มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ขอมอบเกียรติบัตรนี้ไว้เพื่อแสดงว่า

อรรคพล วณิกสัมบัน

ได้นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ

ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ ครั้งที่ 7

ระหว่างวันที่ 1-2 เมษายน 2556 ณ อาคารนวัตกรรม ศ.ดร. สาโรช บัวศรี

ให้ไว้ ณ วันที่ 2 เดือน เมษายน พ.ศ. 2556

(พศ.ดร.ปฐมทัศน์ จิระเดชะ)
ผู้อำนวยการสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย
ประธานจัดงานประชุม

(ดร.วิชชากร จารุศิริ)
บรรณาธิการ

บทคัดย่อ
การประชุมวิชาการระดับชาติ

มศว วิชาการ ครั้งที่ 7

ISBN : 978-616-296-019-2

1-2 เมษายน 2556
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

PROCEEDINGS
การประชุมวิชาการระดับชาติ
มศว
วิชาการ
ครั้งที่
7
ISBN : 978-616-296-020-8
1-2 เมษายน 2556
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
http://research.swu.ac.th

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

SWU7-081: การพัฒนาโปรแกรมบทเรียน เรื่อง การทักทาย ในรายวิชาภาษาอังกฤษ สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1..... **627-633**

THE DEVELOPMENT OFCOURSEWARE ON GREETING UPON ENGLISH SUBJECT FOR MATHAYOMSUKSA ONE STUDENTS

ศักดิ์สิทธิ์ จ่าเหลา, ก่อเกียรติ ขวัญสกุล, มานิตย์ อาษานอก

SWU7-082: การเปรียบเทียบความสามารถในการคิดวิเคราะห์ของนักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 ที่เรียนภาษาไทยด้วยการสอนโดยใช้เทคนิคโจ๊กปริศนากับการสอนภาษาไทยแบบเดิม..... **634-643**

A COMPARISON OF PRATHOM SUKSA VI STUDENTS' ANALYTICAL THINKING ABILITY THROUGH THE INSTRUCTION USING RIDDLE JOKE TECHNIQUES AND TRADITIONAL TEACHING METHODS

รัชดาภรณ์ ตัณฑิกุล, เสาวลักษณ์ รัตนวิชช์

SWU7-083: การเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานกลุ่มของนักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 ที่ได้รับการสอนโดยใช้แบบเรียนอัตลักษณ์กับการสอนแบบเดิมในกลุ่มสาระการเรียนรู้การงานอาชีพและเทคโนโลยี..... **644-649**

A COMPARISON OF PRATHOM SUKSA VI STUDENTS' ABILTY IN GROUP WORKING USING SELF-INSTRUCTIONAL TEXTS AND TRADITIONAL TEACHING METHODS IN OCCUPATION AND TECHNOLOGY SUBJECT

ศุกราวรรณทิชา เสาเวียง, เสาวลักษณ์ รัตนวิชช์

SWU7-085: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว.. **650-654**

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT VP26 STRUCTURAL PROTEIN OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

อรรคพล วณิกสัมบัน, ศิวาพร ลงยันต์, ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร, ไพศาล สิทธิกรกุล

SWU7-086: ควอซีนอร์มอลโมดของหลุมดำรีสส์เนอร์-นอร์ดสตรอม ที่มีสนามแมกเวลล์พื้นหลัง ในปริภูมิเวลาแอนไทดิซิเตอร์ 5 มิติ..... **655-666**

QUASINORMAL MODES OF THE REISSNER-NORDSTROM BLACK HOLES WITH THE MAXWELL FIELD BACKGROUND IN THE 5-DIMENSIONAL ANTI DE SITTER SPACETIME

จรูญศักดิ์ จรัสศรีวิไล, สุพจน์ มุศิริ

SWU7-093: การผลิตไฟฟ้าแบบเทอร์โมโฟโต้โวลเทซใช้ความร้อนจากเตาชีวมวล..... **667-675**

THERMOPHOTOVOLTAIC POWER GENERATIONUSING HEATSOURCE FROM BIOMASSSTOVE

โชติวุฒิ ประสพสุข, มานนท์ สุขละมัย

SWU7-095: ความเข้าใจทางเศรษฐศาสตร์เกี่ยวกับการเลี้ยงหมูในกลุ่มผู้อาศัยบนพื้นที่สูง: กรณีศึกษา บ้านห้วยมะเฟือง และบ้านห้วยจันสี อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่..... **676-689**

ECONOMIC SENSE IN PIG REARING IN HIGHLANDERS: A CASE STUDY OF HUAI MA FUEANG VILLAGE AND HUAI CHAN SI VILLAGE, MAE AI DISTRICT, CHIANG MAI PROVINCE

ชลิสา กัลยาณมิตร

การประชุมวิชาการระดับชาติ "ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ" ครั้งที่ 7

จัดโดย สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย ร่วมกับ เครือข่ายวิจัยเครือข่ายอุดมศึกษาภาคกลางตอนบน สมาคมไฟฟ้าแสงสว่างแห่งประเทศไทย และ สมาคมวิศวกรออกแบบและปรึกษาเครื่องกลและไฟฟ้าไทย

ที่ปรึกษา

อธิการบดี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ผู้อำนวยการสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บรรณาธิการ

อ.ดร.วิชชากร จารุศิริ

ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย

ศ.พิเศษธงทอง จันทรางศุ	ศ.ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์	รศ.ดร.จำลอง โพธิ์บุญ
รศ.ดร.ฉัตรดนัย จิระเดชะ	รศ.ชาญศักดิ์ อภัยนิพัฒน์	รศ.ดร.ดุจเดือน พันธุมนาวิน
รศ.ดร.นันทนา แจ้งสุวรรณ์	รศ.ดร.ธนรักษ์ เมฆฉาย	รศ.ดร.ธราพงษ์ วิทิตศานต์
รศ.ดร.บัญชา ชลาภิรมย์	รศ.ดร.ประพัฒน์ ลักษณพิสุทธิ์	รศ.ดร.ประวิต เอราวรรณ์
รศ.ดร.ยุวดี วงษ์กระจ่าง	รศ.ดร.รัญจวน คำวชิรพิทักษ์	รศ.ดร.อมร เพชรสม
รศ.ดร.วรรณชนก จันทชุม	รศ.ดร.วสันต์ จันทราทิตย์	รศ.ดร.วิทยา ยงเจริญ
รศ.ดร.ศรัทรา อาภรณ์รัตน์	รศ.ดร.สมชาย นำประเสริฐชัย	รศ.ดร.สุรัสวดี หุ่นพยนต์
รศ.ดร.สุวรรณา จันทร์ประเสริฐ	รศ.ดร.อรพรรณ พรสีมา	รศ.สุมาลี เหลืองสกุล
ผศ.ดร.แคทลียา ปัมทพรหม	ผศ.ดร.ธนาดล คงสมบูรณ์	ผศ.ดร.พิชัย กฤชไมตรี
ผศ.จินตนา เวชมี	ผศ.ดร.จำรัส พร้อมมาศ	ผศ.ดร.ธนะบูลย์ สัจจาอนันตกูล
ผศ.ชายชาญ โพธิสาร	ผศ.ดร.โชคชัย ธีรกุลเกียรติ	ผศ.ดร.ประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ
ผศ.ดร.วีระ สุภากิจ	ผศ.ดร.ธเนศ ศรีสถิต	ผศ.ดร.อรรถพล เง่าพิทักษ์กุล
ผศ.นอ.ดร.สรายุทธ์ กันหลง	ผศ.ดร.สมพร ธเนศวาณิชย์	ผศ.ดร.อุไร ไชยศรี
ผศ.ดร.สมยศ วัฒนากมลชัย	ผศ.ดร.สาวิตรี เจียมพานิชกุล	ผศ.ดร.สุรินทร์ กิตติธรกุล
ผศ.ดร.สุวิทย์ อ่องสมหวัง	อ.ดร.วีรพัฒน์ เกียรติเฟื่องฟู	อ.ดร.วุฒิไกร งามศิริจิตต์
อ.ดร.ชลกาญจน์ วงศ์ก่อทรัพย์	อ.ดร.ชัชวาล วงศ์ชูสุข	อ.ดร.ธีรเวช ทิตย์สีแสง
อ.พญ.ปวีณา สุสัณฐิตพงษ์	อ.ดร.ปิยะพรรณ ช่างวัฒนชัย	อ.ดร.เสกสรรค์ ทองคำบรรจง
อ.ดร.พิธาน พื้นทอง	อ.ดร.รติพร ถึงฝั่ง	อ.ดร.ศักดิ์สิทธิ์ บุศยพลากร

ผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย

รศ.ดร.กัญญดา อนุวงศ์	รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ	รศ.ดร.ชมพูนุท โกสลากร เพิ่มพูนวิวัฒน์
รศ.ดร.ชาคริต ชุ่มวัฒนะ	รศ.ดร.ประพันธ์ศิริ สุเสารัจ	รศ.ดร.พรพิมล ม่วงไทย
รศ.ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์	รศ.ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล	รศ.ดร.สุทธิวรรณ พีรศักดิ์โสภณ
รศ.ดร.อังศินันท์ อินทรกำแหง	รศ.ดร.เรณู สุขารมณ์	ผศ.ดร.ชลวิทย์ เจียรจิตต์

ผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย (ต่อ)

ผศ.ดร.ประมา ศาสตระรุจิ
ผศ.ดร.ฑีฆพันธุ์ เจริญพงศ์
ผศ.ดร.กิตติ สถาพรประสาธน์
ผศ.วัชรชัย วิริยะสุทธิวงศ์
อ.ดร.อรุษา เชาวนลิขิต
อ.นพ.ดร.ทัศนัย ปริตรโตทกพร
อ.ดร.จารุวรรณ พลอยดวงรัตน์
อ.ดร.ดวงเด่น บุญปก
อ.ดร.นฤภัทร ตั้งมั่นคงวรกูล
อ.ดร.ล่ำสัน เลิศกูลประหยัด
อ.ดร.สนอง ทองปาน
อ.ดร.สุจิตรา ศรีสังข์

ผศ.ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร
ผศ.ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม
ผศ.รท.ดร.ไพบูลย์ อ่อนมั่ง
ผศ.ทัศนียา วังสะจันทานนท์
อ.ดร.ธนาธิป สุ่มอิ่ม
อ.ทพญ.ดร.ปรมาภรณ์ จิ๋วพัฒนกุล
อ.ดร.ณภัทร โพธิ์วัน
อ.ดร.นพดล อินทร์จันทร์
อ.ดร.นฤมล ศิระวงษ์
อ.ดร.วัฒนีย์ โรจน์สัมฤทธิ์
อ.ดร.วิชชากร จารุศิริ
อ.ดร.สุภัค มหาวรากร

ผศ.ดร.ศิรินุช เทียนรุ่งโรจน์
ผศ.ดร.ปฐมทัศน์ จิระเดชะ
ผศ.ดร.วรรณวิไล ไกรเพ็ชร์ เอวานส์
ผศ.ผจงศักดิ์ หมวดสง
อ.ดร.นุวีย์ วิวัฒนวัฒนา
อ.ดร.รัฐภูมิ ปริชาตปรีชา
อ.ดร.อาจรี ศุภสุธีกุล
อ.ดร.รัชพันธุ์ เชยจิตร
อ.ดร.ปณิธาน วนากมล
อ.ดร.อารียา เอี่ยมบู่
อ.ดร.สกล วรเจริญศรี
อ.ดร.อรพรรณ วีระวงศ์

ผู้ประสานงาน

กรอุษา ศรีสุวรรณ์
จิตรลดา สีฉ่ำ
สรรควร สัตยมงคล
อานัตต์ ปิ่นทอง
นิพนธ์ ราชวุฒิ
ธิดาวัลย์ โชติวรวรรณ
วัชรี ใจประเสริฐ

จัดพิมพ์โดย

สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
114 ซอยสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
โทรศัพท์ 0-2649-5000 ต่อ 15729
โทรสาร 0-2259-1822
พิมพ์ครั้งที่ 1 มีนาคม 2556
ISBN: 978-616-296-020-8

ออกแบบปก ศิริเพ็ญ พิลาคุณ
จัดรูปเล่ม ฝ่ายสำนักพิมพ์
สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

SWU7-085: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT VP26 STRUCTURAL PROTEIN OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

อรรคพล วณิกสัมบัน, ศิวาพร ลงยันต์, ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร, ไพศาล สิทธิกรกุล*

Akapon Vaniksampanna, Siwaporn Longyant, Parin Chaivisuthangkura, Paisarn Sithigorngul*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Thailand.

***Corresponding author, E-mail:** paisarn@swu.ac.th

บทคัดย่อ

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus - WSSV) โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26 (rVP26F109) ซึ่งถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี (SDS-PAGE) พบว่าสามารถคัดเลือกหนูขาวที่มีการตอบสนองต่อ rVP26F109 และโปรตีน VP26 จากกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จากธรรมชาติได้ และเมื่อนำมาผลิตไฮบริโดมา สามารถคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV ได้จำนวน 2 โคลน คือ MAb-12H8 และ MAb-14D10 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองสามารถใช้ในการตรวจสอบ WSSV ที่ติดเชื้อในกุ้งด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry ได้โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกุ้งที่ไม่ติดเชื้อหรือกุ้งที่ติดไวรัสชนิดอื่นๆ ทั้งนี้ MAb-14D10 มีความไวในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี dot blot สูงกว่า MAb-12H8 ประมาณ 16 เท่า ดังนั้นจึงคาดว่าจะสามารถนำ MAb-14D10 มาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งได้หรืออาจใช้ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจ WSSV ได้ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสตัวแดงดวงขาว โมโนโคลนอลแอนติบอดี รีคอมบิแนนท์โปรตีน

Abstract

The recombinant VP26F109 protein was purified by SDS-PAGE and used for immunization into Swiss mice for antisera production. The mouse anti-rVP26F109 antiserum demonstrated specific immunoreactivity against rVP26F109 and VP26 structural protein from WSSV infected shrimp by Western blot assay. Two monoclonal antibodies (MAbs) were produced and they could be used to detect WSSV infection in shrimp by dot blotting, Western blotting and immunohistochemistry without any cross-reactivity to the uninfected shrimp tissues or shrimp infected with other virus. The MAb 14D10 demonstrated 16-fold higher sensitivity than MAb 12H8 and could be used in various assays to enhance the detection sensitivity of previously describe MAbs specific to other structural proteins of WSSV.

Kewords: WSSV, monoclonal antibody, recombinant protein, immunohistochemistry, VP26

บทนำ

ไวรัส WSSV เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งวงศ์ penaeid [1] ไวรัสชนิดนี้พบครั้งแรกที่ประเทศ Taiwan ในปี ค.ศ.1992 ลักษณะอาการของกุ้งที่เป็นโรคนี้คือมีจุดสีขาวบนเปลือกที่หุ้มส่วนหัวและอก (carapace) รยางค์ (appendages) และภายในเปลือกที่ห่อหุ้มร่างกายนอกจากนี้ยังมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นถึง 100% ภายในระยะเวลา 2 ถึง 7 วัน [2] สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีรายงานการติดเชื้อไวรัส WSSV ครั้งแรกในกุ้งที่ใช้ในการทดลองก่อนปี ค.ศ.1994 [3] ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV ขึ้นมาหลายวิธีเช่น วิธีทางพยาธิวิทยา (histophatology) วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological methods) และวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular biology) เช่น PCR และ *In situ* hybridization อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธีหาสารพันธุกรรมนั้นมีวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีราคาแพง อีกทั้งยังไม่สามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อในบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน VP26 ที่ถอดรหัสให้โปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัส ซึ่งโปรตีนในรูป
รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ที่มีโปรตีน histidine จำนวน 6 หน่วยเชื่อมติดอยู่ทางปลาย N (N-terminus) เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับการพัฒนาวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่มีความง่ายและจำเพาะต่อการตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อพัฒนาวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่มีความง่ายและจำเพาะต่อการตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV

วิธีดำเนินการวิจัย

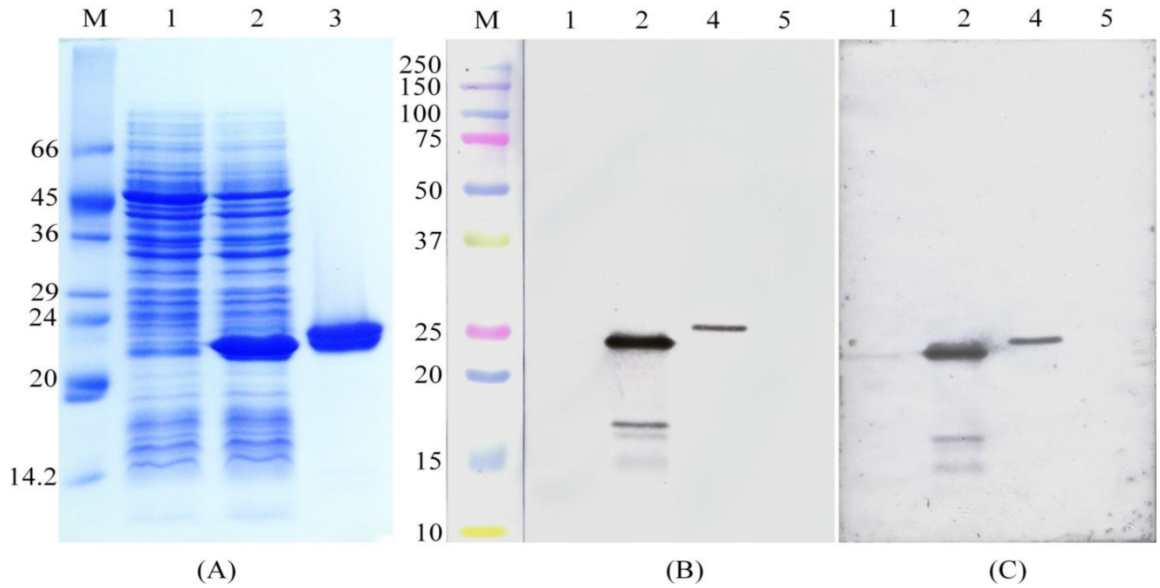
1) การผลิตริคอมบิแนนท์โปรตีน : นำแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด pQE30-VP26F109 จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [4] มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth จนเชื้อเจริญและเข้าสู่ exponential phase จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ 3,000 g นาน 20 นาที ละลายตะกอนของแบคทีเรียด้วย 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8 ที่มี 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำให้เซลล์แตกจนได้ lysate ใส นำ lysate ที่ได้มาแยกโปรตีนต่างๆออกตามขนาดด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) ตัดแถบโปรตีน rVP26F109 และทำ electroelution 2) การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี : ปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วยโปรตีน rVP26F109 บริสุทธิ์ทุกๆสองสัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง เก็บแอนติซีรัมหลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 และนำมาทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีน rVP26F109 และโปรตีน VP26 ในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติด้วยวิธี Western blotting เลือกหนูที่ให้แอนติซีรัมแสดงปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อโปรตีนทั้งสองดีที่สุดนำมาใช้ผลิตไฮบริโดมาและทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยการทดสอบด้วย dot blotting และWestern blotting

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26F109 (rVP26F109) ในแบคทีเรีย *E. coli* แล้วทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตก จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีน rVP26F109 ได้ ซึ่งมีขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 1A แถว 2) จากนั้นตัดแถบโปรตีนนี้มาสกัดโปรตีนออกจากเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า พบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง (ภาพประกอบ 1A แถว 3)

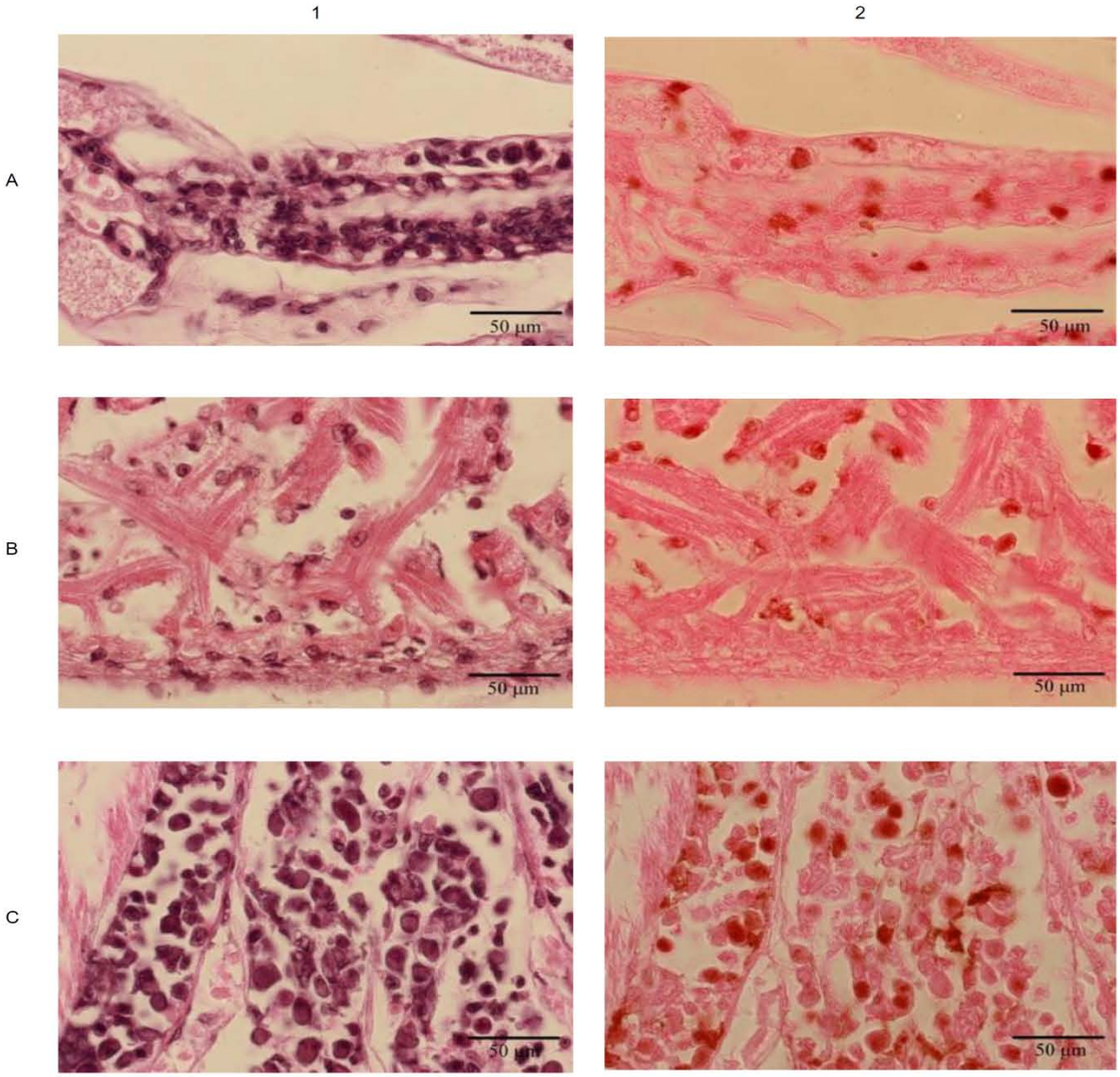
หลังจากปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวจำนวน 4 ตัวด้วย rVP26F109 บริสุทธิ์แล้วนำแอนติซีรัมมาทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าแอนติซีรัมจากหนูแต่ละตัวมีความจำเพาะต่อโปรตีน rVP26F109 และโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV ที่ได้จากสารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้งติดเชื้อ (ภาพประกอบ 1B) และเมื่อทำการผลิตไฮบริโดมาสามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ rVP26F109 และโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV ได้ 2 โคลน คือ MAb-12H8 และ MAb-14D10 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 สามารถจับกับแถบโปรตีนของ rVP26F109 และโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV ได้ และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ WSSV (ภาพประกอบ 1C) นอกจากนี้ MAb ทั้ง 2 ชนิดยังสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ เหงือก หัวใจ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ได้ (ภาพประกอบ 2)

สำหรับการทดสอบความไวในการตรวจการติดเชื้อ WSSV พบว่า MAb-14D10 มีความไวในการจับกับเชื้อ WSSV สูงกว่า MAb-12H8 ประมาณ 16 เท่า คือที่ความเจืองจาง 1:1280 และ 1:80 เท่า ตามลำดับ (ภาพประกอบ 3)

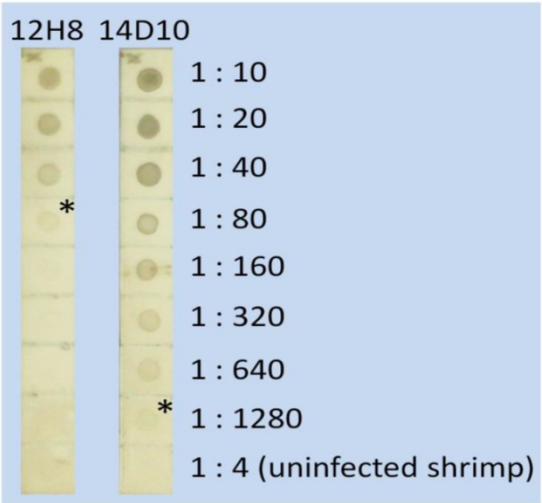


ภาพประกอบ 1. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot โดยการแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นตัดเจลส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสี Coomassie blue (A) เจลส่วนที่เหลือนำไปย้ายโปรตีนลงกระดาษไนโตรเซลลูโลส จากนั้นนำมาบ่มด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ คือ แอนติซีรัมที่ได้จากหนูที่มีการตอบสนองดีที่สุด (B) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-14D10 (C) ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV

M = protein markers (kDa),
1 = lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30
2 = lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30-VP26F109
3 = โปรตีน rVP26F109 บริสุทธิ์
4 = สารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส WSSV
5 = สารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ปกติ



ภาพประกอบ 2. การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส WSSV ในเนื้อเยื่อกุ้งด้วยวิธี immunohistochemistry 1) ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี hematoxylin และ eosin หรือ 2) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV แล้วย้อมทับด้วยสี eosin A = เหงือก, B = หัวใจ, C = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สีน้ำตาลเป็นบริเวณที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับไวรัส WSSV



ภาพประกอบ 3. การตรวจสอบความไวในการตรวจเชื้อ WSSV ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองชนิด (MAb-12H8 และ MAb-14D10) ด้วยวิธี dot blot โดยการเจือจาง two-fold serial dilution สารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ส่วนช่องสุดท้ายหยดสารสกัดจากขากุ้งที่ไม่ติดเชื้อไวรัส จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด * = ค่าความเจือจางสุดท้ายที่สามารถเห็นปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและเชื้อ WSSV

สรุป

จากการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว และคัดเลือกหนูขาวที่มีการตอบสนองดีที่สุดเพื่อใช้ในการผลิตไฮบริโดมา พบว่าสามารถผลิตไฮบริโดมาได้ 2 โคลนที่สร้างโมโน - โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 และโปรตีน VP26 ของเชื้อไวรัส WSSV ได้ ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ไปใช้ร่วมกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างส่วนอื่นๆของไวรัส เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อไวรัส WSSV ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM. Virol 2001; 286: 7-22.

[2] Chou H, Huang C, Wang C, Chiang H, Lo C. Dis. Aquat. Org. 1995; 23: 165-173.

[3] Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW. Dis. Aquat. Org. 1995; 21: 69-77.

[4] Chaivisuthangkura P, Phattanapaijitkul P, Thammapalerd N, Rukpratanporn S, Longyant S, Sithigorngul W, Sithigorngul P. ScienceAsia 2006; 32: 201-204.