย่างที่เก็บได้จากจังหวัดภูเก็ตในปี พ.ศ. 2548 เหงือกของตัวอย่างกุ้งป่วยใกล้ตายจะถูกตัดและเก็บรักษาไว้ใน 95เปอร์เซ็นต์ อัลกอฮอล์ และนำส่งห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาไว้ที่ -20 ˚C จนกว่าจะใช้

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ตามวิธีของ Lo และคณะ [6] ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เหงือกกุ้งน้ำหนักประมาณ 100-200 mg บดด้วยแท่งแก้วใน 1.5 ml microfuge tube ที่เติมด้วย lysis solution จำนวน 600 µl (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH8, 25 mM EDTA , 2% SDS, และเติม 0.5 mg/ml proteinase K ก่อนใช้) หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 65˚C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมด้วย 5 M NaCl จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.7 M จากนั้นเติม 10% CTAB ใน 0.7M NaCl ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรตัวอย่างแล้วบ่มไว้ที่ 65 ˚C นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24/1) ปริมาตรเท่าตัวอย่างและผสมให้เข้ากันเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 g นาน 5 นาที แล้วถ่ายส่วนใสด้านบนไปสู่ 1.5 ml microfuge tube ใหม่ ทำการสกัดต่อด้วย phenol จำนวน 1 หรือ 2 ครั้ง ถ่ายส่วนใสด้านบนไปสู่ 1.5 ml microfuge tube ใหม่ แล้วเติมด้วย chloroform/isoamyl alcohol (24/1) จำนวน 2 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 g นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนถ่ายไปสู่ 1.5 ml microfuge tube ใหม่แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่างแล้วนำไปแช่ที่ -20 ˚C นาน 30 นาทีจากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นที่ 13,000 g นาน 30 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 100 µl แล้วนำไปอุ่นที่ 65 ˚C นาน 15 นาที เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่ -20 ˚C จนกว่าจะใช้

การตรวจหาดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ไพร์เมอร์คู่ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ว่ากุ้งตัวอย่างที่เก็บได้นั้นเป็นกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวและไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ flanking regions ของ tandem repeat บนตำแหน่งของ ORF125 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาจากรายงานการตีพิมพ์ซึ่งมีการยืนยันถึงความสำเร็จในการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาก่อน ดังแสดงใน **Table 1**

Table 1. List of Primers Used for PCR Analysis for Detecting WSSV and Genotyping Study

Primers specific for	Primer	Sequence (5'-3')	References
WSSV	W201F	CAAGGACT(CT)TGCACTAGACAA	Boonyawiwat *et al.* (2000) [23]
W201R		GAGGAGGTACATCCACTGTT	
ORF125	ORF125F	TGGAAACAGAGTGAGGGTCA	Pradeep *et al.* (2008) [21]
	ORF125R	CATGTCGACTATACGTTGAATCC	

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสซึ่งใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสดวงขาวของตัวอย่างกุ้งประกอบด้วย 10Xbuffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3] 1.5 mM $MgCl_2$ 50 mM KCl) 200 uM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs mixture) 2.5U Fhusion TaqDNA polymerase (FINNZYMES®) 1 μM primers (W201F และ W201R) และดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด ปฏิกิริยาดำเนินไปด้วยเครื่อง DNA Engine DYAD (MJ Research) thermo cycler อุณหภูมิที่ใช้ในการหมุนเวียนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสดังนี้ อุณหภูมิแยกสายดีเอ็นเอที่ 95˚C 5 นาที ต่อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 35 รอบ ของ 95 ˚C นาน 30 วินาที 55˚C นาน 30 วินาที และ 72˚C นาน 30 วินาที โดยมีอุณหภูมิเพิ่มสายดีเอ็นเอสุดท้ายที่ 72˚C นาน 10 นาที ตรวจหาดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5% agarose gel ในสารละลาย 1XTBE และย้อมด้วย ethidium bromide 0.05% และตรวจด้วย UV illuminator

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสซึ่งใช้ในการแยกจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสดวงขาวคล้ายกับปฏิกิริยาด้านบนเพียงแต่ใช้ไพร์เมอร์ ORF125F และ ORF125R แทน และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมุนเวียนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสดังนี้ อุณหภูมิแยกสายดีเอ็นเอที่ 95 ˚C 5 นาที ต่อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 35 รอบ ของ 95 ˚C นาน 30 วินาที 60 ˚C นาน 30 วินาที และ 72 ˚C นาน 30 วินาที โดยมีอุณหภูมิเพิ่มสายดีเอ็นเอสุดท้ายที่ 72 ˚C นาน 10 นาที ตรวจหาดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5% agarose gel (Nusieve 3:1) ในสารละลาย 1XTBE และย้อมด้วย ethidium bromide 0.05% และตรวจและบันทึกภาพด้วย gel document system (AlphaDigidoc®) ทำการวัดขนาดของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป AlphaEase®FC version 6.0 software จำนวน repeat units ของ tandem repeat ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส คำนวณได้จากสูตร amplicon size - (44 +14+3)]/69

สกัดดีเอ็นเอจาก agarose gels ด้วย Nucleospin quick Gel Extration Kit (Nucleospin®) และหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยวิธี ABI Prism® BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystem) ลำดับเบสที่อ่านได้ถูกนำมาตรวจสอบหาการปรากฏของ tandem repeat ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Tandem Repeats Finder (TRF) [24] และเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่าง กับลำดับเบสอ้างอิงของดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวที่มีการรายงานใน GenBank (AF332093 AF369029 และAF440570) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ ClustalW

ผลการศึกษา

ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสของตัวอย่างทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกันอย่างมากกับลำดับเบสของดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวที่มีการรายงานใน GenBank โดยทุกตัวอย่างมีค่า maximum identity เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์กับลำดับเบสอ้างอิงทั้งสาม จำนวนซ้ำของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (tandem repeat) ที่มีความยาวเท่ากับ 69 เบสที่ปรากฏบนดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวที่ตำแหน่งของ ORF125 ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บได้จากสุราษฎร์ธานี (ST) นครปฐม (NP1 และ NP2) และภูเก็ต (PK) มีจำนวนเท่ากับ 5 7 7 และ 6 ซ้ำ ตามลำดับ ในขณะที่ดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวอ้างอิงทั้งสามคือ AF332093 AF369029 และAF440570 มีจำนวนซ้ำเท่ากับ 8 6 และ 8 ซ้ำตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่นำมาศึกษาทั้งหมดจะสามารถพบ SNPs ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2 9 50 53 และ 61 ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันเป็นชุดๆที่มีขนาด 69 เบส รายละเอียดของจำนวนซ้ำ และตำแหน่งที่เกิด SNPs ในตัวอย่างดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับลำดับเบสบนดีเอ็นเออ้างอิงทั้งสามดังแสดงใน **Figure 1**

Figure 1. Comparison of Nucleotide Sequence of Our Samples with Three Complete Genome Sequences (AF332093, AF440570 and AF369069) at ORF125 Loci

```
AF440570    TGGAAACAGA GTGAGGGTCA ACCACACAGC CATCAGTGAA AAGC
AF332093    .......... .......... .......... .......... ....
NP1         ********** ********** ********** ********** *...
NP2         ********** ********** ********** ********** ....
AF369029    .......... .......... .......... .......... ....
PK          ********** ********** ********** ********** *...
ST          ********** ********** ********** *********. ....
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    AGAACAAGGA GGAAGAAGAC GCGAGGATAA AGCGTGTAGC CGTCAGGACA TTTACAGCCA TCAGAGAAA AGC
AF332093    .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......... ...
NP1         .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......... ...
NP2         .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......... ...
AF369029    .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......... ...
PK          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......... ...
ST          .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......... ...
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    AGAACAAGGA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTGCAGT CGACATGGCT GTCGCAGCCA TCAACGAAA
AF332093    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP1         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP2         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
AF369029    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
PK          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
ST          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    AGAACAAGGA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTGCAGT CGACATGGCT GTCGCAGCCA TCAACGAAA
AF332093    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP1         .T........ .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP2         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
AF369029    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
PK          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
ST          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    AGAACAAGGA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTGCAGT CGACATGGCT GTCGCAGCCA TCAACGAAA
AF332093    .T........ .......... .......... .......... .........G ..T....... .........
NP1         .T........ .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP2         .T........ .......... .......... .......... .......... .......... .........
AF369029    .T........ .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
PK          .T........ .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
ST          ........A. .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    AGAACAAGGA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTGCAGT CGACATGGCT GTCGCAGCCA TCAACGAAA
AF332093    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP1         .T........ .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
NP2         .T........ .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
AF369029    ........A. .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
PK          ........A. .......... .......... .......... .........G ..T....... C........
ST          ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    ATAACAAGGA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTGCAGT CGACATGGCG GTTGCAGCCA CCAACGAAA
AF332093    .......... .......... .......... .......... .......... .......... T........
NP1         .G......A. .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP2         .G......A. .......... .......... .......... .......... .......... .........
AF369029    ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
PK          ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
ST          ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
                     10         20         30         40         50         60        69
AF440570    AGAACAAGAA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTGCAGT CGACATGGCG GTTGCAGCCA CCAACGAAA
AF332093    .T......G. .......... .......... .......... .......... .......... .........
NP1         ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
NP2         ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
AF369029    ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
PK          ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
ST          ********** ********** ********** ********** ********** ********** *********
                     10         20         30         40         50         60         70         80
AF440570    AGAACAAGAA GGAAGAAGAC GCGAGGATCA AGCGTATAAT TGACTTGACT GTTGATATGA GGATTCAACG TATAGTCGAC ATG
AF332093    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...
NP1         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...
NP2         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...
AF369029    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...
PK          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...
ST          .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...
```

1st RU
2nd RU
3rd RU
4th RU
5th RU
6th RU
7th RU
8th RU

The SNP positions are present at position 2, 9, 50, 53 and 61 bp of 69 bps tandem repeat units. Primer binding sites are underlined. Sample locations indicate by; NP = Nakhon Pathom, ST = Surat Thani, PK = Phuket. Dots and asterisks indicate identical and disappear bases, respectively.

วิจารณ์

พบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันเป็นชุดที่มีความยาวขนาด 69 เบสบนตำแหน่ง ORF125 ของไวรัสดวงขาวที่แยกได้ในประเทศไทย เช่นเดียวกับตัวอย่างไวรัสดวงขาวที่พบในประเทศอินเดีย และประเทศเวียดนาม โดยสามารถพบความแตกต่างของจีโนไทป์ได้ 3 แบบจากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ในขณะที่การศึกษาในอินเดียสามารถจำแนกจีโนไทป์ของไวรัสดวงขาวจากเครื่องหมายพันธุกรรมเดียวกันนี้ได้ 11 จีโนไทป์จากตัวอย่างทั้งหมด 99 ตัวอย่าง [21] และพบลักษณะจีโนไทป์ที่แตกต่างกันนี้จำนวน 3 แบบจากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 6 ตัวอย่างที่ทำการศึกษาในประเทศเวียดนาม [19] ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบ microsattelite ในตำแหน่ง ORF125 นี้สามารถใช้ในการศึกษาจำแนกจีโนไทป์ของไวรัสดวงขาวได้ดีเช่นเดียวกับเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดเดียวกันนี้ที่พบในตำแหน่ง ORF94 บนดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวซึ่งมีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ [22]

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของไวรัสดวงขาวที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อและลำดับเบสอ้างอิงทั้งสามที่มีการรายงานบน GenBank เราสามารถพบการเกิด SNPs บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันเป็นชุดตั้งแต่ในชุดที่ 3 ถึงชุดที่ 7 จำนวน 5 จุดคือในตำแหน่งที่ 2 9 50 53 และ 61 ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 69 เบสที่ซ้ำกันเป็นชุด ในกรณีของตัวอย่างไวรัสที่เก็บได้จากจังหวัดนครปฐมในปี พ.ศ. 2542 ทั้งสองตัวอย่างมีจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำบนตำแหน่งของ ORF125 แบบเดียวกัน (ซ้ำ 7 ชุด) แต่สามารถใช้ SNPs ที่ปรากฏในตำแหน่งที่ 2 ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ซ้ำกันในชุดที่ 3 แยกความแตกต่างของตัวอย่างทั้งสองออกจากกันได้ โดยที่ตัวอย่าง NP1 มีชนิดเบสคือ T ในขณะที่ NP2 มีชนิดเบสเป็น G ตัวอย่างที่แยกได้จากจังหวัดภูเก็ต (PK) ในปีพ.ศ. 2548 มีลักษณะจีโนไทป์ที่แยกได้จากจำนวนชุดของชิ้นดีเอ็นเอที่ซ้ำและลักษณะการปรากฏของ SNPs เป็นจีโนไทป์เดียวกับดีเอ็นเออ้างอิง AF369029 ที่แยกได้จากประเทศไทยก่อนปี พ.ศ. 2544 ซึ่งเป็นหลักฐานหนึ่งที่บ่งบอกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้ค่อนข้างมีความคงตัวสูง ซึ่งอาจนำมาใช้ในการศึกษาการแพร่กระจายตัวของเชื้อไวรัสในพื้นที่ต่าง ๆ ได้ และเมื่อนำความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของเครื่องหมายทางพันธุกรรมทั้งสองมาพิจารณาร่วมกัน จะสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างไวรัสดวงขาวที่แยกได้จากประเทศไทยและไวรัสอ้างอิงทั้งสามออกได้เป็น 6 จีโนไทป์ที่ต่างกัน

อย่างไรก็ตามการวัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด minisatellite จำเป็นต้องใช้ผงวุ้น agarose ชนิดพิเศษซึ่งเมื่อนำไปเตรียมเป็นเจลแล้วจะมีความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันออกจากกันได้ ซึ่งผงวุ้น agarose ดังกล่าวมีราคาสูงกว่าผงวุ้น agarose ชนิดปกติอย่างมาก นอกจากนั้นยังจำเป็นต้องมีเครื่องบันทึกภาพรวมทั้งโปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ภาพอีกด้วย ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดสำหรับบางห้องปฏิบัติการที่จะใช้เทคนิคดังกล่าวในการศึกษาจำแนกชนิดของไวรัสดวงขาวในกุ้ง การศึกษาแยกซับไทป์ของไวรัสดวงขาวด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด SNP ยังจำเป็นต้องใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อจะได้มาซึ่งข้อมูลดังกล่าว ขบวนการดังกล่าว

จะต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่าย ซึ่งอาจจะเป็นข้อจำกัดของวิธีการได้ อย่างไรก็ตามเมื่อมีข้อมูลจากการศึกษามากขึ้นเราสามารถพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เช่น nested PCR เพื่อทำการซับไทป์ไวรัสดวงขาวในตำแหน่งที่เกิด SNP นั้นได้โดยไม่ต้องจำเป็นต้องใช้เทคนิคการหาลำดับเบสอีกต่อไป

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด minisatellite เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาระบาดวิทยาของการกระจายตัวของเชื้อไวรัสดวงขาวที่มีการระบาดในต่างพื้นที่ เช่น พบว่าไวรัสดวงขาวบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศอินเดีย มีความแตกต่างกับไวรัสที่แยกได้จากประเทศไทย และเวียดนาม [21] แต่ SNPs บน minisatellite เหล่านั้นจะช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างของไวรัสที่มีลักษณะทางจีโนไทป์แบบเดียวกันเมื่อศึกษาด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมแบบ minisatellite ออกจากกันได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามย้อนกลับที่มาของเชื้อไวรัสดวงขาวที่มีการระบาดในพื้นที่เดียวกันว่ามาจากแหล่งใด เช่น ลูกกุ้ง หรือพาหะนำโรค เป็นต้น [22]

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักงานพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

1. Flegel TW. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture.* 2006;258:1-33.
2. Wongteerasupaya C, Wongwisansri S, Boonsaeng V, Panyim S, Pratanpipat P, Nash GL, et al. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture.* 1996;143:23-32.
3. Durand S, Lightner DV, Redman RM, Bonami JR. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. *Dis Aquat Organ.* 1997;29:205-211.
4. Chang PS, Chen HC, Wang YC. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture.* 1998;164: 233-242.
5. Jiravanichpaisal P, Bangyeekhun E, Soderhall K, Soderhall I. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus. Dis Aquat Org.* 2001;47(2):151-157.
6. Lo CF, Ho CH, Peng SE, Chen CH, Hsu HC, Chiu YL, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org.* 1996;27: 215-225.
7. Hossain MS, Chakraborty A, Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture.* 2001; 198:1-11.

8. Supamattaya K, Hoffmann RW, Boonyaratpalin S, Kanchanaphum P. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus palagicus*, mud crab *Scyla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis Aquat Org.* 1998;32:79-85.
9. Vijayan KK, Stalin Raj V, Balasubramanian CP, Alavandi SV, Thillai Sekhar V, Santiago TC. Polychaete worms - A vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Org.* 2005; 63(2-3):107-111.
10. Flegel TW. Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (Penaeus monodon) in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol.* 1997;13:433-442.
11. Chang PS, Lo CF, Wang YC, Kou GH. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis Aquat Org.* 1996;27:131-139.
12. Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Bonsaeng V, et al. 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.* 1995;21:69-77.
13. Vlak J.M. Bonami JR, Flegel TW, Kou GH, Lightner DV, Lo CF, Loh PC, Walker PJ. Nimaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier/Academic Press; 2005. p. 187-192.
14. Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, et al. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org.* 1999;35:175-185.
15. Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CH, Yeh PY, Chou HY, et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon. Dis Aquat Org.* 1995;23:239-242.
16. van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology.* 2001;286:7-22.
17. Yang F, He J, Lin X, Li Q, Pan D, Zhang X, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol.* 2001;75:11811-11820.
18. Marks H, Goldbach RW, Vlak JM, van Hulten MC. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. *Arch Virol.* 2004;149:673-697.
19. Dieu BT, Marks H, Siebenga JJ, Goldbach RW, Zuidema D, Duong TP, et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *J Gen Virol.* 2004;85:3607-3618.
20. Musthaq S, Sudhakaran R, Ishaq Ahmed VP, Balasubramanian G, Sahul Hameed AS. Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. *Aquaculture.* 2006;256:34-41.
21. Pradeep B, Shekar M, Gudkovs N, Karunasagar I. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Dis Aquat Organ.* 2008;78:189-98.

22. Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Panyim S, Flegel TW, et al. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Dis Aquat Org.* 2003;54:253-257.
23. Boonyawiwat V, Lertewatcharasarakul P, Wajjwalku W. PCR for Detection os White Spot Syndrome (WSSV) in *Penaeus monodon. Kasetsart Veterinarians.* 2000;10:13-19.
24. Benson G. Tandem repeats finder: A program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:570-580.