

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980036

ชื่อโครงการ: การใช้เทคนิค RNAi ในการยับยั้งการติดเชื้อ HPV ในกิ้งกูดดำ

ชื่อนักวิจัย: ดร.พงโสภี อัครศาสตร์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมลล์: mbpas@mahidol.ac.th และ attasart_aung@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ด้วยระบบการจัดการในฟาร์มเลี้ยงกิ้งกูดที่ไม่เหมาะสมมีผลส่งผลให้เกิดปัญหาสำคัญต่าง ๆ ตามมาเช่น การเกิดโรคระบาดจากไวรัส ซึ่งไวรัส HPV เป็นหนึ่งในนั้นที่ทำให้กิ้งกูดมีลักษณะแคะแแกรน มีราคาขายที่ต่ำกว่ากิ้งกูดปกติอย่างมาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเอาเทคนิค RNAi ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง มาใช้ในการยับยั้งไวรัสชนิดนี้ โดยสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ 3 ชนิดที่มีความจำเพาะกับยีนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบโครงสร้างไวรัส (ns1 และ ns2) และยีนที่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของไวรัสเช่น vp แล้วจึงทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ดังกล่าวเข้าสู่กิ้งกูดก่อนทำให้กิ้งกูดติดไวรัส ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้แสดงเป็นครั้งแรกที่สามารถทำให้กิ้งกูดในระยะ juvenile ติดไวรัส HPV โดยการกินได้สำเร็จ หลังจากทำให้กิ้งกูดติดไวรัสแล้วเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ผลการยับยั้งไวรัสจากการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่จะถูกแสดงโดยวิธี semi-quantitative PCR พบว่ามีการลดลงของไวรัสในกิ้งกูดที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ ในขณะที่กลุ่มกิ้งกูดควบคุมที่ไม่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่สามารถตรวจสอบไวรัสได้ปริมาณมาก นอกจากนี้ยังเห็นผลยับยั้งบ้างในกิ้งกูดที่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับ gfp จากผลการทดลองด้วยปริมาณกิ้งกูดที่มีจำกัดทำให้สามารถสรุปได้ว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับไวรัสสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัส HPV ได้ โดยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ns1 ให้ผลยับยั้งสูงกว่ายีน vp ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน ns1 ในการกำจัดไวรัสในกิ้งกูดที่ติดไวรัสมาแล้วจากธรรมชาติ ซึ่งหลังจากทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อ ns1 เข้าสู่กิ้งกูดเป็นจำนวนหลายครั้งพบว่าสามารถกำจัดไวรัสออกจากกิ้งกูดได้อย่างชัดเจน ในขณะที่กิ้งกูดในกลุ่มที่ไม่ได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่และได้รับอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อ gfp มีปริมาณไวรัสอยู่จำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อ ns1 สามารถนำมาใช้ในการป้องกันและรักษากิ้งกูดจากการติดไวรัส HPV ได้ ทั้งนี้ยังต้องมีการปรับปรุงในเรื่องการนำอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าสู่กิ้งกูดโดยการกินต่อไป เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในฟาร์มเลี้ยงกิ้งกูดในอนาคต

Abstract

Project Code: MRG4980036

Project Title: RNA interference for inhibition of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon*

Investigator: Dr. Pongsoppee Attasart
Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University

E-mail Address: mbpas@mahidol.ac.th, attasart_aung@hotmail.com

Project Period: 2 years

Shrimps with improper farm management leads to many serious problems such as pandemic diseases particularly from virus infection. Hepatopancreatic parvovirus (HPV) causing stunted shrimps is one of such pathogens. Even though the HPV infected *P. monodon* has survived, the price is much lower than that of the normal one. Therefore, the most promising strategy so far, RNA interference (RNAi), was applied to combat with this virus in this study. Three dsRNAs corresponding to the non-structural protein (ns1 and ns2) and the structural protein (vp) genes of HPV were synthesized and introduced into shrimp haemolymph prior to viral challenge. Successful experimental infection of HPV via the oral route in juvenile shrimp was first demonstrated. After allowing viral replication for two weeks, the suppression effect by each dsRNA was evaluated by semi-quantitative PCR and compared with the control (NaCl or non-related dsRNA-gfp). A reduction of HPV in shrimp treated with each dsRNA was observed. In contrast, a high level of viral infection was detected in the control group (NaCl). Moreover, partial viral inhibition was detected while using the dsRNA-gfp. Based on a limited sample number, we reached the tentative conclusion that virus-specific dsRNA can inhibit HPV replication in which the dsRNA-ns1 was more effective than the dsRNA-vp. Moreover, the curative effect of dsRNA-ns1 in the natural HPV infected-shrimps was investigated. After multiple injection of dsRNA-ns1, the clearance of HPV was observed whereas the strong viral infection was detected in the control group (NaCl and non-specific dsRNA-gfp). It demonstrates that dsRNA-ns1 gives both protection and therapeutic effects on HPV infection in shrimp. The delivery approach by oral feeding will be further established before the benefits to shrimp farming.

Keywords: Hepatopancreatic parvovirus, *Penaeus monodon* densovirus, shrimp, RNAi, double-stranded RNA