

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26  
ของไวรัสตัวแดงดวงขาว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตุลาคม 2556

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26  
ของไวรัสตัวแดงดวงขาว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ตุลาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26  
ของไวรัสตัวแดงดวงขาว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตุลาคม 2556

อรรคพล วณิกสัมบัน. (2556). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์, ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล.

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ white spot syndrome (WSSV) โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26 (rVP26F109) ซึ่งกระตุ้นให้มีการสร้างมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-VP26F109 ด้วย 1 mM IPTG ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน histidine 6 หน่วย มีขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน และถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE เมื่อทำการทดสอบแอนติซีรัมพบว่า หนูขาวมีการตอบสนองต่อ rVP26F109 และโปรตีน VP26 จากกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จากธรรมชาติได้ และเมื่อนำมาผลิตไฮบริโดมาสามารถคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV ได้จำนวน 8 โคลน คือ W26-1, W26-3, W26-4, W26-5, W26-6, W26-7, W26-8 และ W26-9 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิดสามารถใช้ในการตรวจสอบ WSSV ที่ติดเชื้อในกุ้งด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry เมื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกุ้งที่ไม่ติดเชื้อหรือกุ้งที่ติดเชื้อ monodon baculovirus (MBV), Taura syndrome virus (TSV), yellow head virus (YHV), Penaeus stylirostris densovirus (PstDNV) และ Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิดที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> และ IgG<sub>2b</sub> และมีโปรตีนสายสั้น (light chain) เป็น kappa (K) เมื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์โปรตีนเข้มข้น 6.8 เฟมโตโมล/จุด และตรวจการติดเชื้อ WSSV ในตัวอย่างสารสกัดขาวำน้ำกุ้งขาวที่เจือจาง 1: 800 ได้

Production of monoclonal antibodies against recombinant VP26 structural protein  
of white spot syndrome virus (WSSV)



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the  
Master of Science Degree in Biotechnology  
At Srinakharinwirot University

October 2013

Akapon Vaniksampanna. (2013). *Production of monoclonal antibodies against recombinant VP26 structural protein of white spot syndrome virus (WSSV)*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura, Assist. Prof. Dr. Siwaporn Longyant, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies (MAbs) that can be used to detect white spot syndrome virus (WSSV). After induction of recombinant plasmid pQE30-VP26F109 in *E. coli* strain M15 (pREP4) with 1 mM IPTG, the 6XHis tagged VP26F109 with molecular masses of 23 kDa. 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. Eight monoclonal antibodies (W26-1, W26-3, W26-4, W26-5, W26-6, W26-7, W26-8 and W26-9) 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 monodon baculovirus (MBV), Taura syndrome virus (TSV), yellow head virus (YHV), *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) and Infectious Myonecrosis Virus (IMNV). The monoclonal antibodies belong to IgG with subclass IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> with kappa (K) light chain. The detection sensitivity of the WSSV (W26-1) was approximately 6.8 fmole/spot of purified rVP26F109 and 1: 800 of pleopod homogenates from wssv-infected *Penaeus vannamei* as determined by dot blotting.

ปริญญาบัตร  
เรื่อง

การผลิตไมโครคอนโทรลเลอร์แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว  
ของ  
อรรถพล วณิชกัมมัน

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒน์กุล)  
วันที่ ..... เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2556

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาบัตร คณะกรรมการสอบปากเปล่า  
..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร) (อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)  
..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์) (รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)  
..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)  
..... กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญาโทฉบับนี้จะไม่สำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ และศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโทร่วม ผู้คอยตักเตือนสั่งสอนและให้คำแนะนำแก่ข้าพเจ้าในด้านต่าง ๆ ทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญาโทที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.พิชามัก สมยูทธพัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการทำปริญญาโทฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบปริญญาโท และช่วยแก้ไขปริญญาโทฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาโทฉบับนี้

ขอขอบคุณ ดร.วารุณี หะยิมะสาและ รุ่นพี่และเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มอบให้แก่ข้าพเจ้าในทุกๆ ด้าน

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ได้ให้กำลังใจ คอยช่วยเหลือสนับสนุน และเป็นแรงผลักดันตั้งแต่เริ่มทำปริญญาโทจนเสร็จจุล่งไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอระลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยและจะนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญาโทฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่สัตว์ทอลงทุกชีวิต ที่ใช้ในการทำปริญญาโทของข้าพเจ้า

อรรคพล วณิกสัมบัน



# สารบัญ

บทที่	หน้า
<b>1 บทนำ</b> .....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
สมมติฐานในการวิจัย.....	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
<b>2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	4
โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome: WSS).....	4
ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV).....	5
การแพร่กระจายและความสามารถของเชื้อ WSSV ในการบุกรุกเจ้าบ้าน (Host range).....	8
พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV.....	13
โปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 26 กิโลดาลตัน.....	14
การศึกษาโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตัน ของไวรัส WSSV.....	14
รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26.....	20
การตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV.....	23
วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว (rapid staining test).....	23
วิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological method).....	24
การตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธีทางชีวโมเลกุล.....	24
การตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	26
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	28
<b>3 วิธีดำเนินการวิจัย</b> .....	30
อุปกรณ์และสารเคมี.....	30
เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	30
สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	30
เคมีภัณฑ์.....	31

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
<b>3 (ต่อ)</b>	
วิธีการดำเนินการ.....	32
การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV.....	33
การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV ให้บริสุทธิ์.....	33
การผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV.....	34
การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว.....	34
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV.....	34
การคัดเลือกไฮบริโดมา.....	36
การคัดเลือกชั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting.....	36
การคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blotting.....	36
การคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting.....	37
การคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยวิธี Immunohistochemistry.....	37
การพิสูจน์สมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	40
การตรวจสอบอิมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA.....	40
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	41
การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ monodon baculovirus (MBV), Taura syndrome virus (TSV), yellow head virus (YHV), Penaeus stylirostris densovirus (PstDNV) และ Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตาม ธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry.....	43
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 และสารสกัดจากขาวว่ายน้ำ ของกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting.....	43
<b>4 ผลการทดลอง.....</b>	<b>44</b>
การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV.....	44
การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV ให้บริสุทธิ์.....	44

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
<b>4 (ต่อ)</b>	
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV.....	46
การพิสูจน์สมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	51
<b>5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>58</b>
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>60</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>68</b>
ภาคผนวก ก.....	69
ภาคผนวก ข.....	71
ภาคผนวก ค.....	74
ภาคผนวก ง.....	77
ภาคผนวก จ.....	81
ภาคผนวก ฉ.....	83
ภาคผนวก ช.....	85
<b>ประวัติย่อผู้วิจัย.....</b>	<b>87</b>

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงโฮสต์ที่สามารถติดเชื้อไวรัส WSSV ได้.....	9
2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	31
4 สรุปลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV ที่ผลิตได้.....	57



## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะจุดสีขาวในเปลือกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV.....	5
2 แสดงโครงสร้างของเชื้อไวรัส WSSV.....	6
3 ภาพวาดแสดงส่วนต่างๆ ของเชื้อไวรัส WSSV และแคปไซเมอร์.....	8
4 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว.....	13
5 แถบโปรตีนขนาด 26 kDa (VP26) ปรากฏในแถบที่ใช้อ่อนภาคไวรัส WSSV เป็นตัวอย่างและแถบที่ใช้ nucleocapsid เป็นตัวอย่าง.....	14
6 แสดงอนุภาคทองคำที่ติดอยู่บริเวณรอบนอกของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส.....	15
7 แสดงแผ่นเจล SDS-PAGE และ Western blot ของไวรัส WSSV.....	17
8 แสดงแผ่นเจลที่ย้อมสี Coomassie blue และ Western blotting.....	19
9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน VP26 และตำแหน่ง ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์.....	21
10 แสดงการวิเคราะห์ Protein's Hydrophobicity Profile ของโปรตีน VP26.....	22
11 แสดงโครงสร้างของ pQE30 expression vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ต่างๆ.....	22
12 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของโรคตัวแดงดวงขาวในเหงือกจาก วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว.....	23
13 แสดงการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ผ่าน <i>de novo</i> pathway และ salvage pathway.....	29
14 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	35
15 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งสำหรับวิเคราะห์ immunohistochemistry.....	38
16 แผนผังกระบวนการย้อมโดยวิธี immunohistochemistry.....	39
17 การตรวจสอบอิมมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA.....	41
18 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	42
19 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109.....	45
20 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว.....	47
21 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่สองด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting.....	48

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting.....	49
23 การตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆของกุ้งขาวด้วยวิธี immunohistochemistry.....	50
24 ค่าดูดกลืนแสงในการตรวจสอบอีพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด.....	52
25 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส WSSV กับเนื้อเยื่อของกุ้งขาวติดเชื้อไวรัสต่างๆ.....	53
26 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting.....	55
27 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจเชื้อ WSSV กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี WI-16, W25-8D และ W29.....	56



# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลัง

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของไทย ซึ่งมีสัดส่วนเป็นกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ร้อยละ 99.7 และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ร้อยละ 0.29 ในปี พ.ศ. 2554 ไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เย็น แช่แข็ง และแปรรูป (ไม่รวมกุ้งกระป๋อง) จำนวน 387,172.9 ตัน คิดเป็นมูลค่า 108,292.9 ล้านบาท โดยมีตลาดการส่งออกหลักในสหรัฐอเมริกา และคาดว่าราคากุ้งในปี พ.ศ. 2555 จะอยู่ในเกณฑ์ที่ดีเนื่องจากตลาดยังมีความต้องการอย่างต่อเนื่อง เช่น ตลาดญี่ปุ่นในสวนผลิตภัณฑ์แปรรูปเพิ่มมูลค่า ตลาดใหม่ในจีนและเกาหลีใต้ที่มีแนวโน้มการบริโภคเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นเหตุจูงใจให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งเพิ่มมากขึ้น (ถนอมจิตร สิริภคพร. 2555) เดิมกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลเพียงชนิดเดียวที่มีการเลี้ยงแบบพัฒนาอย่างแพร่หลาย ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534-2544 แต่เนื่องจากในปี พ.ศ. 2544-2545 อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของไทยประสบปัญหาเกิดโรคระบาด การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติทำให้กุ้งแคะแกระไม่โตขนาดตามความต้องการของตลาด กรมประมงจึงได้อนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อเข้ามาเพาะเลี้ยงในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 (มาลินี วิชชาวุธ และ สมยศ สิทธิเดชพันธ์. 2548: 170-171) ซึ่งกุ้งขาวมีคุณลักษณะที่ดีคือ ทนความเค็มและอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง ทนต่อสภาพออกซิเจนต่ำได้ดี เจริญเติบโตในช่วงพีเอช 7.0-8.5 แต่สามารถทนพีเอชสูงถึง 10 ได้ ให้เปอร์เซ็นต์เนื้อสูง (สำนักงานประมงจังหวัดสุพรรณบุรี. 2545) แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวยังคงประสบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ เช่นเดียวกันกับกุ้งกุลาดำ ปัญหาสำคัญคือการเกิดโรคระบาดที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและไวรัส รวมถึงโปรโตซัว โดยเฉพาะไวรัสซึ่งทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมกุ้งมากที่สุด สำหรับไวรัสก่อโรคในกุ้งสกุล *Penaeus* ที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ yellow-head virus (YHV), hepatopancreatic parvovirus (HPV), monodon baculovirus (MBV) และ white-spot syndrome virus (WSSV) (Flegel. 2006: 1-33)

สำหรับเชื้อ WSSV เป็นสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวซึ่งเป็นโรคที่สำคัญในกุ้งทะเล พบได้แทบทุกภูมิภาคในหลายประเทศ ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง รวมถึงการค้าระหว่างประเทศเป็นอย่างมาก พบครั้งแรกในไต้หวันเมื่อปี ค.ศ. 1992 (Chou; et al. 1995: 165-173) และแพร่กระจายมายังประเทศไทยเมื่อปี ค.ศ. 1994 (Wongteerasupaya; et al. 1995: 69-77) ตั้งแต่มีการปรากฏของโรคนี้ในปี ค.ศ. 1992 ก็ได้มีการแพร่กระจายของโรคไปเกือบทุกประเทศในเอเชีย และพบว่าการระบาดไม่ได้แพร่กระจายออกไปเฉพาะในเอเชีย แต่ยังรวมถึงสหรัฐอเมริกาด้วย (Hasson; et al. 2006: 91-100)

อาการที่แสดงให้เห็นของโรคตัวแดงดวงขาวคือ จุดสีขาวบน carapace, รยางค์ และบริเวณใต้เปลือกหุ้มร่างกาย และภายใน 5-7 วันหลังจากติดเชื้อ อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะเมื่อได้รับความเครียดจากการจับและอุณหภูมิต่ำ (Chou; et al. 1995: 165-173) อย่างไรก็ตาม เมื่อกุ้งติดเชื้อ WSSV จะไม่สามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีใดๆ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งคือ การตรวจวินิจฉัยกุงก่อนที่จะนำมาเลี้ยง และการตรวจวินิจฉัยอย่างทันท่วงทีเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสในบ่อเลี้ยงกุ้ง รวมถึงการจัดการบ่อเลี้ยงที่ดี เช่น การเตรียมบ่อที่ดี ทำความสะอาดพื้นบ่อให้สะอาด ไม่ปล่อยกุงแน่นจนเกินไป และป้องกันพาหะตามธรรมชาติ เช่น กุ้งปู และอาร์โทรพอด หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสด เช่น ปุสดี ปลาสด หรือหอยสดที่อาจเป็นสัตว์พาหะ ทำการเพาะเลี้ยงในระบบปิดและหมั่นตรวจสอบคุณภาพน้ำ (Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994: 9 - 11)

เนื่องจากการวินิจฉัยโรคเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ WSSV ขึ้น โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส (nucleic acid) ได้แก่ วิธี Polymerase chain reactions (PCR) (Hameed; et al. 2002: 1-10); (Kanchanaphum; et al. 1998: 1-7); (Lo; et al. 1996: 215-225); (Lo; et al. 1997: 53-72); (Magbanua; et al. 2000: 77-82); (Otta; et al. 1999: 67-70) ซึ่งมีความไวสูงสามารถตรวจพบไวรัสได้แม้ว่ามีปริมาณไวรัสน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรกๆ และกุงยังไม่แสดงอาการของโรค แต่อย่างไรก็ตามวิธี PCR ยังมีข้อจำกัดในทางปฏิบัติคือ ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในห้องปฏิบัติการและบุคลากรที่มีความรู้ทาง PCR ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ยังมีราคาสูง เกษตรกรจึงไม่สามารถทำการตรวจเชื้อด้วยตนเองได้

วิธีทางวิทยามิคุ่มกัน เป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงคล้ายกับการทำงานของลูกกุญแจและแม่กุญแจ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ในการทดสอบด้วยวิธีทางวิทยามิคุ่มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ได้มีนักวิชาการหลายกลุ่มพัฒนาวิธีทางภูมิมิคุ่มกันวิทยามาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV เช่น Anil และคนอื่นๆ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 และ 18 กิโลดาลตัน มาประยุกต์ใช้กับวิธี immunoblot พบว่าสามารถตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV ในกุงกุลาดำ (*P. monodon*) ได้ แม้วากุงที่ติดเชื้ออยู่ในระยะที่ไม่มีอาการแสดงของโรค (Anil; et al. 2002: 67-75) นอกจากนี้ยังมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสแบบง่าย (strip test) เช่น ในงานวิจัยของ Sithigorngul และคนอื่นๆ ที่ได้ประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 ของไวรัส WSSV โดยสามารถนำเหงือกของกุงที่ต้องการทดสอบมาบดในบัฟเฟอร์และหยดลงไปในช่องหยดตัวอย่าง ปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่ผ่าน test line และ control line และอ่านผลได้ทันที ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ทราบผลเร็ว และไม่ต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106) เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เอง ประหยัดเวลาในการส่งตัวอย่างไปตรวจในห้องปฏิบัติการ และ



สามารถติดตามการติดเชื้อในระหว่างทำการเพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลา ซึ่งจะช่วยลดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส WSSV ได้

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

### ขอบเขตการวิจัย

1. กระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน *vp26* ใน *E. coli*
2. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26 ให้บริสุทธิ์
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26 ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว
4. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี dot blotting วิธี immunohistochemistry และ Western blotting
5. การทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจวิเคราะห์ กุ้งที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี immunohistochemistry และ dot blotting

### สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP26) อาจทำได้โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สังเคราะห์จากยีน *vp26* ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างส่วน VP26 ของไวรัสเป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

### ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

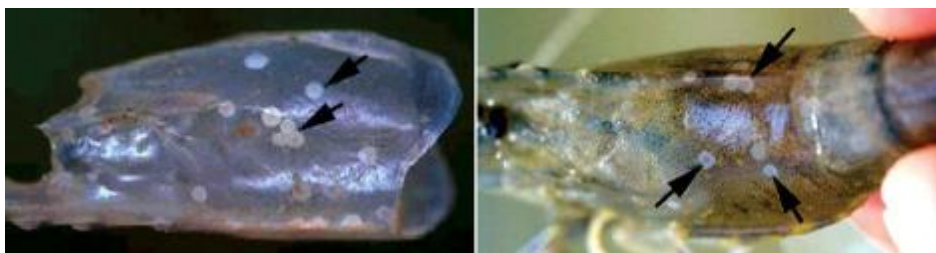
1. ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนโครงสร้างของ WSSV
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโครงสร้างของ WSSV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้ง ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome: WSS)

โรคตัวแดงดวงขาวหรือเรียกว่าโรคจุดขาว เป็นโรคในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งวงศ์ penaeid โรคนี้ได้แพร่ระบาดไปยังประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย ได้แก่ จีน เกาหลีใต้ อินเดีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น รวมทั้งประเทศในทวีปอเมริกา โดยเรียกชื่อไวรัสที่แตกต่างกันไป สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบโรคตัวแดงดวงขาวครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดตรัง และเรียกชื่อไวรัสนี้ว่า systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) เมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV เชื้อจะทำลายเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจาก ectoderm และ mesoderm เช่น เยื่อบุผิวชั้นใต้เปลือก (cuticular epithelium) เยื่อบุทางเดินอาหาร เหงือก หัวใจ เนื้อเยื่อประสาท กล้ามเนื้อ และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด ทำให้นิวเคลียสใหญ่ (hypertrophied nuclei) จนเต็มหรือเกือบเต็มเซลล์ ที่เรียกว่า Cowdry type A inclusion อาการที่พบในกุ้งติดเชื้อ WSSV จะแตกต่างกันไป ขึ้นกับอายุกุ้งและการจัดการฟาร์ม อย่างไรก็ตามความรุนแรงของการระบาดจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดอื่นๆ ด้วย เช่น คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม กุ้งป่วยจะว่ายใกล้ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อ หากเปิดเปลือกส่วนหัวออกดูจะสังเกตเห็นจุดขาวได้ง่าย หลังจากเริ่มแสดงอาการแล้วกุ้งจะตายอย่างรวดเร็วภายในไม่กี่วัน อาการป่วยมักพบในกุ้งระยะวัยรุ่นที่ติดเชื้อ ซึ่งมีได้ 3 แบบ คือ 1) แบบเฉียบพลัน กุ้งที่ติดเชื้อจะป่วยและตายอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน ถึง 5 วัน หลังจากเริ่มแสดงอาการ มีอัตราการตายสะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ มีรอยโรคจุดขาวหรือดวงขาวในเปลือกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 2 มิลลิเมตร (ภาพประกอบ 1) กุ้งอาจมีสีชมพูถึงแดง ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำเชื่องช้า มักอยู่ใกล้ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อ 2) แบบกึ่งเฉียบพลัน กุ้งที่ติดเชื้อจะทยอยป่วยและตายไปเรื่อยๆ มีระยะเวลาไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นกับคุณภาพน้ำและการจัดการฟาร์ม กุ้งอาจมีหรือไม่มีรอยโรคเป็นจุดขาว กินอาหารลดลง เคลื่อนไหวเชื่องช้า มีอัตราการตายสะสม 30 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ 3) แบบเรื้อรัง กุ้งที่ติดเชื้ออาจมีหรือไม่มีรอยโรคเป็นจุดขาวและไม่ตาย (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2550: 10-11)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะจุดสีขาวในเปลือกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (ลูกครี)

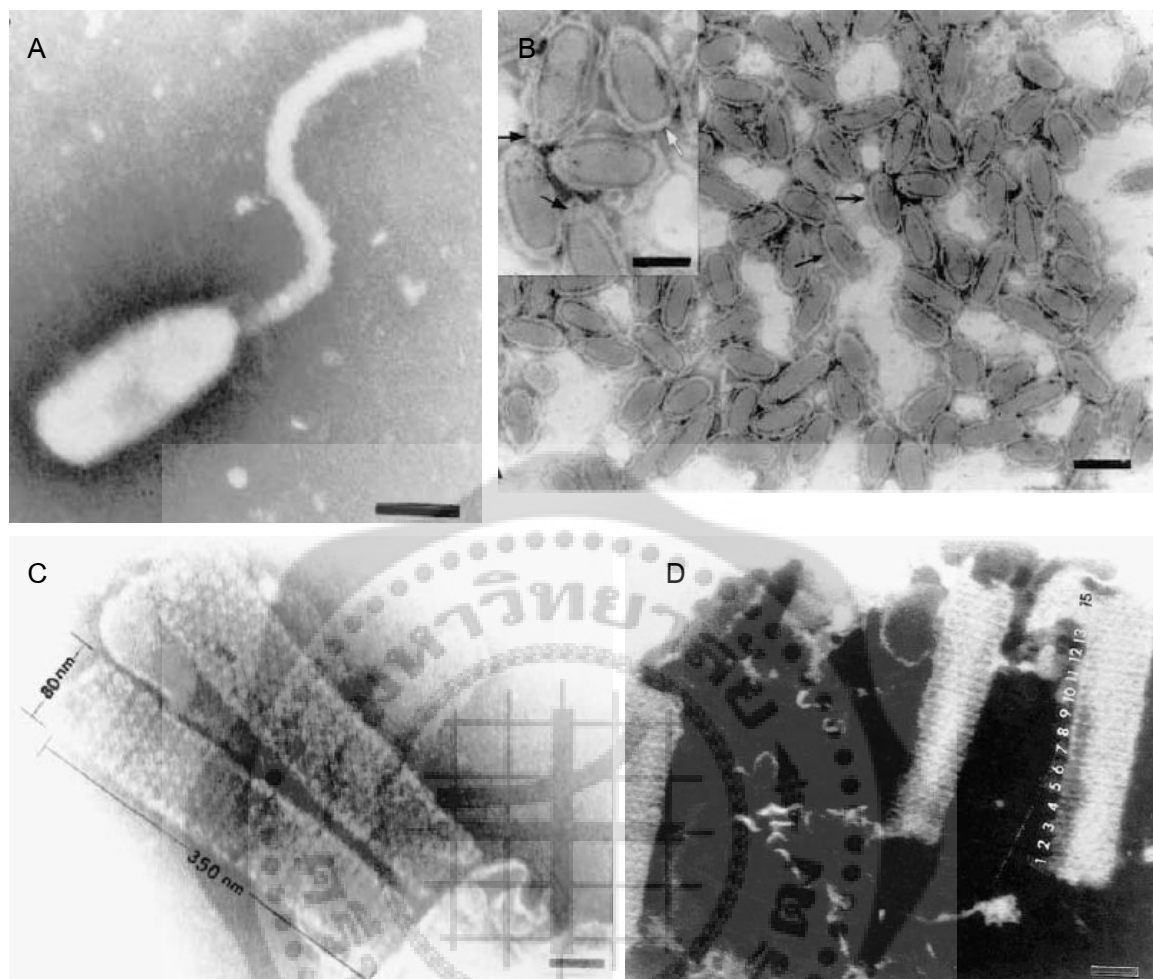
ที่มา: Flegel. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1–33

## 2. ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV)

ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวมีรูปร่างเป็นวงรีเกือบเป็นรูปแท่ง (ovoid-to-bacilliform) มีส่วนที่คล้ายหางยื่นออกมาที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาคไวรัส มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ (double-stranded DNA) (Huang; et al. 2001: 115-125) อนุภาคไวรัสมีความยาวประมาณ 350 นาโนเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 130 นาโนเมตร (Huang; et al. 2001: 115-125) จัดเป็นไวรัสสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด จากการศึกษาจีโนมพบว่ามีความยาวประมาณ 300 kb ประกอบด้วยส่วนที่เป็นยีน (open reading frame) 184 ORFs (Hulten; et al. 2001: 7-22) ซึ่งไม่มีความคล้าย (homology) กับไวรัสใดๆ จึงจัดให้ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวอยู่ใน family และ genus ใหม่ (Flegel; 2006: 1-33) คือ

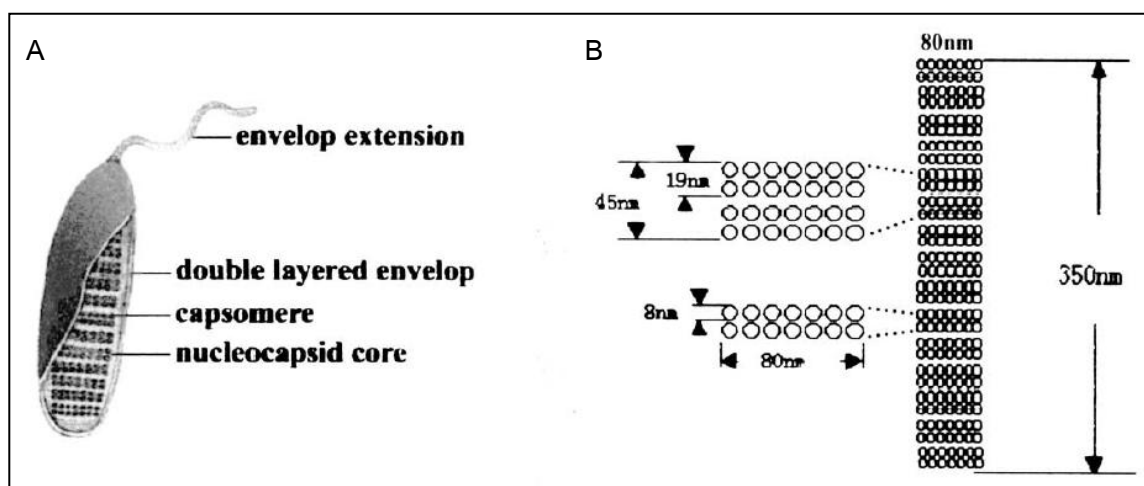
Family	Nimaviridae
Genus	Whispovirus
Species	White spot syndrome virus

ไวรัสชนิดนี้มีเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสสองชั้น (double layer envelope) สำหรับส่วนของนิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid) มีความยาวเฉลี่ย 350 และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 นาโนเมตร ซึ่งจากการศึกษาอนุภาคของเชื้อไวรัส WSSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy: TEM) พบว่านิวคลีโอแคพซิดขดพันเป็นเกลียวคู่ขนานเมื่อมองบริเวณผิวด้านนอกของนิวคลีโอแคพซิดปรากฏเป็นแถวคู่ที่เรียงตัวแนวขวางจำนวน 15 แถว ตลอดความยาวของ nucleocapsid core แถวคู่มีขนาด 19 x 80 นาโนเมตร และประกอบด้วยแคปโซเมอร์ (capsomer) จำนวน 14 หน่วย (7 คู่) ซึ่งแต่ละหน่วยของแคปโซเมอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นาโนเมตร มีระยะห่างระหว่างแถว 7 นาโนเมตร และมีระยะห่างภายในแถว 3 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 2 และ 3) (Huang; et al. 2001: 115-125)



ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างของเชื้อไวรัส WSSV A; อนุภาคเชื้อไวรัส WSSV มีลักษณะกลมรี และที่ปลายด้านหนึ่งมีส่วนยื่นออกมาคล้ายหาง, B; เปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสที่มีลักษณะเป็น double layer envelope C; นิวคลีโอแคพซิดขนาด 80 x 350 นาโนเมตร ซึ่งถูกแยกออกมาจากอนุภาคไวรัส D; นิวคลีโอแคพซิดซึ่งประกอบด้วยเกลียวคู่จำนวน 15 แถว และแต่ละแถวประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 14 หน่วย

ที่มา: Huang; et al. (2001). Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkia*. *Virus Research* 76: 115 – 125.



ภาพประกอบ 3 ภาพวาดแสดง (A) ส่วนต่างๆ ของเชื้อไวรัส WSSV และ (B) แคปโซเมอร์ 7 คู่ที่เรียงตัวในแนวขวาง 15 แถว

ที่มา: Huang; et al. (2001). Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkia*. *Virus Research* 76: 115-125.

จากการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของเชื้อไวรัส WSSV พบว่าประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ อย่างน้อย 35 ชนิด และมี 2 ชนิดที่มีปริมาณมากคิดเป็น 60% ของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส คือ VP28 และ VP26 ซึ่ง VP28 มีบทบาทในการบุกรุกเซลล์ของโฮสต์โดยทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่ไวรัสใช้จับเซลล์ของโฮสต์ (attachment protein) และยังช่วยในการนำไวรัสเข้าสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นไปได้ว่า VP28 มีความสำคัญในการจดจำตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ของกุ้ง ส่วน VP26 เป็นโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีน *wsv311* ซึ่งในครั้งแรกได้จัดจำแนกว่าเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับนิวคลีโอแคพซิด (Van Hulten; & Vlask. 2001: 201-207) และหลังจากนั้นมีการพิสูจน์พบว่าโปรตีน VP26 นั้นถอดรหัสมาจากยีน *p22* ซึ่งเป็นส่วนของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (Zhang; et al. 2002: 471-477) แต่จากการวิเคราะห์ทางด้านจีโนมให้ผลระบุว่าโปรตีน VP26 มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและนิวคลีโอแคพซิด โดยส่วนปลาย N (N-terminus) ซึ่งแสดงสมบัติไม่ชอบน้ำจะยึดติดอยู่กับเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส ขณะที่ทางด้านปลาย C (C-terminus) มีส่วนที่แสดงสมบัติชอบน้ำ จับอยู่กับส่วนนิวคลีโอแคพซิด นอกจากโปรตีน VP28 และ VP26 แล้วยังมีโปรตีนหลักชนิดอื่นๆ ที่สำคัญคือ เปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส VP19 นิวคลีโอแคพซิด VP24 และ VP15 (Arturo. 2010)

### 3. การแพร่กระจายและความสามารถของเชื้อ WSSV ในการบุกรุกเจ้าบ้าน (Host range)

มีรายงานการตรวจพบโรคนี้ในกุ้ง *Penaeus monodon* (กุ้งกุลาดำ), *P. vannamei* (กุ้งขาว), *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus* และ *P. stylirostris* นอกจากนี้ยังพบได้ในปูหลายชนิด จากการทดลองพบว่าเชื้อ WSSV สามารถทำให้กุ้ง *P. articus*, *P. duodarum* และ *P. setiferus* ตายได้ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2007: 10-11) นอกจากนี้เชื้อไวรัส WSSV ยังมีความสามารถในการบุกรุกโฮสต์ได้อีกหลายชนิด ดังนั้นการกำจัดพาหะนำเชื้อไวรัส WSSV ในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง จะสามารถป้องกันหรือลดการแพร่กระจายของเชื้อได้ ปัจจุบันมีการรายงานว่ามีพาหะที่เป็น arthropod ถึง 93 ชนิด (ตาราง 1) ซึ่งสามารถติดเชื้อไวรัส WSSV ทั้งจากการชักนำให้ติดเชื้อในการทดลองและการติดเชื้อเองตามธรรมชาติ (Arturo. 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการติดเชื้อไวรัส WSSV ในไข่และตัวของไรติเฟอร์ *Brachionus urceus* ที่พบในตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งใช้วิธี PCR-dot blot hybridization และจากการทดลองที่ใช้เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. urceus* ผสมกับเชื้อ WSSV ในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อไวรัส WSSV สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไรติเฟอร์เป็น passive host ของเชื้อไวรัส WSSV และทำหน้าที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสไปยังสัตว์จำพวกครัสเตเชียน (Yan; et al. 2004: 69-73) ในปี ค.ศ. 1997 มีการศึกษาการติดเชื้อ WSSV ในพื่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้ง *P. monodon* ที่จับมาจากธรรมชาติ ด้วยวิธี *in situ* hybridization และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามี การติดเชื้อไวรัส WSSV ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ล้อมรอบ seminiferous tubule ในกุ้งเพศผู้ ในขณะที่เพศเมียพบการติดเชื้อในรังไข่, follicle cell, oogonia, oocyte และในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่ไม่พบในไข่ที่เจริญเต็มที่ ซึ่งอาจเป็นเพราะไข่ที่ติดเชื้อไวรัสได้ตายไปก่อนที่จะมีการเจริญเต็มที่ (Lo; et al. 1997: 53-72)

ตาราง 1 แสดงโฮสต์ที่สามารถติดเชื้อไวรัส WSSV ได้ (Arturo. 2010)

Phylum	Order	Family	Species	Type of infection
Arthropoda	Anostraca	Artemiidae	<i>Artemia</i> sp.	E(PO, IMI)
			<i>A. Franciscana</i>	E(PO)
Arthropoda	Calanoida	Pseudodiaptomidae	<i>Schmackeria dubia</i>	N
Arthropoda	Decapoda	Alpheidae	<i>Alpheus brevicristatus</i>	N
			<i>A. lobidens</i>	N
Arthropoda	Decapoda	Astacidae	<i>Astacus astacus</i>	E(IMI)
			<i>A. leptodactylus</i>	E(PO, IMI)
			<i>Pacifastacus leniusculus</i>	E(IMI)
Arthropoda	Decapoda	Calappidae	<i>Calappa lophos</i>	E(PO)
			<i>C. philargius</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Callinassidae	<i>Callinassa</i> sp.	N
Arthropoda	Decapoda	Cancridae	<i>Cancer pagurus</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Cambaridae	<i>Orconectes limosus</i>	E(PO, IMI)
			<i>O. punctimanus</i>	N
			<i>Procambarus clarkia</i>	E(IMI)
Arthropoda	Decapoda	Dorippidae	<i>Paradorippe granulate</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Eriphiidae	<i>Menippe rumphii</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Grapsidae	<i>Grapsus albolineatus</i>	E(PO, IMI)
			<i>Metopograpsus messor</i>	N/E(PO)
Arthropoda	Decapoda	Leucosiidae	<i>Philyra syndactyla</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Lithodidae	<i>Lithodes maja</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Majidae	<i>Doclea hybrid</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Matutidae	<i>Matuta miersi</i>	N
			<i>M. planipes</i>	N
Arthropoda	Decapoda	Ocypodidae	<i>Gelasimus marionis nitidu</i>	N
			<i>Macrophthalmus sulcatus</i>	N
			<i>Uca pugilator</i>	E(IMI)
Arthropoda	Decapoda	Palaemonidae	<i>Exopalaemon orientis</i>	E(PO)
			<i>Macrobrachium idella</i>	E(PO, IMI, IN)
			<i>M. lamarrei</i>	E(PO, IMI, IN)
			<i>M. rosenbergii</i>	N/E(IN)
			<i>Palaemon adspersus</i>	E(PO, IMI)

## ตาราง 1 (ต่อ)

Phylum	Order	Family	Species	Type of infection
Arthropoda	Decapoda	Palinuridae	<i>Panulirus homarus</i>	E(IMI)
			<i>P. longipes</i>	E(PO)
			<i>P. ornatus</i>	E(IMI)
			<i>P. penicillatus</i>	E(PO)
			<i>P. polyphagus</i>	E(IMI)
			<i>P. versicolor</i>	E(PO)
	Decapoda	Parastacidae	<i>Cherax destructor albidus</i>	E(IMI)
			<i>C. quadricarinatus</i>	E(IMI)
	Decapoda	Parathelphusidae	<i>Parathelphusa hydrodomous</i>	E(PO, IMI)
			<i>P. pulvinata</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Parthenopidae	<i>Parthenope prensor</i>	E(PO, IMI)
Arthropoda	Decapoda	Penaeidae	<i>Metapenaeus brevicornis</i>	E(IMI)
			<i>M. dobsoni</i>	N/E(PO)
			<i>M. ensis</i>	N/E(PO)
			<i>M. lysianassa</i>	N
			<i>M. monoceros</i>	E(IMI, PO)
			<i>Parapeneopsis stylifera</i>	N
			<i>Penaeus aztecus</i>	N/E
			<i>P. chinensis</i>	N/E
			<i>P. duorarum</i>	N/E(PO)
			<i>P. indicus</i>	N/E(PO)
			<i>P. japonicus</i>	N/E(PO)
			<i>P. merguensis</i>	N
			<i>P. monodon</i>	N/E
			<i>P. penicillatus</i>	N/E
			<i>P. schmitti</i>	E(IMI)
			<i>P. semisulcatus</i>	N/E
			<i>P. setiferus</i>	N/E(PO)
			<i>P. stylirostris</i>	N/E(PO, IMI, IN)
			<i>P. vannamei</i>	N/E(IMI)
				<i>Trachypenaeus curvirostris</i>



## ตาราง 1 (ต่อ)

Phylum	Order	Family	Species	Type of infection			
Arthropoda	Decapoda	Portunidae	<i>Callinectes arcuatus</i>	N			
			<i>C. sapidus</i>	N			
			<i>Carcinus maenas</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Charybdis annulata</i>	N			
			<i>Ch. cruciata</i>	N			
			<i>Ch. granulate</i>	E(PO)			
			<i>Ch. feriatius</i>	N			
			<i>Ch. japonica</i>	N			
			<i>Ch. lucifera</i>	N/E(PO, IMI)			
			<i>Ch. natator</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Liocarcinus depurator</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Lio. puber</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Podophthalmus vigil</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Portunus pelagicus</i>	N/E(PO, IMI)			
			<i>P. sanguinolentus</i>	N/E(PO)			
			<i>Scylla serrata</i>	N/E(PO, IMI)			
			<i>S. tranquebarica</i>	E(IMI)			
			<i>Thalamita danae</i>	N			
			Arthropoda	Decapoda	Scyllaridae	<i>Scyllarus arctus</i>	E(PO, IMI)
			Arthropoda	Decapoda	Sergestidae	<i>Acetes sp.</i>	N/E(PO, IMI, IN)
Arthropoda	Decapoda	Sesarmidae	<i>Sesarma oceanic</i>	N			
Arthropoda	Decapoda	Solenoceridae	<i>Solenocera indica</i>	N			
Arthropoda	Decapoda	Varunidae	<i>Helice tridens</i>	N			
			<i>Pseudograpsus intermedius</i>	N			
Arthropoda	Decapoda	Xanthidae	<i>Atergatis integerrimus</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Demania splendid</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Halimede ochtodes</i>	E(PO, IMI)			
			<i>Liagore rubromaculata</i>	E(PO, IMI)			

## ตาราง 1 (ต่อ)

Phylum	Order	Family	Species	Type of infection
Arthropoda	Diptera	Ephydriidae	<i>Ephydrida sp.</i>	N
Arthropoda	Stomatopoda	Squillidae	<i>Squilla mantis</i>	N
Annelida	Eunicida	Eunicidae	<i>Marphysa gravelyi</i>	N
Chaetognatha	-	-	-	N
Rotifera	Ploimida	Brachionidae	<i>Brachionus urceus</i>	N

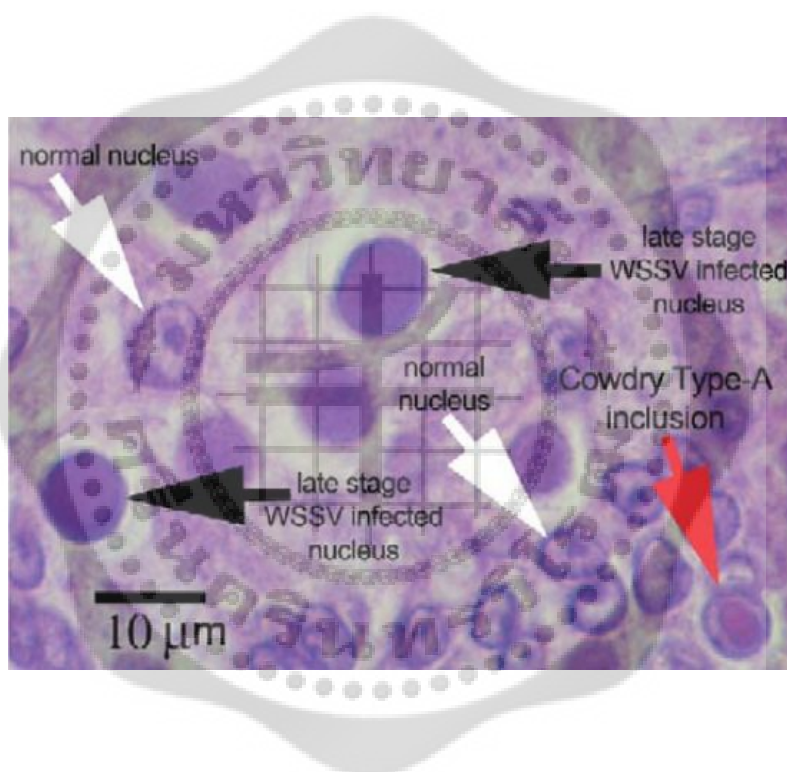
หมายเหตุ N: การติดเชื้อตามธรรมชาติ, E: การติดเชื้อในห้องทดลอง, PO: ชักนำให้ติดเชื้อโดยการกิน, IMI: แชน้ำที่มีเชื้อไวรัส, IN: ฉีดด้วยไวรัส

ที่มา: Arturo. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.* 41: 43.



#### 4. พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV

ลักษณะทางเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV คือ มีการขยายตัวของนิวเคลียสในเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น ectoderm และ mesoderm ส่วนเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส WSSV คือ subcuticular epithelium และในการทำสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อแผ่นบางบริเวณ subcuticular epithelium มักจะแสดงอาการของโรคคือมีการขยายใหญ่ของนิวเคลียสซึ่งภายในมี basophilic inclusion และล้อมรอบด้วยไซโทพลาสซึม สำหรับนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อและอยู่ในระยะ early stage จะพบโครมาตินที่แยกออกมาจาก inclusion และมีขอบเขตชัดเจนของวงแหวนในส่วน nucleoplasm ที่ไม่ติดสี ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า Cowdry type A inclusion (ภาพประกอบ 4) (Flegel; 2006: 1-33)



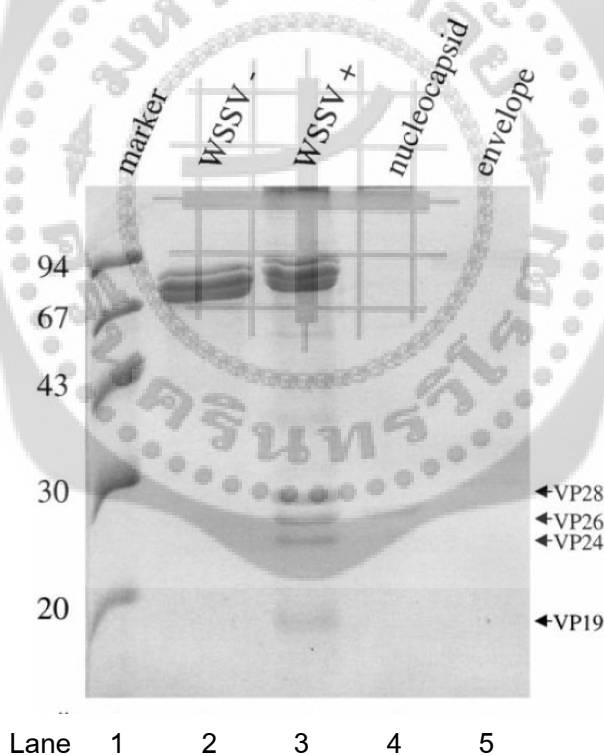
ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวเมื่อย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซิลินและอีโอซิน นิวเคลียสของเซลล์ปกติ (หัวลูกศรสีขาว) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ (hypertrophied nuclei) ติดสีแดงในระยะแรกเรียก Cowdry type A inclusion (หัวลูกศรสีแดง) แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินในระยะหลัง (หัวลูกศรสีดำ)

ที่มา: Flegel. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1–33.

## 5. โปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 26 กิโลดาลตัน

### 5.1 การศึกษาโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตัน ของไวรัส WSSV

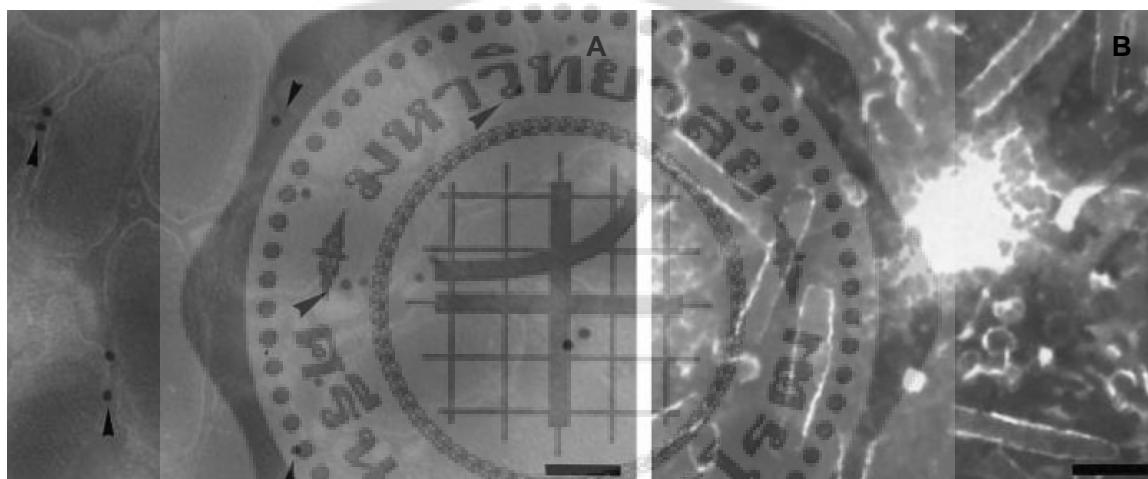
จากการศึกษาของ แวน ฮูลเติน และคนอื่นๆ เมื่อปี ค.ศ. 2000 ได้รายงานว่าโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน ของไวรัส WSSV เป็น nucleocapsid โดยได้ทำการทดลองแยกส่วนของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสด้วย N-P40 (ดีเทอร์เจนท์) และนำส่วน nucleocapsid มาแยกโปรตีนตามขนาดด้วย SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน และ 24 กิโลดาลตัน ในแถวที่ใช้ตัวอย่างเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์และในแถวที่ใช้ตัวอย่างเฉพาะ nucleocapsid ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโปรตีนขนาด 26 และ 24 กิโลดาลตัน นี้เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ nucleocapsid (ภาพประกอบ 5) นอกจากนี้ยังทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน VP26 ซึ่งถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 204 หน่วยที่คำนวณตามทฤษฎีแล้วมีขนาด 22 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์ Protein's Hydropathic Profile พบว่า ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N (N terminus) แสดงคุณสมบัติเป็น hydrophobic สูง (Van Hulten; et al. 2000: 227-236)



ภาพประกอบ 5 แถบโปรตีนขนาด 26 kDa (VP26) ปรากฏในแถวที่ใช้อนุภาคไวรัส WSSV เป็นตัวอย่าง (แถว 3) และแถวที่ใช้ nucleocapsid เป็นตัวอย่าง (แถว 4)

ที่มา: Van Hulten; et al. (2000). Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266: 227-236.

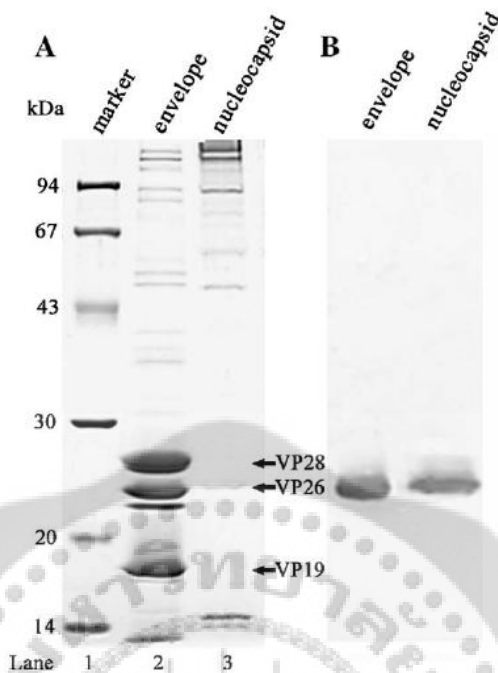
ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 จากการศึกษากายของ หยาง และคนอื่นๆ เมื่อศึกษาด้วยวิธี immunoelectron microscopy โดยทำการกระตุ้นยีน *p22* ซึ่งจัดจำแนกไว้ว่าเป็นรหัสของโปรตีน VP26 ให้มีการแสดงออกในรูปแบบ GST-P22 fusion protein และใช้โปรตีนนี้ในการปลุกภูมิคุ้มกัน ในหนู นำแอนติบอดีที่ได้มาบ่มกับอนุภาคไวรัสที่ตรึงอยู่บนกริด (grid) และบ่มซ้ำด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 คือ gold-labelled anti-mouse IgG ย้อมสีแบบ negative staining ด้วย 2% phosphotungstic acid และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่ามีอนุภาคทองคำมีการกระจายตัวติดอยู่กับบริเวณภายนอกของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส WSSV แต่ไม่พบใน nucleocapsid (ภาพประกอบ 6) จากการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีน *p22* เป็นโปรตีนเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (Zhang; et al. 2002: 471-477)



ภาพประกอบ 6 อนุภาคไวรัส WSSV ที่มีอนุภาคทองคำติดอยู่บริเวณรอบนอกของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (A) และ nucleocapsid ซึ่งไม่พบอนุภาคทองคำ (B)

ที่มา: Zhang; et al. (2002). Transcription and identification of an envelope protein gene (*p22*) from shrimp white spot syndrome virus. *Journal of General Virology* 83: 471-477.

ในปี ค.ศ. 2005 ซี และ แยก ใช้ดีเทอร์เจนท์ (detergent) 1% Triton X-100 และ DTT ในการปลดปล่อยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสออกมาจากอนุภาคไวรัส WSSV พบโปรตีนหลักๆ ของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส WSSV เช่น VP28 และ VP19 ในส่วน soluble (envelope) fraction ส่วนโปรตีน VP26 ส่วนใหญ่พบในส่วน envelope fraction แต่อย่างไรก็ตามยังมีโปรตีน VP26 บางส่วนอยู่ใน insoluble (nucleocapsid) fraction ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าโปรตีน VP26 มีความสัมพันธ์กับ nucleocapsid ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยใช้ anti-VP26 serum พบว่ามีโปรตีน VP26 อยู่ทั้งในส่วนของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและ nucleocapsid (ภาพประกอบ 7) และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน VP26 กับ nucleocapsid โดยการนำ recombinant VP26 มาบ่มรวมกับ nucleocapsid พบว่าสามารถตรวจพบ recombinant VP26 เมื่อนำ nucleocapsid ดังกล่าวมาทดสอบด้วยวิธี Western blot ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโปรตีน VP26 สามารถมีปฏิกิริยากับ nucleocapsid หรืออาจจัดให้เป็นโครงสร้างที่เชื่อมต่อระหว่างเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและ nucleocapsid ซึ่งรูปแบบที่เป็นไปได้คือส่วนปลาย N (N-terminus) ของโปรตีน VP26 ยึดติดอยู่กับเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสผ่านบริเวณที่แสดงสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) และส่วนปลาย C (C-terminus) ยึดติดอยู่กับ nucleocapsid นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถของโปรตีน VP26 ในการจับกับโปรตีน actin โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี coimmunoprecipitation และใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ actin (anti-actin antibody) พบว่าโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV สามารถทำให้ตกตะกอนด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ actin จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV สามารถจับกับโปรตีน actin ได้ ซึ่งเป็นหลักฐานว่าโปรตีน VP26 สามารถจับกับ cytoskeleton โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ actin microfilament และมีบทบาทที่สำคัญที่กระบวนการขนส่งภายในเซลล์ (intracellular transport) เนื่องจากหลังจากที่ไวรัสบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านแล้วต้องมีการขนส่งจีโนมของไวรัสเข้าสู่นิวเคลียสหรือ specific cytosolic membrane (Xie; & Yang. 2005: 93-99)



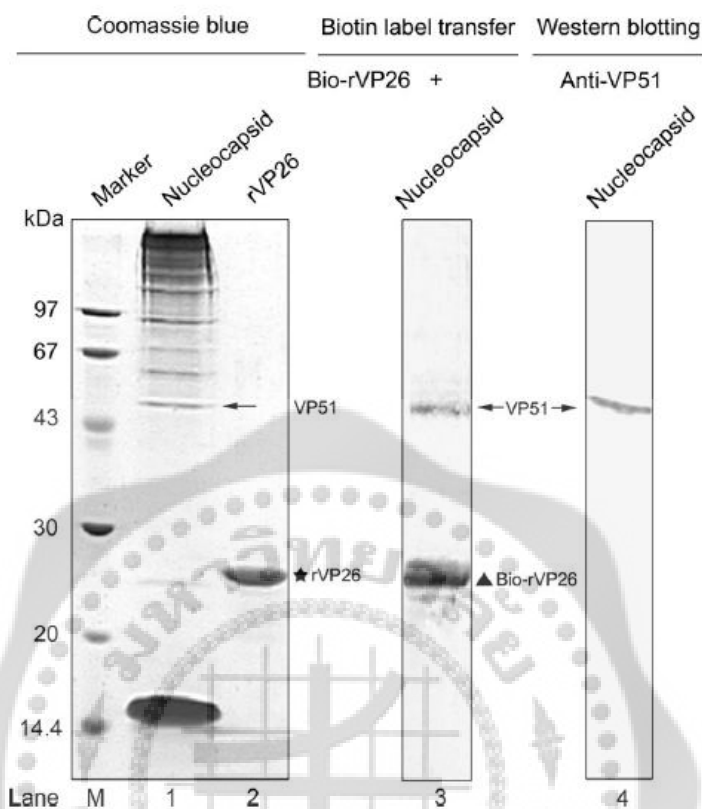
ภาพประกอบ 7 (A) แผ่นเจล SDS-PAGE ของไวรัส WSSV ซึ่งพบโปรตีน VP28 VP26 และ VP19 ในแถบที่มีเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสเป็นตัวอย่าง (B) Western blotting ของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและ nucleocapsid ของไวรัส WSSV เมื่อบ่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26

ที่มา: Xie; & Yang. (2005). Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology* 336: 93-99.

และในปี ค.ศ. 2008 จากงานวิจัยของ วาน และคนอื่นๆ ได้ทำการทดลองเพื่อหาชนิดของโปรตีนใน nucleocapsid ที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน VP26 โดยใช้วิธี biotin label transfer โปรตีน VP26 ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นรีคอมมิแนนท์โปรตีน (rVP26) ที่ติดอยู่กับโปรตีน histidine ทำการเชื่อมติดโปรตีน rVP26 เข้ากับ Sulfo-SBED (Sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(*p*-azidobenzamido) hexanoamido]ethyl-1,3'-dithiopropionate) และนำโปรตีนที่ทำการเชื่อมต่อกับ Sulfo-SBED (Bio-rVP26) แล้ว บ่มกับ nucleocapsid และให้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร นาน 15 นาที นำโปรตีนมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE แล้วนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie blue หรือย้ายโปรตีนลง polyvinylidene fluoride membrane และทำการติดตามโปรตีนที่ติดฉลากด้วย biotin ด้วย streptavidin-alkaline phosphatase และแช่ในสารละลายซับสเตรต NBT/BCIP ซึ่งนอกจากปรากฏแถบโปรตีนของ rVP26 ที่เชื่อมต่อกับ biotin แล้วยังพบแถบโปรตีนของ VP51 ซึ่งมีตำแหน่งเดียวกับ Western blotting ที่บ่มด้วย anti-VP51 (ภาพประกอบ 8) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ามีการส่งผ่าน biotin จาก Bio-rVP26 ให้กับเฉพาะโปรตีน VP51 เท่านั้น (Wan; et al. 2008: 12598-12601)







ภาพประกอบ 8 แสดงแผ่นเจลที่ย้อมสี Coomassie blue (แถว M 1 และ 2) และ Western blotting (แถว 3 และ 4)  
 แถว M โปรตีนมาตรฐาน  
 แถว 1 nucleocapsid  
 แถว 2 รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26 (rVP26)  
 แถว 3 Bio-rVP26 ที่มีการส่งผ่าน biotin ให้กับโปรตีน VP51 บ่มด้วย streptavidin-alkaline phosphatase  
 แถว 4 แถบโปรตีน VP51 ใน nucleocapsid บ่มด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะโปรตีน VP51

ที่มา: Wan; et al. (2008). VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *Journal of Virology* 82: 12598-12601.

## 5.2 รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26

โปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัส WSSV ถอดรหัสมาจากยีน *vp26* ที่มีความยาว 615 คู่เบส กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 204 หน่วย (ภาพประกอบ 9) และเมื่อวิเคราะห์ Protein's Hydrophobicity Profile ตามวิธีของ Kyte-Doolittle พบว่านิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' ถอดรหัสให้กรดอะมิโนที่แสดงคุณสมบัติเป็น hydrophobic part (ภาพประกอบ 10) จึงออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนในบริเวณดังกล่าวให้มีตำแหน่งถัดเข้ามาจากปลาย 5' ของยีน *vp26* ทำให้นิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' หายไป 108 นิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ที่ใช้และบริเวณตัดจำเพาะ (ขีดเส้นใต้) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

VP26F109 : 5'-CG GGA TCC CGT GTT GGA AGA AGC GTC GTC-3'

VP26RPST : 5'-T GCA CTG CAG TTA CTT CTT GAT TTC G-3'

หลังจากใช้เอนไซม์ *pfu* polymerase และไพรเมอร์คู่ดังกล่าวทำ PCR แล้ว PCR product ซึ่งมีขนาด 523 คู่เบส จะถูกโคลนเข้าสู่ pQE30 expression vector ในตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Pst*I (ภาพประกอบ 11) และ transform เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ซึ่งเมื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วย 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) จะได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เชื่อมติดอยู่กับโปรตีน histidine จำนวน 6 หน่วย ซึ่งมีขนาดประมาณ 23 kDa และให้ชื่อว่า rVP26F109 (Chaivisuthangkura; et al. 2006: 201-204)

```

1  ATG GAA TTT GGC AAC CTA ACA AAC CTG GAC GTT GCA ATT ATT GCA 45
1  M  E  F  G  N  L  T  N  L  D  V  A  I  I  A 15

46 ATC TTG TCC ATT GCA ATC ATT GCT CTA ATC GTT ATC ATG GTT ATA 90
16 I  L  S  I  A  I  I  A  L  I  V  I  M  V  I 30

91 ATG ATT GTA TTC AAC ACA CGT GTT GGA AGA AGC GTC GTC GCT AAT 135
31 M  I  V  F  N  T  R  V  G  R  S  V  V  A  N 45

136 TAT GAT CAG ATG ATG CGA GTC CCA ATT CAA AGA AGG GCA AAG GTA 180
46 Y  D  Q  M  M  R  V  P  I  Q  R  R  A  K  V 60

181 ATG TCA ATT CGT GGA GAG AGG TCC TAC AAT ACT CCT CTT GGA AAG 225
61 M  S  I  R  G  E  R  S  Y  N  T  P  L  G  K 75

226 GTG GCC ATG AAG AAT GGT CTC TCC GAT AAG GAC ATG AAG GAT GTT 270
76 V  A  M  K  N  G  L  S  D  K  D  M  K  D  V 90

271 TCT GCT GAT CTT GTC ATC TCT ACC GTC ACA GCC CCA AGG ACT GAT 315
91 S  A  D  L  V  I  S  T  V  T  A  P  R  T  D 105

316 CCC GCT GGC ACT GGG GCC GAG AAC TCT AAC ATG ACT TTG AAG ATC 360
106 P  A  G  T  G  A  E  N  S  N  M  T  L  K  I 120

361 CTC AAC AAC ACT GGC GTC GAT CTC TTG ATC AAC GAC ATT ACT GTT 405
121 L  N  N  T  G  V  D  L  L  I  N  D  I  T  V 135

406 CGG CCA ACT GTT ATT GCA GGA AAC ATT AAG GGA AAT ACT ATG TCG 450
136 R  P  T  V  I  A  G  N  I  K  G  N  T  M  S 150

451 AAC ACT TAC TTC TCG AGC AAG GAC ATT AAA TCT TCA TCT TCA AAA 495
151 N  T  Y  F  S  S  K  D  I  K  S  S  S  S  K 165

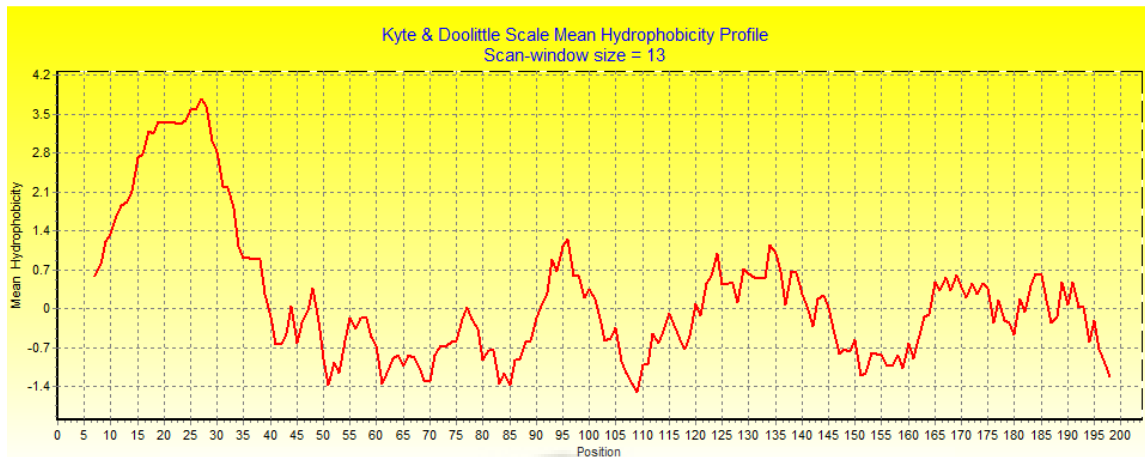
496 ATT ACC CTC ATT GAC GTG TGC AGC AAA TTT GAA GAC GGC GCA GCC 540
166 I  T  L  I  D  V  C  S  K  F  E  D  G  A  A 180

541 TTC GAA GCT ACA ATG AAC ATT GGA TTC ACC TCC AAG AAT GTG ATC 585
181 F  E  A  T  M  N  I  G  F  T  S  K  N  V  I 195

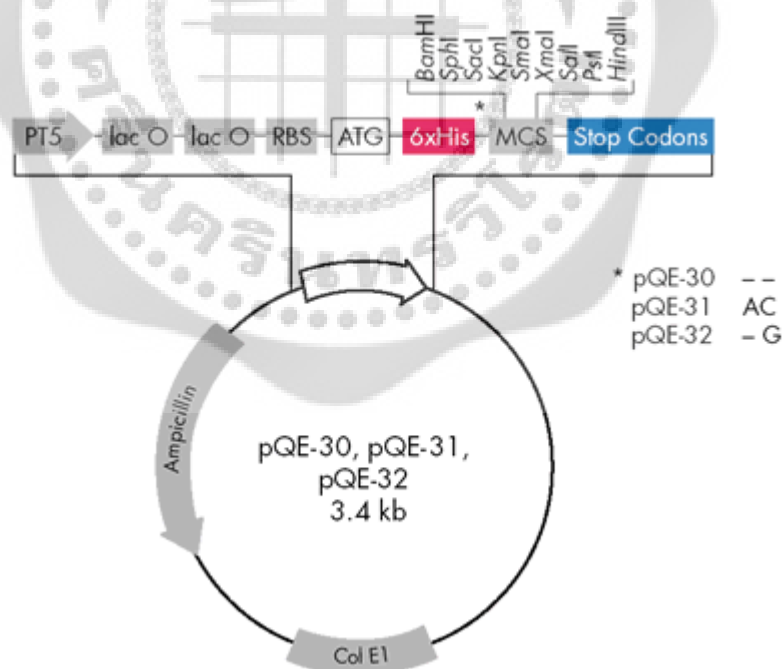
586 GAT ATC AAG GAC GAA ATC AAG AAG AAG TAA 615
196 D  I  K  D  E  I  K  K  K  *

```

ภาพประกอบ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน VP26 โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (Genbank accession no: EF534253.1)



ภาพประกอบ 10 แสดงการวิเคราะห์ Protein's Hydrophobicity Profile ของโปรตีน VP26 โดยคำนวณตามวิธีของ Kyte-Doolittle พบว่าลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N จำนวน 36 หน่วย มีแนวโน้มเป็น hydrophobic part โดยแกน X แสดงตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน และแกน Y แสดงค่า hydrophobicity ของกรดอะมิโน



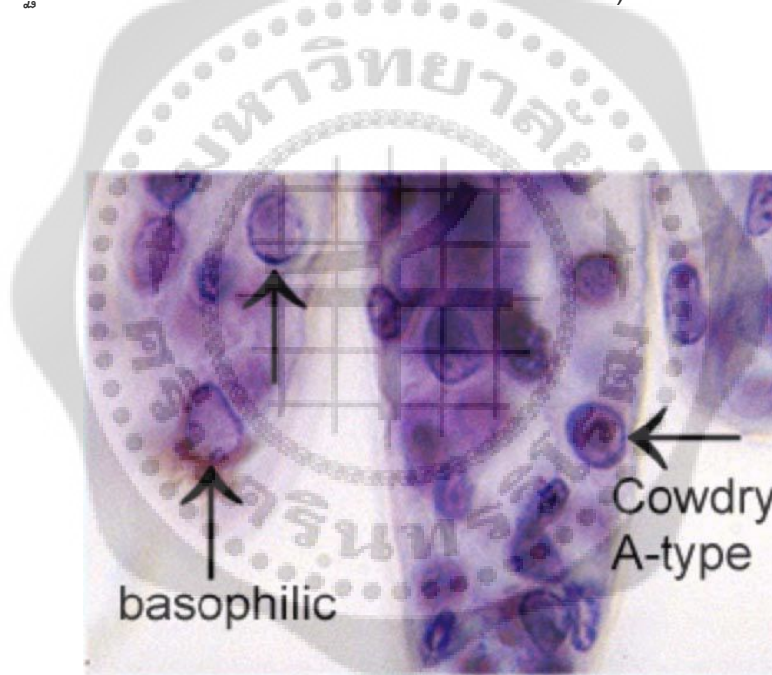
ภาพประกอบ 11 แสดงโครงสร้างของ pQE30 expression vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ต่างๆ (restriction site) (Qiagen)

## 6. การตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV

นอกจากการสังเกตลักษณะอาการของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV (gross pathology) แล้ว ยังมีวิธีอื่นๆ ที่สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส WSSV คือ

### 6.1 วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว (rapid staining test)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโรคในระดับเนื้อเยื่อ โดยย้อมเนื้อเยื่อสดด้วย สีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H&E) ในระยะเวลาสั้นๆ และตรวจดูด้วย กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งกุ้งที่ป่วยเป็นโรคตัวแดงดวงขาวจะพบ inclusion สีม่วงแดงในนิวเคลียสที่ใหญ่กว่าปกติในเซลล์เยื่อบุใต้ผิวหนังอกกุ้ง (subcuticular epithelial cells) (ภาพประกอบ 12) (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2550: 10-11)



ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของโรคตัวแดงดวงขาวในเหงือกจากวิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสระยะแรกมีนิวเคลียสขยายใหญ่ (hypertrophied nuclei) ติดสีแดงเรียก Cowdry type A inclusion และระยะหลังนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (basophilic)

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2550: 10-11.

## 6.2 วิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological method)

วิธีนี้คือการทดสอบโรคในระดับเนื้อเยื่อ โดยย้อมเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการรักษาให้คงสภาพด้วยสี H&E และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ลักษณะทางพยาธิวิทยาของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV จะพบพยาธิสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เจริญมาจากชั้น ectoderm และ mesoderm ที่สำคัญคือ นิวเคลียสใหญ่ขึ้นและติดสีแดงในระยะแรกของการติดเชื้อ และติดสีน้ำเงินในระยะหลัง บางครั้งโครมาตินจะถูกดันไปติดเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ภาพประกอบ 4)

## 6.3 การตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

วิธีทางชีวโมเลกุลที่ได้รับความนิยมในการตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV คือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยอาศัยโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ หรือไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดขอบเขตหรือขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ส่วนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่เกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ซึ่งประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ปฏิกิริยาจะถูกควบคุมด้วยเครื่อง thermal cycler ที่สามารถตั้งโปรแกรมเพื่อควบคุมอุณหภูมิและเวลาที่ต้องการได้ (ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทรงกูร. 2550: 163-165)

งานวิจัยของ โล และคนอื่นๆ ในปี ค.ศ. 1996 ได้ใช้ nested primer ในการทำ PCR เพื่อตรวจการติดเชื้อ WSBV ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กุ้งกุลูมา (*P. japonicus*) *P. semisulcatus*, กุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) และ arthropods ที่พบในบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัส WSBV ขนาด 1,461 คู่เบส ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sall* ในการทำ PCR นั้น One-step PCR ใช้ไพรเมอร์ 146F1/146R1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์คู่นอกสุดสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส WSSV ในตัวอย่างดีเอ็นเอของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อเจือจาง  $10^{-3}$  และเมื่อทำ Two-step PCR ด้วยไพรเมอร์ 146F2/146R2 ที่มีตำแหน่งถัดเข้ามาจากไพรเมอร์คู่แรกพบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัส WSSV ในตัวอย่างดีเอ็นเอของกุ้งติดเชื้อที่เจือจางถึง  $10^{-8}$  นอกจากนี้การใช้เทคนิค One-step PCR และ Two-step PCR ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส WSSV ใน arthropods ที่พบในบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง พบว่าให้ผลบวกในตัวอย่าง Copepods, ปู *Helice tridens*, กุ้ง *Palaemonidae* และในแมลง Ephydriidae ซึ่งเป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าสัตว์เหล่านี้อาจเป็นพาหะของไวรัส WSSV ได้ (Lo; et al. 1996: 215-225)

นอกจากเทคนิค PCR แล้วยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิคอื่นๆ เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส WSSV เช่น เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อลดเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา มีความจำเพาะสูงเนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณต่างๆ ของดีเอ็นเอเป้าหมายถึง 4 ตำแหน่ง และในการทำปฏิกิริยาสามารถทำได้ที่อุณหภูมิเดียวทำให้สามารถใช้เครื่อง heating block แทนเครื่อง thermal cycler ที่มีราคาแพงได้ สำหรับในงานวิจัยของ เจริญรัมย์ และคนอื่นๆ ได้ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุง *P. monodon* พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวที่ไม่แตกต่างไปจาก nested PCR และสามารถติดตาม LAMP products ได้โดยใช้ gel electrophoresis หรืออาจใช้ชุด lateral flow dipstick (LFD) ยืนยัน LAMP products ที่เกิดขึ้นในกรณีผลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis ไม่ชัดเจน (Jaroenram; et al. 2009: 65-70) หรือเทคนิค *in situ* hybridization ที่สามารถใช้ศึกษาในระดับเนื้อเยื่อได้ ดังที่มีการใช้เทคนิคนี้ในงานวิจัยของ แชน และคนอื่นๆ ในปี ค.ศ.1996 ซึ่งทำการตรวจหาอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัส WSSV โดยตัดเนื้อเยื่อของกุงกุลาดำที่ได้รับเชื้อนี้ในชั่วโมงที่ 0, 16, 22, 40, 52 และ 64 มาตรวจหาเชื้อ WSSV โดยทำการ hybridized เนื้อเยื่อกุงกุลาดำที่ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อแล้วกับ PmNOBIII (*P. monodon* non-occluded baculovirus III) ซึ่งเป็น DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin พบว่า เซลล์ที่เริ่มให้ผลบวกในตัวอย่างชั่วโมงที่ 16 คือ เซลล์ของกระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis และ ตับ-ตับอ่อน ในชั่วโมงที่ 22 ให้ผลบวกในอวัยวะน้ำเหลือง antennal gland กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด กล้ามเนื้อ และทางเดินอาหารส่วน midgut และ hindgut สำหรับเนื้อเยื่อประสาทและตาประกอบ (compound eyes) จะพบการติดเชื้อ WSSV เมื่อได้รับเชื้อไปแล้ว 40 ชั่วโมง และนอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อต่างๆ ที่พัฒนามาจาก mesoderm และ ectoderm เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อบุผิว เนื้อเยื่อประสาท และกล้ามเนื้อ สามารถติดเชื้อ WSSV ได้ ในชั่วโมงที่ 52 และ 64 เนื้อเยื่อของกระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด และ antennal gland พบการติดเชื้อ WSSV อย่างรุนแรงจนกระทั่งเนื้อเยื่อเหล่านี้กลายเป็น necrotic ส่วนอาการตัวแดงดวงขาวสังเกตเห็นเมื่อได้รับเชื้อ WSSV ไปแล้ว 40 ชั่วโมง และกุงเริ่มตายที่เวลา 64 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ขณะที่ probe ไม่ให้ผลบวกกับเนื้อเยื่อกุงปกติที่ไม่ติดเชื้อ WSSV (Chang; et al. 1996: 131-139)

#### 6.4 การตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

การตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody) โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งต่างๆ บนแอนติเจน วิธีนี้มีพื้นฐานจากการประยุกต์ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนต่างๆ ของไวรัส

ในปี ค.ศ. 2001 พูลอส และคนอื่นๆ ได้ประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้งวงศ์ penaeid โดยใช้โปรตีนโครงสร้างของไวรัส WSSV ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 15 ถึง 35 กิโลดาลตันเป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนู หลังจากหลอมรวมเซลล์ม้ากับไมอีโลมาแล้วพบว่าไฮบริโดมาจำนวน 4 โคลนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส WSSV สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และ immunofluorescence ได้ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6B9, 8B7 และ 9F1 เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนโครงสร้างขนาด 28 กิโลดาลตัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3H12 เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนโครงสร้างขนาด 28 และ 19 กิโลดาลตัน ทั้ง 4 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นคือ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), hepatopancreatic parvovirus (HPV) และ Taura syndrome virus (TSV) แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของไวรัส WSSV สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จาก จีน ไทย อินเดีย Texas South Carolina และ Panama ได้ (Poulos; et al. 2001: 13-23)

ในปี ค.ศ. 2010 ชัยวิสุทธางกูร และคนอื่นๆ ได้ใช้เทคนิค one-step PCR เพิ่มจำนวนยีน VP19 ของไวรัส WSSV ที่สกัดจากชาวย่น้ำกุ้ง *P. vannamei* โดย PCR product ถูกโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pMAL-C2 และชักนำให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วย isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 mM ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ ซึ่งอยู่ในรูป MBP-VP19 เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว จากนั้นทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่เก็บจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting โดยใช้ตัวอย่างในการทดสอบคือ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์ pMAL-C2 และ VP19-pMAL-C2 นำเซลล์ม้าของหนูที่ให้ผลทดสอบแอนติซีรัมดีที่สุดมาหลอมรวมกับไมอีโลมา เมื่อทำการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting พบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5 ชนิดที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน VP19 ของไวรัส WSSV คือ W25-8D, W10-9D, W9-11C, W9-11D และ W7-7H ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกชนิดสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่างๆ คือ dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry และเมื่อทดสอบความไวในการตรวจการติดเชื้อ WSSV ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี W25-8D ซึ่งเป็นชนิดที่ให้ผลการทดลองในวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่างๆ ดีที่สุด ด้วยวิธี dot blotting พบว่าสามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน MBP-VP19 เจือจางที่สุดที่ 70 pg/spot หรือ 70 ng/ml และจากการทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างสารสกัดชาวย่น้ำกุ้งติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี dot blotting พบว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อในตัวอย่าง



ขาวายน้ำที่เจือจาง 200 เท่า และเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W25-8D ร่วมกับโมโนโคลนอล-แอนติบอดี W29 ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 ของไวรัส WSSV สามารถตรวจพบการติดเชื้อในตัวอย่างที่เจือจาง 400 เท่าได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างกันสามารถเพิ่มความไวในการตรวจการติดเชื้อ WSSV ได้ (Chaivisuthangkura; et al. 2010: 15-20)

สำหรับโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตันนั้น ในปี ค.ศ. 2006 ชัยวิสุทธิทางกูร และคนอื่นๆ ได้พัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV โดยติดตามโปรตีน VP26 ด้วยโพลีโคลนอล-แอนติบอดี ในการทดลองนี้ได้ทำการโคลนยีนของโปรตีน VP26 เข้าสู่เวกเตอร์ pQE30 และชักนำให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ด้วย isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 mM นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นซึ่งมีโปรตีน histidine 6 หน่วยเชื่อมติดอยู่ทางปลาย N (rVP26F109) มาแยกตามขนาดด้วย SDS-PAGE ที่ใช้เจลเข้มข้น 15% เมื่อย้อมเจลด้วยสี Coomassie brilliant blue แลบโปรตีนขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน ถูกตัดออกมาและทำให้บริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว เมื่อทำการทดสอบแอนติซีรัมที่ได้จากหนูดังกล่าวด้วยวิธี Western blotting พบว่ามีปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่จำเพาะต่อทั้งโปรตีน rVP26F109 และสารสกัดจากเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส WSSV สำหรับการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ในเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส WSSV พบว่าโพลีโคลนอล-แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน rVP26F109 มีรูปแบบในการเกิดปฏิกิริยาเหมือนกับโมโนโคลนอล-แอนติบอดี W29 ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน VP28 (Chaivisuthangkura; et al. 2006: 201-204)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาอีกหลายวิธีที่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัส WSSV ได้ เช่น immunofluorescence (Anil; et al. 2002: 67-75); (Escobedo-Bonilla; et al. 2005: 163-170); (Escobedo-Bonilla; et al. 2007: 85-94); (Poulos; et al. 2001: 13-23) immunoblot assays (Anil; et al. 2002: 67-75); (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363); (You; et al. 2002: 77-80); (MaKesh; et al. 2006: 64-71); immunochromatographic test strips (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Liu; et al. 2002: 11-18) และ Western blotting (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363); (Yoganandhan; et al. 2004: 517-522)

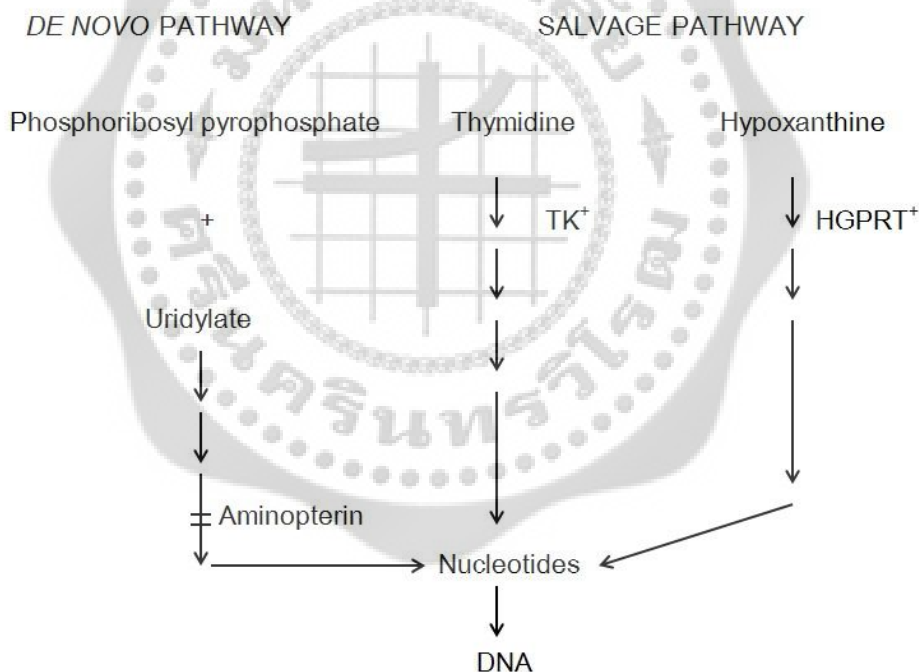
## 7. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ร่างกายจะมีการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมคือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสโลหิต โดยผ่านทางอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่กระจายอยู่ทั่วไปในร่างกาย ซึ่งเมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน เข้าสู่ร่างกาย B lymphocyte (B cells) จำนวนมากจะแบ่งตัวเพิ่มขึ้น และมีการพัฒนาต่อไป จนกระทั่งทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ B lymphocyte แต่ละเซลล์จะผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันไป แอนติบอดีผสมเหล่านี้เรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เพราะว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมามีความจำเพาะต่อ epitope ต่างๆ ที่อยู่บนผิวของแอนติเจนได้ในเวลาเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) ที่ผลิตได้ทั้งหมดนี้ จะมีความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนเพียงอีพิโทปเดียวเหมือนกัน (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ; และคนอื่นๆ. 2543)

นักวิทยาศาสตร์ 2 ท่านแรกที่ค้นพบเทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการหลอมรวมเซลล์สองชนิดเข้าด้วยกันได้สำเร็จคือ Köhler และ Milstein ในปี ค.ศ. 1975 จากการนำเซลล์ myeloma ของหนู mouse กับ B lymphocyte หรือเซลล์พลาสมาจากม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นไว้แล้วด้วยแอนติเจน เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีสมบัติพิเศษ ซึ่งได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 ชนิด คือมีความสามารถในการเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้ตลอดไปเหมือนเซลล์ myeloma และมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนซึ่งเป็นสมบัติที่ได้จาก B lymphocyte ของม้าม ดังนั้นจึงสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะได้ตลอดไปจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมนี้ จากผลงานนี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้ง 2 ท่าน ได้รับรางวัลโนเบลสาขาการแพทย์ ในปี ค.ศ. 1984 (นวลฉวี เวชประสิทธิ์. 2546: 54-64)

ในการหลอมรวมเซลล์เข้าด้วยกัน อาศัยสาร polyethylene glycol (PEG) ซึ่งมีสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์นุ่มและเหนียวหนืดลงไป ทำให้ผิวนอกของเซลล์ 2 เซลล์ที่อยู่ใน mitotic phase เชื่อมรวมกันเป็นเซลล์เดี่ยว ทำให้เกิดการรวมกันของโครโมโซมจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสอง (hybrid cells หรือ heterokaryon) ที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็น tetraploidy ซึ่งเท่ากับจำนวนรวมของโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิด และมีส่วนประกอบทางพันธุกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองเซลล์ หลังจากนั้นเมื่อเซลล์ลูกผสมแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะมีการลดโครโมโซมลงให้เหมือนเซลล์เดี่ยว กลุ่มของเซลล์ที่ได้นี้เรียกว่า hybridoma cells ถ้าการสูญหายของโครโมโซมมีเอ็นของ immunoglobulin ก็ทำให้เซลล์ลูกผสมนั้นหยุดการสร้างแอนติบอดี ถ้าเป็นโครโมโซมที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวและเจริญเติบโต สูญหายไปก็ทำให้กลุ่มเซลล์ลูกผสมนั้นหยุดเจริญเติบโต เซลล์ลูกผสมเป็นเซลล์กลุ่มเดี่ยวที่มีความทนทานต่อ HAT media (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) และสามารถเพิ่มจำนวนและหลั่งแอนติบอดีออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ (แหล่งเดิม. หน้า 54-64.)

เซลล์มะเร็งประกอบด้วย T และ B cells เป็นส่วนใหญ่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนแล้ว B lymphocyte ส่วนหนึ่งกลายเป็นเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี หรือเซลล์พลาสมา (plasma cells) ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้กระตุ้น เซลล์มะเร็งหรือ B lymphocyte (สามารถสร้างเอนไซม์ hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; HGPRT ที่ใช้สร้าง DNA จาก salvage pathway) แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตในหลอดทดลองและตายในเวลาอันสั้น ส่วนเซลล์ myeloma ที่นำมาใช้ในการหลอมรวมเซลล์นั้น เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างแอนติบอดีและเอนไซม์ HGPRT สามารถเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้อย่างไม่จำกัด และอาจเติบโตมากจนเบียดบังเซลล์ลูกผสมที่มีอยู่น้อยกว่าในระยะแรกหลังการหลอมรวมเซลล์ใหม่ๆ ทำให้ไม่ได้เซลล์ลูกผสมที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดเซลล์ myeloma ที่ไม่ต้องการออกไป โดยเซลล์ myeloma ที่บกพร่องในการสร้างเอนไซม์ HGPRT จะไม่สามารถสร้างนิวคลีโอไทด์ผ่าน salvage pathway และไม่สามารถเจริญใน HAT media ได้ เนื่องจากใน HAT media มี aminopterin ซึ่งยับยั้งการสร้างนิวคลีโอไทด์ผ่าน de novo pathway (ภาพประกอบ 13) (แหล่งเดิม. หน้า 54-64.)



ภาพประกอบ 13 แสดงการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ผ่าน de novo pathway และ salvage pathway โดย Aminopterin ซึ่งเป็น analog ของ dihydrofolic acid จับแน่นกับ dihydrofolate reductase ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ทาง de novo pathway ไม่ให้สร้าง purine ดังนั้นเซลล์จะสร้าง DNA ผ่านทาง salvage pathway

ที่มา: ดัดแปลงจาก นวลฉวี เวชประสิทธิ์. (2546). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 54-64.

# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. อุปกรณ์และสารเคมี

#### 1.1 เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ได้จากข่าวน้ำกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

#### 1.2 สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หนูขาว (Swiss mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล  
วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม

2.2 กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) จากฟาร์มในจังหวัดปทุมธานี

#### 1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์	Bio-Rad
2. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
3. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
4. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E	Scientific Industries
5. ตู้ปลอดเชื้อ (horizontal laminar flow cabinets)	NUAIRE
6. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO <sub>2</sub> incubator)	NUAIRE
7. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JENWAY
8. เครื่อง rotary microtome รุ่น RM2135	LEICA
9. แทนอุ่นสไลด์ (Slide warmer)	Medax
10. เครื่อง speed vacuum concentrator รุ่น SC210A	Eppendorf
11. เครื่อง sonicator	LABQUIP
12. เครื่องชั่ง รุ่น A200S ของบริษัท	Sartorius
13. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36	Hirayama
14. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70	Olympus
15. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo
16. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	Sanyo

#### 1.4 เคมีภัณฑ์

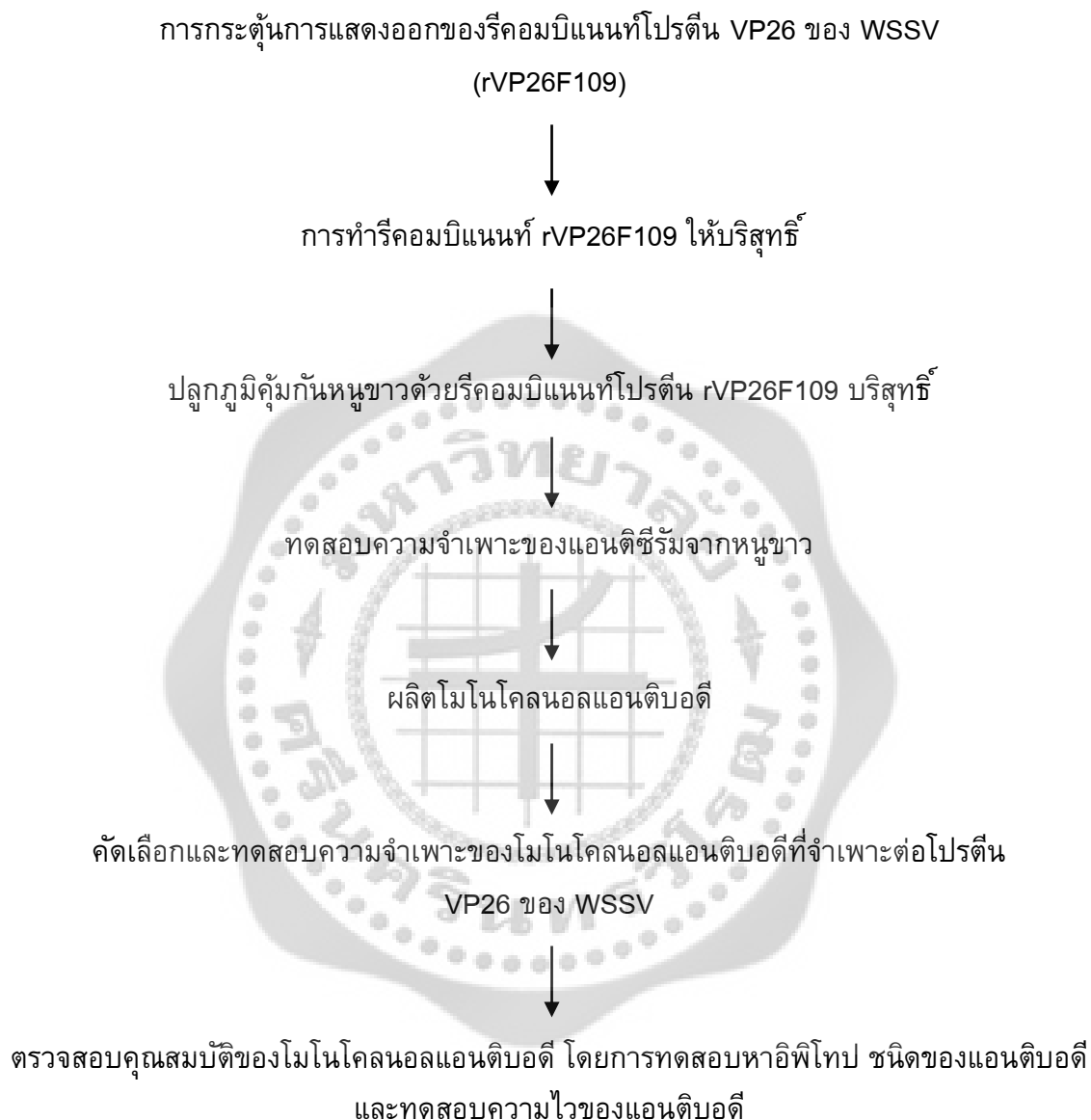
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 3

ตาราง 3 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ยาปฏิชีวนะ (ampicillin)	Sigma
2. ยาปฏิชีวนะ (kanamycin)	Sigma
3. Fetal bovine serum	PAA
4. Polyethylene glycol (PEG)	Starrate
5. Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma
6. Hypoxanthine	Sigma
7. Aminopterin	Gibco
8. Nitrocellulose membrane	Sigma
9. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
10. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
11. Goat anti – mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	BioRad
12. Goat anti – rabbit horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP)	BioRad

## 2. วิธีการดำเนินการ

### ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้



## 2.1 การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV

จากวิธีของ Sambrook; Fritsch; & Maniatis (2000: 17.1-17.10) ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-VP26F109 (Chaivisuthangkura; et al. 2006: 201-204) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ kanamycin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มข้ามคืนใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที จากนั้นแบ่งแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 60-90 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.5-0.7 ทำการเติม isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ rVP26F109 ซึ่งปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มและเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยปั่นด้วยความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ทั้งส่วนใสและนำเซลล์มาผสมกับ buffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris - Cl, 8 M urea pH 8) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมกันจนก้อนของเซลล์กระจายออกและเติม phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM และทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จน lysate ของแบคทีเรียใส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2.2 การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV ให้บริสุทธิ์

นำ lysate ที่ได้จากข้อที่ 2.1 มาผสมด้วย 2X SDS - treatment buffer ในอัตราส่วน 1: 1 ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที นำโปรตีนมาแยกตามขนาดด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จนแถบสีน้ำเงินเคลื่อนที่ถึงขอบล่างสุดของเจล จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย 0.3 M KCl ที่เย็น เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ตัดแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาด 23 kDa ออกมา แช่ใน 0.1% SDS แล้วนำแถบเจลใส่ในถุง dialysis ก่อนนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าใน Towbin buffer ที่ 50 volt อย่างน้อย 8 ชั่วโมง ถ่ายสารละลายที่ได้ใส่ถุง dialysis อันใหม่ แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 2-3 วัน และเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส คำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธี Bradford (Bradford. 1976: 248-254) นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ที่บริสุทธิ์แล้วไปปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และใช้สำหรับการตรวจสอบสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดี

## 2.3 การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26

### ของ WSSV

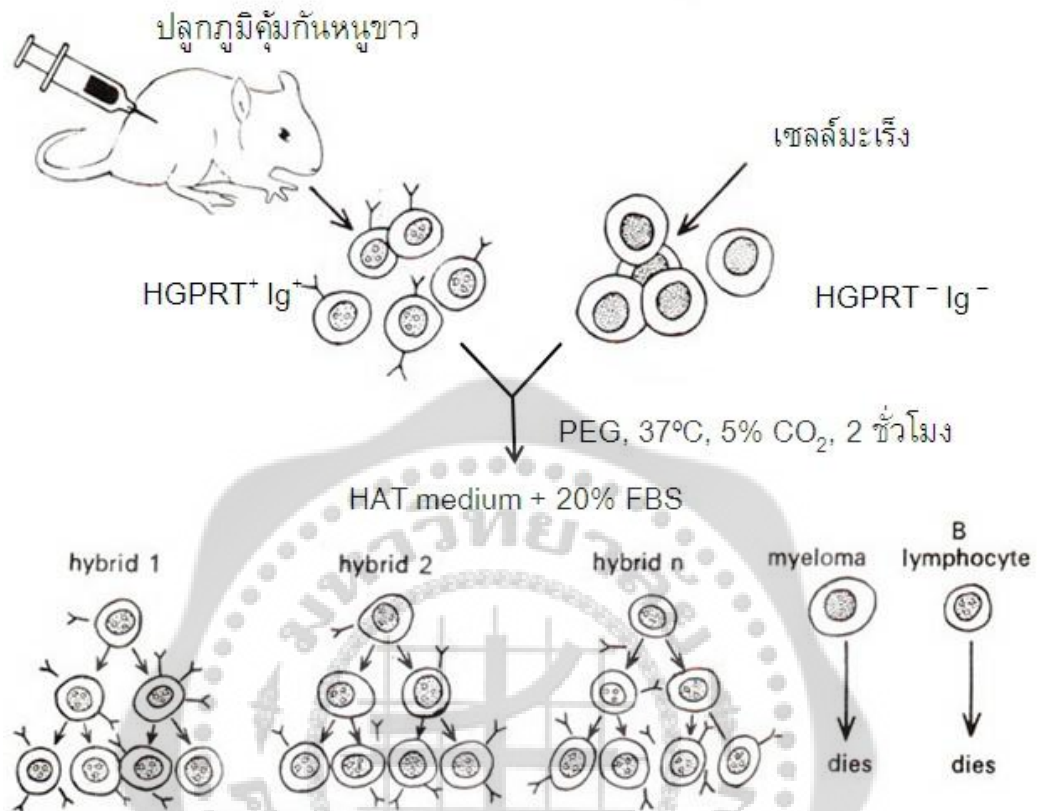
#### 2.3.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวในครั้งแรก นำส่วนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26F109 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 ที่มีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร ฉีดเข้าช่องท้องหนูเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หลังจากนั้นในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีก 3 ครั้งด้วยโปรตีนที่มีปริมาณ 10 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant เว้นระยะเวลาระหว่างการฉีดแต่ละครั้ง 2 สัปดาห์ และเก็บซีรัมจากหนูขาวหลังจากฉีดครั้งที่ 4 ไปแล้ว 1 สัปดาห์ นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ด้วยวิธี Western blotting และเลือกหนูตัวที่มีการตอบสนองดีที่สุดที่สุดมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

#### 2.3.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษานี้ ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Kohler ; & Milstein. 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี ค.ศ. 1979 (Mosmann; Bauman; Williamson. 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์ rVP26F109 ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนดีที่สุดที่สุดมากระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำด้วย rVP26F109 ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากนั้นทำการผ่าตัดแยกม้าม และนำเซลล์ม้ามมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) เข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI และบ่มเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มแยกเซลล์ผสมและกระจายเซลล์ลงเลี้ยงใน 96 wells microculture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) กับ 20% fetal bovine serum (FBS) และเม็ดเลือดแดง 0.5% จำนวน 20 plate เลี้ยงเซลล์ในตู้ CO<sub>2</sub> incubator (ภาพประกอบ 14) ประมาณ 10 วัน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ในหลุมต่างๆ ด้วยกล้อง inverted microscope คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP26 โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry นำไฮบริโดมาที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้วมาทำการโคลนซ้ำ (reclone) โดยวิธี limited dilution เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเพียงเซลล์เดียว จากนั้นทดสอบด้วยวิธี dot blotting และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ตามที่ต้องการ การเก็บรักษาเซลล์ทำได้โดยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้เก็บไว้ใช้ และตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)





ภาพประกอบ 14 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ตัดแปลงจาก [http://www.eplantscience.com/botanical\\_biotechnology\\_biology\\_chemistry/genetics/images/figure/f43.1.jpg](http://www.eplantscience.com/botanical_biotechnology_biology_chemistry/genetics/images/figure/f43.1.jpg) )

### 2.3.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

#### 2.3.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting

ในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting นั้น ทำการทดสอบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยหยดจุดแรกด้วย lysate ของ histidine ที่ได้จากการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ pQE30 expression vector ใน *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ผสมกับสารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ปกติ ส่วนจุดที่สองหยดด้วย lysate rVP26F109 protein ผสมกับสารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อ WSSV โดยทั้งสองจุดใช้สารละลายในการหยดประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto (นมพว่องมันเนย 5% ละลายใน PBS) เป็นเวลา 30 นาที ตัดแบ่งกระดาษไนโตรเซลลูโลสและใส่ลงใน microculture plate จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงใน microculture plate โดยเจือจางน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาด้วย 1% blotto ให้มีค่าความเจือจางสุดท้ายเป็น 1:8 และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นบ่มซ้ำด้วย horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1: 1,500 ในสารละลาย 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง เติมสารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) และ 0.05% cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) ในสารละลาย PBS เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rVP26F109 และหรือ VP26 ของเชื้อ WSSV จะปรากฏจุดสีดำขึ้นในตำแหน่งจุดที่ 2 ซึ่งเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลดังกล่าวและไม่เกิดจุดสีดำในจุดที่ 1 ซึ่งหยดด้วย histidine ผสมกับสารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ปกติ จะถูกคัดเลือกในการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blot, dot blotting และ immunohistochemistry ต่อไป

#### 2.3.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blotting

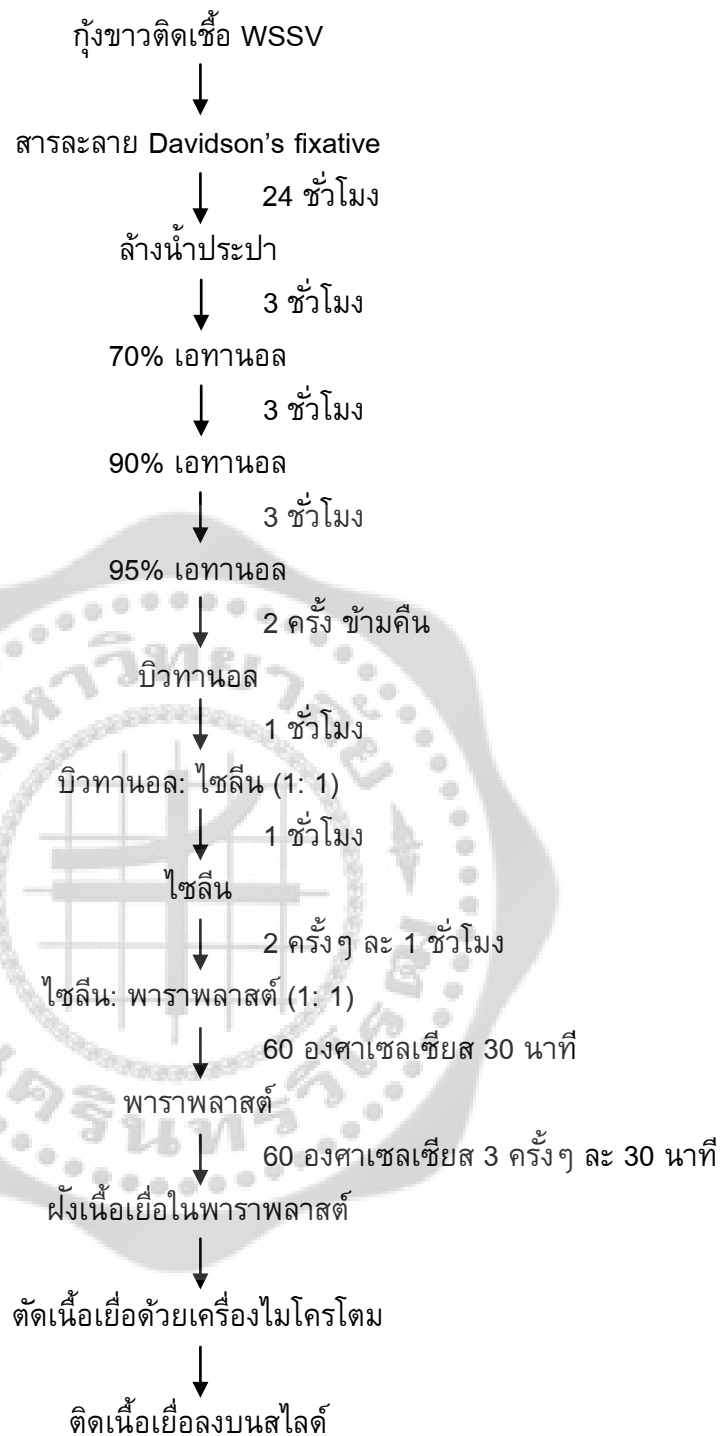
นำสารสกัดขาว่ายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อ WSSV มาแยกโปรตีนใน 12% SDS – PAGE ผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินวิ่งมาถึงขอบล่างของแผ่นเจล ทำการถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตร-เซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แล้วตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นเส้น แยกบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เจือจาง 1: 40 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง บ่มซ้ำด้วย GAM-HRP เจือจาง 1: 1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และเติมสารละลายซับสเตรตเช่นเดียวกับวิธี dot blotting ตามวิธีในข้อ 2.3.3.1 ตรวจสอบผลที่ได้โดยเทียบกับแถบโปรตีนที่บ่มด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดี

### 2.3.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting

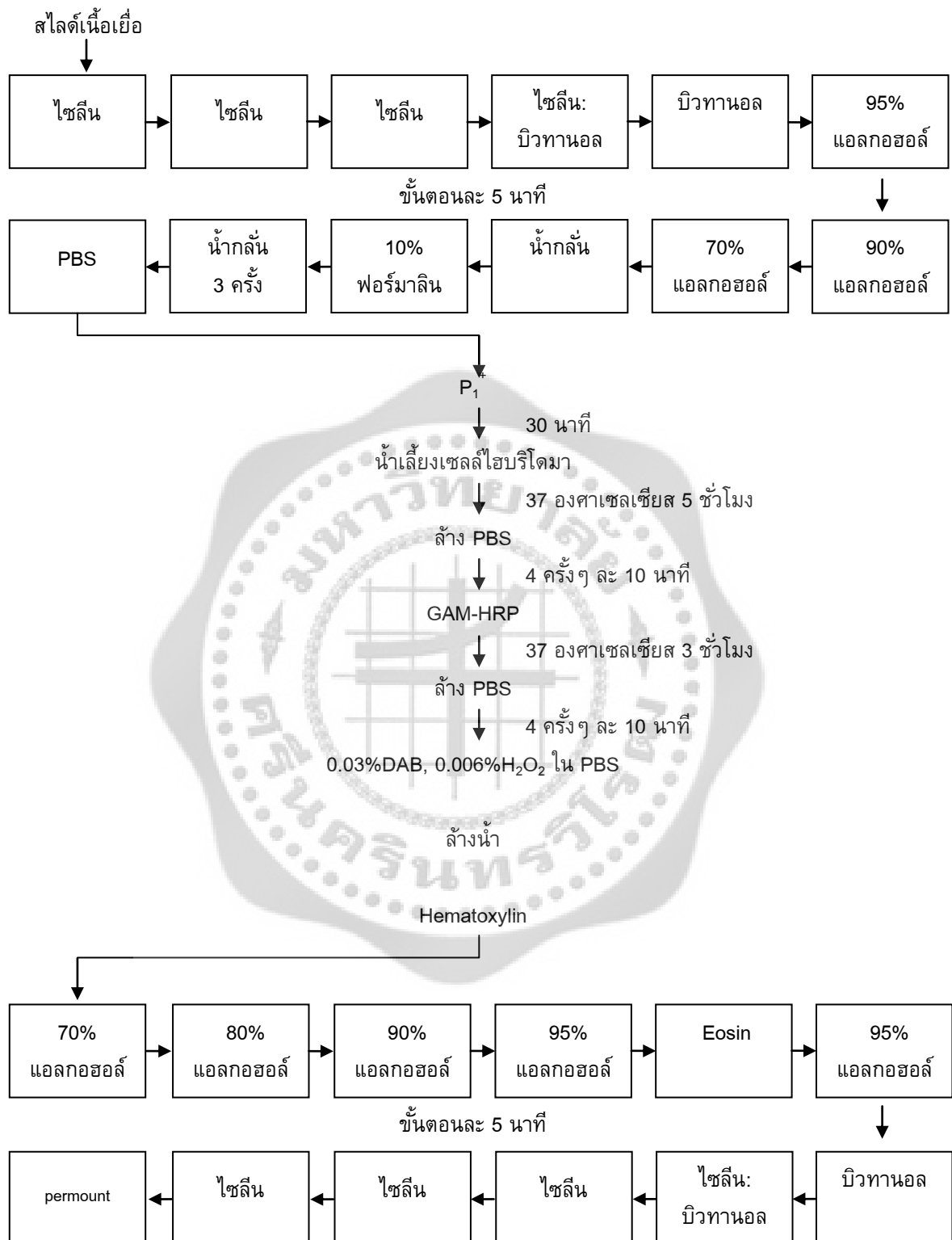
การคัดเลือกในขั้นตอนนี้ทำการทดสอบด้วยจุด 4 จุดที่หยดตัวอย่างต่างกันคือ 1) lysate histidine 2) สารสกัดจากซากกึ่ง *P. vannamei* ปกติ 3) lysate rVP26F109 protein 4) สารสกัดจากซากกึ่ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อ WSSV แต่ละจุดใช้สารละลายในการหยดประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที แฉในสารละลาย 5% blotto (นมพร่องมันเนย 5% ละลายใน PBS) เป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มกับน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเช่นเดียวกันกับข้อ 2.3.3.2 คัดเลือกไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกต่อ rVP26F109 และสารสกัดจากกึ่งที่ติดเชื้อ WSSV แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ histidine และสารสกัดจากกึ่งปกติ

### 2.3.3.4 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Immunohistochemistry

การเตรียมตัวอย่างกึ่งขาวติดเชื้อ WSSV ทำโดยนำกึ่งขาวปกติมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์บรรจุน้ำทะเลที่มีค่าความเค็มประมาณ 5 ส่วนในพันส่วน (ppt) ทำการเตรียมเชื้อ WSSV ที่ใช้ในการฉีดกึ่งขาวปกติ โดยเตรียมจากซากกึ่งขาวติดเชื้อ WSSV นำมาบดด้วย 2X PBS กรองผ่าน Syringe filter ที่มีขนาด pore size 0.45 ไมโครเมตร แล้วเจือจางเป็น 1: 100 ด้วย 2X PBS ทำการฉีดกึ่งด้วยสารสกัดเชื้อ WSSV ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อตัว เก็บกึ่งขาวที่มีอาการอ่อนแอหรือใกล้ตาย ตัดส่วนหัวแฉในสารละลาย Davidson's fixative นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ บิวทานอลผสมไซลีนในอัตราส่วน 1: 1 และไซลีนตามลำดับ ผึ่งเนื้อเยื่อในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตมให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร ตัด section เนื้อเยื่อบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 15) นำสไลด์มาล้างพาราฟินออกด้วยไซลีนและผ่านกระบวนการเติมน้ำเข้าสู่เซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ 95, 90, 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มอลิน 10% ล้างน้ำไหลจนกระทั่งหมดกลิ่นฟอร์มอลินและล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หยดคลุมเนื้อเยื่อด้วยสารละลาย  $P_1^+$  (calf bovine serum 10% ใน PBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในกล่องเก็บความชื้นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกในข้อ 2.3.3.2 และ 2.3.3.3 เจือจาง 1:5 ในสารละลาย  $P_1^+$  หยดคลุมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที บ่มซ้ำด้วย GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1,000 ในสารละลาย  $P_1^+$  บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายซบสเตอร์ (DAB 0.03% และ  $H_2O_2$  0.006% ใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที นำสไลด์ไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยสีอีโอซิน ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการหยดทับเนื้อเยื่อด้วย Permount และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่มีการติดเชื้อจะเป็นสีน้ำตาล ส่วนเนื้อเยื่อที่เป็นกลุ่มควบคุมย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (H&E) (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 15 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งสำหรับวิเคราะห์ immunohistochemistry (IHC)  
 (ตัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000: 27-34)



ภาพประกอบ 16 แผนผังกระบวนการย้อมโดยวิธี immunohistochemistry  
(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000: 27-34)

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ขั้นตอน นำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar. 1985: 1-42) จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ และเก็บรักษาเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

## 2.4 การพิสูจน์สมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV จำนวนมาก และทำการพิสูจน์สมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA ตรวจสอบชนิดของ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน ด้วยวิธี sandwich ELISA ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ WSSV ด้วยวิธี dot blotting และทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry

### 2.4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

#### ด้วยวิธี indirect ELISA

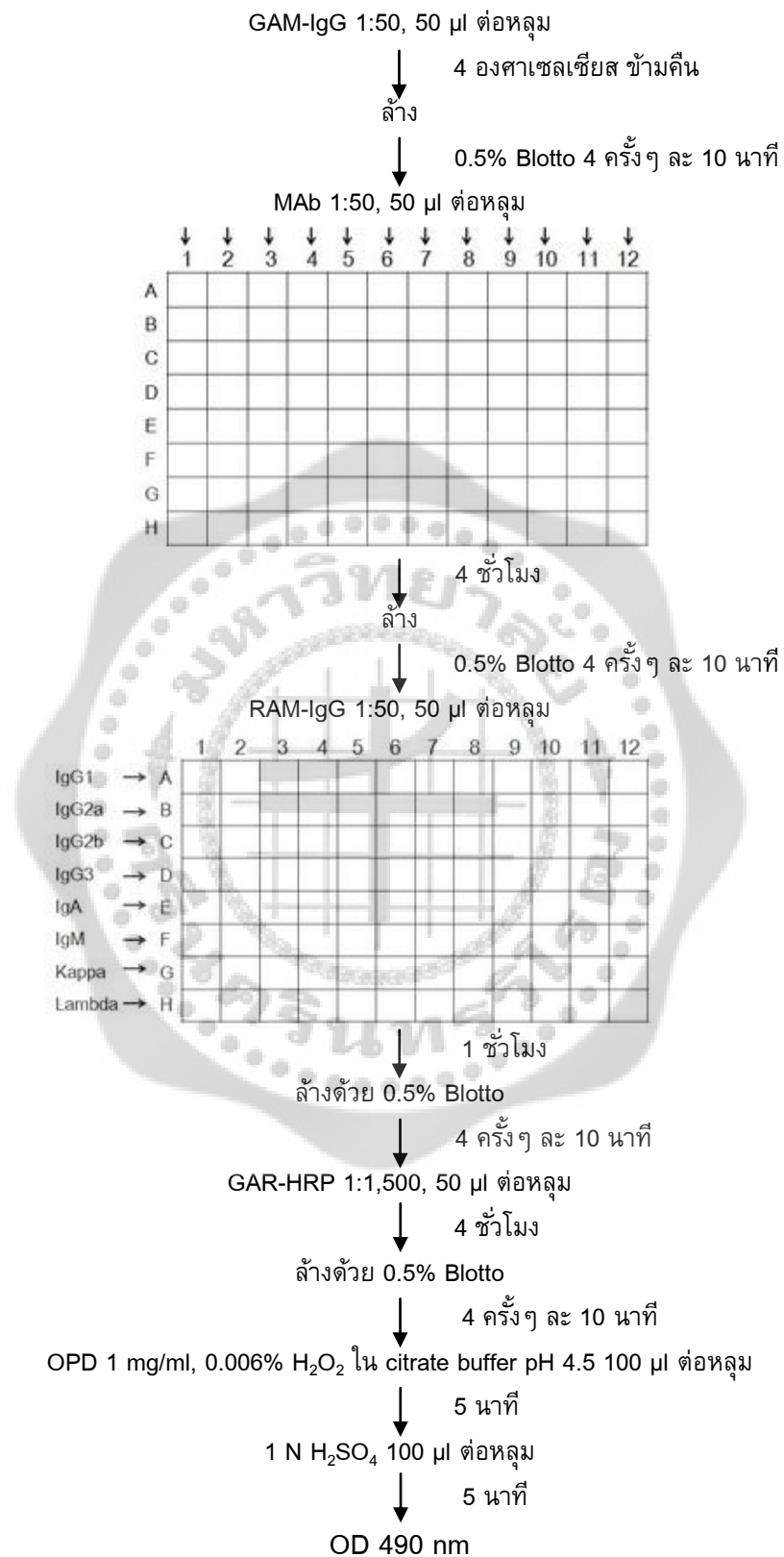
ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26F109 ของ WSSV ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5 % blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1: 20 ในสารละลาย 5% blotto) หรือผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม ELISA microtiter plate (ภาพประกอบ 17) จากนั้นทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1: 1,500 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายด้วย PBS เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ลงในทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (อภิรักษ์ตันศิริสิทธิกุล. 2548: 24)

MAbs WSSV	1	2	3	4	5
1	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5
2		2+2	2+3	2+4	2+5
3			3+3	3+4	3+5
4				4+4	4+5
5					5+5

ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบอิมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์ VP26F109 ของ WSSV (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

#### 2.4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาทำโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ ชุด Zymed's MonoAb ID kit (HRP) โดยทำการตรึง goat anti-Mouse Ig heavy and light chain specific antibody (GAM-H+L) ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotting ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1: 20 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ (1-12) ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1: 50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว (A-H) จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1: 1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ป่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที และเติมสารละลายสับสเตรทเช่นเดียวกับกรณีของการตรวจสอบอิมูโนโพรบในข้อ 2.4.1 (ภาพประกอบ 18) (Winotaphan; et al. 2005: 189-198)



ภาพประกอบ 18 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ดัดแปลงจาก Winotaphan; et al. 2005: 189-198)



**2.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ monodon baculovirus (MBV), Taura syndrome virus (TSV), yellow head virus (YHV), Penaeus stylirostris densovirus (PstDNV) และ Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry**

ทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV ที่ผลิตได้กับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้นๆ เป็น positive control คือ MBV5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ MBV (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371-376) TSV2-88 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส TSV (Chaivisuthangkura; et al. 2010. 433-439), Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส Pst DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), IMN7 ที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV (Kunanopparat; et al. 2011:141-148) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ และเตรียมเป็นสไลด์ถาวรแล้ว ทำการส่องดูเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเปรียบเทียบบริเวณที่เป็น positive control กับผลที่ได้จากการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSSV ที่ผลิตได้

**2.4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 และสารสกัดจากขาวายน้ำกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting**

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26F109 และสารสกัดจากขาวายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อ WSSV มาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดโดยเจือจาง 1: 100 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และบ่มซ้ำด้วย GAM-HRP และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรท ตรวจสอบระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26F109 และสารสกัดจากขาวายน้ำของกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อ WSSV ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

## บทที่ 4

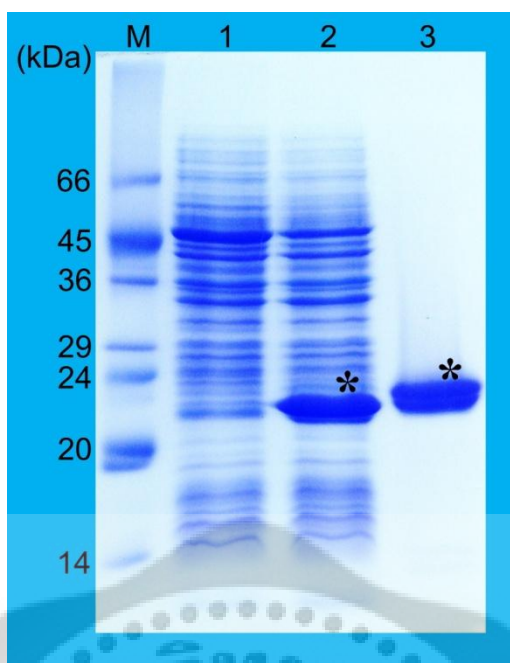
### ผลการทดลอง

#### การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV

จากการนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-VP26F109 มากระตุ้นให้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ WSSV ด้วย IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ *lac* promoter หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์และทำให้ผนังเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง จากนั้นทำการวิเคราะห์การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยแยกด้วย 12% SDS-PAGE พบว่า แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของไวรัส WSSV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน 6XHis-VP26F109 เท่ากับ 23 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 19 แถว 2) ส่วนแบคทีเรียที่มีเพียงพลาสมิด pQE30 ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าว (ภาพประกอบ 19 แถว 1)

#### การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV ให้บริสุทธิ์

จากการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV ให้บริสุทธิ์ โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-VP26F109 มาแยกด้วย 12% SDS-PAGE แล้วแช่แผ่นเจลใน 0.3 M KCl เมื่อปรากฏแถบโปรตีนสีขาวขุ่นบนแผ่นเจลทำการตัดแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน และนำมาแช่ใน 1% SDS ขำมคิน จากนั้นนำสารละลายที่ได้และแถบเจลใส่ลงในถุง dialysis ชะโปรตีนออกจากเจล (elute) โดยผ่านกระแสไฟฟ้าใน Towbin buffer ด้วยชุด Transblot apparatus (BioRad) และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator และนำมาทดสอบด้วย 12% SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูง มีขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน และไม่พบการเจือปนของแถบโปรตีนอื่น (ภาพประกอบ 19 แถว 3)



ภาพประกอบ 19 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 โดยนำมาแยก

ด้วย 12% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-VP26F109

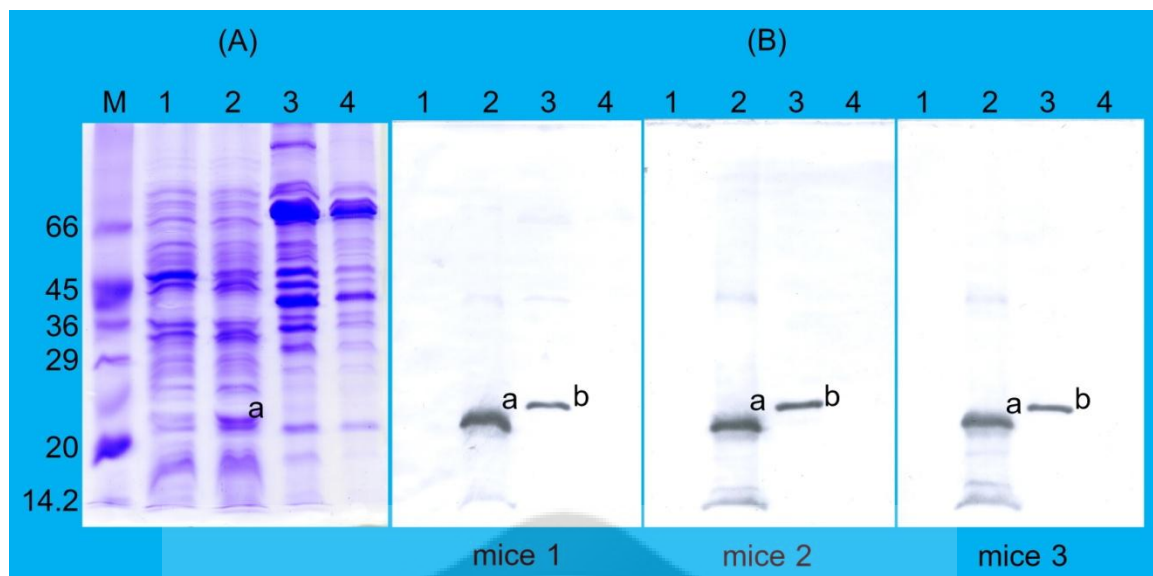
แถวที่ 3 รีคอมบิแนนท์โปรตีน 6XHis-VP26F109 (rVP26F109) ที่ทำให้บริสุทธิ์

โดย \* คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน

## การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV

จากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 บริสุทธิ์มาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อปลูก ภูมิคุ้มกันในหนูขาว โดยใช้โปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อหนู 1 ตัว เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติ ซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting พบว่าหนูทั้ง 3 ตัวสามารถตอบสนองต่อแอนติเจน ในระดับที่ใกล้เคียงกัน โดยทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาด ประมาณ 23 กิโลดาลตัน และสารสกัดจากขาว่ายน้ำกึ่งขาที่ติดเชื้อ WSSV ขนาด 26 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน คาดว่าอาจเป็นแถบ โปรตีนที่เกิดจากการสลายตัวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระหว่างการเตรียม (ภาพประกอบ 20) ซึ่งในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาได้ใช้เซลล์ม้ามของหนูที่มีการตอบสนองต่อทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 และโปรตีน VP26 ดีที่สุด โดยทำการปลูกภูมิคุ้มกันหนูครั้งสุดท้ายก่อนวันผลิตเซลล์ ไฮบริโดมาเป็นเวลา 3 วัน ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant เมื่อทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวน 8 โคลน ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนและ สารสกัดจากขาว่ายน้ำกึ่งขาที่ติดเชื้อ WSSV ในวิธี dot blotting และในวิธี Western blotting พบการเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะกับแถบโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 21) หลังจากทำการแยกโคลนและโคลนซ้ำ เมื่อทำการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอล- แอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting พบว่ามีความจำเพาะต่อรีคอม- บิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาด 23 กิโลดาลตัน และโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตันของ เชื้อ WSSV ส่วนแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าในแถวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนอาจเกิดจากการ สลายตัวของรีคอมบิแนนท์โปรตีน (ภาพประกอบ 22)

การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ WSSV ด้วย วิธี immunohistochemistry โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณส่วนของ cephalothorax จากกึ่งขาที่ติดเชื้อ WSSV พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิด สามารถตรวจการติดเชื้อ WSSV ในตัวอย่าง กึ่งขาด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ ซึ่งพบการติดเชื้อในอวัยวะส่วนต่างๆ เช่น อวัยวะ น้ำเหลือง หัวใจ เหงือก และ subcutaneous epithelium (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B) โดยทำการดูดซับแอนติบอดีที่เจือปน (preabsorption) ด้วย lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน 6X Histidine พบว่าหนูขาว 3 ตัว มีการตอบสนองต่อทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาด 23 กิโลดาลตัน และโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตันของไวรัส WSSV

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30-VP26F109

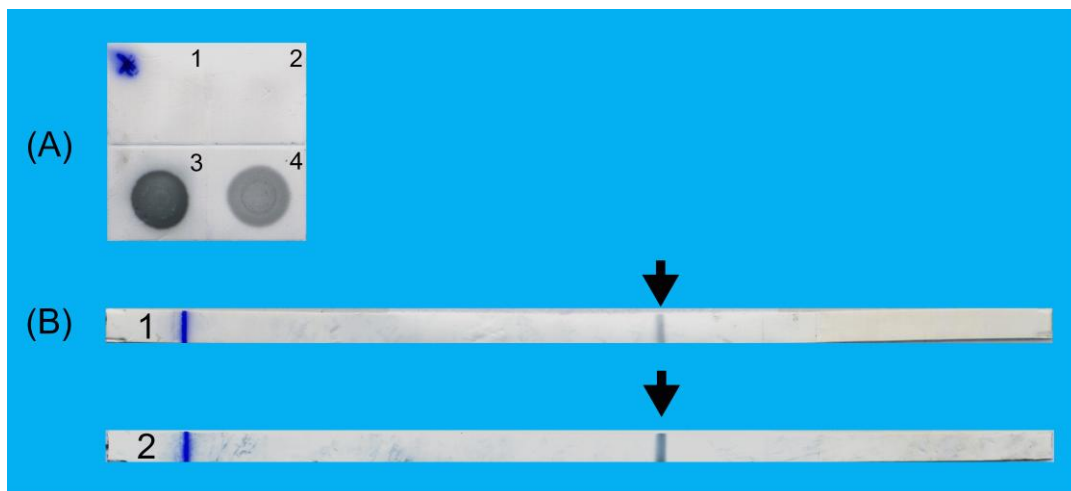
แถวที่ 3 สารสกัดข่าว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติ

แถวที่ 4 สารสกัดข่าว่ายน้ำของกุ้งขาวปกติ

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดเป็นกิโลดาลตัน

a คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาด 23 กิโลดาลตัน

b คือ โปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตันของเชื้อ WSSV



ภาพประกอบ 21 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่สองด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting

Dot blotting (A)

ช่องที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30

ช่องที่ 2 สารสกัดจากขาวายน้ำของกุ้งขาวปกติ

ช่องที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30-VP26F109

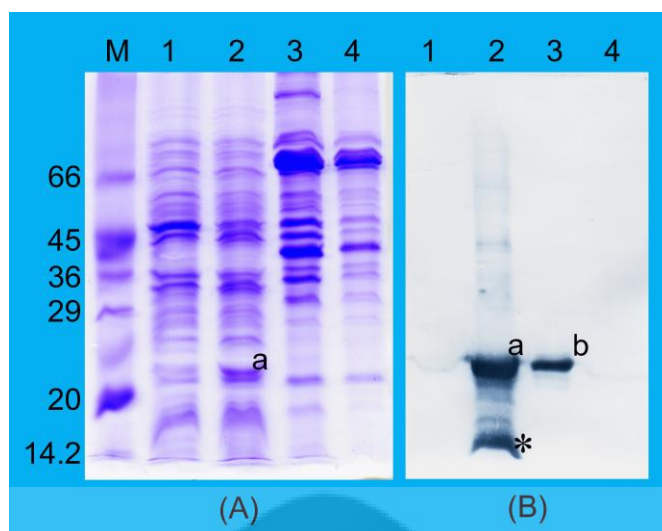
ช่องที่ 4 สารสกัดจากขาวายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติ

Western blotting (B)

แถบที่ 1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาในระดับสองบวก (++)

แถบที่ 2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาในระดับสามบวก (+++)

โดย ▼ คือ แถบโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตันของเชื้อ WSSV



ภาพประกอบ 22 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV ด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B) โดยแยกโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE ย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 เจลอีกส่วนนำมาทำ Western blotting และทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30-VP26F109

แถวที่ 3 สารสกัดข่าวย่น้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติ

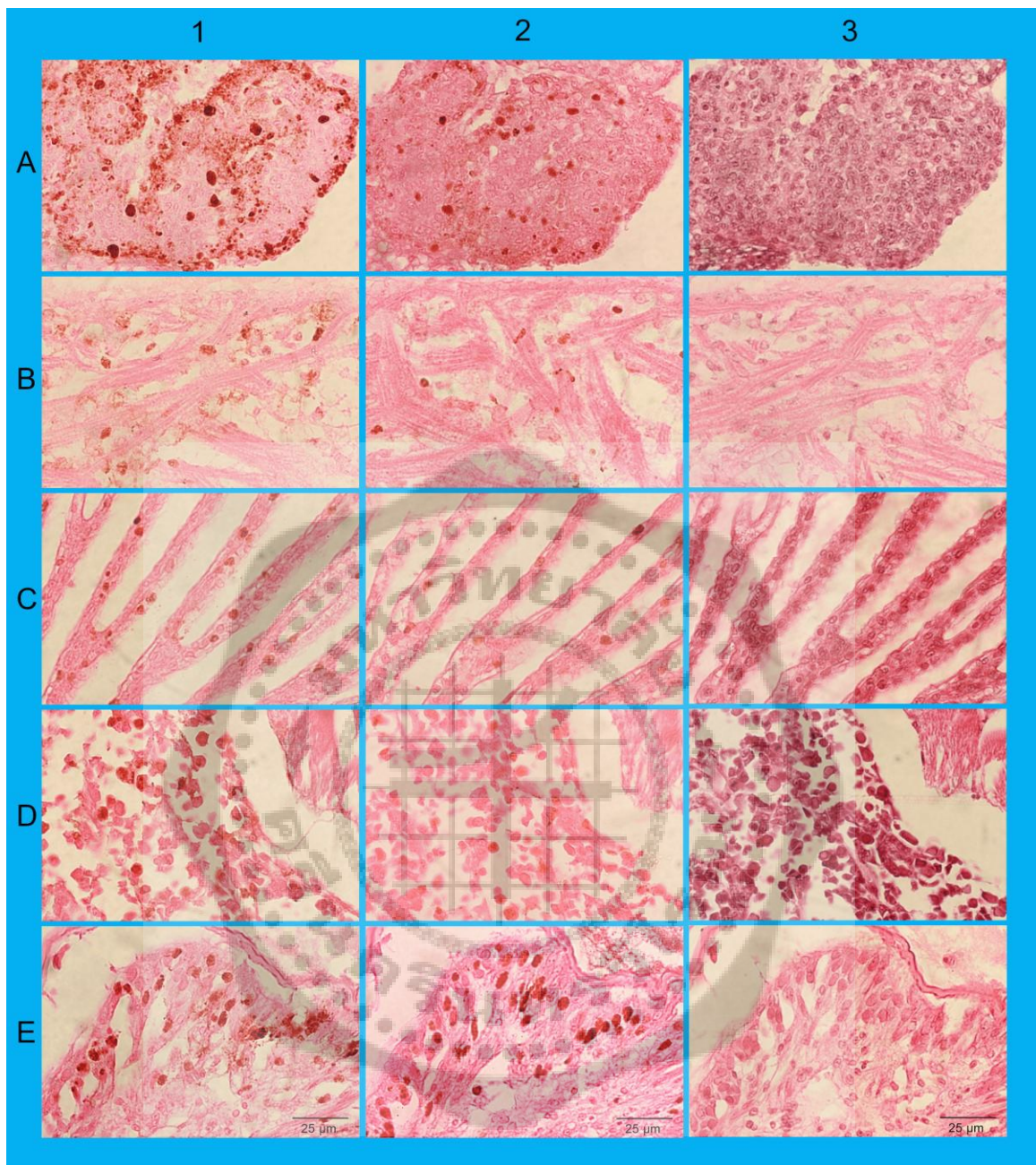
แถวที่ 4 สารสกัดข่าวย่น้ำของกุ้งขาวปกติ

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดเป็นกิโลดาลตัน

a คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาด 23 กิโลดาลตัน

b คือ โปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตันของเชื้อ WSSV

\* คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สลายตัว



ภาพประกอบ 23 การตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของกุ้งขาวด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1 (1), โมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-3 (2) และย้อมสี H&E (3) พบการติดเชื้อ WSSV ซึ่งเห็นติดเป็นสีน้ำตาลในอวัยวะน้ำเหลือง (A), หัวใจ (B), เหงือก (C), เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (D) และ subcutaneous epithelium (E)



## การพิสูจน์สมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

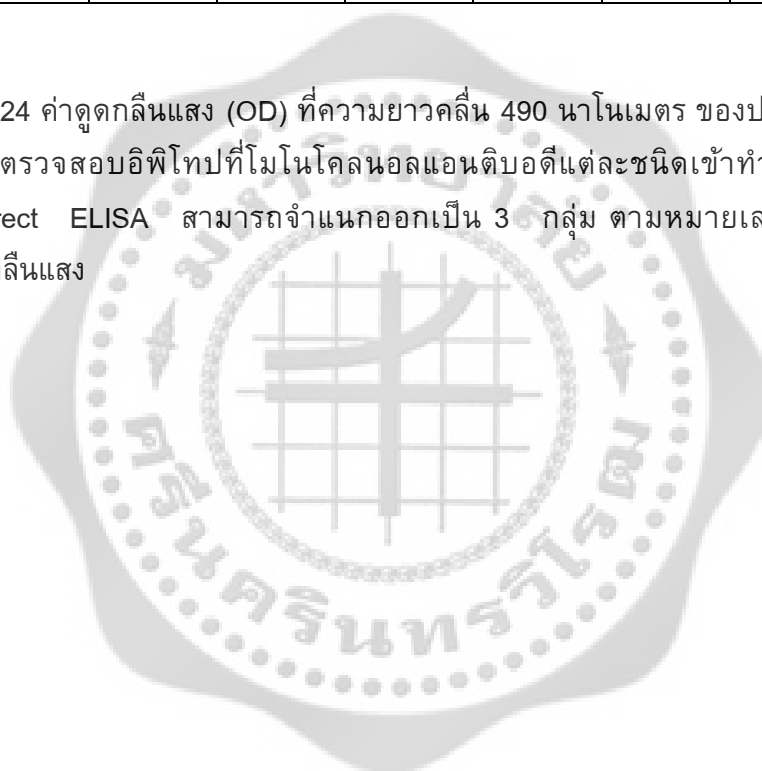
เมื่อตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ สามารถทำปฏิกิริยาด้วยวิธี indirect ELISA โดยทำการตรึงรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP26F109 ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate และเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ โดยผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลุมละ 2 ชนิด และป่มซ้ำด้วย GAM-HRP จากนั้นเติมสารละลายซับสเตรต และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของไวรัส WSSV จำนวน 8 ชนิด มีอีพิโทปที่ต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอีพิโทปที่ 1 คือ W26-1 กลุ่มอีพิโทปที่ 2 คือ W26-3 และกลุ่มอีพิโทปที่ 3 คือ W26-4, W26-5, W26-6, W26-7, W26-8 และ W26-9 เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ในกลุ่มอีพิโทปต่างกันมาผสมกัน ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเพียงชนิดเดียว ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีอีพิโทปคาบเกี่ยวกัน ค่าดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นมาเพียงเล็กน้อย (ภาพประกอบ 24)

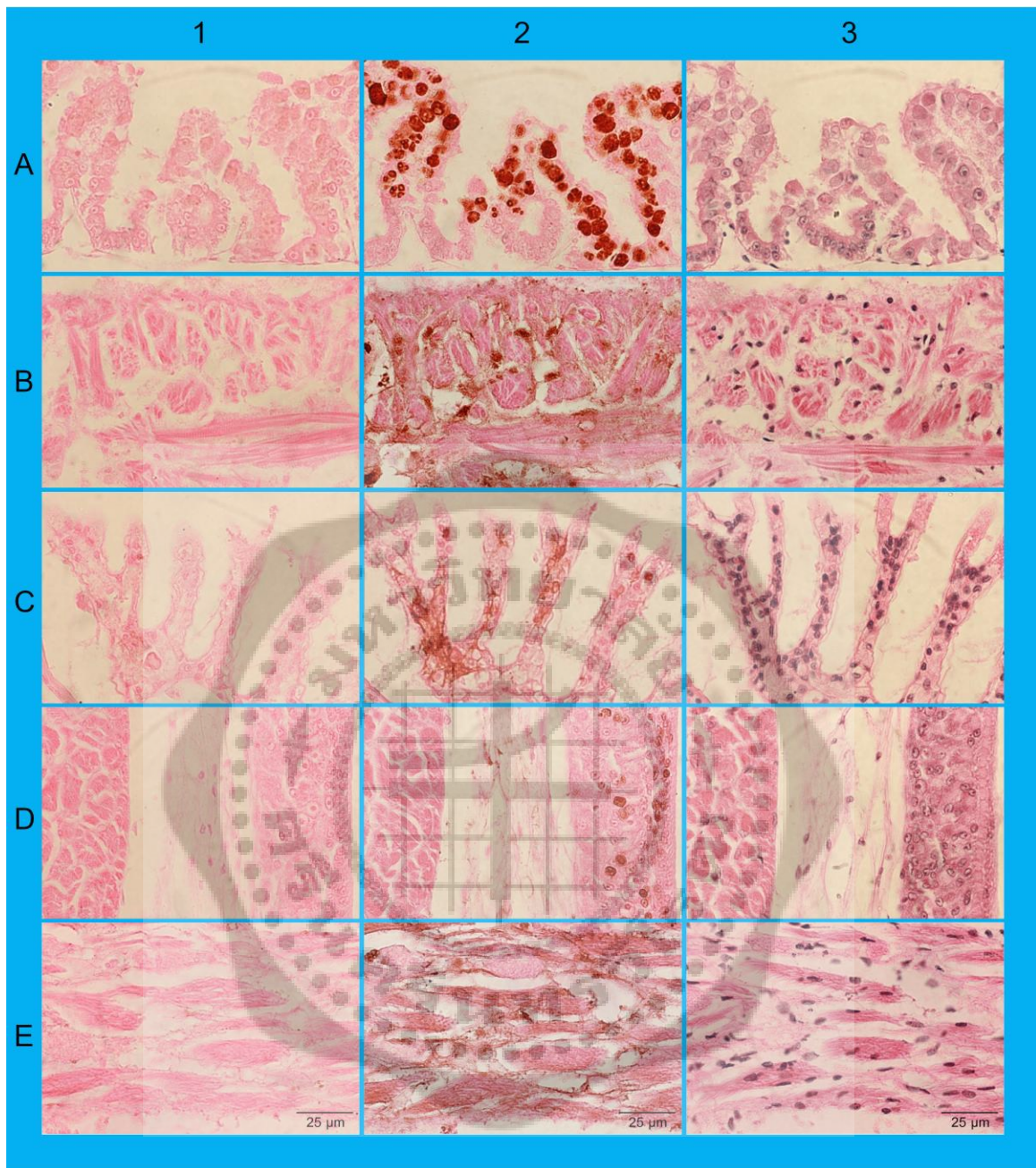
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิด มี class เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> และ IgG<sub>2b</sub> ส่วน light chain เป็น kappa (K) ทั้งหมด (ตาราง 4)

จากการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้เนื้อของกุงที่ติดเชื้อไวรัสต่างๆ ได้แก่ MBV, TSV, YHV, PstDNV และ IMNV และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้นๆ เป็น positive control คือ MBV5 (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371-376), TSV2-88 (Chaivisuthangkura; et al. 2010. 433-439), Y19 (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), IH1-5 (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) และ IMN7 (Kunanopparat; et al. 2011:141-148) ตามลำดับ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อกุงติดเชื้อไวรัสเหล่านั้น (ภาพประกอบ 25)

MAbs	W26-1	W26-3	W26-4	W26-5	W26-6	W26-7	W26-8	W26-9
W26-1	1.445 <sup>1</sup>	1.603	1.722	1.718	1.766	1.810	1.597	1.828
W26-3		0.906 <sup>2</sup>	1.186	1.324	1.339	1.417	1.221	1.421
W26-4			0.797 <sup>3</sup>	0.964	0.940	0.975	0.820	0.978
W26-5				1.073 <sup>3</sup>	1.081	1.063	1.063	1.077
W26-6					1.008 <sup>3</sup>	0.995	0.989	1.077
W26-7						0.985 <sup>3</sup>	0.962	1.078
W26-8							0.749 <sup>3</sup>	0.974
W26-9								1.039 <sup>3</sup>

ภาพประกอบ 24 ค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอีพิโทปที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดเข้าทำปฏิกิริยา ด้วยวิธี indirect ELISA สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ตามหมายเลขที่กำกับไว้บนค่าดูดกลืนแสง

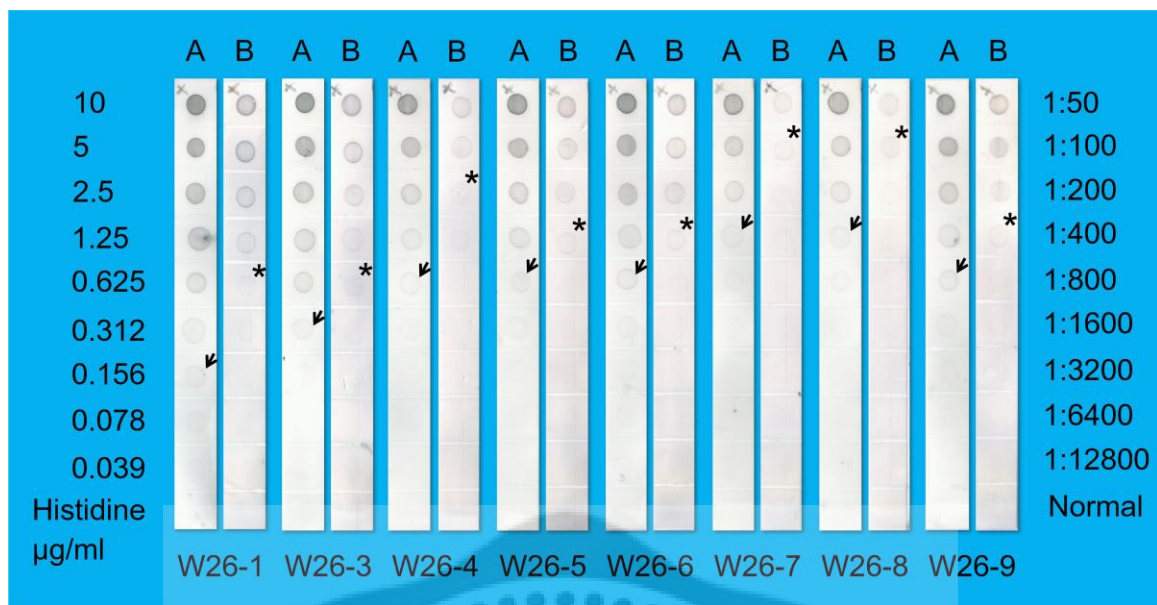




ภาพประกอบ 25 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส WSSV ที่ผลิตได้กับเนื้อเยื่อของกุ้งขาวติดเชื้อไวรัสต่างๆ ได้แก่ ตับ-ตับอ่อนติดเชื้อ MBV (A), กล้ามเนื้อหัวใจติดเชื้อ TSV (B), เหวือกติดเชื้อ YHV (C), subcutaneous epithelium ติดเชื้อ IHNV (D), และกล้ามเนื้อลายติดเชื้อ IMNV (E) โดยในคอลัมน์ (1) ปุ่มด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1 (2) ปุ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ ที่ติดในเนื้อเยื่อนั้นๆ ได้แก่ MBV5 (A2), TSV2-88 (B2), Y19 (C2), IH1-5 (D2) และ IMN7 (E2) คอลัมน์ (3) ย้อมด้วยสี H&E

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิด ในการตรวจหารีคอม-  
 บีแทนที่โปรตีน VP26F109 และสารสกัดจากข่าว่ยน้ำของกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติ  
 ด้วยวิธี dot blotting พบว่าการทดสอบความไวโดยใช้แอนติเจนทั้งสองชนิดให้ผลที่สอดคล้องกัน  
 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถตรวจหารีคอม-  
 บีแทนที่โปรตีนที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดในช่วง 0.156 – 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือในตัวอย่าง  
 จากข่าว่ยน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติที่มีค่าความเจือจางสูงสุด 800 เท่า โดย  
 โมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1 มีความไวมากที่สุด คือสามารถตรวจหารีคอมบีแทนที่ที่มีความ  
 เข้มข้นเพียง 0.156 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (6.8 เฟมโตโมล/จุด) และตัวอย่างข่าว่ยน้ำของกุ้งขาว  
 ติดเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 800 เท่า และโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-3 มีความไวรองลงมา คือ  
 สามารถตรวจหารีคอมบีแทนที่ที่มีความเข้มข้น 0.312 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (13.6 เฟมโตโมล/จุด)  
 และตัวอย่างข่าว่ยน้ำจากกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 800 เท่า ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี  
 ชนิดอื่นๆ มีความไวสามารถตรวจการติดเชื้อในตัวอย่างจากข่าว่ยน้ำของกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV  
 เจือจาง 400, 200 และ 100 เท่า ได้แก่ W26-5 W26-6 W26-9, W26-4 และ W26-7 W26-8  
 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 26)

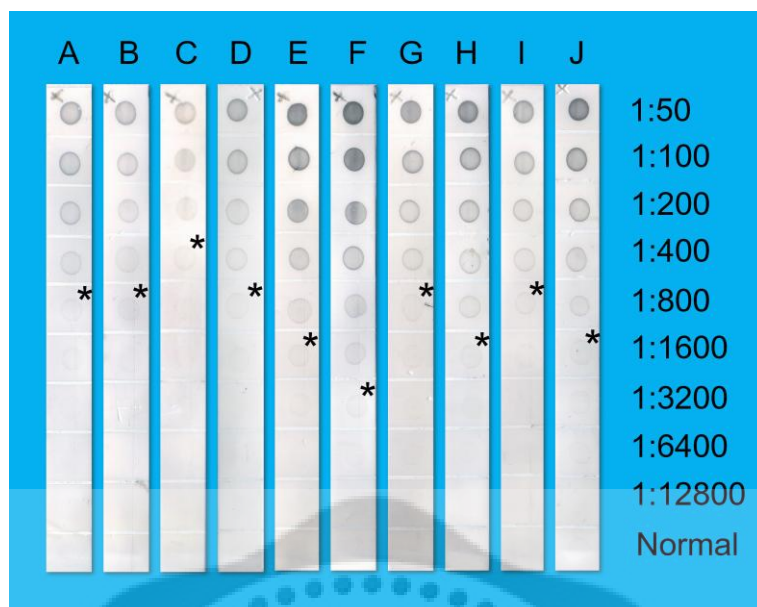
จากการนำตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP26 ของ WSSV ในแต่ละกลุ่ม  
 อีพีโทป (W26-1 W26-3 และ W26-9) มาใช้ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน  
 โครงสร้างส่วนอื่นๆ ของเชื้อ WSSV ได้แก่ WI-16 (จำเพาะต่อโปรตีน *icp11*) (Siriwattanarat; et al.  
 2013: 967-979) W25-8D (จำเพาะต่อโปรตีน VP19) (Chaivisuthangkura; et al. 2010: 15-20)  
 และ W29 (จำเพาะต่อโปรตีน VP28) (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) พบว่าสามารถ  
 เพิ่มความไวในการตรวจเชื้อในตัวอย่างสารสกัดจากข่าว่ยน้ำกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ขึ้นอีก 2 เท่า  
 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านั้นเพียงชนิดเดียว กล่าวคือสามารถเพิ่ม  
 ความไวให้กับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี WI-16 จากค่าความเจือจาง 1: 1,600 เป็น 1: 3,200  
 หรือในกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี W25-8D และ W29 ที่มีความไวเพิ่มขึ้นจากค่าความ  
 เจือจาง 1: 800 เป็น 1: 1,600 (ภาพประกอบ 27)



ภาพประกอบ 26 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting โดยทดสอบกับ (A) รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ที่มีความเข้มข้น 0.039 – 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (B) สารสกัดจากขากวายน้ำของกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 50 – 12,800 เท่า

โดย  $\blacktriangledown$  แสดงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้

\* แสดงความเจือจางที่สูงที่สุดของสารสกัดจากขากวายน้ำของกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้



ภาพประกอบ 27 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจเชื้อ WSSV ในตัวอย่างสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาว โดยบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ ดังนี้

- A บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1
- B บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-3
- C บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-9
- D บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1 W26-3 และ W26-9
- E บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี WI-16
- F บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี WI-16 ร่วมกับ W26-1 W26-3 และ W26-9
- G บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W25-8D
- H บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W25-8D ร่วมกับ W26-1 W26-3 และ W26-9
- I บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W29
- J บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ร่วมกับ W26-1 W26-3 และ W26-9

ตาราง 4 สรุปสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 ของเชื้อ WSSV ที่ผลิตได้

MAbs (subclass)	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี dot blotting		การตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี Western blotting (สารสกัดจากเนื้อเยื่อของ กุ้งขาวติดเชื้อ WSSV)	IHC	การทดสอบ ปฏิกิริยาข้ามกับ MBV, TSV, YHV, PstDNV และ IMNV
	mg/ml	fmole/spot			
W26-1 (IgG <sub>1</sub> )	0.156	6.8	+++	+++	-
W26-3 (IgG <sub>2b</sub> )	0.312	13.6	+++	+++	-
W26-4 (IgG <sub>2a</sub> )	0.625	27.2	+++	+++	-
W26-5 (IgG <sub>2a</sub> )	0.625	27.2	+++	+++	-
W26-6 (IgG <sub>2a</sub> )	0.625	27.2	++	+++	-
W26-7 (IgG <sub>2a</sub> )	1.25	54	+++	+++	-
W26-8 (IgG <sub>2b</sub> )	1.25	54	++	++	-
W26-9 (IgG <sub>2a</sub> )	0.625	27.2	+++	+++	-

- หมายเหตุ
- โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่แสดงปฏิกิริยา
  - ++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจน
  - +++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจนมาก

## บทที่ 5

### สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ของ WSSV โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE30-VP26F109 สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาด 23 กิโลดาลตัน และสามารถทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการปลุกภูมิคุ้มกันหนูขาว และทดสอบแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blotting พบว่าหนูทุกตัวมีการตอบสนองต่อทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 และโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตัน ของเชื้อ WSSV จึงเลือกหนูที่ตอบสนองดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 8 ชนิด ได้แก่ W26-1, W26-3, W26-4, W26-5, W26-6, W26-7, W26-8 และ W26-9 โมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกชนิดที่ผลิตได้มี class เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> และมี light chain เป็น kappa (K) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ขนาด 23 กิโลดาลตัน และโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตันในตัวอย่างสารสกัดจากข่าวายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting และสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ เมื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นๆ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้นๆ เป็น positive control ได้แก่ MBV5 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส MBV (Boosanongchokying; et al. 2006: 371-376) TSV2-88 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส TSV (Chaivisuthangkura; et al. 2010. 433-439), Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), IMN7 ที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV (Kunanopparat; et al. 2011:141-148) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสเหล่านั้น

เมื่อทดสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิด พบว่าสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 3 กลุ่มตามอิพิโทปที่แตกต่างกันโดยการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ดังนี้คือ กลุ่มอิพิโทปที่ 1 ได้แก่ W26-1 กลุ่มอิพิโทปที่ 2 ได้แก่ W26-3 และกลุ่มอิพิโทปที่ 3 ได้แก่ W26-4, W26-5, W26-6, W26-7, W26-8 และ W26-9 โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-1 มีความไวในการตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 ด้วยวิธี dot blotting ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 ชนิด คือ 0.156 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (6.8 เฟมโตโมล/จุด) และสามารถตรวจการติดเชื้อในสารสกัดจากข่าวายน้ำของกุ้งขาวเจือจาง 800 เท่า ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี W26-3 สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีน rVP26F109 เข้มข้น 0.312 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (13.6 เฟมโตโมล/จุด) และการติดเชื้อในสารสกัดข่าวายน้ำกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 800 เท่า สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มอิพิโทปที่ 3 พบว่าโมโนโคลนอล-



แอนติบอดีที่มีความไวมากที่สุดคือ W26-5, W26-6 และ W26-9 สามารถตรวจการติดเชื้อในสารสกัดจากข่าว้ยน้ำของกุ้งขาวติดเชื้อ WSSV ได้ที่ระดับความเจือจาง 400 เท่า

จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP26 มาตรวจสอบความไวเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างอื่นๆ ของเชื้อ WSSV คือ WI-16 (จำเพาะต่อโปรตีน *icp11*) (Siriwattanarat; et al. 2013: 967-979) W25-8D (จำเพาะต่อโปรตีน VP19) (Chaivisuthangkura; et al. 2010: 15-20) และ W29 (จำเพาะต่อโปรตีน VP28) (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) พบว่า WI-16 สามารถตรวจการติดเชื้อในตัวอย่างสารสกัดจากข่าว้ยน้ำของกุ้งขาวที่เจือจาง 1,600 เท่า ส่วน W25-D และ W29 สามารถตรวจได้ที่ตัวอย่างเจือจาง 800 เท่า แต่เมื่อมีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี WI-16, W25-8D และ W29 ร่วมกับตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออีพีโทปต่างๆ ของโปรตีนโครงสร้าง VP26 คือ W26-1, W26-3 และ W26-9 พบว่าสามารถเพิ่มความไวในการตรวจการติดเชื้อ WSSV ได้ 2 เท่า คือที่ระดับความเจือจาง 1: 3,200 เมื่อใช้ร่วมกับ WI-16 หรือ 1: 1,600 เมื่อใช้ร่วมกับ W25-8D และ W29

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวนั้นมีประโยชน์มาก สามารถกระตุ้นแบคทีเรียให้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากตามต้องการโดยไม่ต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งติดเชื้อ ซึ่งช่วยลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเนื้อเยื่อของกุ้งได้

ดังนั้นคาดว่า การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างขนาด 26 กิโลดาลตันของเชื้อ WSSV มาพัฒนาเป็นชุดตรวจอย่างง่ายที่สามารถทราบผลการตรวจภายในระยะเวลาเพียง 15 นาที เช่นเดียวกับชุดตรวจไวรัสและแบคทีเรีย เช่น ชุดตรวจ strip test สำหรับตรวจเชื้อ WSSV (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106), ชุดตรวจเชื้อ WSSV และ YHV ในคราวเดียว (dual immunochromatographic strip test) (Sithigorngul; et al. 2011: 85-91), ชุดตรวจเชื้อ IMNV (Chaivisuthangkura; et al. 2013), ชุดตรวจเชื้อ MBV หรือ *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) (Wangman; et al. 2012: 210-214) และชุดตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) เป็นต้น โดยอาจใช้ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนอื่นๆ ของเชื้อ WSSV เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อ เช่น WI-16 (Siriwattanarat; et al. 2013: 967-979), W25-8D (Chaivisuthangkura; et al. 2010: 15-20) และ W29 (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) ซึ่งเกษตรกรสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจเชื้อ WSSV เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ด้วยตนเองได้



บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- ถนนอมจิตร สิริภคพร. (2555). กุ้งไทยยังสดใสหรือไม่. ส่วนเศรษฐกิจภาค ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคใต้. Retrived November 15, 2012, จาก <http://www.ryt9.com/s/bot/1345603>
- นวลฉวี เวชประสิทธิ์. (2546). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 54-64.
- ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์. (2550). พันธุวิศวกรรมและชีวสารสนเทศศาสตร์เบื้องต้น. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- มาลินี วิชชาวูธ และ สมยศ สิทธิจิตตพันธ์. (2548). การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบ. กรมประมง. วารสารการประมง 58 (2): 170-171.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ. (2543). อิมมูโนวิทยา. กรุงเทพฯ: พีพีเอส ซายน์เทคโนโลยี.
- สำนักงานประมงจังหวัดสุพรรณบุรี. (2545). แนวทางการเลี้ยงกุ้งขาว และโรคของกุ้งขาว. ประมงธุรกิจ. Retrived November 14, 2012, จาก <http://www.fisheries.go.th/fpo-suphunburi/van.htm>
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าและอาหารแห่งชาติ. (2550). กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง. Retrived November 14, 2012, จาก [http://www.acfs.go.th/standard/download/std\\_diagnostic\\_spot\\_shrimp.pdf](http://www.acfs.go.th/standard/download/std_diagnostic_spot_shrimp.pdf)
- อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- Anil, T.M.; Shankar, K.M. & Mohan, C.V. (2002). Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Diseases of Aquatic Organisms* 51: 67-75.
- Arturo S.P. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research*. 41:43.

- Boosanongchokying, C.; Sang-oum, W.; Sithigorngul, P.; Sriurairatana, S. & Flegel, T.W. (2006). Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedrin of *Monodon Baculovirus* (MBV) from Shrimp. *ScienceAsia* 32: 371-376.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitivity method for the quantification of microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chaivisuthangkura, P.; Longyant, S.; Hajimasalaeh, W.; Sridulyakul, P.; Rukpratanporn, S. & Sithigorngul, P. (2010). Improved sensitivity of Taura syndrome virus immunodetection with a monoclonal antibody against the recombinant VP2 capsid protein. *Journal of Virological Methods* 163: 433-439.
- Chaivisuthangkura, P.; Longyant, S.; Rukpratanporn, S.; Srisuk, C.; Sridulyakul, P. & Sithigorngul, P. (2010). Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein. *Aquaculture* 299: 15-20.
- Chaivisuthangkura, P.; Phattanapaijitkul, P.; Thammapalerd, N.; Rukpratanporn, S.; Longyant, S.; Sithigorngul, W. & Sithigorngul, P. (2006). Production of Polyclonal Antibodies against Recombinant VP26 Structural Protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV). *ScienceAsia* 32: 201-204.
- Chaivisuthangkura, P.; Senapin, S.; Wangman, P.; Longyant, S. & Sithigorngul, P. (2013). Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using an immunochromatographic strip test. *Arch Virol* 158: 1925–1930.
- Chaivisuthangkura, P.; Tangkhabuanbutra, J.; Longyant, S.; Sithigorngul, W.; Rukpratanporn, S.; Menasveta, P. & Sithigorngula, P. (2004). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia* 30: 359-363.
- Chang, P.S.; Chen, H.C. & Wang, Y.C. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organism* 27: 131-139.
- Chou, H.Y.; Huang, C.Y.; Wang, C.H.; Chiang, H.C. & Lo, C.F. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organism* 23: 165-173.

- Escobedo-Bonilla, C.M.; Wille, M.; Alday Sanz, V.; Sorgeloos, P.; Pensaert, M.B. & Nauwynck, H.J. (2005). *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms* 66: 163-170.
- Escobedo-Bonilla, C.M.; Wille, M.; Alday Sanz, V.; Sorgeloos, P.; Pensaert, M.B. & Nauwynck, H.J. (2007). Pathogenesis of thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 74: 85-94.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer (ed), *Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine*. New York: Plenum Press. pp. 1-42.
- Flegel, T.W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1-33.
- Hameed, A.S.S.; Murthi, B.L.M.; Rasheed, M.; Sathish, S.; Yoganandhan, K.; Murugan, V. & Jayaraman, K. (2002). An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 204: 1-10.
- Hasson, K.W.; Fan, Y.; Reisinger, T.; Venuti, J. & Varner, P.W. (2006). White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 91-100.
- Huang, C.H.; Zhang, L.R.; Zhang, J.H.; Xiao, L.C.; Wu, Q.J.; Chen, D.H. & Li, J.K.K. (2001). Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*. *Virus Research* 76: 115–125.
- Jaroenram, W.; Kiatpathomchai, W. & Flegel, T.W. (2009). Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. [\*Molecular and Cellular Probes\* 23: 65-70.](#)
- Kanchanaphum, P.; Wongteerasupaya, C.; Sitidilokratana, N.; Boonsaeng, V.; Panyim, S.; Tassanakajon, A.; Withyachumnarnkul, B. & Flegel, T.W. (1998). Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 34: 1-7.
- Kasornchandra, J.; & Boonyaratpalin, S. (1994). White spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *Farming* 12: 9-11.

- Köhler, G.; & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology* 6: 511-519.
- Kunanopparat, A.; Chaivisuthangkura, P.; Senapin, S.; Longyant, S.; Rukpratanporn, S.; Flegel, T.W. & Sithigorngul, P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *Journal of Virological Methods* 171: 141-148.
- Liu, W.; Wang, Y.T.; Tian, D.S.; Yin, Z.C. & Kwang, J. (2002). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 11-18.
- Lo, C.F.; Ho, C.H.; Chen, C.H.; Liu, K.F.; Chiu, Y.L.; Yeh, P.Y.; Peng, S.E.; Hsu H.C.; Liu H.C.; Chang, C.F.; Su, M.S.; Wang C.H. & Kou, G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs, *Diseases of Aquatic Organisms* 30: 53-72.
- Lo C.F.; Ho, C.H.; Peng, S.E.; Chen, C.H.; Hsu, H.C.; Chiu, Y.L.; Chang, C.F.; Liu, K.F.; Su, M.S.; Wang, C.H. & Kou, G.H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 215-255.
- Magbanua, F.O.; Natividad, K.T.; Migo, V.P.; Alfafara, C.G.; Florian O. de la Peña.; Miranda, R.O.; Albaladejo, J.D.; Cesar, E.; Nadala, E.C.B.Jr.; Loh, P.C. & Tapay, L.M. (2000). White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 77-82.
- Makesh, M.; Koteeswaran, A.; Daniel, N.; Chandran, J.; Manohar, B.M. & Ramasamy, V. (2006). Development of monoclonal antibodies against VP28 of WSSV and its application to detect WSSV using immunocomb. *Aquaculture* 261: 64-71.
- Mosmann, T.R.; Bauman, R. & Williamson, A.R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. *European Journal of Immunology* 9: 511-516.
- Otta, K.; Shubha, G.; Joseph, B.; Chakraborty, A.; Karunasagar, I. & Karunasagar, I. (1999). Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms* 38: 67-70.

- Poulos, B.T.; Pantoja, C.R.; Bradley-Dunlop, D.; Aguilar, J. & Lightner D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 13-23.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; & Maniatis, T. (2000). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (Third Edition). New York. pp. 17.1-17.10.
- Siriwattanarat, R.; Longyant, S.; Chaivisuthangkura, P.; Wangman, P.; Vaniksampanna, A. & Sithigorngul, P. (2013). Improvement of immunodetection of white spot syndrome virus using a monoclonal antibody specific for heterologously expressed *icp11*. *Arch Virol* 158: 967–979.
- Sithigorngul, P.; Chauychuwong, P.; Sithigorngul, W.; Longyant, S.; Chaivisuthangkura, P. & Menasveta, P. (2000). Development of monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 27-34.
- Sithigorngul, P.; Hajimasalaeh, W.; Longyant, S.; Sridulyakul, P.; Rukpratanporn, S. & Chaivisuthangkura, P. (2009). Simple immunoblot and immunohistochemical detection of *Penaeus stylirostris* densovirus using monoclonal antibodies to viral capsid protein expressed heterologously. *Journal of Virological Methods* 162: 126-132.
- Sithigorngul, P.; Rukpratanporn, S.; Chaivisuthangkura, P.; Sridulyakul, P. & Longyant, S. (2011). Simultaneous and rapid detection of white spot syndrome virus and yellow head virus infection in shrimp with a dual immunochromatographic strip test. *Journal of Virological Methods* 173: 85–91.
- Sithigorngul, P.; Rukpratanporn, S.; Longyant, S.; Chaivisuthangkura, P.; Sithigorngul, W. & Menasveta, P. (2002). Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 71-76.
- Sithigorngul, P.; Rukpratanporn, S.; Pecharaburanin, N. & Suksawat, P.; Longyant, S.; Chaivisuthangkura, P. & Sithigorngul, W. (2007). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. *Journal of Microbiological Methods* 71: 256–264.
- Sithigorngul, W.; Rukpratanporn, S.; Pecharaburanin, N.; Longyant, S.; Chaivisuthangkura, P. & Sithigorngul, P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 101-106.

- Van Hulten, M.C.W. & Vlaskovits, J.M. (2001). Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. *Virus Genes* 22:2: 201-207.
- Van Hulten M.C.W.; Westenberg M.; Gooball S.D. & Vlaskovits J.M. (2000). Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266: 227-236.
- Van Hulten, M.C.W.; Witteveldt, J.; Peters, S.; Kloosterboer, N.; Tarchini, R.; Fiers, M.; Sandbrink, H.; Lankhorst, R.K. & Vlaskovits, J.M. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.
- Wan, Q.; Xu, L. & Yang, F. (2008) VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *Journal of Virology* 82: 12598–12601.
- Wangman, P.; Longyant, S.; Chaivisuthangkura, P.; Sridulyakul, P. Rukpratanporn, S. & Sithigorngul, P. (2010). *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus detection using an immunochromatographic strip test. *Journal of Virological Methods* 183: 210– 214.
- Winotaphan, P.; Sithigorngul, P.; Muenpol, O.; Longyant, S.; Rukpratanporn, S.; Chaivisuthangkura, P.; Sithigorngul, W.; Petsom, A. & Menasvet, P. (2005). Monoclonal Antibodies Specific to Hemocytes of Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 189-198.
- Wongteerasupaya, C.; Vickers, J.E.; Sriurairatana, S.; Nash, G.L.; Akarajamorn, A.; Boonsaengl, V.; Panyim, S.; Tassanakajon, A.; Withyachumnarnkul, B. & Flegel, T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 69-77.
- Xie, X.; & Yang, F. (2005) Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology* 336: 93-99.
- Yan, D.C.; Feng, S.Y.; Huang, J. & Dong, S.L. (2007). Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 273: 423-426.
- Yoganandhan, K.; Musthaq, S.S.; Narayanan, R.B. & Hameed, A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *Journal of Fish Diseases* 27: 517-522.
- You, Z.; Cesar, E.; Nadala, E.C.B.Jr.; Yang, J.; Van Hulten, M.C.W. & Loh, P.C. (2002). Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5 kDa envelope protein of white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 51: 77-80.



Zhang, X.; Huang, C.; Xu, X. & Hew, C.L. (2002). Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus, *Journal of General Virology* 83: 471-477.







ภาคผนวก ก

**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1. LB broth**

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

**2. LB agar**

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	7.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร





ภาคผนวก ข

**ภาคผนวก ข**  
**บัฟเฟอร์และสารเคมี**

**1. 100 mM IPTG**

IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

**2. Buffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea; pH 8)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.38	กรัม
Tris-HCl (ปรับ pH 8)	0.12	กรัม
Urea	48.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

**3. 100 mM PMSF**

PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol (conc.)	1.0	มิลลิลิตร

**4. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 M pH 7.2**

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

**5. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%**

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
1% Merthiolate (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

**6. Merthiolate เข้มข้น 1 %**

Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

**7. KCl เข้มข้น 1 M**

KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

**8. sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้น 1%**

SDS	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร





ภาคผนวก ค



**ภาคผนวก ค**  
**สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา**

**1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)**

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na (Sigma)	1.1005	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	2.0160	กรัม
HEPES	5.5925	กรัม
Penicillin G	20,000	units
Streptomycin	200.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized Millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

**2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 20%**

RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia) หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร

**3. HAT medium**

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1% ใน RPMI medium	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร

**4. 40% Polyethylene glycol**

Polyethylene glycol	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มิลลิลิตร
เติม RPMI medium (1) ลงใน Polyethylene glycol ที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้		

**5. 12% Dimethylsulfoxide สำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา**

Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium (1)	88.0	มิลลิลิตร





ภาคผนวก ง

## ภาคผนวก ง

## สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE และ Western blotting

## 1. Stock solution

1.1 Monomer solution (30% T, 2.7% C<sub>Bis</sub>)

Acrylamide	58.4	กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	1.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร

## 1.2 4X Running gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		

## 1.3 4X Stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		

## 1.4 10% SDS

sodium dodecyl sulfate	50.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

## 1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1.0	มิลลิลิตร

## 1.6 Running gel overlay

0.15 M Tris-HCl (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

## 1.7 2X Treatment buffer

0.5 M Tris-HCl (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

## 2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

### 2.1 12% separating gel

Monomer solution (1.1)	10.0	มิลลิลิตร
0.15 M Tris-HCl (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.1	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

### 2.2 4% Stacking gel

Monomer solution (1.1)	2.7	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

## 3. Running buffer

### 4X Tank buffer

Tris	12.0	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
10% SDS (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4,000.0	มิลลิลิตร

## 4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

### 4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

#### 4.1.1 Stain stock (1% Coomassie blue R-250)

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

#### 4.1.2 Stain

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
Methanol	250.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

## 4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

## 4.2.1 Destain 1

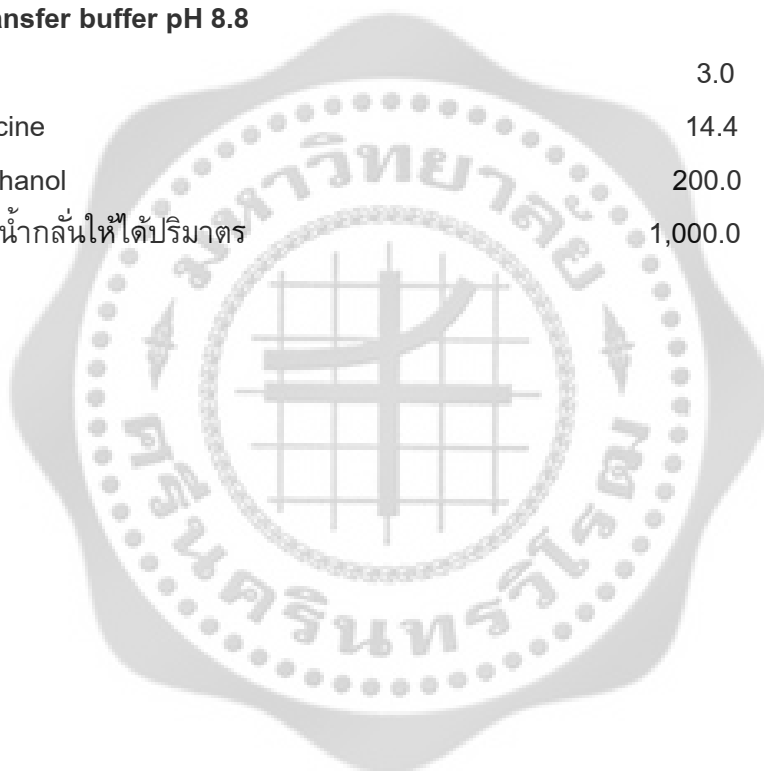
Methanol	500.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร

## 4.2.2 Destain 2

Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	880.0	มิลลิลิตร

## 5. Towbin transfer buffer pH 8.8

Tris	3.0	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร





ภาคผนวก จ

## ภาคผนวก จ

## บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

## 1. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
1% Merthiolate (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

## 2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 0.5%

สารละลาย Blotto เข้มข้น 5% (1)	50.0	มิลลิลิตร
PBS เข้มข้น 0.15 M pH 7.2	950.0	มิลลิลิตร

## 3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 M pH 4.5

Sodium citrate	29.4	กรัม
1% Merthiolate	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

4. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

## 5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)





ภาคผนวก จ

## ภาคผนวก จ

### สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี

#### Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG1 ( $\gamma$ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG2a ( $\gamma$ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG2b ( $\gamma$ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG3 ( $\gamma$ 3 chain specific)
- 5) Rabbit anti-Mouse IgA ( $\alpha$  chain specific)
- 6) Rabbit anti-Mouse IgM ( $\mu$  chain specific)
- 7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
- 8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
- 9) Normal Rabbit Serum, (Negative Control)
- 10) Positive Control, Monoclonal Mouse IgG1  
(Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
- 11) Substrate Buffer, Concentration (10X)  
(1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03%  $H_2O_2$ )
- 12) ABTS Substrate, Concentrated (50X)  
(2,2-azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
- 13) Blocking Solution, Concentration (50X)  
(25% BSA in PBS and 0.05%  $NaN_3$ )
- 14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
- 15) Goat anti-Mouse IgGAM, Concentrated (50X)  
(0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05%  $NaN_3$ )
- 16) 50% Tween 20



**ภาคผนวก ข**  
**บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ**  
**IMMUNOHISTOCHEMISTRY (ICH)**

**1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)**

Gelatin	1.0	กรัม
(CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

**2. Һ้ายาคงสภาพ (Davidson's fixative)**

95% ethanol	30.0	มิลลิลิตร
100% formalin	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

**3. Calf serum 10% (P<sub>1</sub><sup>+</sup>)**

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	90.0	มิลลิลิตร

**4. สี Enrich's acid hematoxylin**

Hematoxylin	8.0	กรัม
95% ethanol	400.0	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.0	กรัม
Glycerine	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร

**5. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol**

Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร



## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายอรรคพล วณิชสัมบัน
วันเดือนปีเกิด	4 มกราคม 2531
สถานที่เกิด	นราธิวาส
สถานที่อยู่	66/6 หมู่ 3 ตำบลไพรวัน อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส 96110
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส
พ.ศ. 2552	วท.บ. (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2556	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

