

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
infectious myonecrosis virus (IMNV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
อารีรัตน์ คุณานพรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2553

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
infectious myonecrosis virus (IMNV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
อารีรัตน์ คุณานพรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
infectious myonecrosis virus (IMNV)

บทคัดย่อ
ของ
อารีรัตน์ คุณานพรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2553

อารีรัตน์ คุณานพรัตน์. (2553). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *infectious myonecrosis virus (IMNV)*. วิทยานิพนธ์ วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล ลิทธิกรกุล.

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการ ตรวจการ ติดเชื้อ *infectious myonecrosis virus (IMNV)* ในกุ้ง โดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ทั้งสามส่วนที่ได้จากการกระตุ้นแบคทีเรีย *E. coli* ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนทางส่วนปลาย N (IMNV-N-intein) บริเวณส่วนกลาง (glutathione-S-transferase (GST)-IMNV-I) และส่วนปลาย C (GST-IMNV-C) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 84, 60 และ 62 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

จากการนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ทั้งสามส่วน ไปใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อ IMNV ได้ 13 โคลน ซึ่งแบ่งได้ออกเป็นสองกลุ่มคือ 1) จำเพาะต่อ IMNV-N จำนวน 8 โคลนดังนี้คือ IMN1, IMN3, IMN4, IMN6, IMN7, IMN10, IMN12, IMN13 2) จำเพาะต่อ IMNV-C จำนวน 5 โคลน ดังนี้คือ IMC1, IMC4, IMC6, IMC8, IMC10 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 13 โคลนที่ผลิตได้ สามารถจับกับ IMNV ในกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ด้วยวิธี dot blotting และจับกับแคปซิดโปรตีนของเชื้อ IMNV ขนาด 106 กิโลดาลตันได้ด้วยวิธี Western blotting อีกทั้งสามารถตรวจ เชื้อ IMNV โดยวิธี immunohistochemistry ได้ โดยพบการติดเชื้อบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อลาย เหนือหัวใจ ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อกุ้งปกติหรือ กุ้งที่ติดเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV), *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV), yellow head virus (YHV) และ *Penaeus monodon* densovirus (PmDNV) โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 13 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa (K) เมื่อทดสอบโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่า IMN12 และ IMN7 จับกับอีพิโทปต่างกันและมีความไวสูงสุดเท่ากัน ประมาณ 12 เฟมโตโมล/จุด ในขณะที่ IMC1 มีความไวสูงสุดประมาณ 1.5 เฟมโตโมล/จุด ซึ่งเมื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN12 ร่วมกับ IMC1 พบว่ามีความไวเพิ่มขึ้นจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN12 หรือ IMC1 เพียงโคลนเดียว เท่ากับ 4 และ 2 เท่า ตามลำดับ และมีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 10 เท่า

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT CAPSID
PROTEIN OF INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS (IMNV)

AN ABSTRACT
BY
AREERAT KUNANOPPARAT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
May 2010

Areerat Kunanopparat. (2010). *Production of monoclonal antibodies against recombinant capsid protein of infectious myonecrosis virus (IMNV)*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies (MAbs) that can be used to detect infectious myonecrosis virus (IMNV) in shrimp. The gene encoding the capsid protein of infectious myonecrosis virus (IMNV) was cloned into three parts; including the N-terminal fragment (IMNV-N), the internal fragment (IMNV-I) and the C-terminal fragment (IMNV-C). PCR products were cloned into pTYB1 (pTYB1-IMNV-N) and pGEX-6P-1 (pGEX-IMNV-I and pGEX-IMNV-C) expression vectors and transformed into *E.coli* strain BL21. After induction, the intein tagged IMNV-N, the glutathione-S-transferase (GST) tagged IMNV-I and GST tagged IMNV-C proteins with molecular masses of 84, 60 and 62 kDa were obtained, respectively. The combination of three purified recombinant proteins were use for immunization into Swiss mice.

Eight MAbs specific to IMNV-N (IMN1, IMN3, IMN4, IMN6, IMN7, IMN10, IMN12, IMN13) and five MAbs specific to IMNV-C (IMC1, IMC4, IMC6, IMC8, IMC10) were obtained. They can be used to detect natural capsid protein of IMNV at molecular mass of 106 kDa in infected *Penaeus vannamei* as determined by dot blotting and Western blot assay, respectively. All MAbs can be used to detect IMNV infection in muscle, gill, heart, midgut and lymphoid organ by immunohistochemistry without cross-reactivity to white spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV), *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV), yellow head virus (YHV) and *Penaeus monodon* densovirus (PmDNV). The monoclonal antibodies belong to IgG with subclass IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} with kappa (K) light chain. The detection sensitivity of the IMN MAbs (IMN7, IMN12) was approximately 12 fmole/spot of purified recombinant IMNV-N-intein protein and of IMC MAb (IMC1) was approximately 1.5 fmole/spot of purified recombinant GST-IMNV-C as determined by dot blotting. Combination of MAbs specific for IMNV-N (IMN12) and IMNV-C (IMC1) resulted in fourfold and twofold higher sensitivity than that using of each MAb alone, respectively. However, the sensitivity of the combined MAbs was approximately ten times lower than that of RT-PCR.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
infectious myonecrosis virus (IMNV)
ของ
อารีรัตน์ คุณานพรัตน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ เดือน พ.ศ.

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณรชต)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

..... กรรมการ
(ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน

จาก

หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง

(ทุนส่งเสริมกลุ่มนักวิจัยอาชีพ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิชาการ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ประวิติ อังประสาทพรชัย ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งศิริจิ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณรชต ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากยิ่งขึ้น และ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน จาก Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp), มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ อีกทั้งกรุณาช่วยประสานงานเรื่องทุนสนับสนุน และตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้อ IMNV ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp), มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ คุณวราณี หะยีมะสาและ ที่ให้ คำปรึกษา และแนะนำแต่สิ่ง ที่ดีเสมอมา ขอบคุณ คุณชุตินา ศรีสุข และ คุณชลินันท์ เพ็งสุข รวมทั้งรุ่นพี่ทุกท่าน ในห้องปฏิบัติการโมโนโค ลนอล แอนติบอดีและห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ขอบคุณ คุณรัตชนก ศิริคะรินทร์ และ เพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา ที่เป็นแรงใจ ขอขอบคุณแรงผลักดัน ที่ทำให้ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และวิจัยได้เรียนรู้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอเนาเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง ทุกชีวิตที่มีส่วนในความสำเร็จของการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

อารีรัตน์ คุณานพรัตน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
สมมติฐานในการวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ความเป็นมาและสภาพปัญหา.....	5
Infectious myonecrosis virus (IMNV).....	11
การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในปัจจุบัน.....	15
จีโนมของ IMNV.....	18
แคปซิดโปรตีนของ IMNV.....	21
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	26
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
อุปกรณ์และสารเคมี.....	28
วิธีดำเนินการทดลอง.....	30
4 ผลการทดลอง.....	41
การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV.....	41
การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ให้บริสุทธิ์.....	41
การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV.....	43
การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	47
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	57
บรรณานุกรม.....	61

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	67
ภาคผนวก ก.....	68
ภาคผนวก ข.....	70
ภาคผนวก ค.....	72
ภาคผนวก ง.....	74
ภาคผนวก จ.....	78
ภาคผนวก ฉ.....	80
ภาคผนวก ช.....	82
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	84

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	28
2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	29
3 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR.....	32
4 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีน RdRp ของ IMNV.....	33
5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV.....	56

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลกระหว่างปี ค.ศ. 1985-2005.....	6
2 อัตราส่วนผลผลิตการเพาะเลี้ยงกุ้งในแต่ละสายพันธุ์ทั่วโลกในปี ค.ศ. 2005.....	6
3 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว <i>L. vannamei</i>	8
4 วงชีวิตของกุ้ง <i>Penaeus</i>	9
5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคในกุ้ง.....	11
6 การระบาดของเชื้อ IMNV ในประเทศบราซิล.....	12
7 ลักษณะของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV.....	13
8 เนื้อเยื่อของกุ้ง <i>L. vannamei</i> ที่ติดเชื้อ IMNV.....	14
9 <i>in situ</i> hybridization ในกล้ามเนื้อลายของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV.....	16
10 IQ2000 TM IMNV Detection kit.....	16
11 ความไวในการตรวจเชื้อ IMNV โดยวิธี RT-LAMP-LFD.....	17
12 ลักษณะและองค์ประกอบของ IMNV.....	18
13 Phylogenetic analysis โดยใช้ยีน RdRp.....	19
14 จีโนมของ IMNV.....	20
15 โครงสร้าง 3 มิติของอนุภาค IMNV.....	20
16 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน IMNV-N.....	23
17 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน IMNV-I.....	24
18 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน IMNV-C.....	25
19 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	38
20 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ¹	39
21 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ²	40
22 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV นำ lysate ของแบคทีเรีย และรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนบริสุทธิ์มาแยกใน 12% SDS-PAGE แล้ว ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250.....	42
23 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting.....	44
24 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	45

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
25 การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของกุ้งขาวที่ติดเชื้อมด้วยวิธี immunohistochemistry.....	46
26 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของไวรัสต่างๆ (WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV).....	48
27 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ตามธรรมชาติ.....	49
28 ผลการรวมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ IMNV-N-intein แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Indirect ELISA	51
29 ผลการรวม โมโนโคลนอลแอนติบอดี จำเพาะต่อ GST-IMNV-C แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Indirect ELISA	52
30 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ IMNV-N ด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โปรตีน IMNV-N-intein.....	53
31 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ IMNV-C ด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โปรตีน GST-IMNV-C.....	53
32 การทดสอบ ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจเชื้อ IMNV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ.....	54
33 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ IMNV ด้วยวิธี RT-PCR.....	55
34 แนวทางการพัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย (strip test) ต่อเชื้อ IMNV.....	60

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลกมีการเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา โดยพบว่าในปี ค.ศ. 2004 ทั่วโลกมีผลผลิตโดยรวมเท่ากับ 59.4 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 70.3 พันล้านเหรียญสหรัฐ (FAO. 2006: Online) โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งจัดเป็นอุตสาหกรรมหลักที่ทำรายได้ให้กับประเทศผู้ส่งออก เนื่องจากเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูง โดยเฉพาะในปัจจุบัน การเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญ อย่างยิ่งในหลายประเทศเช่น จีน ไทย เวียดนาม อินโดนีเซีย อินเดีย เม็กซิโก บราซิล บังคลาเทศ เอกวาดอร์ และพม่า เป็นต้น (FAO. 2007: Online) เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย และในการเลี้ยงจะมีการปล่อยลูกกุ้งจำนวนมาก มีอัตราการขยายพันธุ์ในธรรมชาติสูง และทนทานต่อสภาวะต่างๆ จึงให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในพื้นที่การเลี้ยงที่เท่ากัน แต่ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งก็ประสบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคระบาดต่างๆ ทั้งจากแบคทีเรีย ไวรัส รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201-220) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายรุนแรงต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งอย่างมาก เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อโรคในกุ้ง ชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) (2) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) (3) ไวรัสเฮปาทอแพติกพาร์วไวรัส (hepatopancreatic parvovirus; HPV หรือ *Penaeus monodon* densovirus; PmDNV) (4) ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus; MBV หรือ *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus; PemoNPV) (5) ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) และ (6) ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; IHNV หรือ *Penaeus stylirostris* densovirus; PstDNV) (Loh; et al. 1997: 263–312)

นอกจากนี้ยังพบไวรัสที่ก่อโรคกับกุ้งขาวอย่างรุนแรงอีกชนิดคือ infectious myonecrosis virus (IMNV) ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการกล้ามเนื้อขาวหรือกล้ามเนื้อตาย โดยพบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศบราซิลในช่วงปี ค.ศ. 2002-2005 ทำให้กุ้งขาวมีอัตราการตายสูง ประมาณ 40-70% และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของ ประเทศบราซิล ขาดทุนถึง 440 ล้านดอลลาร์ (Madrid. 2005: 22-29) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 พบการระบาดของ IMNV อีกครั้งในประเทศอินโดนีเซีย (Senapin; et al. 2007: 32-38) ซึ่งส่งผลให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศอินโดนีเซียเสียหายอย่างหนัก แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ IMNV ในประเทศไทย แต่การควบคุมโดยการเฝ้าระวังโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้จะเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อ หรือแพร่ระบาดในประเทศไทย

การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสนั้นยังไม่สามารถทำได้ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว จึงมีความสำคัญมาก เพื่อช่วยลดความสูญเสียที่อาจเกิดขึ้น หรือช่วยใน

การตัดสินใจและวางแผนทางป้องกัน สำหรับการตรวจเชื้อ IMNV ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาขึ้นมากมายประกอบด้วย การตรวจ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy) และการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาโดยจะพบกล้ำมเนื้อตาย หรือกล้ำมเนื้อบางส่วนขาดหายไป มีการสร้าง connective tissue ที่มากกว่าปกติ lymphoid organ จะมีลักษณะเป็น spheroid (Poulos; et al. 2006: 987-996) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์ สูง ใช้เวลามากในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ และไม่สามารถตรวจการติดเชื้อในระยะแรกได้ เทคนิค *in situ* hybridization (Tang; et al. 2005: 261-265) โดยใช้ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ IMNV ได้ถูกพัฒนาขึ้นซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง และสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ IMNV ได้ แต่ยังคงมีความไวต่ำ และใช้ระยะเวลานานในการทราบผลของการติดเชื้อ

ต่อมาได้มีความพยายามในการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหา สารพันธุกรรมของไวรัสโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR) และ nested RT-PCR (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) ทำให้การตรวจการติดเชื้อ มีความไวสูงขึ้นสามารถตรวจพบไวรัสแม้มีปริมาณน้อย ในการติดเชื้อระยะแรก แต่การ ตรวจสอบต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และมีความยุ่งยากในการวิเคราะห์ผล จึงไม่เหมาะในการนำไปตรวจเชื้อในฟาร์มกุ้ง วิธี real-time RT-PCR โดยใช้ TaqMan probe (Andrade; et al. 2007: 9-15) เป็นเทคนิคที่ถูกต้องแม่นยำ สามารถตรวจปริมาณการติดเชื้อเริ่มต้น และแสดงผลได้ทันทีโดยไม่ต้องตรวจสอบผลผลิตของ PCR จึงไม่ต้องใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เทคนิค นี้มีความไว และความจำเพาะสูง เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ได้ถูกพัฒนาให้สามารถตรวจสอบผลผลิตโดยวิธี lateral flow dipstick (Puthawibool; et al. 2009: 27-31) เป็นเทคนิคที่ถูกต้องแม่นยำมีความไวเทียบเท่ากับวิธี RT-PCR และใช้เวลาน้อยในการทราบผล ถึงแม้ว่าเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลจะใช้ในการตรวจการติดเชื้อ IMNV หรือไวรัสอื่นๆ ในกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากการตรวจจะมีต้นทุนสูง และต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญจึงไม่เหมาะสมต่อการใช้งานโดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง

เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAbs) มาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนี้ (ไพศาล สิทธิกรกุล . 2548) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาใช้ MAbs ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ในกุ้ง เช่น เชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), เชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), เชื้อ PmDNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89), เชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), เชื้อ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) และเชื้อแบคทีเรียเช่น *Vibrio harveyi* เป็นต้น (Phianphak; et al. 2005: 161-168) แม้ว่าเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันจะมีความไวต่ำกว่าวิธี PCR แต่ก็ยังเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ อีกทั้งเมื่อ

พัฒนาเป็นชุดตรวจแบบง่าย (strip test) เกษตรกรจะสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมากและประหยัดเวลา (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264)

สำหรับการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ นั้นไม่สามารถทำได้เนื่องจากยังไม่มีรายงานของกึ่งที่ติดเชื้อ IMNV ในประเทศไทย และการนำเข้ากึ่งที่ติดเชื้อไวรัสอาจก่อให้เกิดการระบาดของโรค และนำไปสู่ความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งในประเทศไทยได้ อีกประการหนึ่งการใช้กึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเป็นแอนติเจนนั้นมีขั้นตอนในการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ หลายขั้นตอน และอาจมีองค์ประกอบต่างๆ ของ กึ่งปะปนมาด้วย ซึ่งอาจทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้ส่วนใหญ่จำเพาะกับองค์ประกอบต่างๆ ของกึ่งเช่น haemolymph เนื่องจากมีความเป็น อิมมูโนเจนสูงกว่าองค์ประกอบของไวรัส จากเหตุผลดังกล่าวร่วมกับ ความรู้เกี่ยวกับจีโนมของ IMNV (Poulos; et al. 2006: 987-996) ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมไวรัส และสามารถจำแนกยีนที่ ทำหน้าที่ผลิตแคปซิดโปรตีน ของไวรัสได้ ซึ่งแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุด ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด ดังนั้นการใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV เป็นแอนติเจน เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี จึงมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการ โดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ IMNV
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจกึ่งที่ติดเชื้อ IMNV ด้วยวิธี dot

blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

1. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนใน *Escherichia coli* (*E. coli*)
2. การทำรีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีน ที่ได้จากการกระตุ้นการแสดง ออกใน แบคทีเรีย *E. coli* ให้มีความบริสุทธิ์
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ IMNV โดยใช้รีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีนที่ผลิตได้
4. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry
5. การพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอีพีโทป ชนิดของแอนติบอดี รวมทั้งการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของเชื้อ IMNV อาจทำได้โดยใช้รีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีน ที่สร้างจากยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัสเป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. สามารถกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนทั้ง 3 ส่วนของIMNV ได้
2. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ IMNV ได้
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ผลิตได้มาใช้ตรวจ โรคที่เกิดจากเชื้อ IMNV ด้วย

วิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

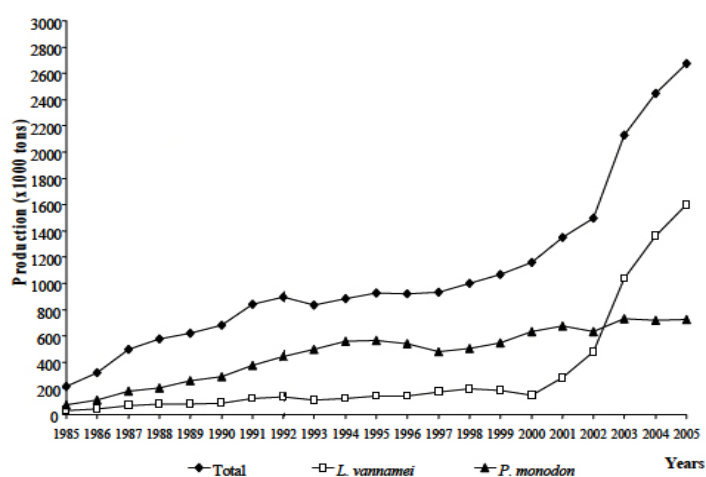
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นมาและสภาพปัญหา

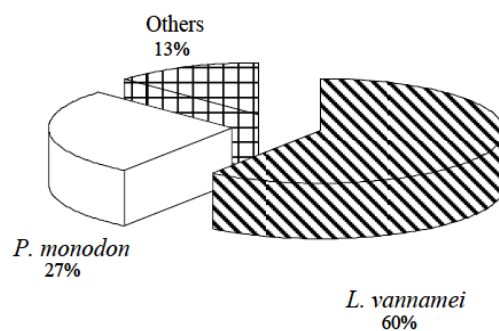
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา โดยในปี ค.ศ. 2004 พบว่าทั่วโลกมีผลผลิตสัตว์น้ำโดยรวม เท่ากับ 59.4 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 70.3 พันล้านเหรียญสหรัฐ โดยผลผลิตเพิ่มขึ้นสูงอย่างต่อเนื่องระหว่างปี ค.ศ. 1980-2004 เนื่องจากความรู้และวิชาการทางการเกษตรมีส่วนช่วยในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมไปถึงการใช้ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีในการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอุตสาหกรรมหลักที่ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมาก พบว่าในปี ค.ศ. 1985-2005 มีผลผลิตเพิ่มขึ้นจาก 2.0 แสนตัน ไปถึง 2.7 ล้านตัน ตามลำดับ (FAO. 2006: Online)

ในช่วงปี ค.ศ. 1985-1995 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นกุ้งทะเลเพียงชนิดเดียวที่มีการเลี้ยงแบบพัฒนากันอย่างแพร่หลายทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นประสบปัญหาต่าง ๆ เช่น ปัญหามลพิษ ความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม ปัญหาทางการค้าและการตลาด และ ในปี ค.ศ. 1995 เกิดปัญหาจากการระบาดของโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำอย่างรุนแรง (Flegel; Fegan; & Sriurairatana. 1995: 65–79) ทำให้ในหลายๆ ประเทศมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ทดแทนการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมากขึ้น ส่งผลให้สัดส่วนในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำลดลง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2002 อัตราส่วนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงใกล้เคียงกับกุ้งขาวประมาณ 5.0 แสนตัน (ภาพประกอบ 1) และในปี ค.ศ. 2005 อัตราส่วนการเลี้ยงกุ้งขาวเพิ่มสูงสุดเมื่อเทียบกับกุ้งกุลาดำและกุ้งชนิดอื่นๆ คิดเป็น 60, 27 และ 13% ของผลผลิตกุ้งทั้งหมด ตามลำดับ (FAO. 2007: Online) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 1 ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลกระหว่างปี ค.ศ. 1985-2005

ที่มา: FAO. (2007). *Fishery Statistics Aquaculture Production*. (Online).



ภาพประกอบ 2 อัตราส่วนผลผลิตการเพาะเลี้ยงกุ้งในแต่ละสายพันธุ์ทั่วโลกในปี ค.ศ. 2005

ที่มา: FAO. (2007). *Fishery Statistics Aquaculture Production*. (Online).

กุ้งขาว (Pacific white shrimp)

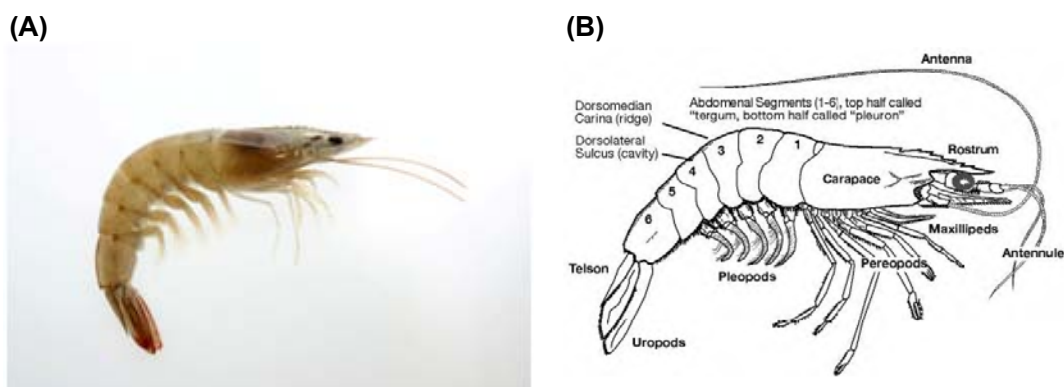
อนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Supclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Dendrobrachiata
Family	Penaeidae
Genus	Penaeus
Subgenus	Litopenaeus
Species	<i>Litopenaeus vannamei</i>

กุ้งขาวแปซิฟิก (*L. vannamei*) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่ากุ้งขาว เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก ทางตอนเหนือของประเทศเม็กซิโก จนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู โดยกุ้งชนิดนี้มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย และบราซิล กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน ทำให้มีการนำเข้าไปเลี้ยงในหลายๆ ประเทศ กุ้งชนิดนี้ได้มีการนำเข้ามาเลี้ยงในทวีป เอเชียครั้งแรกในประเทศไต้หวัน ปี พ.ศ. 2539 และประเทศจีนในปี พ.ศ. 2541 สำหรับประเทศไทยได้มีการนำกุ้งขาวเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 (ชลอ ลิ้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. ม.ป.ป.: 118)

ลักษณะทั่วไป

กุ้งขาวมีลักษณะทั่วไปคือมีลำตัว 6 ปล้อง สีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว มีกรี (rostrum) อยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก หัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยม สีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่าง 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัว (carapace) มีสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดิน (pereopods) มีสีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวด (antenna) แดงยาว 2 เส้น ตาสีแดงเข้ม เปลือกตัวบางสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาวายน้ำ (pleopods) 5 คู่ โดยที่ปลายมีสีแดงและข้างในมีสีขาว ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหาง (telson) มีสีแดงเข้ม แพนหาง (uropods) มี 4 ใบและ 1 กรีหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มตัวของกุ้งสายพันธุ์นี้มีความยาวเท่ากับ 230 มิลลิเมตร (9 นิ้ว) (ภาพประกอบ 3) กุ้งขาวหากินทุกระดับความลึกของน้ำ ลอกคราบเร็วทุกๆ สัปดาห์ไม่หมกตัว (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)



ภาพประกอบ 3 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว *L. vannamei* (A); ภาพถ่าย , (B); ภาพวาดแสดงโครงสร้างอวัยวะภายนอก

ที่มา: Rosenberry, B. (2005). *World Shrimp Farming*. In *Shrimp News International*. (Online).

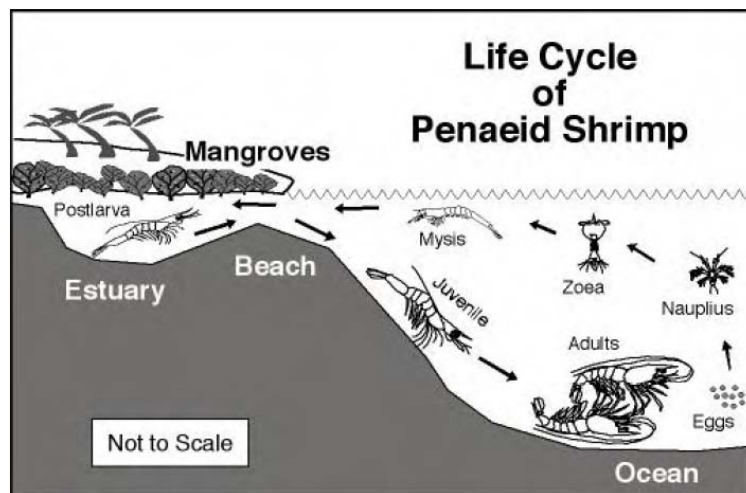
วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

ในธรรมชาติของกุ้งขาวจะมีอายุขัยประมาณเกือบ 36 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 มิลลิเมตร ไข่ที่ฟักแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000-250,000 ฟอง แม่กุ้งจะว่ายน้ำรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มออกไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้าๆ เนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งขาวมีลักษณะเป็นแบบเปิด (opened thelycum) แตกต่างจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วยซึ่งมีลักษณะเป็นแบบปิด (closed thelycum) ดังนั้นรูปแบบการสืบพันธุ์และพฤติกรรมในการผสมพันธุ์จึงเป็นไปคนละลักษณะกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ระบบสืบพันธุ์และการผสมพันธุ์ปกติของกุ้งขาวจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืนหลังจากมีการลอกคราบของตัวเมียและผสมพันธุ์กันที่ความลึก 10-15 เมตร ถึง 30-50 เมตร ในธรรมชาติแม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมที่จะวางไข่นั้นจะสังเกตได้จากรังไข่เป็นลำทึบมีสีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัวทั้งสองข้าง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545: 121-124)

ขั้นตอนการพัฒนาของตัวอ่อน

ตัวอ่อนของกุ้งขาวมีการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วง ของการลอกคราบ โดยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีลักษณะกลมมีเมือกห่อหุ้ม พบ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร ไข่จะจมลงสู่พื้นเพราะ มีความหนาแน่นกว่า น้ำทะเล ไข่ที่ฟักจะเป็นตัวในบริเวณที่วางไข่จากนั้นลูกกุ้งวัยอ่อนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่งในย่านน้ำกร่อย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวเองอยู่ในบริเวณนั้นจนโตถึงขั้นพ่อแม่พันธุ์จึงค่อยอพยพสู่ทะเลลึกเพื่อทำการสืบพันธุ์วางไข่ต่อไป การพัฒนาตัวอ่อนระยะของกุ้งขาวเมื่อไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้วภายใน 12-14 ชั่วโมง ก็จะฟักตัวอ่อน ในระยะนาอเพลียส (nauplius) ลูกกุ้งที่ฟักออกมาเป็นตัวนี้

จะมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจนกระทั่งเหมือนตัวเต็มวัยซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้ (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 วงชีวิตของกุ้ง *Penaeus*

ที่มา: Rosenberry, B. (2005). *World Shrimp Farming*. In *Shrimp News International*. (Online).

ตัวอ่อนระยะที่ 1 นอเพลียส (nauplius)

รูปร่างคล้ายแมงมุมยังไม่ต้องการอาหารเนื่องจากมีถุงอาหาร (yolk sac) ติดอยู่กับลำตัว ตัวอ่อนระยะนี้จะผ่านการลอกคราบ 5-6 ครั้ง ภายในเวลา 36-48 ชั่วโมงก่อนจะเข้าระยะที่ 2

ตัวอ่อนระยะที่ 2 โปรโตซูเอีย (protozoa)

ตัวอ่อนระยะนี้จะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวและลำตัวแยกจากกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 3 ขั้นตอน ใช้ระยะเวลาประมาณ 4-7 วัน

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ไมซิส (mysis)

ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลักษณะคล้ายลูกกุ้งวัยรุ่น แต่การว่ายน้ำยังว่ายน้ำแบบหัวทิ่มลงและติดขึ้นลง พัฒนาการของลูกกุ้งระยะนี้มี 3 ขั้นตอน ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 5-7 วัน

ตัวอ่อนระยะที่ 4 โพลลารวา (post larva)

ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับลูกกุ้งวัยรุ่นมากขึ้นมีอวัยวะต่างๆ เกือบครบทุกส่วนและพัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่ระยะกุ้งวัยรุ่น ลูกกุ้งในระยะโพลลารวาจะมีขาเดิน 3 คู่ คู่แรกมองเห็นเป็นก้ามชัดเจน หางแคบเข้าเป็นระยะที่มีรยางค์ครบ มีขากรรไกร (mandible) ที่

ชัดเจน ขาวว่ายน้ำเจริญให้เห็นชัดเจนขึ้น กรีสันกว่าดวงตา ระยะระหว่างตากางออกมองเห็นได้ชัดเจน ลักษณะลำตัวสั้นป้อมจะมีลักษณะใสมีเส้นสีน้ำตาลพาดยาวจากบริเวณหนวดถึงหาง โดยปล้องท้องปล้องที่ 6 จะยาวกว่าปล้องหัวเล็กน้อย กุ้งวัยรุ่น (juvenile) จะมีขนาดตัวโตขึ้นโดยมีการเจริญของเหงือกที่สมบูรณ์ กุ้งในระยะนี้จะมีการพัฒนาของกรืออย่างเต็มที่ มองเห็นกริด้านบนมี 8-9 ฟัน ความยาวกรือจะสั้นกว่า exopodite ของหนวด ปลายกรือเรียวตรง การเคลื่อนไหวจะคล้ายกับกุ้งที่โตเต็มที่แล้ว คือใช้ขาเดินและขาวว่ายน้ำ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

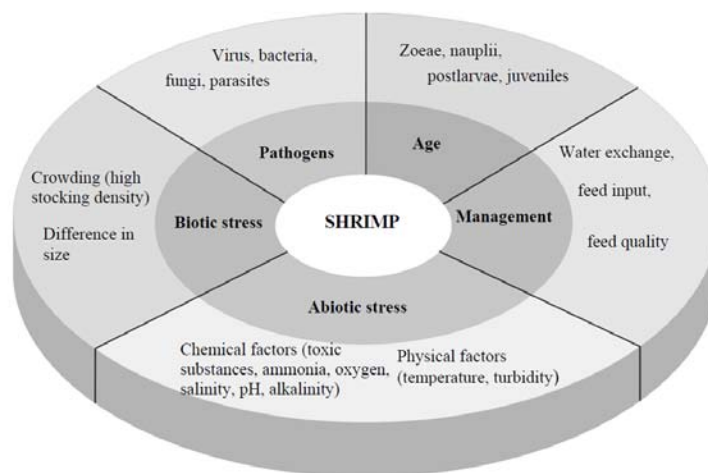
กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ เช่นสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในที่มีระดับความเค็ม ที่ 5-35 ppt และระดับความเค็มต่ำ 0-5 ppt แต่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt ส่วนอุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 26-29 องศาเซลเซียส แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ระดับออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ควรมีค่า 4-9 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับค่า pH ควรอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง หรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ กุ้งชนิดนี้ชอบอยู่ในน้ำที่มีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงและตื่นตกใจง่าย (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

โรคที่เกิดขึ้นในกุ้ง

โรคที่เกิดกับกุ้งเป็นผลของความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรคเมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิพลเพิ่มมากขึ้น เช่นความรุนแรงของเชื้อก่อโรค การปรากฏของเชื้อก่อโรคหลายๆ ชนิด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงหรือภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสมก็จะส่งผลทำให้การก่อเกิดหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Snieszko. 1973: 201-220) โรคส่วนใหญ่ที่เกิดกับกุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ (1) โรคไม่ติดเชื้อ และ (2) โรคติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (ภาพประกอบ 5) (Phuoc. 2008: 1-234) ส่วนโรคติดเชื่อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญซึ่งส่งผลกระทบเชิงลบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก

โรคติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201-220) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112) เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้แก่ (1) ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) (2) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) (3) ไวรัสเฮปาทอแพนแครติกพาร์วไวรัส (hepatopancreatic parvovirus; HPV หรือ *Penaeus monodon* densovirus; PmDNV) (4) ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus; MBV หรือ *Penaeus monodon* nucleopoly-

hedrovirus; PemoNPV) (5) ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) และ (6) ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; IHNNV หรือ *Penaeus stylirostris* densovirus; PstDNV) (Loh; et al. 1997: 263–312)



ภาพประกอบ 5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคในกุ้ง

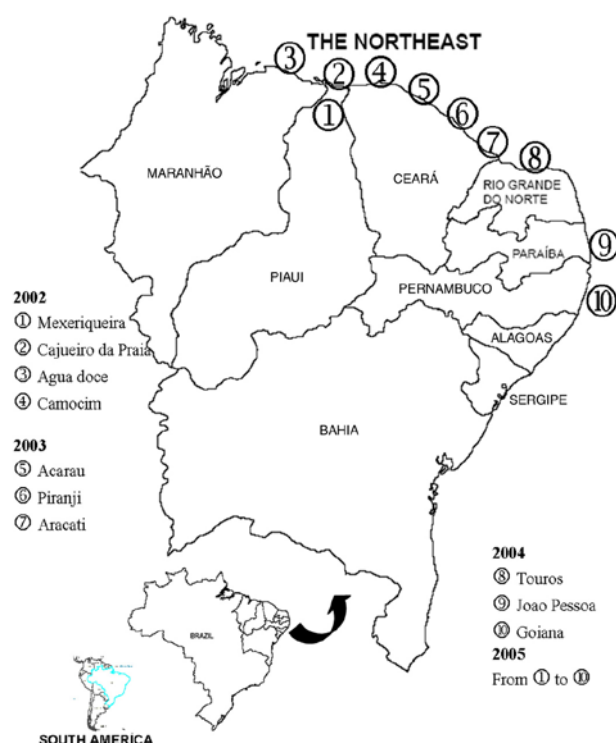
ที่มา: Phuoc, L. H. (2008). *Single and Dual Experimental Infection of Specific Pathogen-free Litopenaeus vannamei Shrimp with White Spot Syndrome Virus and Vibrio Species*. Dissertation, Ph.D. (Applied Biological Sciences). Ghent University, Belgium. Photocopied. p. 175.

Infectious myonecrosis virus (IMNV)

Infectious myonecrosis virus (IMNV) พบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล (Poulos; et al. 2006: 987-996) มีการแพร่กระจายตามแนวชายฝั่งของรัฐ Piaui จากนั้นก็ระบาดไปตามรัฐ Ceará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Pernambuco และ Paraíba (ภาพประกอบ 6) (Andrade; et al. 2007: 9-15) ซึ่งในระหว่างปี ค.ศ. 2003-2005 มีกุ้งตายอย่างต่อเนื่อง คิดเป็นผลผลิตโดยรวม 3.8 แสนตัน (Nunes; et al. 2005: 26-33) ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจในประเทศบราซิลให้ขาดทุนถึง 440 ล้านดอลลาร์สหรัฐหรือสูญเสียผลผลิตไปถึง 70% (Madrid. 2005: 22-29) โดยในขณะนั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่ทำให้กุ้งตายและก่อให้เกิดความเสียหาย จนกระทั่งในช่วงกลางปี ค.ศ. 2003 ตัวอย่างของกุ้งที่ติดเชื้อทั้งแบบแช่แข็งและในรูป Davidson's alcohol–formalin–acetic acid (AFA)-fixed tissues ถูกส่งมาตรวจที่ Aquaculture Pathology Laboratory มหาวิทยาลัยอริโซนา สหรัฐอเมริกา ต่อมาในเดือน

กุมภาพันธ์ปี ค.ศ. 2004 ดร.โดแนลด์ วี ไลท์เนอร์ (Donald V. Lightner) ได้ประกาศว่าเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดใหม่ (Poulos; et al. 2006: 987-996)

นอกจากประเทศบราซิลที่มีรายงานการติดเชื้อเป็นครั้งแรกแล้ว ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 มีรายงานการติดเชื้ออีกครั้งที่ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งเมื่อทำ genome sequencing ของเชื้อ IMNV ที่พบในประเทศอินโดนีเซียเปรียบเทียบกับที่พบในประเทศบราซิลพบมีความเหมือน 99.6% ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่เคยมีรายงานการระบาด ในประเทศทางแถบเอเชียมาก่อนจึงสันนิษฐานว่าการติดเชื้อในประเทศอินโดนีเซียนั้นเกิดจากการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากประเทศบราซิล (Senapin; et al. 2007: 32-38)

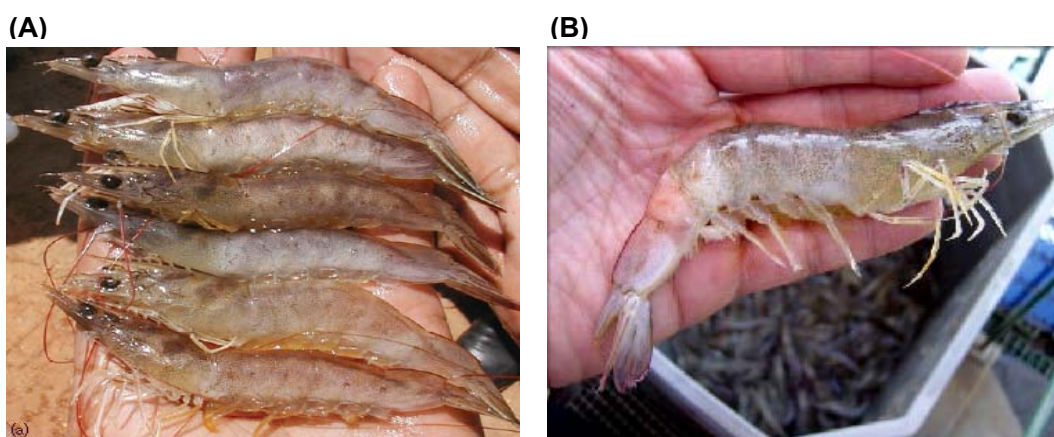


ภาพประกอบ 6 การระบาดของเชื้อ IMNV ในประเทศบราซิล ในช่วงปี ค.ศ. 2002-2005 แผนที่แสดงบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อ IMNV โดยตัวเลขในภาพแสดงบริเวณเริ่มมีการระบาด ตั้งแต่ 1-10

ที่มา: Andrade, T. P. D.; et al. (2007). Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Using *TaqMan* Probe for Detection and Quantification of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV). *Aquaculture*. (264): 10.

ลักษณะอาการของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV

กุ้งที่ติดเชื้อ IMNV จะสังเกตพบกล้ามเนื้ออักเสบเป็นสีขุ่นขาว (white necrosis areas) บริเวณปลายหาง แพนหาง โดยเฉพาะจะเริ่มเกิดจากหางปล้องสุดท้าย กุ้งจะยังคงมีชีวิตและว่ายน้ำได้ แต่จะอ่อนแอมีการติดตัวน้อยลง ว่ายน้ำอย่างแคบบริเวณผิวน้ำหรือขอบบ่อ มีการกินอาหารเพิ่มจากปกติ จนเมื่ออาการมากขึ้นจะพบกุ้งลอยที่ ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อมากขึ้น และพบอาการกล้ามเนื้อขุ่นขาวบริเวณลำตัวร่วมด้วย (ภาพประกอบ 7A) (Poulos; et al. 2006: 987-996) ตัวออกสีแดงเรื่อๆ หรือในบางกรณีอาจพบกล้ามเนื้อบริเวณโคนหางตายและเปลี่ยนเป็นสีแดงเหมือนกุ้งต้มสุก (ภาพประกอบ 7B) (GeneReach Biotechnology Corp. 2006: Online)



ภาพประกอบ 7 ลักษณะของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV (A); แสดงกล้ามเนื้อตายเปลี่ยนเป็นสีขุ่นขาว, (B); บริเวณโคนหางไปจนถึงลำตัวและโคนหางเปลี่ยนเป็นสีแดงเหมือนกุ้งต้มสุก

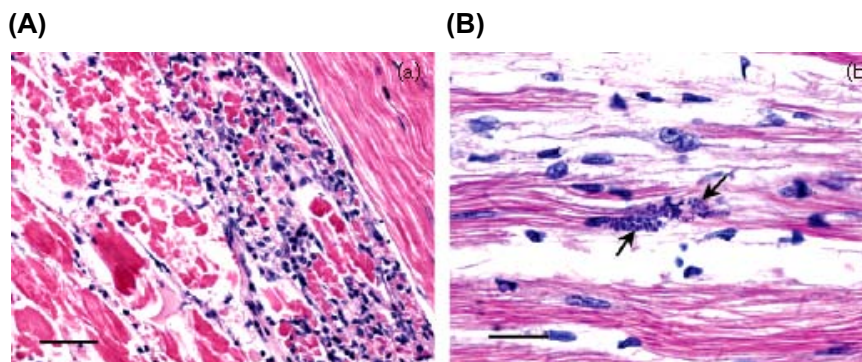
ที่มา: (A) Poulos, B. T.; et al. (2006). Purification and Characterization of Infectious Myonecrosis Virus of Penaeid Shrimp. *Journal of General Virology*. (87): 991.

ที่มา: (B) GeneReach Biotechnology Corp. (2006). (Online).

พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV

IMNV เพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อลายซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญที่สุดในการติดเชื้อ โดยสามารถพบการติดเชื้อ บริเวณเหงือก และ lymphoid organ ได้เช่นกัน กุ้งที่ติดเชื้ออย่างรุนแรง จะแสดงลักษณะขาวขุ่นบริเวณกล้ามเนื้อลาย และเกิดการ ตายบริเวณกล้ามเนื้อ (coagulative muscle necrosis) อาจมีการบวมน้ำร่วมด้วย (edema) มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยเกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาว (haemocytic infiltration) มีการสร้าง เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มากกว่าปกติ (fibrosis) ส่วนที่ lymphoid organ จะมีลักษณะเป็น spheroid และมักพบบริเวณช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ (hemocoel) รวมถึงเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหลวม (loose connective

tissues) โดยเฉพาะที่ท่อหัวใจ และบริเวณที่ติดต่อกับ antennal gland tubules (ภาพประกอบ 8) (Poulos; et al. 2006: 987-996)



ภาพประกอบ 8 เนื้อเยื่อของกุ้ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ IMNV (A); แสดงกล้ามเนื้อที่ตาย (coagulative muscle necrosis) รวมถึง haemocytic infiltration และ fibrosis (มูมบนด้านขวา คือกล้ามเนื้อปกติ); bar = 50 ไมโครเมตร, (B); พบ basophilic inclusion รอบๆ นิวเคลียสของกล้ามเนื้อลาย; bar = 20 ไมโครเมตร

ที่มา: Poulos, B. T.; et al. (2006). *op. cit.* p. 992.

การแพร่กระจายและการติดเชื้อ IMNV

IMNV สามารถก่อโรคได้กับกุ้งทุกขนาด ตั้งแต่โรงเพาะฟัก และบ่อเลี้ยง ทำให้กุ้งในระยะ juveniles และ sub-adults ตาย พบว่าการระบาดจะส่งผลกระทบได้นั้นมีความสัมพันธ์กับความเครียด และสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ระดับความเค็มของน้ำ และการกินอาหารที่ไม่ได้คุณภาพ สามารถกระตุ้นให้กุ้งที่ได้รับเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ เกิดอาการได้ถ้าอยู่ในสภาวะที่อ่อนแอ หรือไม่เหมาะสม การแพร่ระบาดเชื่อว่าสามารถส่งผ่านจากพ่อแม่สู่ไข่และไปสู่ลูกกุ้งได้ (vertical transmission) และสามารถจะส่งผ่านไวรัสจากการกินกันเองหรือกินกุ้งที่มีการติดเชื้อ (horizontal transmission) (Poulos; et al. 2006: 987-996) ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาถึงพาหะของเชื้อ IMNV พบว่าสามารถติดเชื้อได้ในกุ้ง 4 สปีชีส์คือ *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *P. monodon* (Tang; et al. 2005: 261–265) และ *Farfantepenaeus subtilis* (Coelho; et al. 2009: 1-4) โดยในกุ้ง *L. vannamei* เท่านั้นที่แสดงอาการและทำให้กุ้งตายได้

การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในปัจจุบัน

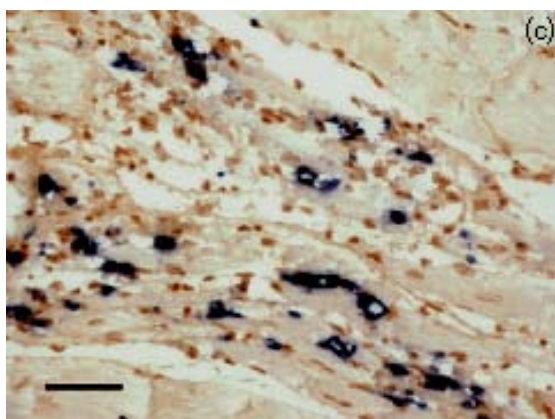
การตรวจเชื้อทางพยาธิวิทยาและการย้อมสี

การดูอาการของกุ้งที่ติดเชื้อโดยดูจากกล้ามเนื้อขุ่นขาวนั้นไม่สามารถบ่งบอกได้ถึง การติดเชื้อ IMNV เนื่องจากอาการขุ่นขาวสามารถเกิดขึ้นได้เป็นปกติถ้ากุ้งมีความเครียดจากการขนส่ง จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นเช่น *Penaeus vannamei* nodavirus; PvNV (Tang; et al. 2007: 183-190) การตรวจเชื้อ IMNV โดยวิธี histology ด้วยการ ย้อมสี haematoxylin และ eosin นั้น เป็นเทคนิคที่ต้องมีการเตรียมเนื้อเยื่อที่ต้องใช้เวลานาน อีกทั้ง ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกได้ และลักษณะที่เห็นอาจมีความคล้ายคลึงกับการ ติดเชื้อ PvNV ที่มีเป้าหมายบริเวณกล้ามเนื้อเช่นเดียวกัน

การตรวจเชื้อโดยวิธีทางด้านชีวโมเลกุล

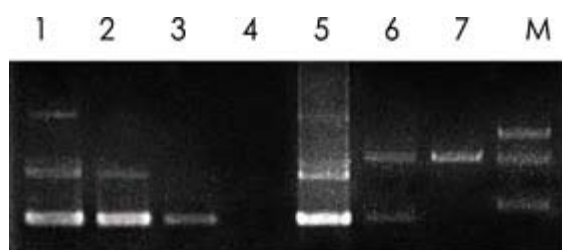
ในปี ค.ศ. 2006 ได้มีการพัฒนาใช้เทคนิค *in situ* hybridization โดยทำการออกแบบ digoxigenin-labeled IMNV probe ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ในเนื้อเยื่อได้ (ภาพประกอบ 9) แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิค *in situ* hybridization ยังคงมีความไวต่ำ (Tang; et al. 2005: 261–265) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ IMNV เช่น การทำ RT-PCR และ nested RT-PCR (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) โดย ออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะกับจีโนมของ IMNV สำหรับการทำให้ nested RT-PCR โดยจะให้ ผลผลิตขนาด 328 และ 139 คู่เบส ตามลำดับ การทดลองใช้ RNA ที่สกัดจากไวรัสที่ถูกทำให้ บริสุทธิ์ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจเชื้อได้เมื่อมีปริมาณเชื้อในระดับ 100 copies ของ IMNV ในการทำ PCR ขั้นที่ 1 และตรวจเชื้อในระดับ 10 copies ของ IMNV ในการทำ PCR ขั้นที่ 2 ซึ่งวิธีนี้ จัดเป็นวิธีที่มีความไวสูง จำเพาะ และรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ IMNV

ต่อมา ทีมงานของ ดร.ไลท์เนอร์ร่วมมือกับ Farming IntelliGene Tech Corp. พัฒนา ชุดตรวจที่เรียกว่า IQ2000TM viral detection series ซึ่งภายในชุดตรวจประกอบด้วย internal control และ semi-quantitative design โดย internal control จะช่วยลด false negative ซึ่งอาจเกิด จากการผิดพลาดในขั้นตอนการสกัด nucleic acid, inhibitory effect ส่วน semi-quantitative design จะช่วยในการวัดระดับความรุนแรงในการติดเชื้อได้ (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 9 *in situ* hybridization ในกล้ามเนื้อเนื้อลายของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV โดยใช้ digoxigenin-labeled IMNV probe แสดงบริเวณที่ probe จับเห็นเป็นตะกอนสีดำ; bar = 50 ไมโครเมตร

ที่มา: Poulos, B. T.; et al. (2006). *op. cit.* p. 992.



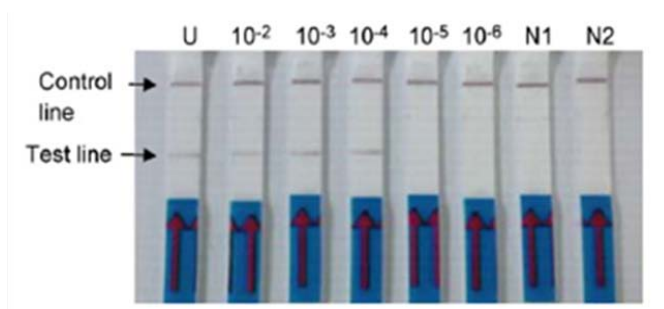
ภาพประกอบ 10 IQ2000™ IMNV Detection kit

- คอลัมน์ที่ 1: IMNV มาตรฐาน 2,000 copies/ปฏิกิริยา
- คอลัมน์ที่ 2: IMNV มาตรฐาน 200 copies/ปฏิกิริยา
- คอลัมน์ที่ 3: IMNV มาตรฐาน 20 copies/ปฏิกิริยา
- คอลัมน์ที่ 4: กลุ่มควบคุมที่เป็นลบ (yeast tRNA หรือ ddH₂O)
- คอลัมน์ที่ 5: ตัวอย่างติดเชื้อ IMNV รุนแรง
- คอลัมน์ที่ 6: ตัวอย่างติดเชื้อ IMNV ไม่รุนแรง
- คอลัมน์ที่ 7: ตัวอย่างไม่ติดเชื้อ IMNV
- คอลัมน์ M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 848, 630 และ 333 คู่เบส ตามลำดับ

ที่มา: Farming IntelliGene Tech Corp. (2006). IQ2000™ IMNV Instruction Manual Infectious Myonecrosis Virus (IMNV).

การตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV โดยการทำ RT-PCR และ nested RT-PCR พบว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจพบไวรัส ได้แม้มีปริมาณน้อย แต่ไม่สามารถตรวจหาปริมาณของการติดเชื้อ IMNV เริ่มต้นได้ ดังนั้นในปี ค.ศ. 2007 จึงได้พัฒนาวิธีการ real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) โดยใช้ TaqMan probe (Andrade; et al. 2007: 9-15) ในการตรวจและหาปริมาณไวรัสในกุ้ง จากการทดลองพบว่าวิธี real-time RT-PCR สามารถตรวจเชื้อ IMNV ได้ 10 copies number/ไมโครลิตร ในขณะที่วิธี nested RT-PCR จะไม่สามารถตรวจเชื้อในระดับที่ต่ำกว่า 1,000 copies number/ไมโครลิตร เมื่อทดสอบกับไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น YHV, TSV, IHNV, WSSV หรือ necrotizing hepatopancreatic bacterium (NHPB) พบว่าให้ผลเป็นลบ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธี real-time RT-PCR มีความไวสูง รวดเร็ว และสามารถตรวจหาปริมาณของเชื้อ IMNV ได้ในระดับที่ต่ำมาก แต่ถึงอย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเป็นวิธีที่มีต้นทุนสูงในการตรวจวิเคราะห์และจำเป็ นที่ต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญจึงไม่เหมาะสมต่อการตรวจการติดเชื้อในภาคสนามโดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง

ในปี ค.ศ. 2009 ได้มีการพัฒนาการตรวจการติดเชื้อ IMNV โดยการทำ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้อยู่แบบจากบริเวณ ยีน RdRp และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี chromatographic lateral flow dipstick (LFD) (Puthawibool; et al. 2009: 27-31) (ภาพประกอบ 11) จากการทดลองพบว่าสามารถตรวจการติดเชื้อได้ เทียบเท่ากับวิธี nested RT-PCR และใช้เวลาน้อยกว่าในการทราบผล อีกทั้งอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาไม่สูงนัก แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ ด้วยวิธีนี้ก็ยังจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญเช่นกัน จึงไม่เหมาะสมต่อการตรวจโดยเกษตรกร

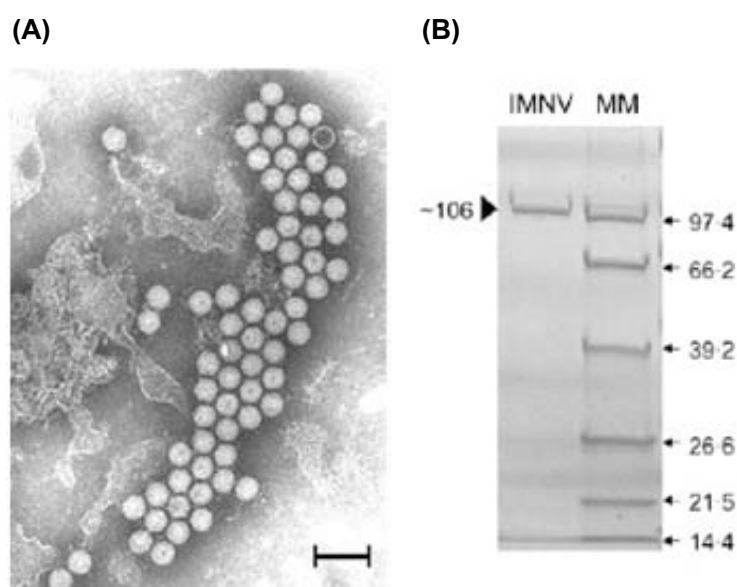


ภาพประกอบ 11 ความไวในการตรวจเชื้อ IMNV โดยวิธี RT-LAMP-LFD (U); สารสกัด RNA จากกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV เข้มข้น 100 นาโนกรัม และทำการเจือจางที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-6} , (N1); สารสกัด RNA จากกุ้งปกติ เข้มข้น 100 นาโนกรัม, (N2); กลุ่มควบคุมที่เป็นลบ

ที่มา: Puthawibool, T.; et al. (2009). Detection of Shrimp Infectious Myonecrosis Virus by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral Flow Dipstick. *Journal of Virological Methods*. (156): 30.

จีโนมของ IMNV

ในปี ค.ศ. 2005 ได้มีการศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัส IMNV ด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) พบว่ามีลักษณะอนุภาคเป็น icosahedral ไม่พบ envelope เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 12A) มีความหนาแน่น (buoyant density) เท่ากับ 1.366 กรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) เมื่อนำไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์โปรตีนของอนุภาคไวรัสด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 106 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 12B) (Poulos; et al. 2006: 987-996)



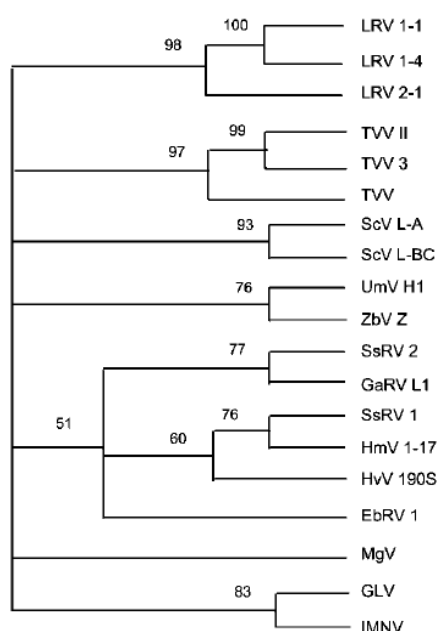
ภาพประกอบ 12 ลักษณะและองค์ประกอบของ IMNV (A); มีอนุภาคเป็น icosahedral ไม่พบ envelope เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร, (B); เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า capsid protein ของ IMNV มีน้ำหนักโมเลกุล 106 กิโลดาลตัน; bar = 100 นาโนเมตร

ที่มา: Poulos, B. T.; et al. (2006). *op. cit.* pp. 990-992.

IMNV มีสารพันธุกรรมเป็น อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA; dsRNA) ขนาด 7,560 คู่เบส ประกอบด้วย 2 open reading frames (ORFs) ที่ไม่ซ้อนทับกันคือ ORF1 อยู่ทางด้านปลาย 5' ที่เบสตำแหน่ง 136-4,953 ซึ่งคาดว่าเป็นรหัสสำหรับการแสดงออกของ RNA-binding protein และ capsid protein โดย RNA-binding protein จะอยู่ทางครึ่งแรกของ ORF1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 หน่วย ส่วนครึ่งหลังของ ORF1 เริ่มที่เบสตำแหน่ง 2,227-4,953 เป็นรหัสสำหรับการแสดงออกของ capsid protein จำนวนกรดอะมิโน 901 หน่วย ส่วน ORF2 อยู่ทางด้านปลาย 3' ที่

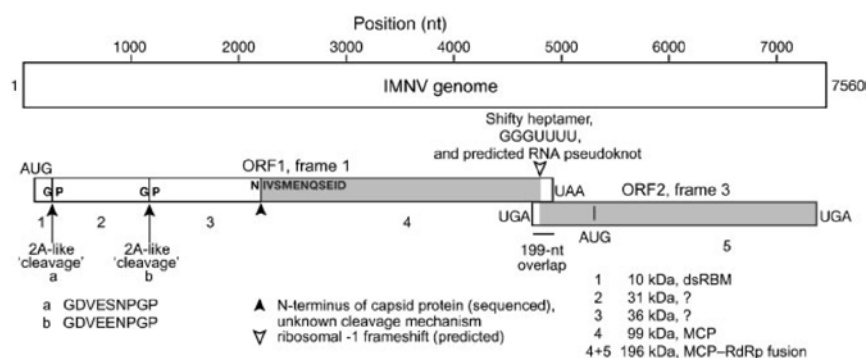
เบสตำแหน่ง 5,241-7,451 ซึ่งคาดว่าเป็นรหัสสำหรับ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ประกอบด้วยบริเวณอนุรักษ์ทั้ง 8 บริเวณ (motif) เมื่อนำยีน RdRp มาศึกษาโดยวิธี Phylogenetic analysis พบว่า IMNV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Giardia lamblia virus* (GLV) (ภาพประกอบ 13) ในแฟมิลี Totiviridae จากการศึกษำข้างต้น IMNV จึงอาจจัดอยู่ใน family Totiviridae และอาจเป็น dsRNA ไวรัสชนิดใหม่ที่ก่อโรคใน invertebrate hosts (Poulos; et al. 2006: 987-996)

แต่พบว่าภายในแฟมิลี Totiviridae โดยส่วนใหญ่มักจะเป็นไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในราและโปรโตซัว ในขณะที่ IMNV มีรายงานการติดเชื้อในกุ้งขาว ทำให้ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 มีการศึกษาถึงความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการระหว่าง IMNV และ GLV ภายในแฟมิลี Totiviridae โดยศึกษาจีโนมของ IMNV พบความแตกต่างจากครั้งก่อนกล่าวโดยสรุปคือ (1) พบบริเวณตัดจำเพาะของ polyprotein (2A-like) สองตำแหน่งอยู่บน ORF1 (2) พบการซ้อนทับกัน 199 นิวคลีโอไทด์ บริเวณด้านปลาย ORF1 frame1 และส่วนต้นของ ORF2 frame 3 (3) พบตำแหน่งที่เกิด “shifty heptamer” และ RNA pseudo knot บริเวณที่เกิดการซ้อนทับกันของ ORF1 และ ORF2 (ภาพประกอบ 14) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า IMNV มีแนวโน้มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้กับ GLV นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกันกับ *Saccharomyces cerevisiae virus* L-A ภายในแฟมิลี Totiviridae อีกด้วย (Nibert. 2007: 1315-1318)



ภาพประกอบ 13 Phylogenetic analysis โดยใช้ยีน RdRp พบว่า IMNV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Giardia lamblia virus* ในแฟมิลี Totiviridae

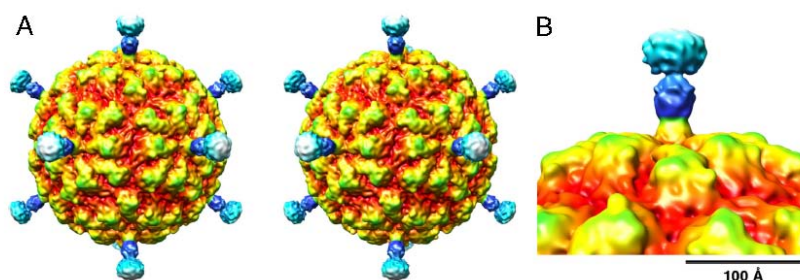
ที่มา: *Ibid.* p. 994.



ภาพประกอบ 14 จีโนมของ IMNV

ที่มา: Nibert, M. L. (2007). '2A-like' and 'Shifty Heptamer' Motifs in Penaeid Shrimp Infectious Myonecrosis Virus, a Monosegmented Double-stranded RNA Virus. *Journal of General Virology*. (88): 1317.

ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 มีรายงานการศึกษาถึงโครงสร้างแคปซิดโปรตีนของ IMNV โดยวิธี electron cryomicroscopy ร่วมกับการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของอนุภาคไวรัส พบว่า 1 แคปซิดของอนุภาค IMNV ประกอบไปด้วย 120 หน่วยย่อย (subunits) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 45 นาโนเมตร พบ fiber complexes ยื่นออกมาด้านแกน 5f (5 fold axes) (ภาพประกอบ 15) ซึ่งคาดว่าส่วนที่ยื่นออกมาเหล่านี้จะมีบทบาทในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสออกนอกเซลล์ (Tang; et al. 2008: 17526-17531)



ภาพประกอบ 15 โครงสร้าง 3 มิติของอนุภาค IMNV พบ fiber complexes ยื่นออกมาด้านแกน 5f (5 fold axes), (A); แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกในรูปแบบ 3 มิติ, (B); ภาพขยายส่วนที่ยื่นออกมาและบริเวณโดยรอบ 1 ส่วน

ที่มา: Tang, J.; et al. (2008). Infectious Myonecrosis Virus Has a Totivirus-like, 120-subunit Capsid, but with Fiber Complexes at the Fivefold Axes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (45): 17528.

แคปซิดโปรตีนของ IMNV

จากการศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของ IMNV พบว่ายีนที่เป็นรหัสสำหรับการแสดงออกแคปซิดโปรตีนของ IMNV อยู่ที่บริเวณทางด้านปลาย 3' ของ open reading frames (ORF1) ตำแหน่งที่ 2,227-4,953 มีความยาว 2,706 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดการถอดรหัสจะได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 901 หน่วย เมื่อนำไวรัสบริสุทธิ์มาหาลำดับกรดอะมิโนพบว่า มีลำดับทางด้านปลาย N เริ่มต้นที่ IVSMENQSEID (Poulos; et al. 2006: 987-996) จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของ IMNV นี้เป็นประโยชน์ในการนำลำดับดีเอ็นเอของยีนแคปซิดโปรตีนมาโคลนและแสดงออกเพื่อใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของเชื้อ IMNV เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี และพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป เนื่องจากแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด จึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมแก่การตรวจวินิจฉัยกุ่มที่ติดเชื้อ IMNV โดยใช้แอนติบอดี

นอกจากนี้การใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนสามารถผลิตโปรตีนได้ ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุ่มที่ติดเชื้อ แต่เนื่องจากยีนแคปซิดโปรตีนของ IMNV มีความยาวถึง 2,706 นิวคลีโอไทด์ จึงได้ทำการแสดงออกของยีนเป็นสามส่วนโดยมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสสำหรับส่วนปลาย N (IMNV-N), ส่วนกลาง (IMNV-I) และส่วนปลาย C (IMNV-C) ซึ่งตรงกับเบสตำแหน่งที่ 2,248-3,045, 3,046-3,954 และ 3,955-4,953 ตามลำดับ โดยจะให้ผลผลิตขนาด 798, 909 และ 999 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งจะแปลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 266, 303 และ 332 หน่วย ตามลำดับ

ซึ่งการโคลนยีนแคปซิดโปรตีนของ IMNV-N จะเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ IMNV-N ด้วยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ IMNVF22 (C CAT ATG ATT GTT TCA ATG GAA AAT C) และ IMNVR819 (G GAA TTC TTG TAG TGC AGT TGC TGG) โดยเติมบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* (ขีดเส้นใต้) ตามลำดับ จากนั้นใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase โดยใช้ double stranded DNA (Genscript) เป็น template (ภาพประกอบ 16) ทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pTYB1 expression vector แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

ส่วนการโคลนยีนแคปซิดโปรตีนของ IMNV-I เพื่อเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ IMNV-I ด้วยวิธี RT-PCR โดยไพรเมอร์ IMNVF820 (CG GGA TCC GCT GCA AAA GAG GGT GCT CG) และ IMNVR1728 (G GAA TTC TTG CAT TGA ACT CCA CGA AAA C) โดยเติมบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *EcoRI* (ขีดเส้นใต้) ตามลำดับ โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย Superscript reverse transcriptase โดยใช้ไพรเมอร์ IMNVR (G GAA TTC TTA TAC TGT TGC TGT CGC TTG) และ *Escherichia coli* RNaseH โดยเอนไซม์ SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) เป็น template (ภาพประกอบ 17) จากนั้นโคลนผลผลิตของ

PCR เข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

สำหรับการโคลนยีนแคปซิดโปรตีนของ IMNV-C เพื่อเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ IMNV-C ด้วยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ IMNVF1729 (CG GGA TCC GGT AGT ATT GCA CCA GCA ATG) และ IMNVR (G GAA TTC TTA TAC TGT TGC TGT CGC TTG) โดยเติมบริเวณตัดจำเพาะของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI (ขีดเส้นใต้) ตามลำดับ แล้วใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase โดยมี double stranded DNA (Genscript) เป็น template (ภาพประกอบ 18) จากนั้นโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (สงกรานต์ สดุษฎาศักดิ์. 2551)

IMNVF22 →

```

2227 atgcatgttgaaaatggaaacattgtttcaatggaaaatcagtct 2271
      M H V E N G N I V S M E N Q S
2272 gaaattgatagtcaaactaaattcttttactgttagaagatgat 2316
      E I D S Q T K F F S L L E D D
2317 aacaaacttccaattgtagatgagctaagagtattagctgatatg 2361
      N K L P I V D E L R V L A D M
2362 acggcacaaaagaagcaacgtaaacactgctggtaatcatcttcgt 2406
      T A Q R S N V N T A G N H L R
2407 gataatgactctattagggccgacgctgttctagctaacaataca 2451
      D N D S I R A D A V L A N N T
2452 gtacgtaacaattgtcaaattccaattcctgtaacaacactaata 2496
      V R N N C Q I P I P V T T L I
2497 ccaagacaaattcgtggattgaatgggtgtacttgtaaatacagcaa 2541
      P R Q I R G L N G V L V N Q Q
2542 ttacgggttacagggaattgaaacacacattacagacagttatatt 2586
      L R L Q G I E T H I T D S Y I
2587 tcaaaagctgagccatctgactatttcgaaacaactgtctgaaatg 2631
      S K A E P S D Y S K Q L S E M
2632 gttaatgctcaaaagacatcaacttggcgagcaaacaatatcgca 2676
      V N A Q K T S T W R A N N I A
2677 tcacaggggtgggacatgtttgatactgtacagttaaatacaaac 2721
      S Q G W D M F D T V Q L N T N
2722 atatcacaaaaagatctttcaatggacactgctttgacaaagcct 2766
      I S Q K D L S M D T A L T K L
2767 atgttggtgtaccagctaacaacacaaaatctgccagcaacacaa 2811
      M L L Y Q L T T Q N L P A T Q
2812 ttaccatcaagcattttattctgcatttgattcaagaacacagcct 2856
      L P S S I Y S A F D S R T Q P
2857 actttacaggatggaatttgggtataaataatgggtgtaataata 2901
      T L Q D G I W G I N N G V N I
2902 tttggtgaacaatgcggtggattagccgcgcagtcctttccattc 2946
      F G E Q C G G L A A P V F P F
2947 agtgggggcaccggagaaattactttccatcttactttacaatct 2991
      S G G T G E I T F H L T L Q S

                                     ← IMNVR819
2992 gttccacaggaatttcaagaatcagcaattttcgtaccagcaact 3036
      V P Q E F Q E S A I F V P A T

3037 gcactacaa 3045
      A L Q

```

ภาพประกอบ 16 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน IMNV-N โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง ไพร์เมอร์ โดยเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* (CCATATG) และ *EcoRI* (GGAATTC) ที่ปลาย 5' ของไพร์เมอร์ IMNVF22 และ IMNVR819 ตามลำดับ (Genbank accession no: AY570982)

IMNVF820
→

```

3046 gctgcaaaagaggggtgctcgaacattggcaatgtatgttttaatg 3090
      A A K E G A R T L A M Y V L M
3091 tttgcagaatggccatttggtatgtatacaaaaactaaacaaaca 3135
      F A E W P F G M Y T K T K Q T
3136 acagacaatgctggtaataatcaatcagatcaaatttttcattcac 3180
      T D N A G N N Q S D Q I F I H
3181 tccgaatctactgtacatattccaggacaaaaacaaatgcatatt 3225
      S E S T V H I P G Q K Q M H I
3226 gtgctgccagaagaaagtgaacatgggtgaaccccactacaattgca 3270
      V L P R K V N M V N P T T I A
3271 gaagcaaatgcacgtgtagtaattcaaccaacatacgggtacagtg 3315
      E A N A R V V I Q P T Y G T V
3316 gcagctggggcaggtgtcgcaaattggtaatttaacgtagctgct 3360
      A A G A G V A N G N I N V A A
3361 gttggtgtggccctgccactgtaaatttgactgactatcttgta 3405
      V G V A L P T V N L T D Y L V
3406 tcctgggcaaccgatttcacacttggcgacataaaacaattgggtt 3450
      S W A T D F T L G D I K Q L V
3451 gaaagaatgaaaacaacactgccaatagtcgagacttgatggca 3495
      E R M K T T L P I S R D L M A
3496 gcacgtcaaaatgctatgtttattgagtactctatcttccacta 3540
      A R Q N A M L L S T L F P P L
3541 attcagagcaatgtggcttcagacacaaaggaagtcccaggaaca 3585
      I Q S N V A S D T K E V P G T
3586 gctggagcatacactgcatgtcttgcaaacttaggtattcctgaa 3630
      A G A Y T A C L A N L G I P E
3631 acactaacagtttaactggggagtagatataaatgttcagccattg 3675
      T L T V N W G V D I N V Q P L
3676 tatcagctacttgaaacggacatcacagcccacaatcggtacgta 3720
      Y Q L L E T D I T A H N R Y V
3721 ttaaacctgttcaaaagagaagaagtggtagcaggtgcatatgaa 3765
      L N L F K R E E V V A G A Y E
3766 tttgggtggttgggacacatggccagttatatgatgggactcctt 3810
      F G W L G H M A S Y M M G L L
3811 ctaacaatgaatatatcatcagtgtttaacgttttggtattcaaca 3855
      L T M N I S S V F N V W Y S T
3856 agacgtattttcaacaaaggcgtgggacacagcatatgatagtaac 3900
      R R I S T K A W D T A Y D S N

```

IMNVR1728
←

```

3901 atccaagcatatcaggacatgcattatcaaattgttttcgtggagt 3945
      I Q A Y Q D M H Y Q M F S W S
3946 tcaatgcaa 3954
      S M Q

```

ภาพประกอบ 17 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน IMNV-I โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง ไพรเมอร์ โดยเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (CGGGATCC) และ *Eco*RI (GGAATTC) ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ IMNVF820 และ IMNVR1728 ตามลำดับ (Genbank accession no: AY570982)

IMNVF1729

3955 ggtagtattgcaccagcaatgggtggacgaaattcttcataacctt 3999
 G S I A P A M V D E I L H N L

4000 tgtggccaaatgtttgggttcagcttaccattgagacaagtctta 4044
 C G Q M F G F S L P L R Q V L

4045 tttaacgcattgccaatcactttttcatcgtttggaagttggatg 4089
 F N A L P I T F S S F G S W M

4090 ttgcctagagtttctgatgggtttccaaactgtaaggtattatgat 4134
 L P R V S D G F Q T V R Y Y D

4135 gtaggtccaccagtcattaatgcaaacgtgatggggaagtacca 4179
 V G P P V I N A K R D G E V P

4180 gtaagtatgattgacgcatggacctataaatttacagaaaaattg 4224
 V S M I D A W T Y K F T E K L

4225 caaaaagttttttgccatggccaatgccagaaggaaaggacagt 4269
 P K S F L P W P M P E G K D S

4270 acaatgggatatgatccggaagaaaccagcactaattgataat 4314
 T M G Y D P E K E P A L I D N

4315 tcaaatgagacaggcaatgtattcagaccatttatggcaagaaat 4359
 S N E T G N V F R P F M A R N

4360 ggcaacaattctaattatttgccaaccaactacacaattgacgta 4404
 G N N S N Y L P T N Y T I D V

4405 tcacagaatggatcatgatgagagttgtattaatgttgacctttt 4449
 S Q N G H D E S C I N V D L F

4450 aacaatgttgcaggagtaacactaacaattatgatggaaccgca 4494
 N N V A G V T L T N Y D G T A

4495 acaaacgcagacgtcgtaccaacaggatcatatattaagcagaga 4539
 T N A D V V P T G S Y I K Q R

4540 gcaatgcctatcaatgcaaatgcggtacgaccaactgaaacactc 4584
 A M P I N A N A V R P T E T L

4585 gacgctgctaaccatacaaaaccttttgctattgaaggaggaaga 4629
 D A A N H T K P F A I E G G R

4630 ctcgtatatttgggtggaacaattgcaaatacaaccaatgtggta 4674
 L V Y L G G T I A N T T N V V

4675 aacgcaatgcagaggaaacaaaggctttcaaaaccggcattcaag 4719
 N A M Q R K Q R L S K P A F K

4720 tgggcacatgctcagagacaacgtgtatatgacagcagtcgtcca 4764
 W A H A Q R Q R V Y D S S R P

4765 gggatggacgcaatcacaaagttgtgtgcacgaaagtcgggtttt 4809
 G M D A I T K L C A R K S G F

4810 atgaatgcccggttcacagcaatgatggcacccaagactggactc 4854
 M N A R S T A M M A P K T G L

4855 agcgtgttatagatcaagcaccaatacatctcaagacttgatc 4899
 S A V I D Q A P N T S Q D L I

IMNVR

4900 gaacagccgagtcagcaagaggttatggatatgcaagcgacagca 4944
 E Q P S Q Q E V M D M Q A T A

4945 acagtataa 4953
 T V *

ภาพประกอบ 18 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน IMNV-C โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง ไพรเมอร์ โดยเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (CGGGATCC) และ *Eco*RI (GGAATTC) ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ IMNVF1729 และ IMNVR ตามลำดับ (Genbank accession no: AY570982)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ลิมโฟไซต์ชนิด B (B cells) จำนวนมากจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและมีการพัฒนาต่อไปจนกระทั่งทำห น้ำที่ได้อย่างสมบูรณ์ B cell แต่ละเซลล์จะผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันไป แอนติบอดีผสมเหล่านี้เรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพราะแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมามีความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ต่าง ๆ ที่อยู่บนผิวของแอนติเจนได้ในเวลาเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามโมโนโคลนของเซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) ที่ผลิตได้ทั้งหมดนี้ จะมีความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนเพียงอีพิโทปเดียวเหมือนกัน (สุทธิพันธ์; และคนอื่น ๆ. 2537)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คิดค้นในช่วงกลางปี ค.ศ. 1970 (kohler; & Milstein. 1976: 511-519) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นทำได้โดยการฉีดแอนติเจน ที่สนใจเข้าไปในหนู ทำให้หนูมีการตอบสนอง ่องทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้น B cells ให้จดจำแอนติเจน จากนั้นนำ B cells จากม้ามของหนูมาผสมกับ myeloma cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด เมื่อเซลล์ 2 ชนิดเกิดการหลอมหลวมกันจะได้เซลล์ใหม่ที่เรียกว่า ไฮบริโดมา

ไฮบริโดมามีส่วนหนึ่งของเซลล์ที่มีคุณสมบัติของ myeloma cell ขณะเดียวกันอีกส่วนหนึ่งมีคุณสมบัติของเซลล์ม้าม ทำให้ไฮบริโดมาสามารถหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจนเพียงชนิดเดียวได้ซึ่งเรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี การหลอมรวม myeloma cells กับ B cells จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล ซึ่งในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกัน หลอมรวมกันเอง และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้อง หาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีทั่วไปที่ใช้ได้แก่ การใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิว คลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงใน HAT medium นี้ myeloma cell ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่าง myeloma cell กับ B cell เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จาก B cell ส่วน B cell ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT (HGPRT⁻) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้าม ส่วน myeloma cell เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน

ที่ให้กับสัตว์ทดลอง วิธีคัดเลือกที่ใช้ทั่วไปได้แก่ ELISA และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันรูปแบบต่างๆ เช่น dot blotting, Western blot, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้ว ต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป

ถึงแม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1975 และใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัย นักวิทยาศาสตร์ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในหลายๆ ด้านโดยเฉพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคและการบำบัดโรค การตรวจวินิจฉัยโรคในหลายๆ กรณีได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างได้ผล โดยทั่วไปวิธีการเหล่านี้มีความไวและมีความแม่นยำมากกว่าวิธีการที่เคยใช้มาก่อนหน้านี้ ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัย การตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่างๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้มข้นได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548.)

ในปัจจุบันได้มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสในกุ่มมากมาย อาทิ เช่น เชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), เชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), เชื้อ PmDNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89), เชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), เชื้อ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), และเชื้อแบคทีเรียเช่น *Vibrio harveyi* (Phianphak; et al. 2005: 161-168) ดังนั้นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ แคปซิดโปรตีนของ IMNV จึงคาดว่าจะสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ IMNV ในกุ่มโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาเช่น dot blotting, Western blot และ immunohistochemistry ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พลาสมิด

1.1 พลาสมิด pTYB1-IMNV-N ที่มียีนแคปซิดโปรตีนที่เป็นรหัสทางส่วนปลาย N ของ IMNV (ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ)

1.2 พลาสมิด pGEX-IMNV-I ที่มียีนแคปซิดโปรตีนที่เป็นรหัส ส่วนกลางของ IMNV (ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ)

1.3 พลาสมิด pGEX-IMNV-C ที่มียีนแคปซิดโปรตีนที่เป็น รหัสทางส่วนปลาย C ของ IMNV (สงกรานต์ สดุมชาศักดิ์. 2551)

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หนูขาว (Swiss mouse) ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

2.2 กุ้งขาว (*Litopenaeus. vannamei*) ที่ติดเชื้อ IMNV ดองในแอลกอฮอล์ จากประเทศอินโดนีเซีย (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น, Centex Shrimp, มหาวิทยาลัยมหิดล)

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 1

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์	Bio-Rad
2. ชุด mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
3. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
4. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
5. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinets)	NUAIRE

ตาราง 1 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
6. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ incubator)	NUAIRE
7. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JENWAY
8. เครื่อง rotary microtome รุ่น RM2135	LEICA
9. เครื่อง thermal cycler	Eppendorf
10. เครื่อง Speed vacuum concentrator รุ่น SC210A	Savant

4. เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ชุด High pure viral nucleic acid kit	Roche
2. ชุด SuperScript TM III One-Step RT-PCR System with Platinum [®] Taq DNA Polymerase	Invitrogen
3. ไพร์เมอร์ IMNV-13F และ IMNV-13R	ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น
4. ยาปฏิชีวนะ (ampicillin และ kanamycin)	Sigma
5. fetal bovine serum	Starrate
6. polyethylene glycol (PEG)	Sigma
7. Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma
8. hypoxanthine	Gibco
9. aminopterin	Sigma
10. nitrocellulose membrane	Sigma
11. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
12. diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
13. goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ทั้งสามส่วน (รหัสทางส่วนปลาย N (IMNV-N), ส่วนกลาง (IMNV-I) และส่วนปลาย C (IMNV-C))



การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IMNV-N, IMNV-I และ IMNV-C ให้บริสุทธิ์



ปลูกภูมิคุ้มกันให้หนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IMNV บริสุทธิ์



ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาว



ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี



คัดเลือกและทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี



ตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ความจำเพาะ ความเข้มข้นของ binding site, ความไว และ ชนิดของแอนติบอดี

1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ แคปซิด โปรตีน ของ IMNV ทั้งสามส่วน โดยเริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (สำหรับ รหัสทาง ส่วนปลาย N; pTYB1-IMNV-N), และ สายพันธุ์ BL21 (สำหรับรหัสส่วนกลาง; pGEX-IMNV-I และส่วนปลาย C; pGEX-IMNV-C) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ บ่มข้ามคืนใน shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นแบ่งแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร และมี ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้นโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำแบคทีเรียไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติม buffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

2. การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาผสมกับ 2X SDS-treatment buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pTYB1 และ pGEX-6P-1 ซึ่งผลิตโปรตีน intein และ glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 55 และ 26 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ เป็น positive control (เพื่อดูความสำเร็จในการกระตุ้นด้วย IPTG) และแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิดเป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IMNV ในแต่ละส่วนเทียบกับโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pTYB1 (intein) และ pGEX-6P-1 (GST)

3. การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ให้บริสุทธิ์

การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาแยกโดยใช้ 12% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 แล้วแช่เจลในสารละลาย 0.3 M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที ตัดแถบที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนนำไปแช่ในสารละลาย 1% SDS ข้ามคืน

เก็บสารละลายและเจลที่ได้ใส่ในถุง dialysis ดึงโปรตีนออกจากเจลโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ ประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นแยกสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis อีกครั้งนำไปแช่ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส คำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธี Bradford (Bradford. 1976: 248-254) โดยส่วนหนึ่งนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี (วารุณี หะยิมะสาและ. 2552: 23-24)

4. การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาวด้วยวิธี RT-PCR โดยนำตัวอย่างขาววายน้ำจากกุ้งที่สกัด nucleic acid โดยใช้ชุด High pure viral nucleic acid kit จาก Roche Molecular Biochemical มาทำการสังเคราะห์ cDNA และการเพิ่มจำนวนยีน RdRp ของ IMNV โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase และ Taq DNA polymerase ตามลำดับ โดยผสมสารต่างๆ (ตาราง 3) ใส่ลงในหลอด thin wall ขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนของ IMNV (ตาราง 4) (Senapin; et al. 2007: 32-38)

Primer ที่ใช้มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer (F13) : 5'-TTTATACACCGCAAGAATTGGCCAA -3'

Reverse primer (R13) : 5'-AGATTTGGGAGATTGGGTCGTATCC-3'

ตาราง 3 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA ที่สกัดจากกุ้งขาว	1.0
RT/ Platinum [®] Taq Mix	0.5
2X Reaction Mix (ประกอบไปด้วย 0.4 mM dNTP, 2.4 mM MgSO ₄)	12.5
IMNV-13F primer (10 µM)	1.0
IMNV-13R primer (10 µM)	1.0
Deionized Water	9.0
ปริมาตรสุทธิ	25.0

ตาราง 4 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีน RdRp ของ IMNV โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase และ Taq DNA polymerase ด้วยวิธี RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)	
1. cDNA synthesis	50	30.00	ทำซ้ำขั้นตอนที่ (3)-(5) เป็นจำนวน 29 รอบ
2. pre-denaturation	94	2.00	
3. denaturation	94	00.40	
4. annealing	45	00.40	
5. extension	72	00.40	
6. final extension	72	5.00	

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gels ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิตของ PCR มีขนาด 600 คู่เบส โดยกึ่งขาวที่ติดเชื้อ IMNV ที่ได้จากผลในข้อนี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ IMNV ต่อไป

5. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ IMNV

5.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ที่ได้จากข้อ 3 ทั้งสามส่วนคือส่วนปลาย N (IMNV-N-intein น้ำหนักโมเลกุล 84 กิโลดาลตัน), ส่วนกลาง (GST-IMNV-I น้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน) และส่วนปลาย C (GST-IMNV-C น้ำหนักโมเลกุล 62 กิโลดาลตัน) มาผสมในอัตราส่วน 1:1 กับ complete Freund's adjuvant จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว จำนวน 4 ตัวๆ ละ 100 ไมโครลิตร (0.05 มิลลิกรัมของโปรตีน) และอีก 3 ครั้ง ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1 สัปดาห์เก็บซีรัมจากหนูแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV โดยวิธี Western blot และต่อเชื้อ IMNV โดยวิธี immunohistochemistry เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ IMNV

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี ค.ศ. 1979 (Mosmann; Bauman; & Williamson. 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรั่มกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยฆ่าหนูผ่าตัดม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ 40% polyethylene glycol (PEG) หลังจากนั้นนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ (selective medium - HAT medium) ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal bovine serum ใน RPMI medium และมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 เพลต บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่ำ ๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมาไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV โดยวิธี dot blotting, Western blot และ immunohistochemistry (วารุณี หะยิมะสาและ. 2552: 25)

5.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

จากการผลิตไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 wells microculture plate ซึ่งมีจำนวน 20 เพลต ทำให้คาดว่าจะจะได้ไฮบริโดมาจำนวนมากจึงต้องคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อน จากนั้นจึงนำโคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting มาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blot และวิธี immunohistochemistry ต่อไป (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้พลาสมิด pTYB1 และ pGEX-6P-1 expression vector ในการผลิตโปรตีนทำให้ได้โปรตีนลูกผสมของ intein และ GST จาก vector กับโปรตีนที่ต้องการ ตามลำดับ ดังนั้นในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting จึงต้องหยด lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* โดยแยกออกเป็นสองส่วนคือ (1) lysate ของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV โดยนำมาผสมกันทั้งสามส่วน (lysate ส่วนปลาย N, ส่วนกลาง I และส่วนปลาย C), (2) lysate ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pTYB1 (intein) ผสมกับ pGEX-6P-1 (GST) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อโปรตีนของ IMNV เท่านั้น จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotting นำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotting = 1% non fat dry milk, 0.1% Triton X-100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-

HRP) เจือจาง 1:1,500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และปมในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.030% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.050% cobalt chloride ($CoCl_2$) ละลายใน PBS (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IMNV แต่ไม่จำเพาะต่อ intein และ GST นำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี dot blotting, Western blot และ immunohistochemistry ต่อไป

5.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี dot blotting, Western blot และ immunohistochemistry

5.3.2.1 วิธี dot blotting

การคัดเลือกในขั้นตอนนี้จะทำคล้ายคลึงกับในขั้นตอนที่ 1 จะแตกต่างโดยในการหยด lysate ของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV จะทำการหยดแยกกันในแต่ละส่วนคือ lysate ส่วนปลาย N, ส่วนกลาง I, ส่วนปลาย C และหยดสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV ตามธรรมชาติเพิ่มเติม นำไปปมกับน้ำเลี้ยงเซลล์และสารละลาย substrate เช่นเดียวกับวิธี dot blotting ในการคัดเลือกขั้นที่ 1 คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ IMNV ในส่วนที่แตกต่างกันและจำเพาะต่อกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV ตามธรรมชาติได้

5.3.2.2 วิธี SDS-PAGE และ Western blot

นำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิด pTYB1-IMNV-N, pGEX-IMNV-I และ pGEX-IMNV-C มาแยกบน 12% SDS-PAGE ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของเจลมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกปมในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:8 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

5.3.2.3 วิธี immunohistochemistry

นำส่วนหัวกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV และส่วนหัวกุ้งปกติแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้งเพื่อกำจัด fixative ออก นำมาผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก และไซลีน (xylene) แล้วนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมครอน ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ นำน้ำกลับเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) โดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene (deparaffination) จากนั้นผ่านลง butanol และแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากความเข้มข้นมากไป

น้อย ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่น และ PBS จากนั้น block ด้วย P_1^+ (calf bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 ใน P_1^+ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.030% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วยสี haematoxylin และ eosin Y (H & E) ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก และ butanol ทำให้ใสใน xylene แล้วทำเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแคปซิด โปรตีนของ IMNV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ชั้น จะนำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar. 1985: 1-42) จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวน และเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไปและทำการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

6. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากโคลนซ้ำไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบ ความจำเพาะด้วย วิธี dot blotting และ วิธี immunohistochemistry ตรวจสอบอิพิโทป ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ IMNV ด้วยวิธี dot blotting และตรวจสอบชนิดของ heavy chain, light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA ดังต่อไปนี้

6.1 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV ด้วยวิธี dot blotting

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), PemoNPV (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371-376), PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) และ PmDNV (ชุดิมา ศรีสุข. 2551) ด้วยวิธี dot blotting โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV มาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:100 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase จากนั้น

ตรวจสอบปฏิกริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV โดยสามารถสังเกตเห็นได้

6.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อไวรัส WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาตินั้นทำเช่นเดียว กับวิธี immunohistochemistry ที่ใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV โดย ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสต่างๆ เป็น positive control คือ W29 ที่จำเพาะต่อ เชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV3-666 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), MBV5-3H ที่จำเพาะต่อเชื้อ PemoNPV (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371-376), IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) และ HPV3-3H ที่จำเพาะต่อเชื้อ PmDNV (ชุดิมา ศรีสุข. 2551) จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาบริเวณที่ติด เชื้อไวรัส ซึ่งจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายของกุ้งที่ติดเชื้อ

6.3 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึงรีคอมบีแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ในส่วนที่ต้องการตรวจสอบ ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงที่กันหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย blotto เข้มข้น 5% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:5 ในสารละลาย blotto เข้มข้น 5%) ลงในหลุมต่าง ๆ ของถาด 96 หลุม (ภาพประกอบ 19) จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% จากนั้นเติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 M pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N H_2SO_4 ลงในทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader (อภีรักษ์ ทันศิริสิทธิกุล. 2548: 24)

MAbs IMNV	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 19 การตรวจสอบอีพีโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดย ผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีนของ IMNV (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

6.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV และเชื้อ IMNV ที่ได้จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี dot blotting

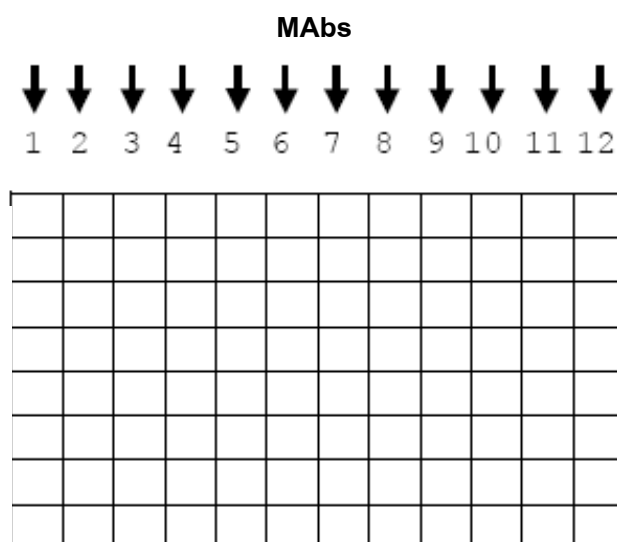
นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV และเชื้อ IMNV ที่ได้จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมาทำเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับ (1) โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน (2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีอีพีโทปต่างกันรวมกัน โดยเจือจาง 1:50 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูระดับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้

6.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ IMNV จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ

สกัดขาว่ายน้ำของกึ่งขาวที่ติดเชื้อ IMNV ด้วย 0.1% Triton X-100 ใน PBS ทำเจือจางแบบ 10 fold serial dilution ด้วยสารสกัดจาก กึ่งขาว ปกติ นำตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทดสอบด้วยวิธี dot blotting เช่นเดียวกับหัวข้อ 6.4 และวิธี RT-PCR เช่นเดียวกับหัวข้อ 4 เปรียบเทียบระดับความเจือจางสูงสุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีและวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้

6.6 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ดังนี้ เคลือบภาตหลุม 96 หลุมด้วย goat anti-mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 20)



ภาพประกอบ 20 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA ลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบซึ่งสร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 โดย 1 คอลัมน์ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 โคลน

เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H (ภาพประกอบ 21) จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม HRP-goat anti-rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ 10 นาที และผ่านกระบวนการ immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของการตรวจสอบอีพีโทป

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IgG ₁	→	A												
IgG _{2a}	→	B												
IgG _{2b}	→	C												
IgG ₃	→	D												
IgA	→	E												
IgM	→	F												
Kappa	→	G												
Lambda	→	H												

ภาพประกอบ 21 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ลูกศรแสดงการเติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา

บทที่ 4

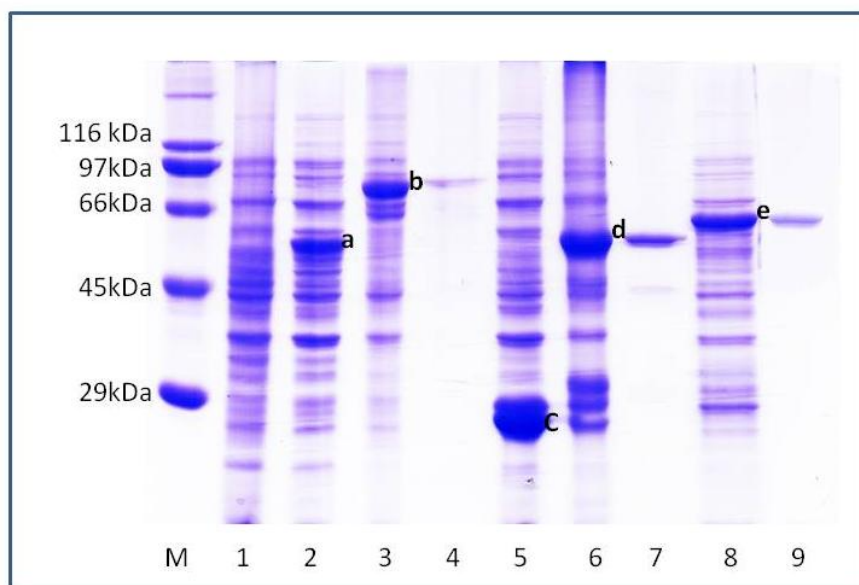
ผลการทดลอง

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV

จากการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน IMNV ทั้งสามส่วนโดยเริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1-IMNV-N และ แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-IMNV-I และ pGEX-IMNV-C ตามลำดับ โดยใช้ 1 mM IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ T7 promoter และ tac promoter ตามลำดับ เก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง และวิเคราะห์การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนโดยแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ซึ่งมีขนาดประมาณ 84, 60 และ 62 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 22 แถวที่ 3, 6 และ 8 ตามลำดับ) โดยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ของ IMNV-N ที่ได้จะมีโปรตีน intein เชื่อมอยู่ทางปลาย C (IMNV-N-intein) ส่วนรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ของ IMNV-I และ IMNV-C ที่ได้จะมีโปรตีน GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N (GST-IMNV-I และ GST-IMNV-C) โดยที่แบคทีเรีย *E. coli* ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่พบโปรตีนดังกล่าว (ภาพประกอบ 22 แถวที่ 1) ส่วนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1 จะมีการแสดงออกของโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 22 แถวที่ 2) และแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 จะมีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 22 แถวที่ 5)

การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ให้บริสุทธิ์

จากการ แยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ของ IMNV ให้บริสุทธิ์โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1-IMNV-N, pGEX-IMNV-I และ pGEX-IMNV-C แยกด้วย 12% SDS-PAGE และแช่เจลใน 0.3 M KCl จะพบแถบโปรตีนเป็นสีขาวขุ่น จากนั้นตัดแถบเจลบริเวณที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ของ IMNV ในแต่ละส่วน แยกโปรตีนออกจากเจลโดยแช่เจลใน 1% SDS ข้ามคืน ดึงโปรตีนออกจากเจลโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ประมาณ 8 ชั่วโมง และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น เมื่อทำโปรตีนให้เข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator แล้วนำมาแยก ด้วย 12% SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV-N-intein, GST-IMNV-I และ GST-IMNV-C ซึ่งมีขนาดประมาณ 84, 60 และ 62 กิโลดาลตันตามลำดับ (ภาพประกอบ 22 แถวที่ 4, 7 และ 9 ตามลำดับ)



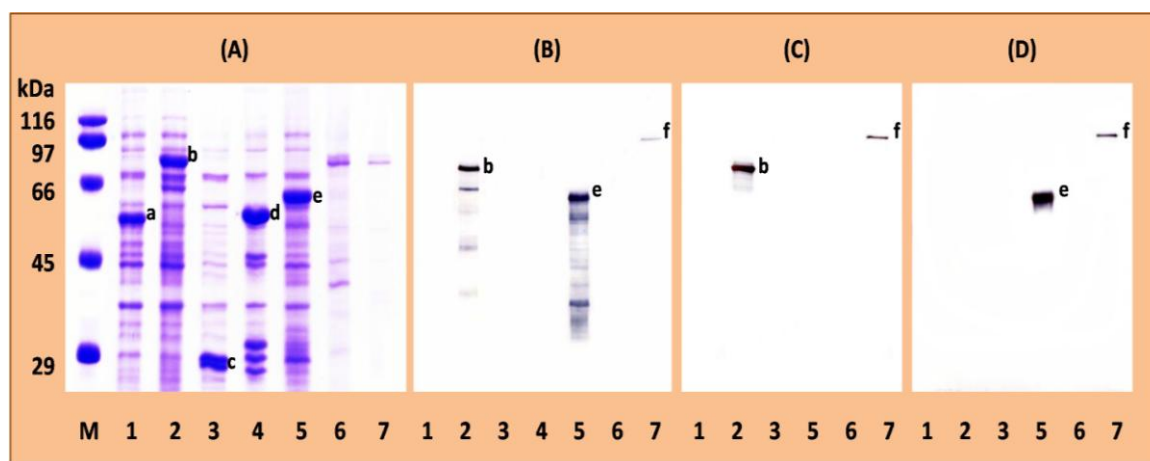
ภาพประกอบ 22 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV นำ lysate ของแบคทีเรีย และ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนบริสุทธิ์มาแยกใน 12% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

- แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด
- แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1
- แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1-IMNV-N
- แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV-N-intein ที่ทำให้บริสุทธิ์
- แถวที่ 5 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1
- แถวที่ 6 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-I
- แถวที่ 7 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-IMNV-I ที่ทำให้บริสุทธิ์
- แถวที่ 8 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-C
- แถวที่ 9 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-IMNV-C ที่ทำให้บริสุทธิ์
- M คือ โปรตีนมาตรฐาน
- a คือ โปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน
- b คือ โปรตีน IMNV-N-intein ขนาดประมาณ 84 กิโลดาลตัน
- c คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน
- d คือ โปรตีน GST-IMNV-I ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน
- e คือ โปรตีน GST-IMNV-C ขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV

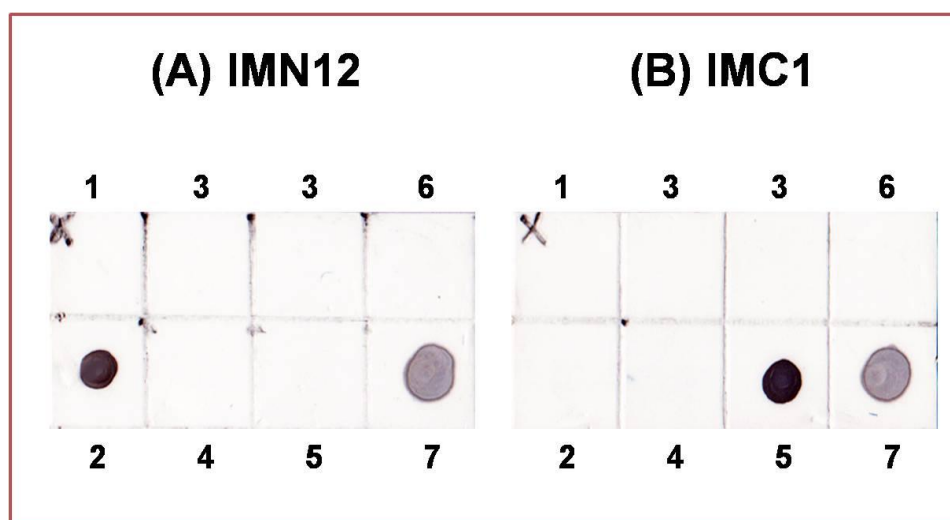
จากการนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ของ IMNV ทั้งสามส่วน (IMNV-N-intein, GST-IMNV-I และ GST-IMNV-C) ที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยโปรตีนที่ได้ในแต่ละส่วนมีความเข้มข้น ประมาณ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว โดยฉีดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ของ IMNV ที่ทำให้บริสุทธิ์ทั้งสามส่วนในอัตราส่วนที่เท่ากันปริมาณส่วนละ 10 ไมโครกรัม/ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อ IMNV-N-intein และ GST-IMNV-C ได้ทุกตัวในระดับที่แตกต่างกัน แต่ไม่ตอบสนองต่อ GST-IMNV-I โดยได้เลือกหนูตัวที่สามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน และกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 23B) และต่อเชื้อ IMNV จากวิธี immunohistochemistry ที่ดีที่สุดมาฉีดด้วย รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ทั้งสามส่วนผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากการผลิตและทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IMNV โดยวิธี dot blotting และ Western blotting พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IMNV ได้จำนวน 13 โคลน (ตาราง 5) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ 1) จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีน IMNV-N จำนวน 8 โคลน ดังนี้คือ IMN1, IMN3, MN4, IMN6, IMN7, IMN10, IMN12, IMN13 2) จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีน IMNV-C จำนวน 5 โคลน ดังนี้คือ IMC1, IMC4, IMC6, IMC8, IMC10 โดยทั้งสองกลุ่มสามารถจับกับ กึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ขนาด 106 กิโลดาลตัน ได้ด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 23C และ 23D ตามลำดับ) และ dot blotting (ภาพประกอบ 24)

สำหรับการตรวจเชื้อ IMNV ในกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มสามารถจับกับเชื้อ IMNV บริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อลาย หัวใจ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบ ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ (ภาพประกอบ 25) โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อกึ่งปกติ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN12 สามารถจับกับเชื้อ IMNV ได้ชัดเจนที่สุด โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN1, IMN3, IMN4, IMN6, IMN7, IMN10, IMN13 และ IMC1 สามารถจับได้ต่ำกว่าเล็กน้อย ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี IMC4, IMC6, IMC8, IMC10 สามารถจับกับเชื้อ IMNV ได้ต่ำกว่า IMC1 (ตาราง 5)



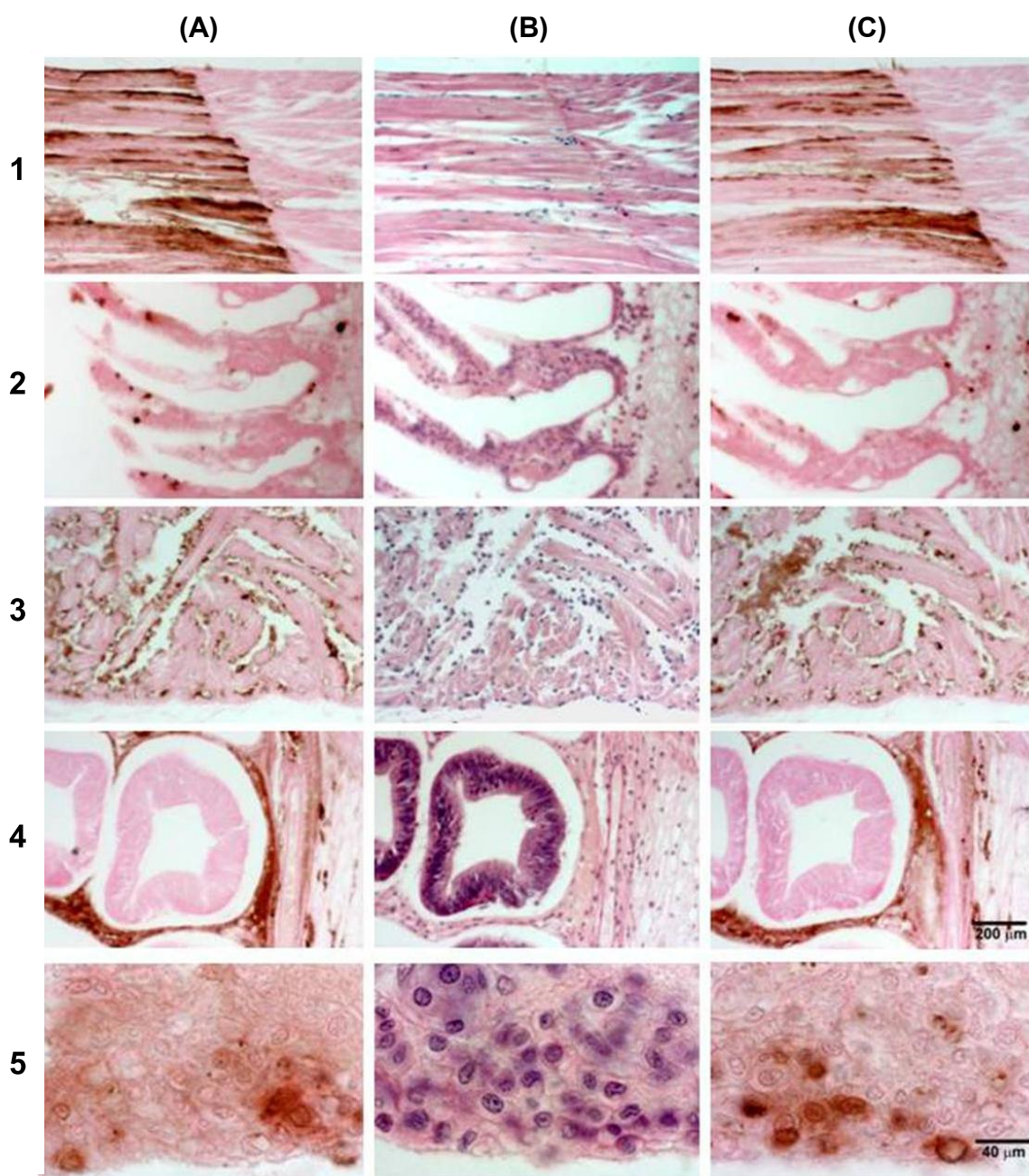
ภาพประกอบ 23 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Western blotting โดยแยกโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 (A) เจลอีกส่วนนำมาทำ Western blotting (B-D) โดยทดสอบกับโพลี-โคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับแอนติบอดีที่เจือปนก่อน (preabsorption) ด้วย lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1 และ แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน intein และ GST ขนาด 55 และ 26 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (B) และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN12 (C), IMC1 (D)

- แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1
- แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1-IMNV-N
- แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1
- แถวที่ 4 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-I
- แถวที่ 5 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-C
- แถวที่ 6 สารสกัดจากขำวายน้ำของกุ้งปกติ
- แถวที่ 7 สารสกัดจากขำวายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ IMNV ตามธรรมชาติ
- M คือ โปรตีนมาตรฐาน
- a คือ โปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน
- b คือ โปรตีน IMNV-N-intein ขนาดประมาณ 84 กิโลดาลตัน
- c คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน
- d คือ โปรตีน GST-IMNV-I ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน
- e คือ โปรตีน GST-IMNV-C ขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน
- f คือ แคปซิดโปรตีนของ IMNV ขนาดประมาณ 106 กิโลดาลตัน



ภาพประกอบ 24 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด และทดสอบด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) IMN12 และ (B) IMC1 ต่อเชื้อ IMNV ด้วยวิธี dot blotting สารที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

- (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1
- (2) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1-IMNV-N
- (3) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1
- (4) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-I
- (5) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-C
- (6) สารสกัดจากขาวายน้ำของกึ่งปกติ
- (7) สารสกัดจากขาวายน้ำของกึ่งขาวที่ติดเชื้อ IMNV ตามธรรมชาติ



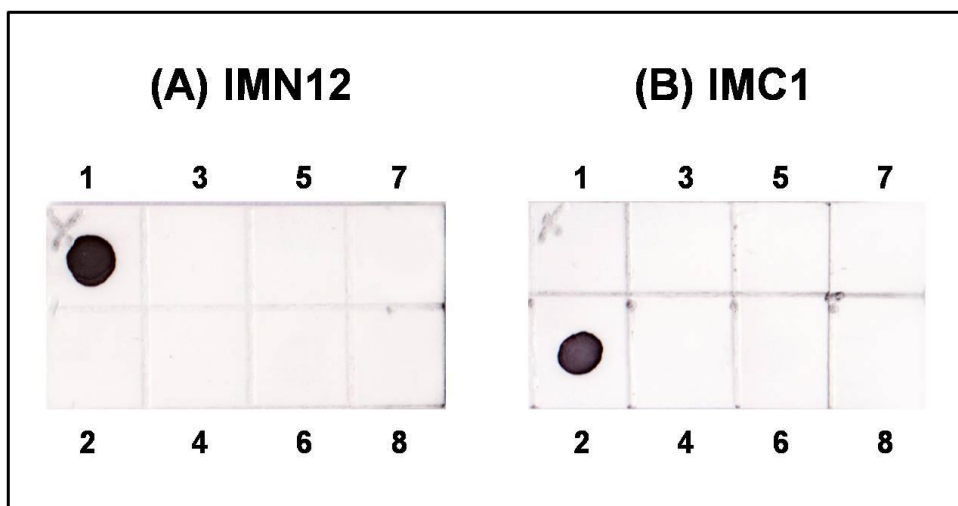
ภาพประกอบ 25 การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของกุ้งขาวที่ติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN12 (A) และ IMC1 (C) บริเวณ เซลล์กล้ามเนื้อลาย (1), เหงือก (2), หัวใจ (3), เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) (4) และอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) (5) พบ immunoreactivity บริเวณ ไซโทพลาสซึมของเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเห็นติดเป็นสีน้ำตาล, (B) ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin

การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบ ความจำเพาะด้วย วิธี dot blotting และวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้ไม่มี ปฏิกริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) และ PmDNV (ชุตติมา ศรีสุข. 2551) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 26) และไม่มีปฏิกริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเชื้อ WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเมื่อทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry (ภาพประกอบ 27)

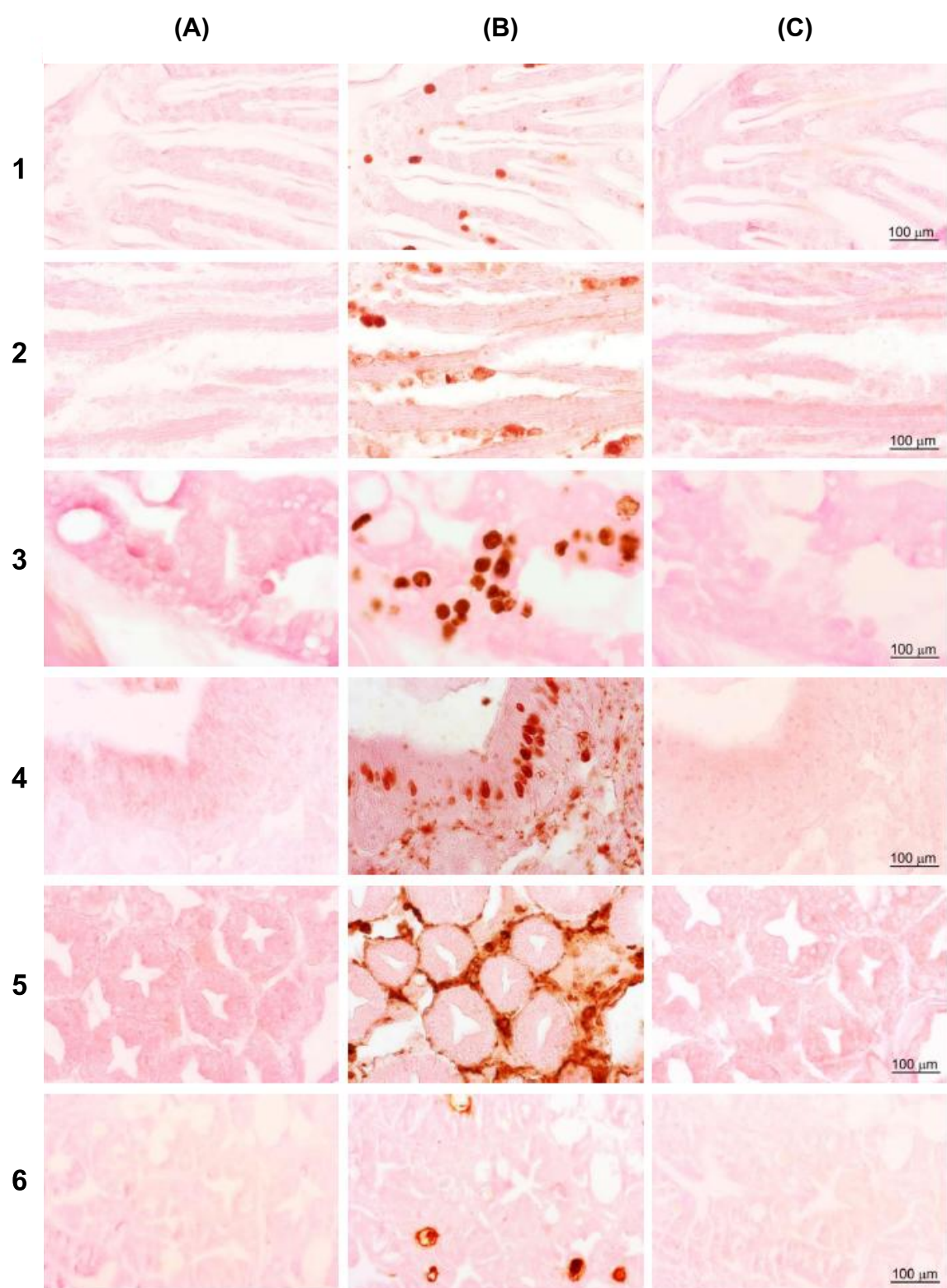
เมื่อตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV ในแต่ละส่วนที่ต้องการทดสอบแต่ละโคลนมาผสมรวมกัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV-N จำนวน 8 โคลน ได้แก่ IMN1, IMN3, IMN4, IMN6, IMN10, IMN12 และ IMN13 จับอีพิโทปที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน โดย IMN12 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในขณะที่ IMN7 จับอีพิโทปต่างจากโคลนอื่นๆ เนื่องจาก ผลรวม โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN7 กับโคลนอื่นๆ มีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปฏิกริยาระหว่างแอนติเจน กับแอนติบอดีชนิดเดียว (ภาพประกอบ 28) ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV-C จำนวน 5 โคลน ทุกโคลน มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวกัน เนื่องจาก มีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปฏิกริยาระหว่างแอนติเจน กับแอนติบอดี ชนิดเดียว โดย IMC1 ให้ค่าการดูดกลืนแสง สูงสุด (ภาพประกอบ 29)

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 13 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa (K) (ตาราง 5)



ภาพประกอบ 26 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของไวรัสต่างๆ (1) WSSV, (2) TSV, (3) PemoNPV, (4) PstDNV, (5) YHV และ (6) PmDNV โดยหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีน ต่าง ๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังรายการข้างล่างและทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) IMN12, (B) IMC1

- (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IMNV-N-intein
- (2) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน GST-IMNV-C
- (3) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือก (envelope) ของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363)
- (4) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP3 ซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78)
- (5) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน polyhedrin (OBC) ของ PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267)
- (6) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132)
- (7) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน gp116N ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8)
- (8) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ PmDNV (ชุตินา ศรีสุข. 2551)



ภาพประกอบ 27 การทดสอบ ปฏิกริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ตามธรรมชาติ ได้แก่ (1) เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, (2) หัวใจกุ้งที่ติดเชื้อ TSV, (3) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ PemoNPV, (4) epithelial cells ที่ติดเชื้อ PstDNV, (5) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ YHV และ (6) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ PmDNV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (A) IMN12, (C) IMC1 หรือ (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสต่าง ๆ (1B) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), (2B) TSV3-666 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), (3B) MBV5-3H ที่จำเพาะต่อเชื้อ PemoNPV (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371-376), (4B) IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), (5B) Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) และ (6B) HPV3-3H ที่จำเพาะต่อเชื้อ PmDNV (ชุตติมา ศรีสุข. 2551)

MAbs IMNV-N	IMN1	IMN3	IMN4	IMN6	IMN7	IMN10	IMN12	IMN13
IMN1	0.646 ¹	0.581	0.620	0.598	2.007	0.699	2.095	0.662
IMN3		0.578 ¹	0.581	0.485	1.964	0.739	2.114	0.630
IMN4			0.585 ¹	0.477	2.009	0.775	2.155	0.600
IMN6				0.336 ¹	1.993	0.748	2.169	0.484
IMN7					1.836 ²	1.882	2.321	1.897
IMN10						0.795 ¹	2.136	0.777
IMN12							2.116 ¹	2.073
IMN13								0.617 ¹

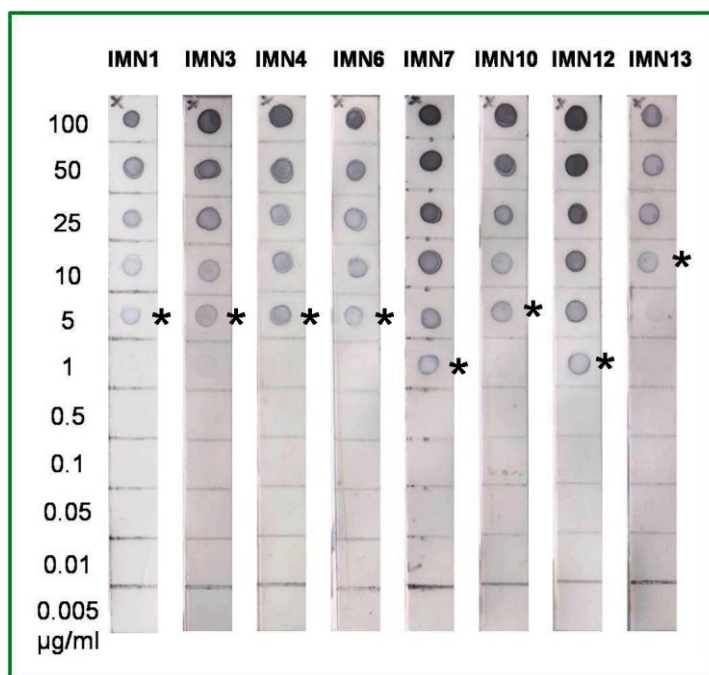
ภาพประกอบ 28 ผลการรวม โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ IMNV- N-intein แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนของ IMNV-N (ตัวเลขที่เหมือนกันหรือต่างกันเหนือค่า OD คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ที่จับกับอีพิโทปคาบเกี่ยวกันหรืออีพิโทปต่างกัน ตามลำดับ)

MAbs IMNV-C	IMC1	IMC4	IMC6	IMC8	IMC10
IMC1	0.338 ¹	0.184	0.214	0.224	0.208
IMC4		0.143 ¹	0.145	0.137	0.184
IMC6			0.160 ¹	0.127	0.176
IMC8				0.090 ¹	0.153
IMC10					0.164 ¹

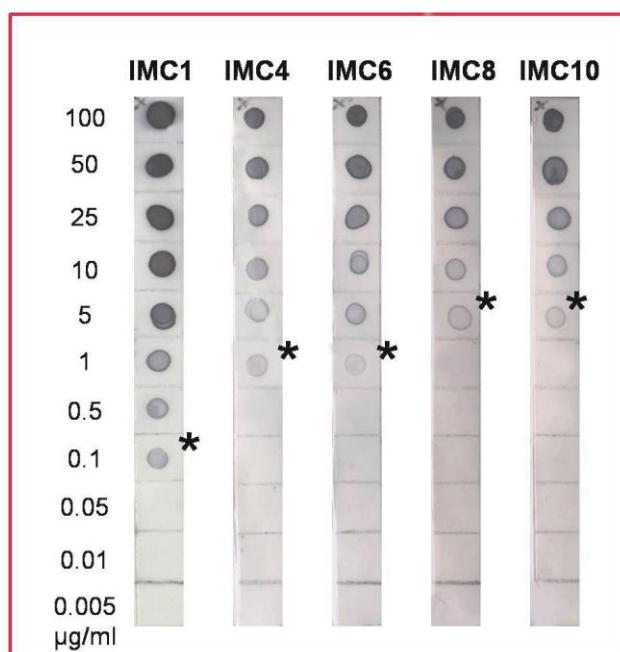
ภาพประกอบ 29 ผลการรวม โมโนโคลนอลแอนติบอดี จำเพาะต่อ GST-IMNV-C แสดง ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนของ IMNV-C (ตัวเลขที่เหมือนกันหรือต่างกันเหนือค่า OD คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ที่จับกับอีพีโทปคาบเกี่ยวกันหรืออีพีโทปต่างกัน ตามลำดับ)

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV โดยวิธี dot blotting พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อ IMNV-N (IMN7 และ IMN12) สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไว สูงสุดประมาณ 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (12 เฟมโตโมล/จุด) (ภาพประกอบ 30) ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV-C (IMC1) สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไว สูงสุดประมาณ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (1.5 เฟมโตโมล/จุด) (ภาพประกอบ 31)

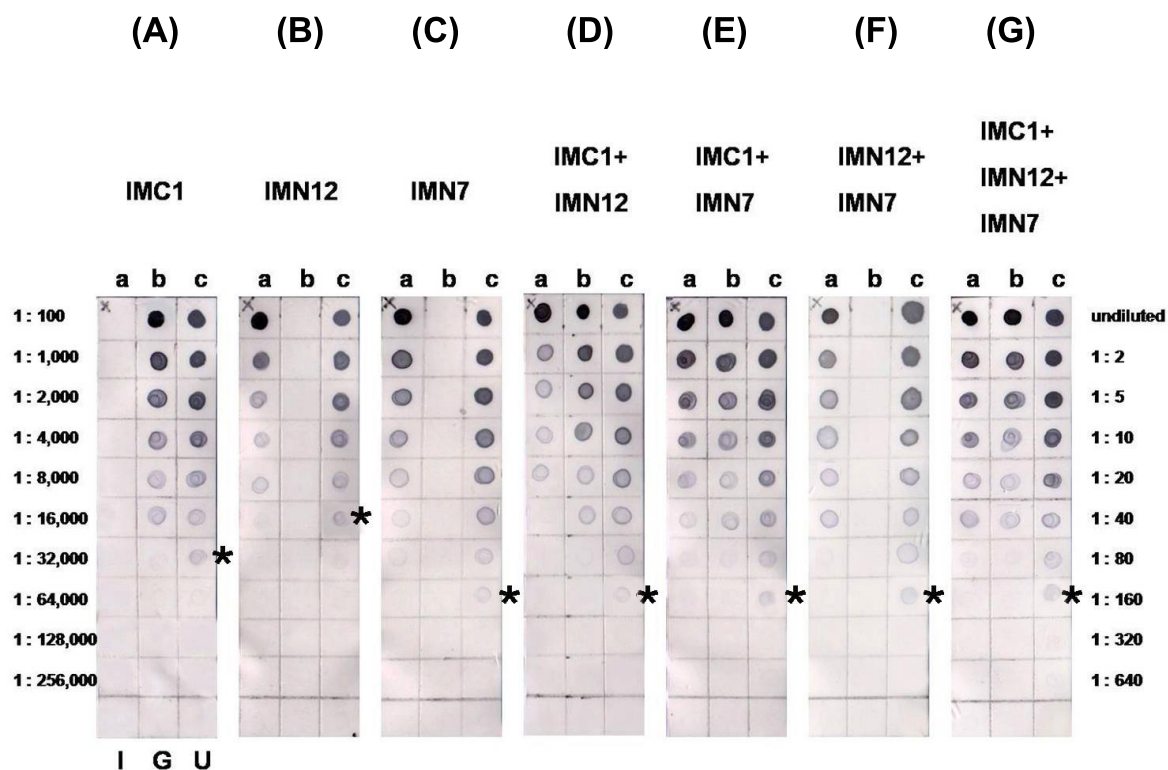
จึงได้เลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออีพีโทปต่างกัน และมีความไวสูงสุดคือ IMC1, IMN12 และ IMN7 มาทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ IMNV จากกุ่มที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยบ่มกับ (1) โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน (2) โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีอีพีโทปต่างกัน ร่วมกัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี IMC1, IMN12 และ IMN7 สามารถตรวจหาเชื้อ IMNV จากกุ่มขาวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:80, 1:40 และ 1:160 ตามลำดับ โดยที่เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMC1 ร่วมกับ IMN12 จะทำให้มีความไวเพิ่มมากขึ้น โดยสามารถตรวจหาเชื้อ IMNV จากกุ่มขาวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:160 ได้ชัดเจนขึ้น (ภาพประกอบ 32) ในขณะที่นำตัวอย่างนี้ไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยตรงสามารถตรวจหาเชื้อ IMNV จากกุ่มขาวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:1,000 ได้ (ภาพประกอบ 33) ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 ชนิดผสมกันในวิธี dot blotting มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 10 เท่า



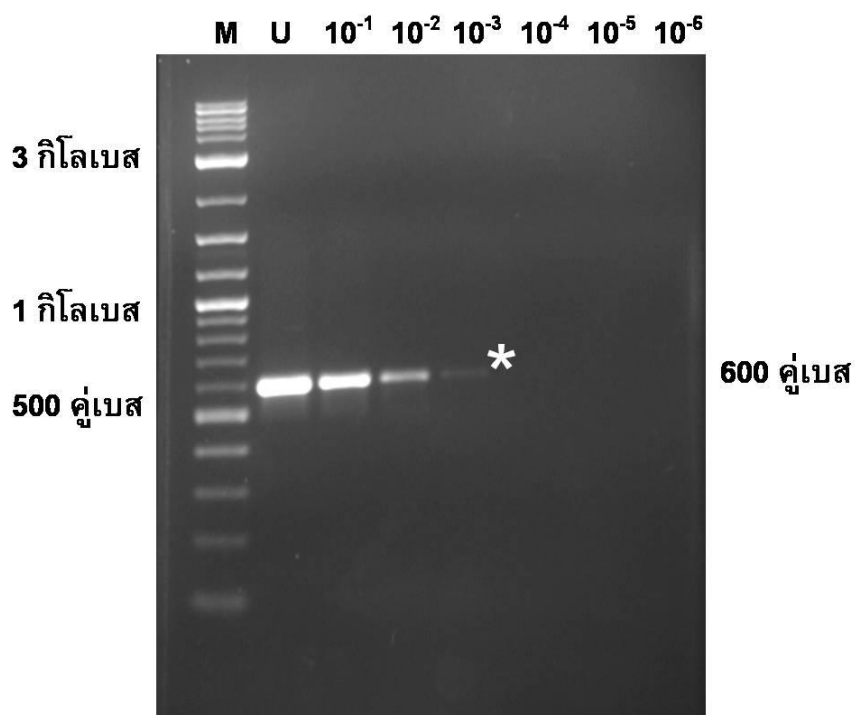
ภาพประกอบ 30 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ IMNV-N ด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โปรตีน IMNV-N-intein ที่ความเข้มข้น 100 ถึง 0.005 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (* แสดงความไวสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้)



ภาพประกอบ 31 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ IMNV-C ด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โปรตีน GST-IMNV-C ที่ความเข้มข้น 100 ถึง 0.005 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (* แสดงความไวสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้)



ภาพประกอบ 32 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาลู่วิธี IMNV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออีพิโทปแตกต่างกัน ดังแสดงในการจับกับ (a) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1-IMNV-N, (b) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-IMNV-C ซึ่งเจือจาง 1:100 ถึง 1:256,000 และ (c) เชื้อ IMNV ที่สกัดได้จากขาวายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ด้วยวิธี dot blotting ซึ่งเจือจาง 1:2 ถึง 1:640 โดยหยดแต่ละความเจือจาง 1 ไมโครลิตร/จุด (* แสดงความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้) โดยจุดสุดท้ายในคอลัมน์หยดด้วย I = lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTYB1 (intein), G = lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 (GST), U = สารสกัดจากกุ้งปกติ



ภาพประกอบ 33 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ IMNV ด้วยวิธี RT-PCR จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยทำการเจือจาง เชื้อ IMNV ที่สกัดได้จากขำวายน้ำของกึ่งขาวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ด้วยสารสกัดจากกึ่งขาวปกติ โดยผลผลิตของ PCR มีขนาด 600 คู่เบส (* แสดงความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

U คือ สารที่สกัดได้จากขำวายน้ำของกึ่งขาวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ

ตาราง 5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV ที่ผลิตได้ ซึ่งทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (IHC)

MABs (class)	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี dot blotting (เฟมโตโมล/จุด)	การตรวจหา แอนติเจนโดยวิธี Western blotting (สารสกัดจาก เนื้อเยื่อของกุ้งขาว ที่ติดเชื้อ IMNV)	IHC	ปฏิกิริยาข้าม กับ WSSV, PmDNV, TSV, PemoNPV, YHV และ pstDNV	จำเพาะต่อ รีคอมบิแนนท์ แคปซิด โปรตีน
IMN7 (IgG ₁)	12	+++	++	-	IMNV-N
IMN12 (IgG _{2a})	12	+++	+++	-	IMNV-N
IMN1, IMN3, IMN4, IMN6 IMN10 (IgG ₁)	60	++	++	-	IMNV-N
IMN13 (IgG _{2b})	120	++	++	-	IMNV-N
IMC1 (IgG ₁)	1.5	+++	++	-	IMNV-C
IMC4 (IgG ₁)	15	+	+	-	IMNV-C
IMC6 (IgG _{2b})	15	++	+	-	IMNV-C
IMC8 (IgG _{2b})	80	++	+	-	IMNV-C
IMC10 (IgG ₁)	80	+	+	-	IMNV-C

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

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการกระตุ้นการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของ IMNV สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV ได้ทั้งสามส่วนคือ IMNV-N-intein, GST-IMNV-I และ GST-IMNV-C โดยพบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 84, 60 และ 62 กิโลดาลตัน ตามลำดับ พบว่าสามารถทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ โดยพบแถบของโปรตีน ที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาฉีดให้หนูขาว และทำการทดสอบความจำเพาะ ของแอนติซีรัมที่ได้ ต่อรีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีน ทั้งสามส่วน และต่อเชื้อ IMNV ในกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดย วิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry

พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อโปรตีน IMNV-N-intein และ GST-IMNV-C ได้ โดยแอนติซีรัมที่ได้นั้นสามารถจับ แถบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน และแถบ โปรตีนขนาดเล็ก จำนวนมาก ซึ่งเมื่อทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่าแถบโปรตีนขนาดเล็กจำนวนมากเกิดจากรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ที่ยังสร้างไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเห็นรูปแบบในการจับแบบเดียวกันกับแอนติซีรัม แต่หนูขาวนั้นไม่สามารถตอบสนอง ต่อ GST-IMNV-I ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากแอนติเจนในส่วนนี้มีความเป็นอิมมูโนเจนต่ำกว่าในส่วนอื่นๆ

จากนั้นจึงได้เลือกหนูที่ตอบสนอง ดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้ทั้งหมด 13 โคลนโดย แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ 1) จำเพาะต่อ IMNV-N จำนวน 8 โคลน ดังนี้คือ IMN1, IMN3, IMN4, IMN6, IMN7, IMN10, IMN12, IMN13 และ 2) จำเพาะต่อ IMNV-C จำนวน 5 โคลน ดังนี้คือ IMC1, IMC4, IMC6, IMC8, IMC10 โดยทั้งสองกลุ่มสามารถจับกับ IMNV ในกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ด้วยวิธี dot blotting และจับกับแคปซิดโปรตีนของเชื้อ IMNV ขนาด 106 กิโลดาลตัน ได้ด้วยวิธี Western blotting อีกทั้งสามารถตรวจเชื้อ IMNV โดยวิธี immunohistochemistry ได้ โดยพบการติดเชื้อ บริเวณไซโตพลาสซึม ของเซลล์กล้ามเนื้อลาย หัวใจ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบ ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อทุกชนิดหรือเชื้อ WSSV, TSV, PemoNPV, PstDNV, YHV และ PmDNV ในเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ

จากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV-N มี 2 โคลนที่จับกับอีพิโทปต่างกันและมีความไวสูงสุดใกล้เคียงกันคือ IMN7 และ IMN12 ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IMNV-C ที่ผลิตได้ทั้งหมดมีอีพิโทปเดียวกัน โดย IMC1 มีความไวสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA และวิธี dot blotting ซึ่งพบว่าคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้และมีความไวสูงสุด 3 โคลน ได้แก่ IMN7, IMN12 และ IMC1 มีความสามารถในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ได้แตกต่างกันในแต่ละ

วิธีการ โดย IMN12 สามารถจับกับอวัยวะที่ติดเชื้อมากกว่าด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ชัดเจนกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนอื่นๆ แต่เมื่อทดสอบการตรวจเชื้อ IMNV ในกึ่งที่ติดเชื้อมาตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting พบว่า IMN7 มีความไวสูงกว่า IMC1 และ IMN12 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนพบว่า IMC1 มีความไวสูงสุด

จากความสามารถในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ได้แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด จับกับแอนติเจนในรูปแบบที่แตกต่างกัน โดย IMN12 และ IMN7 สามารถจับแอนติเจนในสภาพปกติ (native form) โดย IMN12 จับกับอีพิโทปของแคปซิดโปรตีนที่มี conformation เดิมของโปรตีนภายในเนื้อเยื่อ ได้ดีที่สุด เนื่องจากในขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry จะผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเช่น การทำให้เนื้อเยื่อคงรูปด้วยฟอร์มาลิน (formalin fixed) ทำให้รักษาสภาพของโครงสร้างเดิมของไวรัส ไว้ได้ ในขณะที่ IMN7 สามารถจับกับโครงสร้างของแคปซิดโปรตีนในรูปแบบปฏิกิริยาหรือทุติยภูมิ ที่ได้จากการสกัดด้วย Triton X-100 เมื่อตรวจหาเชื้อ IMNV จากกึ่งที่ติดเชื้อมาตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting อาจทำให้โครงสร้างหลักเปลี่ยนแปลงไป และเป็นสาเหตุทำให้ IMN12 มีความไวต่ำลงเนื่องจาก conformation ของโปรตีนตามธรรมชาติแตกต่างไปจากเดิม

ในขณะที่ IMC1 จับกับแอนติเจนในรูปเสียสภาพ (denatured form) หรือจับกับโครงสร้างของแคปซิดโปรตีนในรูปแบบปฏิกิริยา ได้ดีที่สุด เนื่องจากรีคอมบิแนนท์ โปรตีนเมื่อผ่านการเตรียมโดย SDS จะทำหน้าที่ในการตัดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide-bond) ทำให้แอนติเจนเสียสภาพอยู่ในรูปปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตาม IMC1 สามารถจับกับแอนติเจนด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ด้วย อาจเป็นเพราะจับได้ดีทั้งแอนติเจนตามธรรมชาติ (natural antigen) และรีคอมบิแนนท์โปรตีนในบริเวณอีพิโทปที่ไม่ต่างกันมาก

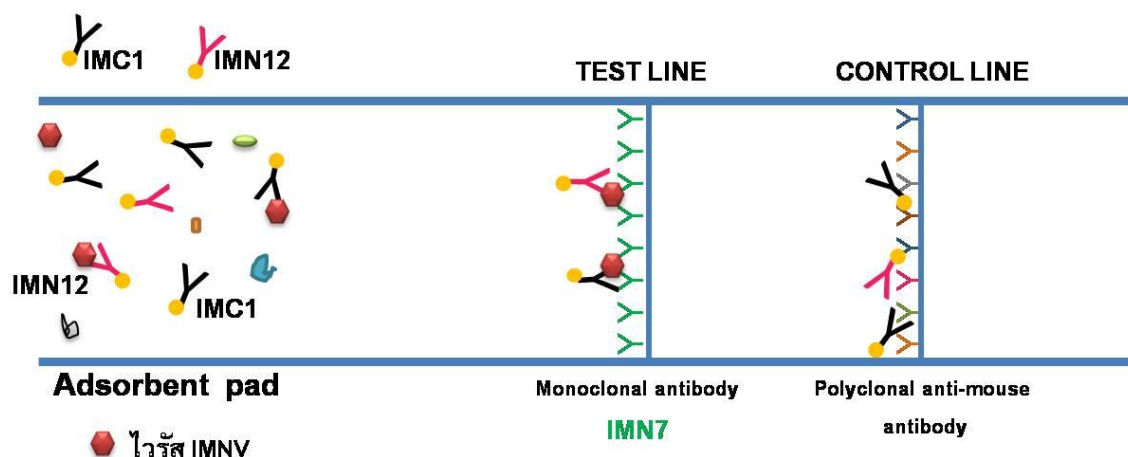
เมื่อทำการทดสอบ ความไวในการจับกับแอนติเจนโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีอีพิโทปต่างกันร่วมกันโดยเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR แม้ว่าจะไม่เห็นความแตกต่างเมื่อใช้ IMN7 ที่มีความไวสูงสุดร่วมกับ IMN12 และ IMC1 ในการตรวจหาเชื้อ IMNV ด้วยวิธี dot blotting แต่พบว่าเมื่อใช้ IMN12 ร่วมกับ IMC1 สามารถตรวจพบเชื้อ IMNV ได้โดยมีความไวเพิ่มขึ้นจากการใช้ IMN12 เพียงตัวเดียว 4 เท่า และเพิ่มขึ้นจากการใช้ IMC1 เพียงตัวเดียว 2 เท่า เนื่องจากเมื่อตัวอย่างกึ่งผ่านขั้นตอนในการสกัดทำให้ได้รูปแบบอีพิโทปที่โครงสร้างหลากหลาย โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลนนั้นจับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่ ตำแหน่งต่างกัน จึงเพิ่มความไวในการตรวจสอบได้สูงขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามความไวที่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ IMN12 หรือ IMC1 ร่วมกับ IMN7 ก็พบว่ามีความไวใกล้เคียงกับการใช้ IMN7 เพียงตัวเดียวเท่านั้น อาจเกิดจากความไวที่เพิ่มขึ้นนั้นมีปริมาณไม่สูงมากพอที่จะสังเกตเห็นได้ด้วยวิธี dot blotting ซึ่งการตรวจสอบด้วยเทคนิคอื่นๆ อาจตรวจจับความไวได้ มากกว่าเช่น การทำ ELISA เนื่องจากการขยายสัญญาณและตรวจสอบจากเครื่อง microplate reader โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีเมื่อใช้ร่วมกันนั้นมีความไวสูงสุดใน

การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งเท่ากับ 1:160 เท่า ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR มีความไว 1:1,000 เท่า จะเห็นได้ว่าวิธี RT-PCR มีความไวมากกว่าประมาณ 10 เท่า

ซึ่งการทดสอบความไวในการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR นั้น ในการเตรียมตัวอย่างกุ้งที่สกัดด้วย 0.1% Triton X-100 อาจทำให้ได้กรดนิวคลีอิกในปริมาณน้อยกว่าการใช้ชุดสกัด ทำให้ในผลการทดลองมีความไวต่ำกว่าที่ควรจะเป็น แต่ในการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี dot blotting และ RT-PCR จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่ผ่านขบวนการเตรียมด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อลดความลำเอียงที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดสอบ

จากการศึกษานี้พบว่า การใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ เชื้อ IMNV เป็นแอนติเจน เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ IMNV ส่วนต่างๆ ได้ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกุ้งปกติหรือเชื้อไวรัสกุ้งชนิดอื่นๆ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถ เลือกนำไปใช้ในการตรวจการติดเชื้อ IMNV ให้เหมาะสมกับวิธีที่ต้องการตรวจสอบ ได้เช่น ในวิธี immunohistochemistry อาจเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN12 ซึ่งมีความแรง (affinity) ในการจับกับแอนติเจนสูงสุด แทนที่วิธี *in situ* hybridization (Tang; et al. 2005: 261–265) ซึ่งสามารถให้ผลเช่นเดียวกัน

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN7 ซึ่งมีความไวสูงในการตรวจเชื้อ IMNV ด้วยวิธี dot blotting นั้นอาจสามารถนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย เช่น immunochromatographic strip test เช่นเดียวกับชุดตรวจเชื้อ WSSV (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106), *Vibrio harveyi* (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) และ YHV (Sithigorngul; et al. 2007: 193-199) ด้วยวิธี sandwich ELISA โดยอาจใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMN7 ร่วมกับ IMC1 หรือ IMN12 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IMC1 หรือ IMN12 เชื่อมกับ colloidal gold และใช้ IMN7 เป็นแอนติบอดีบริเวณ test line (ภาพประกอบ 35) อาจทำให้มีความไวในการตรวจมากขึ้น เช่นเดียวกับ ผลของชุดตรวจเชื้อ WSSV ที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28 เชื่อมกับ colloidal gold เป็นแอนติบอดีที่สามารถตรวจหาการติดเชื้อ WSSV ได้อย่างจำเพาะและมีความไวในการตรวจหาเชื้อสูงกว่าการใช้วิธี dot blotting 4 เท่า แต่ยังคงมีความไวต่ำกว่าวิธี 1-step PCR แต่อย่างไรก็ตามชุดตรวจนั้นสามารถใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวได้ (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106)



ภาพประกอบ 34 แนวทางการพัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย (strip test) ต่อเชื้อ IMNV

ดังนั้นชุดตรวจไวรัสแบบง่าย จึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัส และแบคทีเรียได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับการใช้วิธีทางวิทยามิคุ่มกันอื่น ๆ เช่น dot blotting หรือ Western blotting เนื่องจากชุดตรวจมีความจำเพาะ ใช้งานง่าย และรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 15 นาที (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในกุ้งที่เลี้ยงภายในฟาร์มกุ้งได้อย่างทันท่วงที

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ IMNV ในประเทศไทยแต่การเฝ้าระวังโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ให้สามารถป้องกันและควบคุมเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ให้มีการระบาดหรือสร้างความเสียหายรุนแรง ในประเทศไทย ได้ จึงคาดว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ IMNV ที่ผลิตได้นี้จะสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสแบบง่าย เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจการติดเชื้อ IMNV และลดความสูญเสียที่จะเกิดขึ้น หรืออาจใช้ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ชลอ ลีมสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. (ม.ป.ป.). อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ชุตติมา ศรีสุข. (2551). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ *hepatopancreatic parvovirus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2545). ศาสตร์ของกุ้งขาลีโทพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 2). วารสาร สัตว์น้ำ. 14(160): 121-124.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- วารุณี หะยิมะสาและ. (2552). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV)*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สงกรานต์ สุตบุษาคักดี. (2551). การโคลนและการแสดงออกของยีนแคปซิดโปรตีนของ *infectious myonecrosis virus (IMNV)* และการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี. ปัญหาพิเศษ วท.บ. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ; และคนอื่นๆ. (2537). อิมมูโนวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: เค.พี. พรินต์ติ้งจำกัด.
- อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- Andrade, T. P. D.; et al. (2007). Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Using *TaqMan* Probe for Detection and Quantification of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV). *Aquaculture*. (264): 9-15.
- Bachere, E. (2000). Introduction Shrimp Immunity and Disease Control. *Aquaculture*. (191): 3-11.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*. (72): 248-254.
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2004). Monoclonal Antibodies Against a Truncated Viral Envelope Protein (VP28) can Detect White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infections in Shrimp. *ScienceAsia*. (30): 359-363.

- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Molecular Isolation and Characterization of a Novel Occlusion Body Protein Gene from *Penaeus monodon* Nucleopolyhedrovirus. *Virology*. (381): 261-267.
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Preferential Suppression of Yellow Head Virus (YHV) Envelope Protein gp116 in Shrimp that Survive Challenge with YHV. *Diseases of Aquatic Organisms*. (79): 1-8.
- Coelho, M. G. L.; et al. (2009). Susceptibility of the Wild Southern Brown Shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis (IHHN) and Infectious Myonecrosis (IMN). *Aquaculture*. (294): 1-4.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal Antibody Strategy and Technique. In T.A. Springer (ed), Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine. New York: Plenum Press.
- FAO. (2006). State of World Aquaculture 2006. *FAO Fisheries Technical Paper*. (500).
- FAO. (2007). Fishery Statistics Aquaculture Production. (100/2): 202.
- Farming IntelliGene Tech Corp. (2006). IQ2000TM IMNV Instruction Manual Infectious myonecrosis virus (IMNV).
- Flegel, T. W.; et al. (1992). Occurrence Diagnosis and Treatment of Shrimp Disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL (eds) Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. *Oceanic Institute, Honolulu*: 57–112.
- Flegel, T. W.; Fegan, D. F.; & Sriurairatana, S. (1995). Environmental Control of Infectious Shrimp Diseases in Thailand. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture*, vol. II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.: 65–79.
- Flegel, T. W. (2006). Detection of Major Penaeid Shrimp Viruses in Asia, a Historical Perspective with Emphasis on Thailand. *Aquaculture*. (258): 1-33.
- GeneReach Biotechnology Corp. (2006). Retrieved February 11, 2010, from http://www.iq2000kit.com/imnv_2.htm
- Köhler, G.; & Milstein, C. (1976). Derivation of Specific Antibody Producing Tissue Culture and Tumor Cell Fusion. *European Journal of Immunology*. (6): 511-519.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. (227): 680-685.
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Penaeid Shrimp. *Journal World Aquaculture Society*, Baton Rouge.

- Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1998). Shrimp Diseases and Current Diagnostic Methods. *Aquaculture*. (164): 201–220.
- Loh, P. C.; et al. (1997). Viral Pathogens of the Penaeid Shrimp. *Advances in Virus Research*. (48): 263–312.
- Longyant, S.; et al. (2008). Specific Monoclonal Antibodies Raised Against Taura Syndrome Virus (TSV) Capsid Protein VP3 Detect TSV in Single and Dual Infections with White Spot Syndrome Virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. (79): 75-81.
- Madrid, R. M. (2005). A Crise Econômica da Carcinicultura. *Panorama da Aquicultura*. (90): 22–29.
- 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.
- Nibert, M. L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' Motifs in Penaeid Shrimp Infectious Myonecrosis Virus, a Monosegmented Double-stranded RNA Virus. *Journal of General Virology*. (88): 1315-1318.
- Nunes, A. J. P. (2005). Um ano de Mudanças, Perdas e Ganhos. *Panorama da Aquicultura*. (92): 26–33.
- Phianphak, W.; et al. (2005). Production of Monoclonal Antibodies for Detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (63): 161-168.
- Phuoc, L. H. (2008). *Single and Dual Experimental Infection of Specific Pathogen-free Litopenaeus vannamei Shrimp with White Spot Syndrome Virus and Vibrio Species*. Dissertation, Ph.D. (Applied Biological Sciences). Ghent University, Belgium. Photocopied.
- Poulos, B. T.; et al. (2006). Purification and Characterization of Infectious Myonecrosis Virus of Penaeid Shrimp. *Journal of General Virology*. (87): 987-996.
- Poulos, B. T.; & Lightner, D. V. (2006). Detection of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) of Penaeid Shrimp by Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Diseases of Aquatic Organisms*. (73): 69-72.
- Puthawibool, T.; et al. (2009). Detection of Shrimp Infectious Myonecrosis Virus by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral Flow Dipstick. *Journal of Virological Methods*. (156): 27-31.

- Rosenberry, B. (2005). World Shrimp Farming 2005. In *Shrimp News International*. Retrieved February 11, 2010, from <http://www.fishbase.gr/ListByLetter/FBReferencesF.html>
- Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of Monoclonal Antibodies Specific to Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (65): 85–89.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; & Maniatis, T. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). New York.
- Senapin, S.; et al. (2007). Outbreaks of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in Indonesia Confirmed by Genome Sequencing and Use of an Alternative RT-PCR Detection Method. *Aquaculture*. (266): 32-38.
- Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal Antibodies Specific to Yellow-head Virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (49): 71-76.
- Sithigorngul, P.; et al. (2007). A Simple and Rapid Immunochromatographic Test Strip for Detection of Pathogenic Isolates of *Vibrio harveyi*. *Journal of Microbiological Methods*. (71): 256-264.
- Sithigorngul, P.; et al. (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, W.; et al. (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.
- Sithigorngul, W.; et al. (2007). A Convenient Immunochromatographic Test Strip for Rapid Diagnosis of Yellow Head Virus Infection. *Journal of Virological Methods*. (72): 193-199.
- Snieszko, S. F. (1973). Disease of Fishes and their Control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. Janson, London, 55-66.
- Tang, J.; et al. (2008). Infectious Myonecrosis Virus has a Totivirus-like, 120-subunit Capsid, but with Fiber Complexes at the Fivefold Axes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (45): 17526-17531.

- Tang, K. F. J.; et al. (2005). *In situ* Hybridization Demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are Susceptible to Experimental Infection with Infectious Myonecrosis Virus (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms*. (63): 261-265.
- Tang, K. F. J.; et al. (2007). Development of *in situ* Hybridization and RT-PCR Assay for the Detection of a Nodavirus (PvNV) that Causes Muscle Necrosis in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (75): 183-190.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

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

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 100 mM IPTG

IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

2. Buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea pH 6.3)

NaH ₂ PO ₄	1.38	กรัม
Tris-HCl (ปรับ pH 6.3)	0.12	กรัม
Urea	48.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

3. 100 mM PMSF

PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol	1.0	มิลลิลิตร

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

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

5. 5% Blotto

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

6. 1% Merthiolate

Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

7. 1 M KCl

KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

8. 1% SDS

SDS	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. RPMI medium

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4000	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6000	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
C ₃ H ₃ O ₃ Na	1.1005	กรัม
NaHCO ₃	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
Penicillin G	20,000.0000	units
Streptomycin	200.0000	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0000	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร		

2. 20% Fetal bovine serum

RPMI medium	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	3.0	มิลลิลิตร

5. 12% Dimethylsulfoxide

Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium	88.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 Monomer solution (30% T, 2.7% C_{Bis})

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
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 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
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 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	1,000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 Destain 2

Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	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

6. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma) ประกอบด้วย

β -Galactosidase, <i>Escherichia coli</i>	116.0	กิโลดาลตัน
Phosphorylase b, rabbit muscle	97.0	กิโลดาลตัน
Albumin, bovine serum	66.0	กิโลดาลตัน
Ovalbumin, chicken egg	45.0	กิโลดาลตัน
Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29.0	กิโลดาลตัน

ภาคผนวก จ

**สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดี**

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ 3 chain specific)
- 5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
- 6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ 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 จ

สารเคมีสำหรับ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. 0.1 M Citrate buffer, pH 4.5

Sodium citrate	29.4	กรัม
1% Merthiolate	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

2. 1 N H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. coated slide solution

Gelatin	1.0	กรัม
CrK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	50.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. 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% (P₁⁺)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

4. สี Enrilich'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

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาวอารีรัตน์ คุณานพรัตน์
วันเดือนปีเกิด	6 เมษายน พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	142 ถ.อ่อนนุช17 แยก7 แขวง/เขตสวนหลวง จ.กรุงเทพฯ 10250
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2546	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ
พ.ศ.2551	วท.บ. (จุลชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ.2552	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ