

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๕
ชุดโครงการวิจัยเรื่อง

การตรวจวินิจฉัยและป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ

วีระวรรณ สิทธิกรกุล

(ผู้ประสานงาน)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หน้าว่าง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้
ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีน-
ครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ผู้วิจัย

กันยายน 2546

บทคัดย่อ

งานวิจัยในชุดโครงการวิจัยนี้เป็นการสร้างเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอณูชีววิทยา ซึ่งประกอบด้วย

การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus) แบบ indirect immuno-peroxidase sandwich ELISA ทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 และ 22 kD ร่วมกับ rabbit anti mouse IgG H and L horseradish peroxidase conjugate เป็นตัวตรวจสอบ และใช้ rabbit anti YHV antibody เป็นตัวจับไวรัสใน microtiter plate วิธีนี้สามารถให้ความไวในการตรวจสอบใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR โดยมีความไวต่ำกว่าเพียง 5-10 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถใช้พื้นฐานการตรวจสอบนี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจแบบง่าย ๆ ได้แก่ strip test สำหรับบุคคลทั่วไปใช้ได้ต่อไป

การหาลำดับ cDNA บางส่วนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสโรคหัวเหลือง ทำโดยแยกยีน p135 โดยวิธี RT-PCR (ซึ่งใช้ cDNA ที่สร้างจาก RNA ของ YHV เป็น template) พบว่าได้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 4200 bp และจากการหาลำดับ DNA บางส่วน (1720 bp) ของผลผลิต RT-PCR นี้ พบว่ามีความสอดคล้องกับยีน gp116 ของ YHV ที่รายงานโดย Jitrapakdee และคณะ (2003) จากการแยกยีน p65 และ p65F78 (p65 ที่ปราศจาก transmembrane region) โดยวิธี RT-PCR พบว่าได้แถบ DNA ขนาด 1708 bp และ 1630 bp ตามลำดับ แต่ผลการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ายังไม่ประสบผลสำเร็จจากความพยายามในการแยกยีน p22 โดยวิธี RT-PCR พบว่าได้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 750 bp และจากการหาลำดับ DNA และการวิเคราะห์ open reading frame (ORF) ของผลผลิต RT-PCR นี้ พบว่าไม่มี ORF ที่สอดคล้องกับโปรตีนขนาด 22 kD ดังนั้นจึงคาดว่าลำดับ DNA ที่ได้น่าจะเป็นส่วนของ 3' untranslated region ของ YHV

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยวิธี multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส 3 ชนิดพร้อมกันด้วยวิธีนี้คือ ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง และไวรัส HPV (hepatopancreatic parvo-like virus) และยังสามารถพัฒนาการตรวจสอบโดยวิธี multiplex RT-PCR ของไวรัสหัวเหลืองและ GAV (gill associated virus) ทำให้แยกการติดเชื้อจากไวรัสต่าง ๆ ได้

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV ทำโดยแยกสกัด HPV จากตับของกุ้งกุลาดำที่แคะ ทำให้บริสุทธิ์และนำมาปลูกภูมิคุ้มกันในหนู สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 12 โคลน โดยทุกโคลนจับกับโปรตีนขนาด 97 กิโลดาลตัน แต่ยังไม่ได้โคลนที่จับกับโปรตีนขนาด 54 กิโลดาลตัน ซึ่งจะต้องพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อไปอีก

สารบัญ

หน้า

คำนำ	1
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์และหรือเป้าหมายหลักของชุดโครงการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4
แผนการดำเนินงานพร้อมทั้งขั้นตอนการดำเนินงานตลอดชุดโครงการวิจัย	5
ชื่อชุดโครงการวิจัยย่อย/โครงการวิจัย/หัวหน้าโครงการวิจัย	6
ขอบเขตของแผนงานชุดโครงการวิจัยในปี พ.ศ. 2545	7
สรุปผลการดำเนินการของชุดโครงการวิจัย	8
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 1	9
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 2	10
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 3	11
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 4	12
เอกสารอ้างอิง	13

หน้าว่าง

คำนำ

หน้าว่าง

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นอาชีพที่ทำรายได้สู่ประเทศไทยปีละหลายหมื่นล้านบาท แต่ในระยะหลังนี้มีปัญหาการติดเชื้อโรคไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus : YHV) และโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) ซึ่งเป็นโรคติดต่อร้ายแรงได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก โดยพบว่าในปี ค.ศ.1995 ผลผลิตกุ้งจากประเทศไทยลดลงจากปี ค.ศ.1994 ถึงประมาณ 30,000 ตัน โดยคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 9,600 ล้านบาท (Flegel et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่มีความรุนแรงต่ำได้แก่ monodon baculovirus (MBV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) ซึ่งไวรัสเหล่านี้ถึงแม้จะไม่ทำให้กุ้งตายเสียหายทันที แต่ก็อาจเป็นสาเหตุก่อให้เกิดการเจริญเติบโตช้า และกุ้งแคะแกรนไม่ได้ขนาด ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจจำนวนมากเช่นกัน (Fegan et al. 1991; Flegel et al., 1992)

ปัจจุบันการแก้ปัญหาการเกิดโรคไวรัสโดยการรักษายังไม่มีวิธีที่ชัดเจน การลดการสูญเสียจากโรคติดเชื้อไวรัส ทำโดยการป้องกันการติดเชื้อ โดยการตรวจวินิจฉัยคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และกุ้งวัยอ่อนที่ปลอดเชื้อก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม และตรวจสอบการติดเชื้อระหว่างการเลี้ยง ซึ่งวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อต่าง ๆ โดยการตรวจพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (histopathology) และตรวจดูอาการของโรค (symtomatic diagnosis) ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วสามารถตรวจพบเมื่อกุ้งแสดงอาการของโรคเต็มที่ และส่วนตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหาย เนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาในเวลาที่เหมาะสมและถูกต้อง อีกทั้งอาการของโรคมักมีอาการเกี่ยวกับการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อโปรโตซัวอื่นร่วมอยู่ด้วย ซึ่งเป็นปัญหาทำให้การวิเคราะห์วิธีเหล่านี้ไม่ให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ

การวินิจฉัย WSSV ได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR และ in situ hybridization เพื่อใช้ในการวินิจฉัย การติดเชื้ออย่างกว้างขวางทั้งในกุ้งกุลาดำ (Chang et al., 1996 ; Lo et al., 1997) กุ้งตระกูล *Penaeus* ชนิดต่าง ๆ (Chou et al., 1995 ; Lo et al., 1996) และสัตว์กลุ่มครัสเตเชียอื่น ๆ ที่อาจเป็นพาหะของโรค WSSV ได้แก่ ปูและกุ้งต่าง ๆ (Kanchanaphum et al., 1998 ; Supamattaya et al., 1998) ในทำนองเดียวกันได้มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ (Wongteerasupaya et al., 1997) ซึ่งวิธีทั้งสองนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัส แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในเมื่อต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการตรวจต่อตัวอย่างค่อนข้างสูงและการตรวจต้องใช้ห้องปฏิบัติการและบุคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะทาง

สำหรับกรณีของ HPV และ MBV การวินิจฉัยหลักส่วนใหญ่ทำโดยการตรวจเนื้อเยื่อตามกระบวนการย้อมสีตามปกติ (histopathology) และมีการพัฒนาเทคนิคทาง PCR เพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อถึงแม้กุ้งยังไม่แสดงอาการ (Sukhumsirichart et al., 1999 ; Belcher and Young, 1998)

ส่วนการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อใช้ตรวจ WSSV และ YHV นั้น ได้มีการผลิตแอนติซีรั่มต่อ WSSV และ YHV เพื่อการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค Western blot (Loh et al., 1997) แต่อย่างไรก็ตามการใช้โพลีโคลนอลแอนติซีรั่มเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำ และไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก ถึงแม้จะสามารถดัดแปลงใช้วิธี dot blot (Nadala et al., 2000) แต่ความไวในการตรวจสอบก็ยังต่ำอยู่มาก

ความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งจำเพาะต่อไกลโคโปรตีนที่คาดว่าเป็นองค์ประกอบส่วนที่เป็นเปลือกหุ้มของ YHV (Nadala et al., 1997) สามารถใช้ตรวจหา YHV ได้ใน haemolymph และเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยวิธี dot blot, Western blot และ immunocytochemistry ซึ่งวิธีเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังต้องทำในห้องปฏิบัติการ บางวิธีต้องใช้เวลาในการตรวจหลายวัน และความไวของวิธีตรวจยังไม่ถึงจุดสูงสุด จึงจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจเพื่อให้ใช้ได้ง่าย สะดวก และมีความไวสูงต่อไป จากตัวอย่างความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถปรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสได้อย่างหลายวิธี และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก จึงน่าจะนำมาใช้ในการตรวจหา MBV และ HPV ด้วยเช่นกัน กรณีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV และ YHV ไม่ได้นำเสนอในชุดโครงการนี้ เนื่องจากโครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติในช่วงปี 2543-2545 ซึ่งดำเนินการวิจัยสำเร็จแล้วในบางส่วนและได้ดำเนินการวิจัยควบคู่กันไป

สำหรับแนวทางการป้องกันการติดเชื้อไวรัสอีกแนวทางหนึ่งได้แก่ การสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโดยการให้วัคซีน จากรายงานการศึกษาเบื้องต้นโดย Withachumnarnkul (unpublished) ซึ่งใช้ YHV ที่ผ่านการฉายรังสี UV ฉีดให้กุ้งและชักนำให้กุ้งติดเชื้อภายหลัง (challenged) พบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีด YHV ที่ผ่านการฉายรังสี UV ก่อน มีชีวิตนานและอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีด YHV ที่ผ่านการฉายรังสี UV (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการให้วัคซีนก็อาจเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสต่าง ๆ ในกุ้ง ซึ่งการพัฒนาวัคซีนให้ได้ปริมาณมากในราคาที่ไม่แพงนัก อาจทำได้โดยนำยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของไวรัสใส่ในยีนพาหะที่สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีน (expression vector) โดยนำเข้าสู่แบคทีเรียหรือยีสต์ จากนั้นกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนเหล่านี้ในปริมาณมากเพื่อนำมาใช้เป็นวัคซีน ซึ่งแนวทางการวิจัยนี้จะเริ่มนำร่องในการสร้างวัคซีนต่อส่วนของโปรตีนเปลือกหุ้มของ YHV ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อที่รุนแรงก่อน เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตวัคซีนต่อไวรัสชนิดอื่นต่อไป

โดยสรุปชุดโครงการวิจัยนี้เป็นการสร้างเครื่องมือในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อที่จะได้เครื่องมือวินิจฉัยที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อไวรัสในระดับต่าง ๆ และสามารถปรับใช้ภาคสนามได้ อันเป็นแนวทางการป้องกันและติดตามการติดเชื้อไวรัสในการเลี้ยงกุ้งและศึกษาอุปนิสัยการของไวรัส ส่วนแนวทางการป้องกันการติดเชื้ออีกแนวทางหนึ่งจะเป็นโครงการนำร่องการผลิตวัคซีน เพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน

ประชากรของกุง ซึ่งจะใช้ YHV ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงเป็นต้นแบบสำหรับใช้เป็นแนวทางในการผลิตวัคซีนของไวรัสชนิดอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์และหรือเป้าหมายหลักของชุดโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุงกลาดำ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุงกลาดำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอนุชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุงกลาดำ
2. สามารถพัฒนาวิธีการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุงกลาดำ
3. สามารถพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตการเลี้ยงกุงเนื่องจากโรคไวรัส
4. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุงกลาดำสู่กลุ่มเป้าหมาย

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

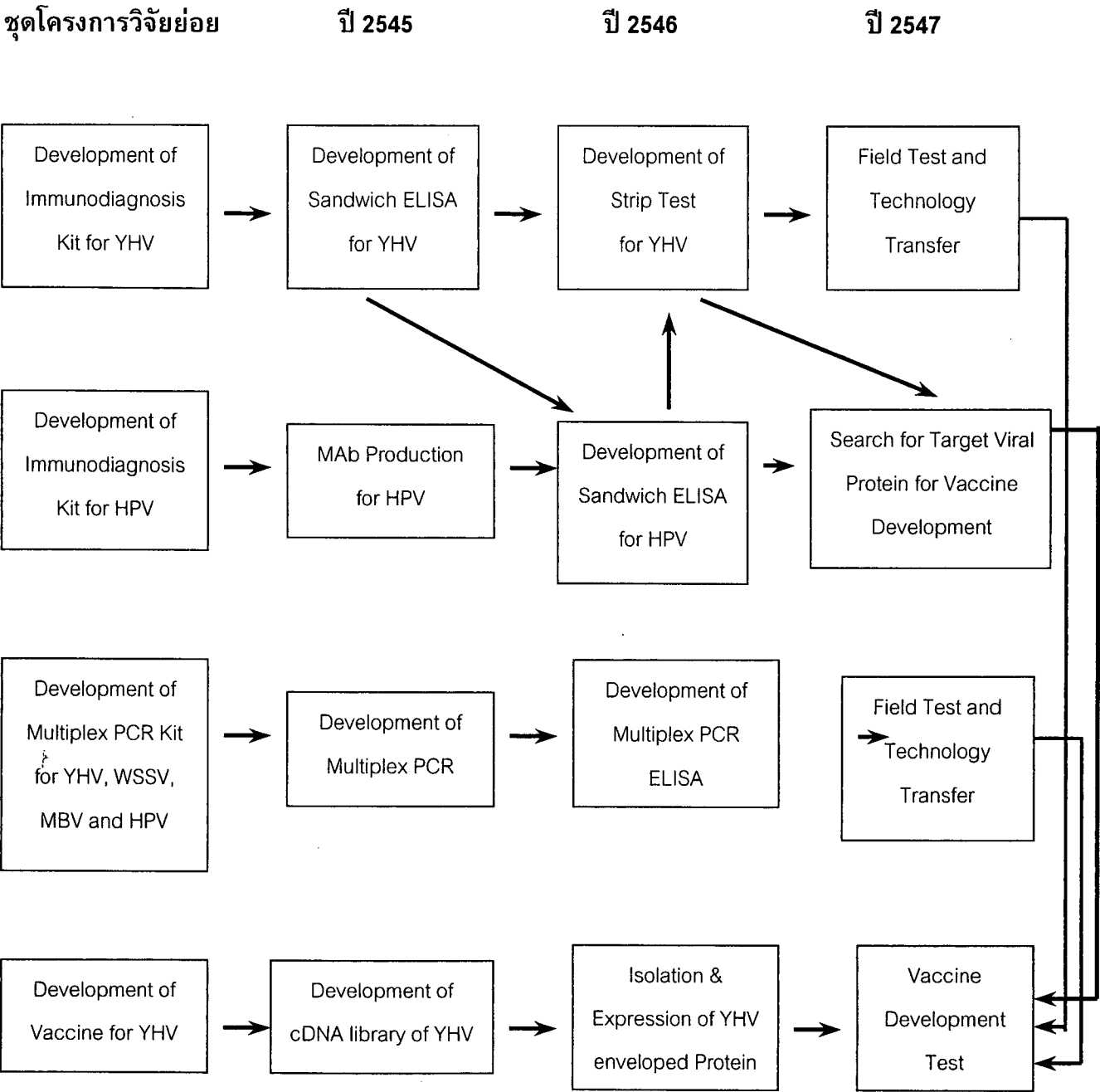
หน่วยงานภาครัฐ

1. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการดูแลด้านการเพาะเลี้ยงกุงกลาดำ เช่น กรมประมง
2. สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ เช่น ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และศูนย์วิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงกุงกลาดำ เป็นต้น
3. สถาบันอุดมศึกษาที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกุงกลาดำ เช่น มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นต้น

หน่วยงานภาคเอกชน

1. เกษตรกรผู้เลี้ยงกุงกลาดำ
2. บริษัทที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์การเพาะเลี้ยงกุงกลาดำ เช่น สถาบันวิจัยสัตว์น้ำเครือเจริญโภคภัณฑ์

แผนการดำเนินงานพร้อมทั้งขั้นตอนการดำเนินงานตลอดชุดโครงการวิจัย



ชื่อชุดโครงการวิจัยย่อย/โครงการวิจัย/หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อชุดโครงการวิจัยย่อย	ชื่อโครงการวิจัยในปี 2545 /หัวหน้าโครงการวิจัย
1. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัด- เหลืองในกึ่งกลาดำโดยใช้เทคนิค ภูมิคุ้มกันวิทยา	การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลาดำที่มี ความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี sandwich ELISA (รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)
2. การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกัน การติดเชื้อไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่ง กลาดำ	การหาลำดับ cDNA บางส่วนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีน ส่วนเปลือกของไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลาดำ (ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธานุการ)
3. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่ง กลาดำโดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา	การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่งกลาดำโดยวิธี multiplex RT-PCR (ผศ.ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีระทรัพย์)
4. การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีและ ชุดตรวจเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ ไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำ	การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย ไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำ (ผศ.ดร. วาสนา สุขุมศิริชาติ)

ขอบเขตของแผนงานชุดโครงการวิจัยในปี พ.ศ. 2545

โครงการวิจัย	ขอบเขต
1. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองใน กึ่งกลาดำที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA	- การผลิต Ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) V3-2B - การผลิต Rabbit anti-YHV antiserum - การพัฒนาชุดตรวจ Sandwich ELISA โดยใช้ indirect immunoperoxidase method - การทดสอบความแม่นยำ ความไว ความจำเพาะของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น
2. การหาลำดับ cDNA บางส่วนที่เป็นรหัสสำหรับ สร้างโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสโรคหัดเหลือง ในกึ่งกลาดำ	- การเพิ่มจำนวนของไวรัส YHV - การสกัด RNA ของไวรัสและสร้าง cDNA library ของ YHV - การหาลำดับ cDNA บางส่วนของ YHV enveloped protein และตรวจยืนยันผลผลิตจาก cDNA ด้วย MAb ที่จำเพาะต่อ YHV enveloped protein
3. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่งกลาดำ โดย วิธี Multiplex RT-PCR	- การออกแบบ primer - การปรับสภาวะ Multiplex RT-PCR - การพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Multiplex RT-PCR
4. การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการ ตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำ	- การแยกสกัดไวรัส HPV - การผลิต MAb ต่อไวรัส HPV - การตรวจสอบการติดเชื้อโดย immunocytochemistry

สรุปการดำเนินงานของชุดโครงการวิจัย

1. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 1

1.1 เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลูตาต้าที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี sandwich ELISA

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองโดยวิธี sandwich ELISA ที่มีความไวและความจำเพาะสูง

2. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองที่ง่าย แม่นยำ และราคาถูกสำหรับใช้ในภาคสนามต่อไป

1.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

สามารถผลิตชุดตรวจ indirect sandwich ELISA ที่มีความแม่นยำและมีความไวสูง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 ประกอบกับ rabbit anti-mouse Ig-horseradish peroxidase conjugate เป็น detector antibody และ rabbit anti-YHV antibody เป็น capture antibody ความไวของชุดตรวจใกล้เคียงกับ RT-PCR สามารถใช้ตรวจได้ครั้งละ 80-88 ตัวอย่างในราคาไม่เกิน 1,000 บาท

1.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินต่อ

เสร็จสมบูรณ์

1.5 % ความสำเร็จของโครงการ

100 %

1.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

ปฏิกิริยาข้ามของ GAM-HRP ซึ่งแก้โดยใช้ RAM-HRP ที่ดูดซับด้วยแอนติบอดีของมนุษย์

1.7 งบประมาณที่ใช้

350,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 1

2. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 2

2.1 เรื่อง การหาลำดับ cDNA บางส่วนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสโรค
หัวเหลืองในกุ่มกุลดำ

2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเตรียม YHV cDNA library

2. เพื่อแยก cDNA บางส่วนที่เป็นรหัสสำหรับสร้าง enveloped protein ของ YHV

2.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

สามารถโคลนยีนของโปรตีนโครงสร้างของไวรัสขนาด 135 และ 67 kD ได้สำเร็จ
สำหรับโปรตีนโครงสร้างขนาด 22 kD ผลการวิจัยยังไม่สมบูรณ์ซึ่งจะได้ดำเนินการตัดต่อยีนเหล่านี้
เข้าในแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกในโครงการต่อไป

2.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินต่อ

โคลนและพิสูจน์ทราบโครงสร้างของยีนของโปรตีนโครงสร้างขนาด 22 kD

2.5 % ความสำเร็จของโครงการ

90 %

2.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

ยังไม่สามารถโคลนยีนของโปรตีนขนาด 22 kD ได้

2.7 งบประมาณที่ใช้

314,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 2

3. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 3

3.1 เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยวิธี multiplex RT-PCR

3.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัส HPV และไวรัส MBV โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบผสม (multiplex RT-PCR)

2. เพื่อนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจภาคสนาม เช่น ตรวจหาเชื้อในพ่อแม่พันธุ์กุ้ง และตรวจลูกกุ้ง nauplii เพื่อเป็นการคัดเลือกลูกกุ้งหรือตรวจหาการติดเชื้อไวรัสในขณะที่ยังไม่แสดงอาการ และเพื่อการตรวจหาพาหะของเชื้อไวรัสทั้ง 4 ชนิด

3.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

ได้พัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสโดยวิธี multiplex RT-PCR และได้ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบเชื้อไวรัส 3 ชนิดพร้อมกันคือ ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลืองและ ไวรัส HPV และได้ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาการตรวจสอบโดยวิธี multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัส GAV (gill associated virus) ที่ระบาดมากในประเทศออสเตรเลียทำให้สามารถแยกชนิดการติดเชื้อโรคจากไวรัสต่าง ๆ ได้

3.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินต่อ

-

3.5 % ความสำเร็จของโครงการ

100 %

3.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

-

3.7 งบประมาณที่ใช้

255,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 3

4. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 4

4.1 เรื่อง การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV ในกึ่ง
กลาดำ

4.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV

2. เพื่อใช้เทคนิค dot-ELISA และ immunohistochemistry เพื่อคัดเลือกแอนติบอดี
ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส HPV

3. เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาชุดตรวจสอบ HPV ในกึ่งกลาดำที่ง่าย สะดวก รวด
เร็ว และแม่นยำในโครงการต่อไป

4.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

ได้ทำการแยกสกัด HPV จากตับของกึ่ง ทำให้บริสุทธิ์ และนำมาฉีดให้หนูเพื่อผลิต
โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 12 โคลนทุกโคลนจับกับโปรตีนขนาด 97 kD ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนน้อยแต่
ไม่จับกับโปรตีนขนาด 54 kD ตามที่คาดหวัง แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเซลล์ของเนื้อเยื่อที่
ติดเชื้อไวรัสเด่นชัดและที่ยังไม่แสดง hypertrophied nuclei แสดงว่ามีความจำเพาะต่อ HPV

4.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินต่อ

ผลิต MAbs เพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 54 kD ในโครงการ
ต่อไป

4.5 % ความสำเร็จของโครงการ

80 %

4.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

การหลอมรวมเซลล์ให้ผลผลิตของ hybridoma น้อยทำให้ไม่ได้โคลนของแอนติบอดี
ที่ต้องการ การปรับปรุงวิธีการแก้ปัญหา พยายามหาทางเพิ่มผลผลิตของ hybridoma ให้เพิ่มขึ้น

4.7 งบประมาณที่ใช้

349,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 4

เอกสารอ้างอิง

- Belcher, C.R. and Young, P.R. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* post larvae. J. Virol. Meth. 74 : 21-29.
- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C. and Gou, G.H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Dis. Aquat. Org. 27:131-139.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang ,H.C. and Lo, C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis. Aquat. Org. 23 : 165-173.
- Fegan, D.F., Flegel, T.W., Sriurairatana, S. and Waiakrutra, M. 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon vaculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand. Aquaculture 96 : 205-217.
- Flegel, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikornudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantanachookhlin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. in Fulks W. and Main, K.L. eds. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Oceanic Institute, Honolulu HI, USA.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), Diseases in Aquaculture III., Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p 285-302.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Kanchanaphum, P., Wongteerasupaya, C., Sittidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crab to shrimp *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 34 : 1-7.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquacultures. 164 : 201-220.

- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.* 27 : 215-225.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu K.F., Chiu, Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.* 30 : 53-72.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., LU, Y. and Nadala, E.C.B. Jr. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. *Advances in Virus Research* .48 : 263-311.
- Nadala Jr., E.C., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow-head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the western blot technique. *J. Virol. Meth.* 69 : 39-44
- Nadala Jr., E.C. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *J. Virol. Meth.* 84 : 175-179.
- Sithigorngul, P., Chauychwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sukhumsirichart, W., Wongteerasupaya, C., Boonseng, V., Panyim, S., Sriuratana, S., Withyachumnarkul, B. and Flegel, T.W. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 38 : 1-10
- Supamattaya, K., Hoffmann, R.W., Boonyaratapalin, S. and Kanchanaphum, P. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis. Aquat. Org.* 32 : 79-85.
- Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.

หน้าว่าง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีความไวและ
ความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA

Development of high sensitivity and high accuracy diagnostic kit for
detection of yellow head virus in *Penaeus monodon* :
Sandwich ELISA

ไพศาล สิทธิกรกุล คีวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร
ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธำรง และ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองในกุ่มกุลาดำที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยต่อเนื่องเรื่อง การตรวจวินิจฉัยและการป้องกันโรคไวรัสในกุ่มกุลาดำ ซึ่งโครงการนี้เป็นการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยมาเพื่อประดิษฐ์เป็นชุดตรวจที่มีความไวสูง สามารถใช้โดยห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เพื่อที่จะใช้ทดแทนการตรวจโดยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้อยู่ทั่วไป เนื่องจากคาดว่าจะได้วิธีตรวจที่มีความไวสูงใกล้เคียงกันในราคาที่ไม่แพงนัก ซึ่งแนวทางการพัฒนานี้นอกจากจะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ่มแล้วยังเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนาชุดตรวจง่าย ๆ ที่เกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้ซึ่งจะพัฒนาในโครงการวิจัยต่อจากโครงการวิจัยนี้ เมื่อการวิจัยสำเร็จก็จะสามารถเผยแพร่และจัดอบรมให้แก่ผู้ต้องการใช้ในโอกาสต่อไป

ในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร-วิโรฒที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2546

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus) แบบ indirect immuno-peroxidase sandwich ELISA ทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 และ 22 kD ร่วมกับ rabbit anti mouse IgG H and L horseradish peroxidase conjugate เป็นตัวตรวจสอบ และใช้ rabbit anti YHV antibody เป็นตัวจับไวรัสใน microtiter plate วิธีนี้สามารถให้ความไวในการตรวจสอบใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR โดยมีความไวต่ำกว่าเพียง 5-10 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถใช้พื้นฐานการตรวจสอบนี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจแบบง่าย ๆ ได้แก่ strip test สำหรับบุคคลทั่วไปใช้ได้ต่อไป

ABSTRACT

Yellow head virus (YHV) detection kit using indirect immunoperoxidase sandwich ELISA was developed. Monoclonal antibodies V3-2B and Y19, specific to 135 and 22 kD structural proteins of YHV, respectively and rabbit anti mouse IgG H and L horseradish peroxidase conjugate were used as detector antibodies. Rabbit anti YHV antibody was used as captured antibody on the microtiter plate. The sensitivity of this method is comparable to RT-PCR with 5-10 fold less sensitive. This method provides a basis for further development of simple strip test for shrimp farmers in the upcoming project.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
โรคหัวเหลือง	2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการทดลอง	11
สัตว์ทดลอง	12
การเตรียมไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV)	12
การเตรียม rabbit anti YHV antiserum	12
การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry	13
การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B, Y18 และ Y19	14
Indirect sandwich ELISA	14
Direct sandwich ELISA	15
การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR	16
ผลการทดลอง	17
สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	33

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 Indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody เจือจางระดับต่าง ๆ	24
2 Indirect sandwich ELISA เพื่อตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-mouse IgG-HRP ทั้ง 3 ชนิด	25
3 การทดสอบความสามารถในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV	26
4 ความไวของการตรวจหา YHV ใน haemolymph โดย indirect sandwich ELISA	27
5 การทดสอบความสามารถในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B HRP conjugate ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV (direct sandwich ELISA)	28

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
1	กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง	3
2	เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง	4
3	Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลือง	6
4	SDS-PAGE และ Western blot ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จากกึ่งกลาดำ	21
5	Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำ	22
6	RT-PCR ของhaemolymph จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของกึ่งก้ามกรามปกติ	23
7	แผนภูมิขั้นตอนการตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA	32

บทนำ

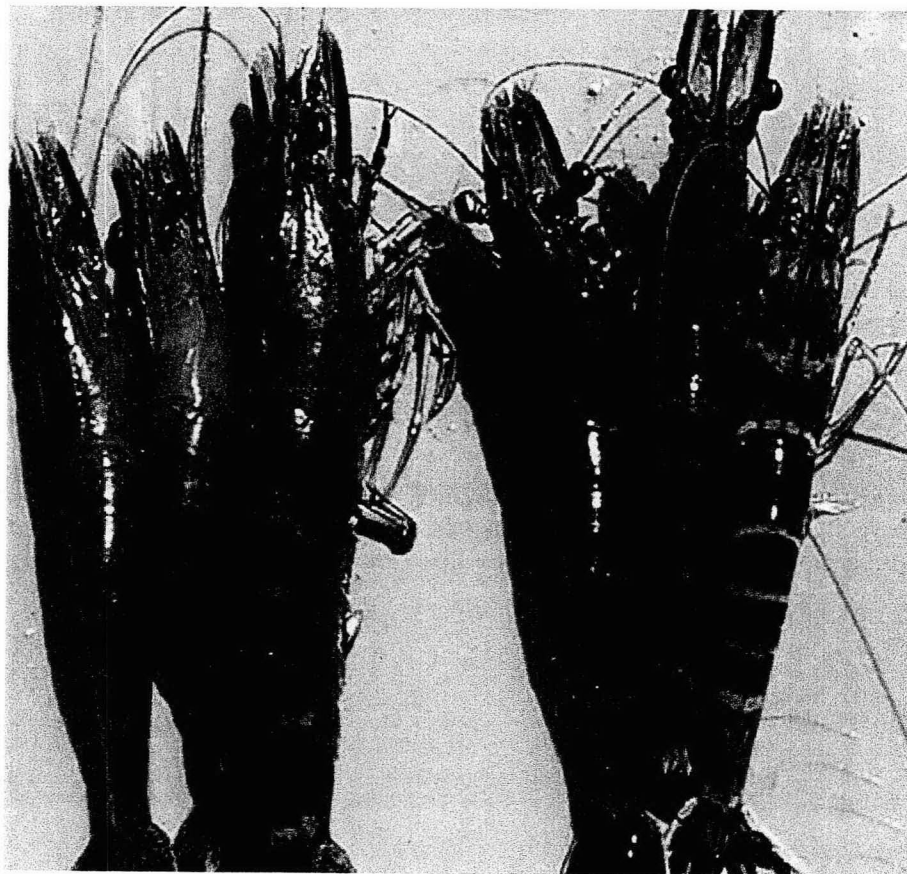
การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามในระยะหลังนี้การติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow-head virus : YHV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) (Boonyaratpalin et al., 1993; Wongteerasupaya et al., 1995) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยพบว่าในปี 2538 การผลิตกุ้งจากประเทศไทยลดลงจากปี 2537 ถึงประมาณ 30,000 ตันโดยคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 9600 ล้านบาท (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV ในกุ้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) จำเพาะต่อโรคหัวเหลือง ซึ่งผลิตจากห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย (Sithigorngul et al., 2000) เพื่อนำไปสู่การใช้ในห้องปฏิบัติการและพัฒนารูปแบบอื่น ๆ เพื่อที่จะสามารถใช้โดยเกษตรกรได้ต่อไป

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นการค้าไม่เฉพาะประเทศไทยเท่านั้น ยังรวมไปถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก (Lu et al., 1994, 1995) โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำมีรายงานครั้งแรกบริเวณภาคตะวันออกเฉียงและภาคกลางของประเทศ เมื่อปี 2533 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคหัวเหลืองบริเวณภาคใต้ของประเทศพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคหัวเหลืองได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535) การตรวจลักษณะการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในบริเวณเหงือก ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง ในกุ้งที่ปรากฏอาการเป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งทำให้ส่วนหัว ดับ-ดับอ่อน และ เหงือกจะมีสีเหลือง เห็นได้ชัดเจน พยาธิสภาพของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ถ้ากุ้งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วยโดยจะส่งผลให้มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3-5 วันหลังจากได้รับเชื้อซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543 ; สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

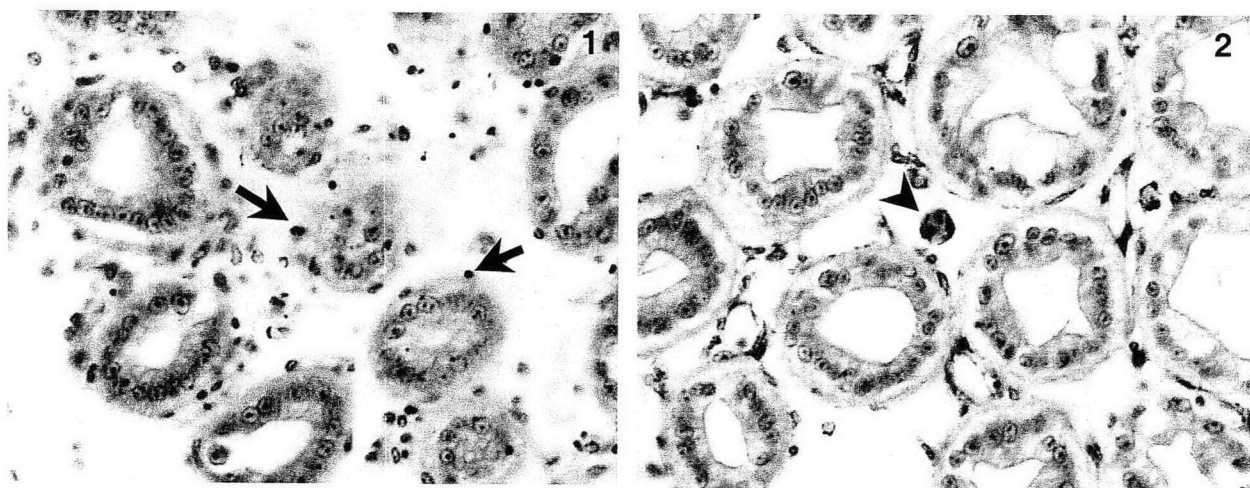
สำหรับกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีลักษณะอาการดังนี้คือ กุ้งมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารจะลดลงจนผิดปกติ กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงติด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็น

ส่วนตับ ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลือง (รูปที่ 1) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้าหลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)



รูปที่ 1 กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (ซ้าย) สังเกตบริเวณหัวซึ่งเป็นส่วนของตับ-ตับอ่อนและเหงือกมีสีเหลืองและซีดกว่ากุ้งกุลาดำปกติ (ขวา)

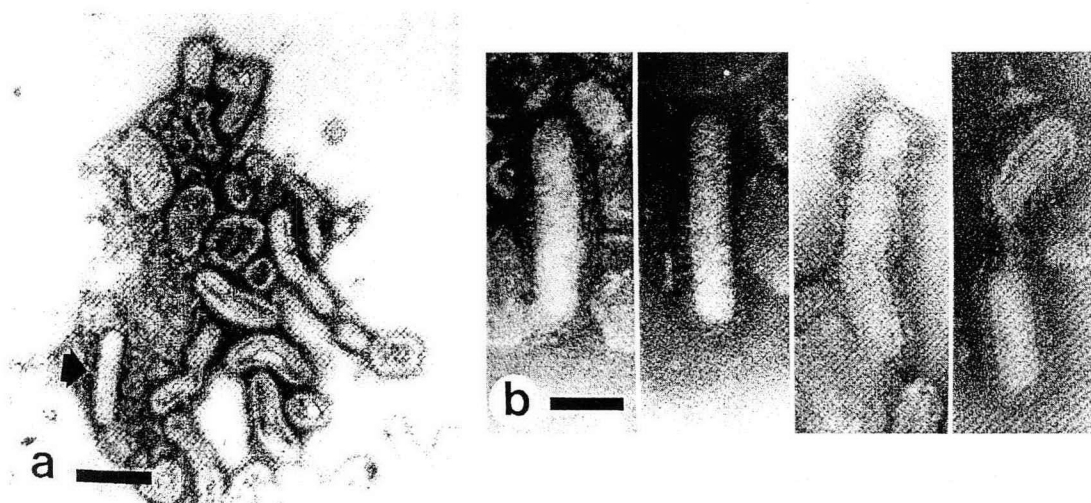
เมื่อตรวจวิเคราะห์กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ เช่น บริเวณเหงือกในกึ่งที่เป็นโรคหัวเหลือง เซลล์ภายในซี่เหงือก (pillar cell) จะบวม เกิดการตายและสลายตัวของเซลล์และออร์กาเนลล์ในส่วนนี้ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดระหว่าง pillar cell มากขึ้น มีการขยายตัวของท่อเลือด (lacuna) ใหญ่กว่าปกติ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกึ่งที่เป็นโรคจะเกิดการตายและเสื่อมสลายของเซลล์ รวมทั้งมีลักษณะของ granuloma เพิ่มขึ้น มีการคั่งของฮีโมลิมฟ์ (haemolymph) และการขยายตัวในส่วนของ hemal sinus นอกจากนี้พบว่ามี การบวมพองของนิวเคลียสในเซลล์ของอวัยวะน้ำเหลืองทั่วไป ตรวจพบ dense bodies ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง เมื่อนำมาย้อมด้วย Feulgen reaction พบว่า dense bodies จะติดสีชมพูเข้มอยู่ภายใน cytoplasm (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535 ; Chantanachookin et al. 1993) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (1) การตรวจสอบด้วยวิธีทาง histology เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นลักษณะของนิวเคลียสรวมกัน (pycnotic nuclei) (ลูกศร) (2) การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry เซลล์ที่พบไวรัสจะติดสีน้ำตาลและแสดงความผิดปกติของนิวเคลียส (หัวลูกศร)

นอกจากจะพบโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแล้ว ยังพบการติดเชื้อโรคนี้ในกุ้งอีกหลายชนิดในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง blue shrimp *Penaeus stylirostris* และกุ้ง white shrimp *Penaeus vannamei* อีกด้วย (Lu et al., 1994; Lu et al., 1995) จนกระทั่งปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานถึงการต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งสปีชีส์ต่าง ๆ (Lightner and Redman, 1998)

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและย้อมด้วยวิธี negative stain พบว่า ไวรัสหัวเหลืองมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 50–60 x 190–200 nm ภายในเป็น nucleocapsid ล้อมรอบด้วย envelope ปุ่มปมหรือหนาม (Nadala et al., 1997) เมื่อศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าไวรัสนี้มีสารพันธุกรรม (genome) ชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) (Wongteerasupaya et al., 1995) (รูปที่ 3) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS- PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนัก 135 กิโลดาลตันเป็น glycosylated protein ซึ่งมีลักษณะคล้าย Rhabdovirus (Nadala et al., 1997) แต่ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่า genome ของ YHV เป็น positive-sense RNA (Tang and Lightner, 1998) ซึ่งจากการศึกษาลำดับเบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ gill-associated virus (GAV) จากออสเตรเลีย (Cowley et al., 1999) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวและการแสดงออกของยีนคล้ายกับ coronaviruses, toroviruses และ arteriviruses จึงได้จัด YHV และ GAV ใน genus Okavirus family Roniviridae รวมอยู่ใน order Nidovirales (Cowley et al., 2000 ; Sittidilokratna et al., 2002) และจากการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของยีนส่วนประกอบของโปรตีนโครงสร้างของ YHV พบว่าประกอบด้วยโปรตีนขนาด 116 64 และ 20 kD (Jitrapakdee et al., 2003) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่รายงานโดย Nadala et al. (1997) เล็กน้อย แต่เพื่อป้องกันการสับสนจึงยังคงใช้ขนาดของโปรตีนตามเดิมไปก่อน



รูปที่ 3 Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลี่ยมเตรียมโดย negative staining
a. ภาพกำลังขยายต่ำ scale bar = 150 nm b. ภาพกำลังขยายสูง scale bar = 50 nm
(Wongteerasupaya et al., 1995)

ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาโรคหัวเหลี่ยมได้ ดังนั้นวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่นักวิชาการหลายกลุ่มทำการศึกษาเพื่อเสนอแนะวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่ผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดการที่ดีทั้งในเรื่องอาหาร น้ำ และพื้นบ่อจะลดโอกาสการเกิดโรคได้มาก หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง รักษาสภาพพื้นบ่อให้สะอาด รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ระหว่างบ่อเลี้ยงปนกัน การเพาะเลี้ยงระบบปิดและการตรวจคุณภาพน้ำ (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543; Flegel and Sriurairatana. 1993) นอกจากนี้การกำจัดสัตว์ต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรพอด (arthropod) ที่เชื่อว่าอาจเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลี่ยมก่อนปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยง ก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัวเหลี่ยมได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุ้ง อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันเหล่านี้ก็ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุด เนื่องจาก ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมมาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลี่ยม ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกุ้งวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลี่ยม ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัย

สามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย วิธีการนี้จะช่วยลดเวลาในการตรวจได้รวดเร็วมีความไวสูง (Wongteerasupaya et al., 1997) ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ และความชำนาญทางเทคนิค RT-PCR เป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูงในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากค่าตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทาง PCR มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 800 บาทต่อตัวอย่าง) ทั้งไม่สามารถรองรับความแม่นยำตลอดการนำผลมาเทียบเคียงกันระหว่างห้องปฏิบัติการได้เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน และวิธีการสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยก็แตกต่างกันไปด้วย หากมีผลการตรวจที่ขัดแย้งกัน อาจทำให้เกิดความสับสนขึ้นกับผู้ใช้บริการได้และส่งผลให้ผู้ใช้บริการเกิดความไม่มั่นใจในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการนี้ และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคนิค RT-PCR มีข้อจำกัดในด้านการใช้

สำหรับวิธีตรวจอื่น ๆ อย่างเช่น การตรวจทางชิ้นเนื้อและพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยการดูอาการของโรค (symptomatic diagnosis) ก็ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและอาการของโรคมักจะมีการเกี่ยวข้องกับติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ก็จะไม่ให้ผลที่น่าเชื่อถือในทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส YHV

เมื่อ 3 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรั่มเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส YHV และ WSSV (Loh et al., 1997) โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามการใช้โพลีโคลนอลแอนติซีรั่มเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำและวิธี Western blot ก็ไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยสามารถประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kD ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) ของ YHV (Nadala et al., 1997) โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และในสภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกึ่งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของ YHV ขนาด 22, 67 และ 135 kD เพิ่มเติมได้ (Sithigorngul et al., 2002)

โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form และแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry ได้

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยตรงสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ immunohistochemistry, dot blot และ Western blot แต่ในแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันคือ

-Immunohistochemistry เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก สามารถใช้วินิจฉัยเนื้อเยื่อและ haemocyte ของกุ้งที่ติดเชื้อเพียงเล็กน้อยโดยที่กุ้งยังไม่แสดงอาการของโรค (Sithigorngul et al., 2000) แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีนี้ต้องทำในห้องปฏิบัติการ เพราะต้องผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้ paraffin section ซึ่งกินเวลามากถึง 3 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีมาก ไม่สะดวกในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก และการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องตรวจดูจาก section บาง ๆ สามารถตรวจดูได้เพียงบริเวณแคบ ๆ ถ้าการติดเชื้อมีน้อยอาจตรวจไม่พบ

-Dot blot เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วสามารถทำได้ง่ายนอกห้องปฏิบัติการ เพราะไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน สามารถเจาะเลือดมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method ประมาณ 6 ชั่วโมง แต่วิธีนี้มีความไวค่อนข้างต่ำใช้ได้ดีกรณีที่กุ้งติดเชื้อมาก และนอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาก่อให้เกิด background staining เนื่องจากการจับของแอนติบอดีกับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเลือดแบบไม่จำเพาะ ทำให้เกิดความสับสนกรณีที่ติดเชื้อปริมาณน้อยจึงทำให้ความแม่นยำต่ำ

-Western blot เป็นวิธีคล้ายกับ dot blot แต่ทำการแยกโปรตีนของไวรัสก่อนแล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method จึงต้องเพิ่มเวลาในการแยกโปรตีนและย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสทำให้ใช้เวลาเพิ่มขึ้น ความแม่นยำจะสูง แต่ความไวยังคงต่ำเช่นกันและต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไว ความแม่นยำสูง ทำได้ง่ายและอาจทำนอกห้องปฏิบัติการได้ โดยการใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัส ตรึงและรวบรวมไวรัสในหลุมของ ELISA plate แล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method สำหรับตรวจสอบ ไวรัสทำให้สามารถใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบปริมาณมากได้และทำได้ทั้งการตรวจไวรัสในเลือดหรือเนื้อเยื่อก็ได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อนมากนัก และอีกทั้งยังเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจให้ง่ายขึ้นเช่นกรณีของชุดตรวจการตั้งครรภ์

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wongteerasupaya et al. (1997) ได้พัฒนา RT-PCR สำหรับตรวจการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยใช้ primer ขนาด 135 bp สามารถใช้ตรวจไวรัสปริมาณน้อยมาก

ประมาณ 0.01 pg ของ YHV-RNA และตรวจพบไวรัสในเลือดกุ้งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดจากเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมง

Loh et al. (1997) และ Nadala et al. (1997) ได้ผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ YHV และใช้ Western blot ในการตรวจการติดเชื้อ YHV ในกุ้ง *Penaeus vanamei* พบว่าแอนติซีรัมสามารถตรวจพบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 170, 135, 67 และ 22 kDa และสามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหลังจากกุ้งได้รับการฉีดไวรัสตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป

Poulos et al. (1999) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Taura syndrome virus (TSV) และสามารถใช่วิธี dot blot และ Western blot ในการตรวจหาไวรัสจาก haemolymph ของกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงได้ แต่ในกรณีของกุ้งที่ติดเชื้อเรื้อรังผลการตรวจยังค่อนข้างแปรปรวนต้องพัฒนาให้มีความไวสูงขึ้น

Nadala et al. (2000) ได้ใช้เทคนิค dot blot ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV ในกุ้ง *Penaeus vanamei* โดยใช้ rabbit anti-YHV Ig HRP conjugate พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสในสารสกัดเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสที่เจือจาง 1:10 เท่า ซึ่งมีความไวค่อนข้างต่ำ

Sithigorngul et al. (2000) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ YHV โดยแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kD ซึ่งสามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัสได้ โดยมีความไวและความจำเพาะสูงโดยใช่วิธี dot blot, Western blot และ immunocytochemistry ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะวิธี immunocytochemistry สามารถตรวจพบการติดเชื้อ YHV ได้แม้ในกุ้งที่ยังไม่แสดงอาการของโรคก็ตาม

Sithigorngul et al. (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV เพิ่มเติมขนาด 22, 67 และ 135 kD จากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูเมาส์ด้วย YHV ที่ทำให้บริสุทธ์บางส่วนจาก haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV โดยการฉีด สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 4 กลุ่ม แอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับ native protein ของ YHV ขณะที่อีก 3 กลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form แอนติบอดีทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนขนาด 22 kD จะให้ผลการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry ดีที่สุดในแง่ของความเข้มและความชัดในการย้อม

สำหรับรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคในกุ้งมีการใช้ในการตรวจโรค WSSV ได้แก่การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VP28 protein ของ WSSV โดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูด้วย WSSV บริสุทธ์ ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลนที่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (Poulos et al., 2001) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV โดยใช้ recombinant VP28 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 โคลนซึ่งสามารถนำไปพัฒนาติดสลาไกด้วย biotin สำหรับตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี

antigen capture ELISA พบว่ามีความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไวรัสบริสุทธิ์ได้ 4 โคลนซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี dot blot (Anil et al., 2002)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV ซึ่งสามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยจำนวนมากสามารถที่จะพัฒนาไปสู่การใช้งานในรูปแบบที่มีความไวสูงและสามารถใช้ได้โดยบุคคลทั่ว ๆ ไป การศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มด้วยการพัฒนา sandwich ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงโดยจะทดสอบทั้งในรูป indirect และ direct sandwich ELISA เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจแบบง่าย ๆ สำหรับเกษตรกรต่อไป

วิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซื้อจากฟาร์มใกล้เคียงกรุงเทพ ฯ ขนาด 20-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt กุ้งก้ามกรามซื้อจากจังหวัดอยุธยา ขนาด 15-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำจืดสำหรับเก็บเลือดเพื่อใช้เจาะจางเลือดกุ้งกุลาดำและเป็น negative control สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

2. การเตรียมไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV)

นำกุ้งกุลาดำฉีดด้วย haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV เจือจาง 1 : 1000 สังเกตการติดเชื้อประมาณ 2-3 วัน เลือกกุ้งที่แสดงอาการติดเชื้อนำมาเจาะเลือดผสมกับน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Rodriguez et al., 1995) ในอัตราส่วน 1 : 1 ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกที่ 3000 g นำ supernatant มาตกตะกอนที่ 33 % saturated ammonium sulfate ละลายตะกอนด้วยใน 2X PBS นำไปปั่นที่ 3000 g แยกส่วนของตะกอนที่ไม่ละลายออกก่อนนำไปปั่นแยกไวรัสที่ 100,000 g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 2X PBS 2 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 2X PBS หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford et al. (1976) แบ่งเป็นส่วนย่อย ๆ หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -70°C ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวรัสที่ได้โดย SDS-PAGE และ Western blot

3. การเตรียม rabbit anti YHV antiserum

3.1 นำไวรัส YHV ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดให้กระต่ายขาวทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) และได้ผิวหนัง (intradermal injection) อีก 2 แห่งในอัตราประมาณ 5 มิลลิกรัม/ตัว ฉีดซ้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดจากใบหูกระต่ายทิ้งให้แข็งตัว นำมาปั่นแยกซีรัมออกที่ 3000 g เป็นเวลา 30 นาที

3.2 เตรียม haemolymph เชื่อมต่อกับเม็ดเลือดแดงของแกะ (haemolymph-SRBC) นำ haemolymph จากกุ้งก้ามกรามและจากกุ้งกุลาดำปกติ (RT-PCR negative) มาเชื่อมต่อกับเม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cell = SRBC) โดยผสม haemolymph กับ SRBC ในอัตราส่วน 2 : 1 เติมน้ำ PBS 3 เท่าและเติม paraformaldehyde ให้เป็น 4 % ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงล้างด้วย PBS 5 เท่าตัวจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเจือจางด้วย PBS ให้ได้ 2 % SRBC และเติม 0.01 % thimerosal เก็บไว้ที่ 4°C

3.3 การดูดซับ rabbit anti-YHV antiserum ด้วย haemolymph-SRBC ในอัตราส่วน 1 : 5 ทิ้งไว้ประมาณ 8 ชั่วโมงที่ 4°C โดยเขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจาย นำไปปั่นที่ 1500 g แยก supernatant ออก ทดสอบความจำเพาะของ antiserum ที่ได้โดยวิธี Western blot

3.4 การทำให้บริสุทธิ์ rabbit anti-YHV antibody นำ serum มาตกตะกอนด้วย 40 % saturated NH_4SO_4 ที่ 4°C ปั่นที่ 3,000 g แยกตะกอนออกและนำไป dialyzed และละลายใน

PBS จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Protein A column ผสมแอนติซีรั่มกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผ่าน protein A column ล้างด้วย binding buffer และเก็บแอนติบอดีโดยใช้ elution buffer จากนั้นนำไป dialyzed ด้วยน้ำกลั่นและทำให้เข้มข้นด้วย vacuum concentrator (Savant) เติม 5X PBS ในอัตราส่วน 5 : 1 ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford reagent แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บไว้ที่ -70°C

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ rabbit anti YHV antiserum
ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ rabbit anti YHV antiserum ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย NH_4SO_4 และ protein A column โดย SDS-PAGE ตรวจสอบความจำเพาะของ rabbit anti YHV antiserum โดย Western blot ของ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและ YHV ที่แยกจาก haemolymph เปรียบเทียบกับ monoclonal antibodies V3-2B, Y18 และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัส YHV และ immunohistochemistry

4. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry

นำ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและกิ้งปกติมาแยกด้วยกระบวนการ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) นำตัวอย่างในเจลส่วนหนึ่งไปย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 ตัวอย่างในเจลอีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ Transblot Cell (BioRad) จากนั้นนำไปบ่มใน rabbit anti-YHV antiserum ที่เจือจางใน 5 % blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ 37°C ล้างใน 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมงใน goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP-Biorad) เจือจาง 1:1,000 (ใน 5 % blotto, 40 % haemolymph ของกิ้งปกติ) หลังจากล้าง 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย 0.03 % diaminobenzidine, 0.006 % hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

สำหรับการประมาณตำแหน่งของแถบโปรตีนของไวรัส ทำโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลส นั้นไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ haemocyanin (PMVS-22) (Longyant et al., 2000) และใส่สารละลายสับสเตรทที่ไม่มี cobalt chloride

ส่วนการตรวจทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้โดยวิธี immunohistochemistry ทำโดยนำเนื้อเยื่อที่เตรียมใน paraffin section มาละลายพาราฟินออก หยอดด้วย P_1^+ (10 % calf bovine serum เจือจางใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยอดด้วย P_1^+ , rabbit anti-YHV antiserum และย้อมด้วย GAR-HRP ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin แล้วทำเป็นสไลด์ถาวร

5. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B, Y18 และ Y19

นำ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีทั้ง 3 clone มาเลี้ยงใน RPMI เสริมด้วย 10 % fetal calf serum จนกระทั่ง culture media เปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำไปปั่นแยก culture media ออกจากเซลล์ ตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดย Western blot แบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็นส่วน ๆ เก็บที่ -70°C

6. Indirect sandwich ELISA

6.1 การทดสอบหาปริมาณ rabbit anti YHV antibody ที่เหมาะสม

ตั้ง rabbit anti YHV antibody ความเข้มข้น 5 2 1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งเดิม 0.5 % blotto 150 ไมโครลิตรเพื่อล้างแอนติบอดีส่วนเกินและปิด binding site ที่เหลือ เดิม haemolymph ของกิ้งก่าดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย 5 % blotto 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เดิมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ชนิดเจือจาง 1 : 25 ด้วย 5 % blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เดิม rabbit anti mouse IgG H+L minimal cross-reaction to human serum proteins horseradish peroxidase conjugate (RAM-HRP II-Pierce) เจือจาง 1 : 2,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เดิม substrate ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 0.006 % hydrogen peroxide (H_2O_2) ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง (OD.) ที่ 590 nm ด้วย microtiter plate reader ตรวจสอบค่า titer OD. สูงสุดที่ได้และ background ที่เกิดจาก haemolymph ของกิ้งก่าดำปกติ หาปริมาณ rabbit anti YHV antibody ที่เหมาะสม

6.2 การทดสอบหาชนิดและความเข้มของ anti-mouse IgG-HRP ที่เหมาะสม

ตั้ง rabbit anti YHV antibody ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และนำไปผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับข้อ 6.1 ซึ่งหลังจากล้างด้วย 0.5 % blotto เพื่อเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ส่วนเกินออกแล้ว เดิม anti-mouse IgG-HRP ชนิดต่าง ๆ คือ goat anti-mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP-Biorad) หรือ rabbit anti-mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (RAM-HRP I-Pierce) หรือ RAM-HRP II เจือจางระดับต่าง ๆ คือ 1 : 1,000 1 : 2,000 หรือ 1 : 3,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ จากนั้นผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 6.1 หลังจากวัดค่าดูดกลืนแสง

แล้ว ตรวจค่า titer OD. สูงสุดที่ได้และ background ที่เกิดจาก haemolymph ของกิ้งกูดำปกติ หาชนิดและปริมาณของ anti-mouse IgG-HRP ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด

ทำการทดลอง sandwich ELISA เช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดคือ V3-2B หรือ Y18 หรือ Y19 เจือจางในระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบ OD. ของระดับความเจือจางต่าง ๆ ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 3 ชนิดที่ได้ซึ่งยังคงให้ค่า OD. สูงสุดมากกว่า 3.0

7. Direct sandwich ELISA

7.1 การเตรียม ascites fluid ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

เลี้ยง hybridoma clone V3-2B นำมา reclone เพื่อคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดีขยายเซลล์จนมีจำนวนประมาณ 50 ล้านเซลล์ ปั่นแยกเซลล์นำไปฉีดให้หนูขาวที่ฉีด pristane (0.5 มิลลิลิตร/ตัว) ล่วงหน้าอย่างน้อย 2 สัปดาห์ในปริมาณ 5 ล้านเซลล์/ตัวทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วัน ตรวจเช็คการเจริญของ hybridoma เลือกหนูที่มีการเจริญของ ascites tumor เต็มที่มาเจาะ ascites fluid จากช่องท้องออกรวบรวม ปั่นแยกเซลล์ออกที่ 3,000 g ดูดซับแอนติบอดีที่ได้โดยด้วย haemolymph-SRBC conjugate (เหมือนข้อ 3.3) ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์โดยนำมาตกตะกอนด้วย 40 % saturated NH_4SO_4 ที่ 4 °C และนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยผ่าน Protein G column (เหมือนข้อ 3.4) จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดย Western blot และ immunohistochemistry

7.2 การเตรียม V3-2B-HRP conjugate (Javois. 1999)

ละลาย HRP ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติม 0.1 M sodium periodate ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที นำไป dialyzed ใน 1 mM sodium acetate buffer pH 4.4 2 ครั้ง ทิ้งข้ามคืน ผสมแอนติบอดี V3-2B ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรละลายใน PBS pH 8 (10 mM potassium phosphate 50 mM NaCl) ในสารละลาย peroxidase และเติม 0.5 M sodium carbonate buffer pH 9.5 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (ปรับ pH ให้เป็น 9.5 โดยเพิ่ม buffer อีกเล็กน้อย) ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม sodium borohydride (4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้น dialyse ใน PBS 3 ครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งเป็นส่วน ๆ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพเทียบกับวิธี indirect sandwich ELISA

7.3 ตรวจสอบความเข้มข้นของ V3-2B-HRP conjugate ที่เหมาะสม

ทำการทดลอง sandwich ELISA เช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยใช้ V3-2B-HRP conjugate แทน V3-2B และ anti-mouse IgG-HRP เปรียบเทียบ OD. ที่ได้กับ indirect sandwich ELISA

8. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

นำ haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ YHV มาเจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ haemolymph ของกิ้งกูดดำเป็นตัว diluent นำตัวอย่างปริมาณ 200 ไมโครลิตรมาสกัดกรดนิวคลีอิกของไวรัสโดยใช้ชุดสำเร็จรูป (Roche Molecular Biochemicals) นำกรดนิวคลีอิกที่ได้ไปทำ RT-PCR โดยใช้ SuperScript one step RT-PCR system (GIBCO BRL) โดยใช้ไพรเมอร์ YHV10F (CCGCTAATTTCAAAACTA CG) และไพรเมอร์ YHV144R (AAGGTGTTATGTCCG AGGAAG) (Wongteerasupaya et al., 1997) PCR-product ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วย 2 % agarose electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 Volt ประมาณ 1 ชั่วโมงใน Tris-borate-EDTA (TBE) buffer และย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะให้ผลผลิตขนาด 135 bp

ผลการทดลอง

1. การเตรียมไวรัส YHV

กึ่งกลาต่ำประมาณ 120 ตัวนำมาเก็บ haemolymph ได้ 150 มิลลิลิตร นำมาแยกไวรัส ได้ประมาณ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างมาแยกด้วย SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue พบแถบโปรตีนหลักของไวรัสที่ 135 67 และ 22 kD โดยมีแถบโปรตีนขนาด 170 kD ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ปะปนมาเล็กน้อยความบริสุทธิ์ของไวรัสมากกว่า 90 % (รูปที่ 4A)

2. การเตรียม rabbit anti YHV antiserum

จากการฉีด YHV ให้กระต่ายจำนวน 4 ตัว พบว่ากระต่ายทุกตัวมีการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีต่อ YHV ครบทุกส่วนคือต่อโปรตีนขนาด 135 67 และ 22 kD ซึ่งเมื่อทดสอบด้วย haemolymph-SRBC conjugate แล้วไม่พบ cross reactivity กับโปรตีนอื่น ๆ ใน haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งที่ติดเชื้อ (รูปที่ 4B) และเมื่อทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry พบว่า rabbit anti YHV antiserum ที่ได้สามารถย้อมเนื้อเยื่อของกึ่งบริเวณที่ติดเชื้อ YHV ได้ (รูปที่ 5) สามารถเก็บ serum ของกระต่ายได้ประมาณ 100 มิลลิลิตรและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ประมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรได้จำนวน 5 มิลลิลิตร

3. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B Y18 และ 19

เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 3 clone ทดสอบความจำเพาะโดยวิธี Western blot พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 3 มีความจำเพาะคงที่ตามรายงานใน Sithigorngul et al., 2002 (รูปที่ 4C, D และ E)

4. Sandwich ELISA

4.1 ปริมาณ rabbit anti YHV antibody ที่เหมาะสม

จากการใช้ rabbit anti YHV antibody ความเข้มข้น 5 2 1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรที่หุ้มถาด ELISA ตรวจสอบโดยวิธี indirect sandwich ELISA พบว่าที่ 5 2 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรให้ค่า OD สูงสุดและต่ำสุดกับ haemolymph ของกึ่งติดเชื้อ YHV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ใกล้เคียงกันและสูงกว่าที่ 0.5 ไมโครกรัม แต่สำหรับกรณีของ 5 และ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรให้ background staining สูงกว่าที่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรดังตารางที่ 1 และที่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า OD. ของ haemolymph ของกึ่งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง 1 : 10,000 มีความแปรปรวนต่ำกว่าที่ 0.5 2 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้นของ rabbit anti YHV antibody ที่เหมาะสมได้แก่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 ชนิดและความเข้มข้นของ anti-mouse IgG-HRP 3 ชนิด

RAM-HRP II ที่ความเข้มข้น 1 : 2,000 ให้ค่า OD. สูงกว่าที่ความเข้มข้น 1 : 3,000 และไม่แตกต่างจาก 1 : 1,000 แต่ที่ความเข้มข้น 1 : 1,000 ให้ค่า OD. กับ normal haemolymph สูงกว่า ซึ่งทั้ง GAM-HRP และ RAM-HRP I ให้ค่า OD. ที่ความเข้มข้น 1 : 2,000 ต่ำกว่าและเกิด background สูงกว่า (ตารางที่ 2) ซึ่งเมื่อหักความเข้มข้นของ background แล้วจะได้ค่า OD. ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น RAM-HRP II จึงมีคุณภาพดีกว่าแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด การศึกษาครั้งต่อไปจึงใช้ RAM-HRP II

4.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด

จากการเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ที่ระดับต่าง ๆ ใน sandwich ELISA พบว่าที่ระดับเจือจางของ culture fluid 1 : 800 ยังคงให้ค่า OD. สูงสุดมากกว่า 3.0 ดังนั้นค่าระดับความเจือจางที่เหมาะสมใช้ประมาณ 1 : 400 เท่า แต่เมื่อใช้ haemolymph ของกิ้งกือติดเชื้อ YHV ที่ผสม 1 % triton X-100 พบว่าค่า OD. สูงสุดลดลงเล็กน้อย สำหรับกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ให้ค่า OD. สูงสุดเฉพาะกับตัวอย่าง haemolymph ของกิ้งกือที่ติดเชื้อ YHV ที่ผสมกับ 1 % triton X-100 เท่านั้น โดยค่าระดับความเจือจางที่เหมาะสมใช้ประมาณ 1 : 50 เท่า สำหรับ haemolymph ปกติให้ค่า OD. ต่ำมาก แต่กรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18 ให้ค่า OD. ต่ำทั้งกรณีของ haemolymph ปกติและผสมกับ triton X-100 (ตารางที่ 3) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถใช้ตรวจสอบ YHV ได้ดีได้แก่ V3-2B แต่กรณีของ Y19 จะใช้ตรวจได้ก็ต้องใช้ตัวอย่างผสมกับ triton X-100 เท่านั้น ซึ่งการผสม triton X-100 มีผลต่อการจับของ V3-2B บ้างเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูงแต่ไม่มีผลที่ความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง V3-2B และ Y19 ร่วมกันได้ ในกรณีของ Y18 มีการจับกับ YHV ต่ำไม่ว่าจะผสมกับ Triton X-100 หรือไม่ก็ตาม

4.4 ความไวของการตรวจหา YHV โดย indirect sandwich ELISA

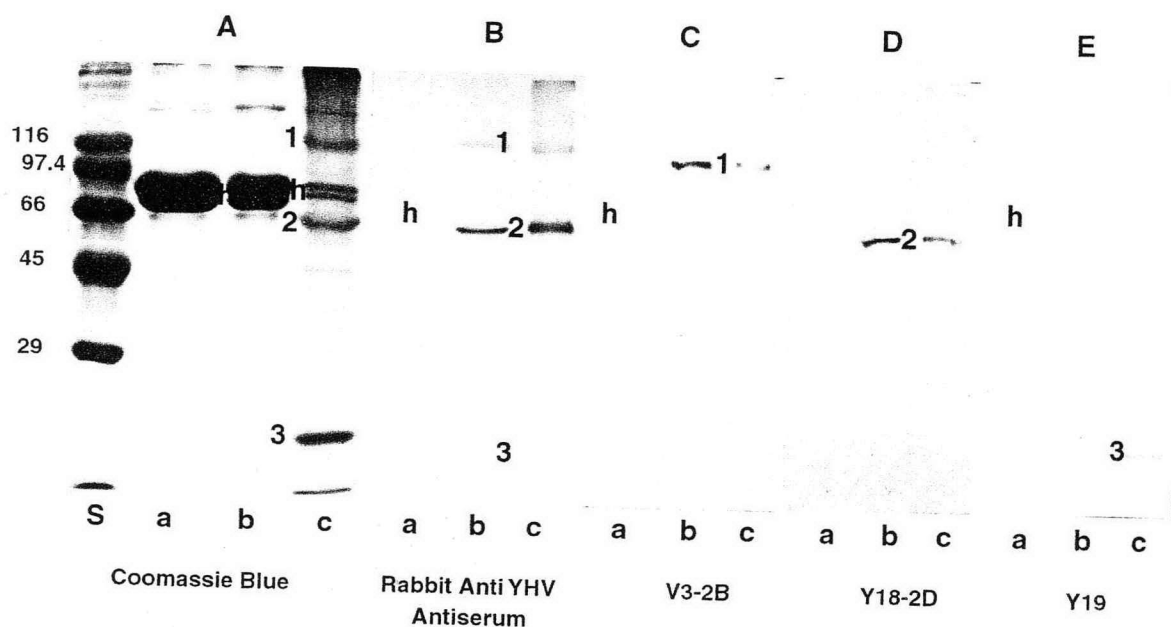
จากการใช้วิธี indirect sandwich ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ตรวจหา YHV ใน haemolymph จากกิ้งกือล่าดำที่ติดเชื้อในสภาพปกติหรือผสมกับ triton X-100 ที่เจือจางด้วย normal haemolymph ของกิ้งกือก้ามกรามนั้นพบว่าสามารถเจือจางได้ถึง 1 : 64,000 เท่า โดยยังให้ค่า OD. มากกว่า background 0.2 หน่วย (ตารางที่ 4) แต่กรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 สามารถเจือจางได้ 1 : 100,000 เท่า ซึ่งใช้ได้เฉพาะตัวอย่าง haemolymph ที่ผสม triton X-100 เท่านั้น ซึ่งเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันค่า titer ของ haemolymph จากกิ้งกือล่าดำที่ติดเชื้อ YHV ในสภาพปกติหรือผสมกับ triton X-100 ค่า OD. เพิ่มขึ้นสามารถเจือจางตัวอย่างได้ 1 : 250,000 เท่า

4.5 ความไวของการตรวจหา YHV โดย direct sandwich ELISA

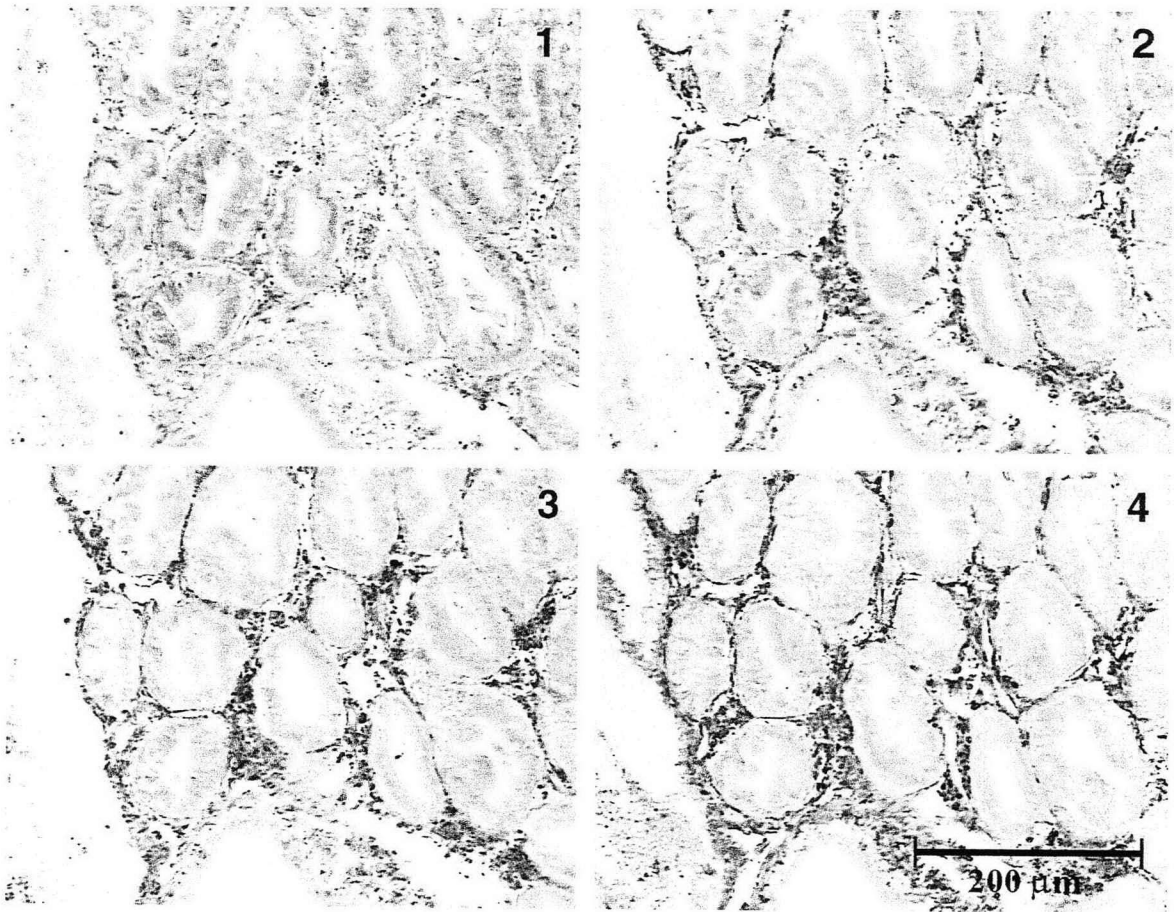
จากการตรวจหา YHV ใน haemolymph จากกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อในสภาพปกติด้วยวิธี direct sandwich ELISA โดยเจือจาง V3-2B-HRP conjugate ที่ระดับต่าง ๆ นั้นพบว่าเมื่อเจือจาง V3-2B-HRP conjugate ประมาณ 1 : 200 เท่า ได้ค่า OD. 0.294 ซึ่งต่ำกว่าวิธี indirect sandwich ELISA มาก (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการ conjugate กับ HRP อาจเสียความสามารถในการจับกับเชื้อ YHV ไป ดังนั้นวิธี direct sandwich ELISA มีความไวต่ำกว่า indirect sandwich ELISA มากเนื่องจากไม่มีการขยายสัญญาณโดยแอนติบอดีตัวที่สอง

5. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

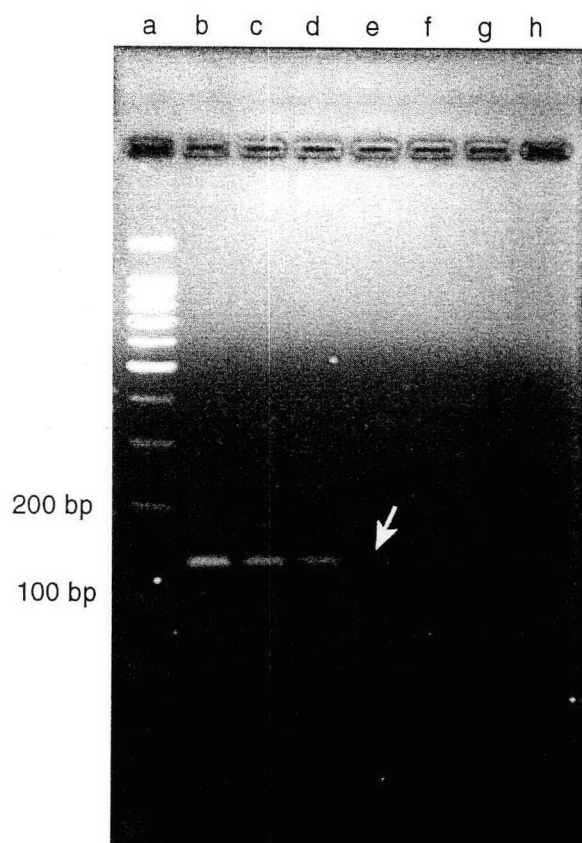
สำหรับการตรวจหา YHV ใน haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบ YHV ใน haemolymph ที่เจือจางด้วย haemolymph ของกิ้งกูดประมาณ ~ 1,000,000 เท่า (รูปที่ 6) โดยเห็นเพียงแถบบาง ๆ ของ PCR-product ที่ 135 bp (ลูกศร)



รูปที่ 4 SDS-PAGE (A) และ Western blot (B-E) ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก กิ่งกุลาดำ ตัวเลขด้านซ้ายมือเป็นน้ำหนักโมเลกุล (kD) ของโปรตีนมาตรฐาน (A) เจลที่ย้อมด้วย Coomassie blue Western blot ที่ย้อมด้วย (B) rabbit anti YHV antiserum และโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B (C) Y18-2D (D) และ Y19 (E) s = โปรตีนมาตรฐาน a = haemolymph ของกิ่งกุลาดำปกติ b = haemolymph ของกิ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV c = YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน 1, 2, 3 = โปรตีนหน่วยย่อยของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ตามลำดับ h = haemocyanin Rabbit anti YHV antiserum มีความจำเพาะต่อ YHV สูงตั้งผลการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยแอนติซีรั่มสามารถจับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 67 และ 22 kD ได้โดยมี background staining เล็กน้อย



รูปที่ 5 Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่ออวัยวะไตโดยใช้ (1) rabbit anti YHV antiserum เทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B (2) Y18 (3) และ Y19 (4) ซึ่ง rabbit anti YHV antiserum สามารถย้อมบริเวณที่ติดเชื้อ YHV (ติดสีน้ำตาล) ได้ดีเช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี



รูปที่ 6 RT-PCR (a) DNA marker (100 bp ladder) haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของ กุ้งก้ามกรามปกติคือ (b) $1 : 2.5 \times 10^4$ (c) $1 : 1 \times 10^5$ (d) $1 : 5 \times 10^5$ (e) $1 : 1 \times 10^6$ (f) $1 : 2.5 \times 10^6$ (g) $1 : 5 \times 10^6$ ตาม ลำดับ และ (h) haemolymph ของกุ้งก้าม กรามปกติ PCR product ที่ 135 bp ลดลง จนเห็นเพียงเล็กน้อยที่ระดับเจือจาง $1 : 1,000,000$ เท่า (ลูกศร)

ตารางที่ 1 Indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody เจือจางระดับต่าง ๆ ตีรัง
แต่ละแถวของ microtiter plate และใช้ V3-2B เจือจาง 1 : 25 และ RAM-HRP II เจือจาง
1 : 2,000 เป็น detection antibody (n = 8)

ระดับความเจือจางของ rabbit anti YHV antibody (µg/ml)	ค่า OD.			
	Haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง		Haemolymph ของกิ้งปกติเจือ จาง 1 : 20	Background stain
	1 : 20	1 :10,000		
5	>3.000	0.406 ± 0.078	0.063 ± 0.066	0.191 ± 0.074
2	>3.000	0.263 ± 0.019	0.044 ± 0.012	0.034 ± 0.023
1	>3.000	0.234 ± 0.009	0.045 ± 0.024	0.018 ± 0.015
0.5	2.317 ± 0.267	0.266 ± 0.042	0.084 ± 0.061	0.021 ± 0.036

ตารางที่ 2 Indirect sandwich ELISA เพื่อตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-mouse IgG-HRP ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีเรียงแต่ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody และใช้ V3-2B เจือจาง 1 : 25 (n = 8)

ชนิด anti-mouse IgG-HRP	ระดับความเจือจาง	ค่า OD.			
		Haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง		Haemolymph ของกิ้งปกติ เจือจาง 1 : 20	Background stain
		1 : 20	1 : 10,000		
GAM-HRP	1 : 1000	>3.000	0.319 ± 0.062	0.196 ± 0.018	0.260 ± 0.042
	1 : 2000	2.534 ± 0.044	0.252 ± 0.059	0.152 ± 0.031	0.229 ± 0.083
	1 : 3000	2.175 ± 0.022	0.218 ± 0.010	0.132 ± 0.042	0.107 ± 0.023
RAM-HRP I	1 : 1000	>3.000	0.526 ± 0.023	0.347 ± 0.025	0.328 ± 0.023
	1 : 2000	2.907 ± 0.037	0.391 ± 0.006	0.211 ± 0.013	0.214 ± 0.012
	1 : 3000	2.379 ± 0.028	0.252 ± 0.009	0.073 ± 0.009	0.091 ± 0.009
RAM-HRP II	1 : 1000	>3.000	0.418 ± 0.023	0.144 ± 0.019	0.106 ± 0.018
	1 : 2000	>3.000	0.283 ± 0.019	0.065 ± 0.011	0.056 ± 0.022
	1 : 3000	2.778 ± 0.041	0.214 ± 0.009	0.017 ± 0.005	0.028 ± 0.007

ตารางที่ 3 การทดสอบความสามารถในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีรังแต่ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody Haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV ตามปกติหรือผสม 1 % Triton X-100 และใช้ RAM-HRP II เจือจาง 1 : 2,000 (K = 1000, ND = ไม่ได้ทดลอง)

	Haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง 1 : 20	ค่า OD. ของ MAb เจือจางระดับต่าง ๆ										
		1:10	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1.6K	1 : 3.2K	1 : 6.4K	1 : 128K
2B	Native	ND	>3.000	ND	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	2.889	2.356	1.716	1.291
	+Triton X-100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	Native	0.531	ND	ND	0.436	0.206	0.160	0.083	0.078	0.063	ND	ND
	+Triton X-100	0.511	ND	0.122	0.068	0.015	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	Native	1.225	ND	ND	0.636	0.409	0.310	0.255	0.192	0.054	ND	ND
	+Triton X-100	>3.000	ND	>3.000	2.821	2.753	2.697	2.485	1.990	1.539	1.030	0.678

ตารางที่ 4 ความไวของการตรวจหา YHV ใน haemolymph โดย indirect sandwich ELISA แสดงค่า OD. ของ haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีรังแต่ ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody และใช้ RAM-HRP II เจือ จาง 1 : 2,000 (K = 1000, n = 4)

ชนิด MAb	YHV	ค่า OD. ของ haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ									
		1 : 20	1 : 1K	1 : 2K	1 : 4K	1 : 8K	1 : 16K	1 : 32K	1 : 64K	1 : 128K	1 : 256K
V3-2B 1 : 400	Native	>3.000	>3.000	2.717 ± 0.044	1.718 ± 0.045	1.090 ± 0.035	0.658 ± 0.024	0.366 ± 0.027	0.211 ± 0.012	0.119 ± 0.010	0.06 ± 0.005
	+Triton X-100	>3.000	1.941 ± 0.013	1.568 ± 0.015	1.019 ± 0.023	0.688 ± 0.042	0.452 ± 0.058	0.284 ± 0.044	0.183 ± 0.034	0.154 ± 0.084	0.07 ± 0.005
Y19 1 : 50	Native	0.884 ± 0.015	0.488 ± 0.009	0.408 ± 0.005	0.327 ± 0.024	0.255 ± 0.025	0.203 ± 0.006	0.176 ± 0.003	0.155 ± 0.019	0.129 ± 0.015	0.11 ± 0.005
	+Triton X-100	>3.000	2.587 ± 0.002	2.227 ± 0.019	1.713 ± 0.022	1.280 ± 0.018	0.898 ± 0.015	0.595 ± 0.017	0.392 ± 0.020	0.256 ± 0.009	0.18 ± 0.005
V3-2B 1 : 400 + Y19 1 : 50	native	>3.000	>3.000	>3.000	2.409 ± 0.099	1.667 ± 0.032	1.062 ± 0.015	0.680 ± 0.032	0.443 ± 0.020	0.311 ± 0.018	0.22 ± 0.005
	+Triton X-100	>3.000	>3.000	>3.000	2.381 ± 0.033	1.817 ± 0.035	1.269 ± 0.039	0.807 ± 0.012	0.517 ± 0.019	0.353 ± 0.011	0.25 ± 0.005

ตารางที่ 5 การทดสอบความสามารถในการจับของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี-V3-2B HRP conjugate ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV (direct sandwich ELISA) โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีรัง แต่ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody (K= 1000, n = 2)

ชนิด MAb	Haemolymph ของกิ้งกือที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง 1 : 20	ค่า OD. ของ MAb เจือจางระดับต่าง ๆ						
		1 : 200	1 : 1K	1 : 2K	1 : 4K	1 : 8K	1 : 16K	1 : 32K
V3-2B - HRP	Native	0.294	0.273	0.276	0.253	0.188	0.101	0.036

สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจไวรัส YHV โดยวิธี indirect sandwich ELISA โดยการผลิต rabbit anti YHV antibody ($r \alpha$ YHV) ใช้เป็น capture antibody สำหรับจับเชื้อ YHV ในตัวอย่างโดยตรง $r \alpha$ YHV ลงบนภาชนะหลุมชนิด 96 หลุมไว้วางหน้า การตรวจทำโดยใส่ตัวอย่างลงไปในแต่ละหลุม บ่ม 4-6 ชั่วโมง ล้างและใส่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี บ่ม 4-6 ชั่วโมง จากนั้นล้างและใส่ RAM-HRP II บ่มอีก 4-6 ชั่วโมง ล้างและเติม substrate เทียบสีกับ control ที่ระดับต่ำ ค่าที่ได้ถ้าสูงกว่าเป็น positive ขั้นตอนในการทำดัง diagram

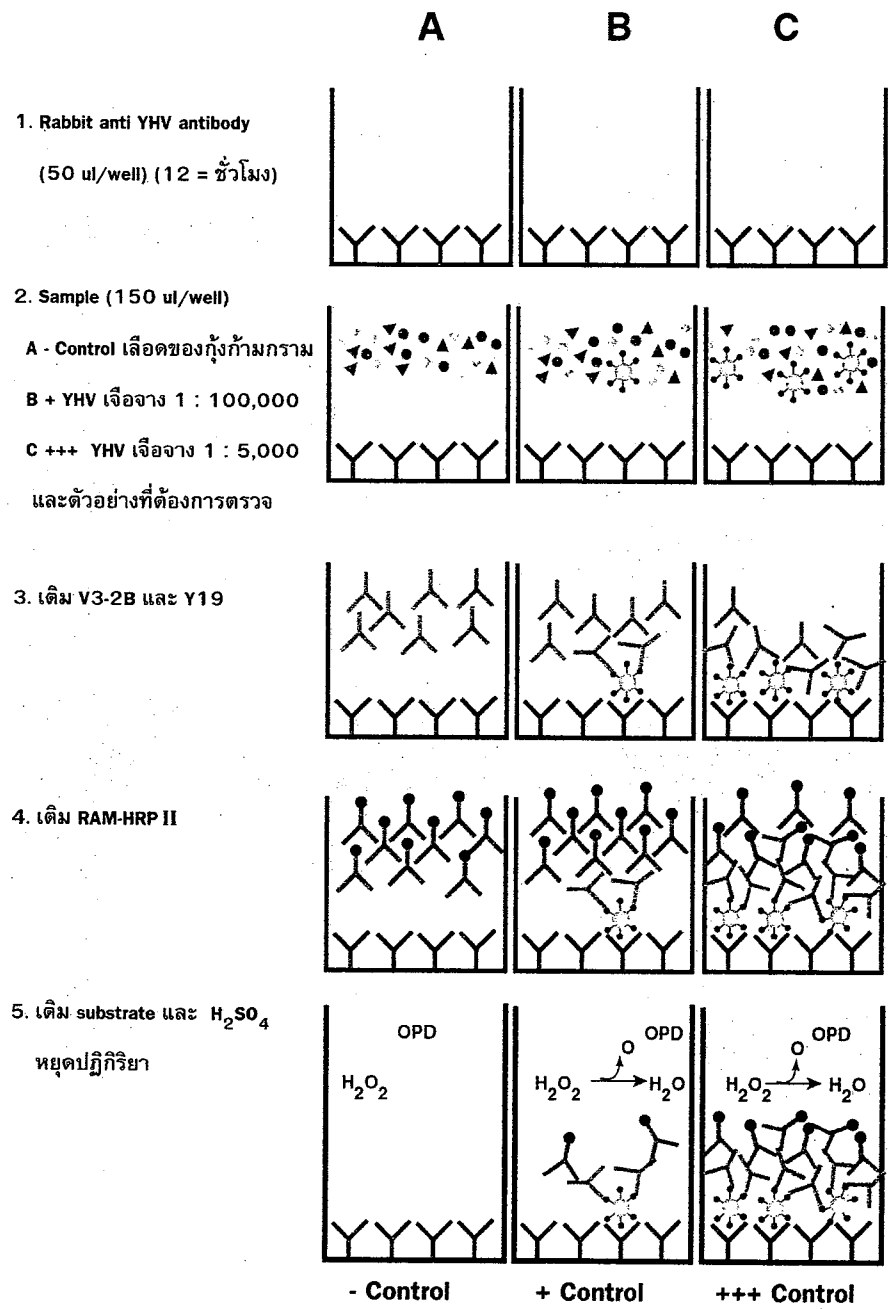
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองพบว่า V3-2B ที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ขนาด 135 kD ให้ผลที่ดีคือสามารถจับกับ YHV ใน haemolymph ของกุ้งที่ติดเชื้อทั้งในสภาพปกติ และในกรณีที่ผสม haemolymph กับ triton X-100 ได้ดี ส่วนกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18 ที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ขนาด 67 kD ไม่ได้ผลเนื่องจากแอนติบอดีอาจจับส่วนที่เป็น hiding epitope สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ขนาด 22 kD นั้น ได้ผลต้องใช้ haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV ผสมกับ triton X-100 เพื่อเป็นการสลายอนุภาคของไวรัสทำให้ epitope ซึ่งอยู่ภายใน nucleocapsid แดกออกมาทำให้ Y19 สามารถจับได้ ซึ่งเป็นการเพิ่ม sensitivity อีก 1 เท่า (ตารางที่ 4)

ส่วน HRP conjugate Ab พบว่าทั้ง GAM-HRP และ RAM-HRP I ให้ background stain ที่สูงกว่า RAM-HRP II ดังนั้นการทดลองจึงใช้ HRP conjugate Ab คือ RAM-HRP II ซึ่งให้ผลดีที่สุด

จากการเปรียบเทียบความไวในการตรวจหา YHV ใน haemolymph ของกุ้งที่ติดเชื้อ พบว่าการตรวจโดยวิธี indirect sandwich ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดต่าง ๆ ของ YHV คือ V3-2B และ Y19 สามารถตรวจพบ YHV ในระดับเชื้อจากประมาณ 1 : 60,000 ถึง 1 : 100,000 เท่า แต่เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดผสมกันจะเพิ่มความไวในการตรวจพบ YHV เชื้อจาก 1 : 250,000 เท่า เมื่อเทียบกับวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจ YHV ที่เชื้อจาก ~ 1,000,000 เท่า ดังนั้นวิธี indirect sandwich ELISA มีความไวต่ำกว่า RT-PCR ~10 เท่า เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเดียว แต่ถ้าใช้ V3-2B และ Y19 ร่วมกันจะมีความไวต่ำกว่า RT-PCR เพียง ~ 4 เท่า ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมากคล้ายกับการรายงานในการใช้วิธีคล้าย ๆ กันใน WSSV ซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็น capture และโมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมต่อกับ alkaline phosphatase พบว่าความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002)

การเผยแพร่สู่ผู้ใช้จะดำเนินการฝึกอบรมพร้อมทั้งชุดตรวจแบบ strip test ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนา องค์ประกอบของชุดตรวจแบบ sandwich ELISA ประกอบด้วยส่วนประกอบดังนี้ (สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้ประมาณ 80-88 ตัวอย่าง) ราคาประมาณ 1,000 บาท

Sandwich ELISA



รูปที่ 7 แผนภูมิขั้นตอนการตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA

เอกสารอ้างอิง

- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543 กู้ไทย 2000. กรุงเทพฯ ฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์.
- สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535. Baculovirus สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุม สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ : 200-205.
- Anil, T.M., Shankar, K.M. and Mohan. C.V. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. Dis. Aquat. Org. 51 : 67-68.
- Boonyaratpalin, S., Supamataya, K., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U. and Chantanachookin, C. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol. 28 (3) : 103-109.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat Org. 17 : 145-157.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. and Walker, P.J. 2000. Gill-Associated virus of *Penaeus monodon* prawns : An invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen Virol. 81 : 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasuoaya, C., Boonsaeng, V. Panyim, S. and Walker, P.J. 1999. Yellow dead virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. Dis. Aquat. Org. 36 : 153-157.
- Flegel, T. and Sriurairatana, S. 1993. Black tiger prawn diseases in Thailand. Page 6 in D.M. Akiyama, editor. Technical Bulletin AQ39 1993/3, American Soybean Association, Singapore 0923.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), Diseases in Aquaculture III., Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p 285-302.

- Javois, L.C. 1999. Immunocytochemical methods and protocols. Methods in molecular biology. V115 2nd ed. 465p.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquacultures. 164 : 201-220.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., LU, Y. and Nadala, E.C.B. Jr. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. Advances in Virus Research .48 : 263-311.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Thampalerd., N., Sithigorngul., W., and Menasveta. P. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. Invert. Reprod. Dev. 37(3) : 211-221.
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, J.A. and Loh, P.C. 1994. Infection of the yellow head baculovirus (YHB) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish. Dis. 17: 649-656
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, Loh, P.C. and Brock, J.A. 1995. Distribution of yellow head virus in selected tissue. Dis. Aquat. Org. 23 : 67-70.
- Lui, W., Wang, Y.T., Tian, D.S. Yin, Z.C. and Kwang, J. 2002. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelop protein (28 kDa). Dis. Aquat. Org. 49 : 11-18.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. J. Virol. Meth. 69 : 39-44.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M. and Loh, P.C. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis.Aquat.Org. 31 : 141-146.
- Nadala Jr., E.C.B. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. J. of Virol. Meth. 175-179.

- Poulos, B.T., Kibler, R., Bradley-Dunlop, D., Mohney, L.L. and Lightner, D.V. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 37 : 99-106.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aquilar, J. and Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 47 : 13-23.
- Rodriguez J., Boulo, V., Mialhe, E. and Bachere E. 1995. Characterisation of shrimp haemocyte and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell. Science.* 108 : 1043-1050.
- Sithigorngul, P., Chaüychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49 : 71-76.
- Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Panyim, S., Cowley, J.A., Jittrapakdee, S., Boonsaeng, V. and Walker P.J. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow-head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis. Aquat. Org.* 50 : 87-93.
- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1998. A yellow-head virus probe : application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis. Aquat. Org.* 35 : 165-173.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Anutara, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Thongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.

หน้าว่าง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545

การหาลำดับ cDNA บางส่วน ที่เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีนส่วน
เปลือกของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

Isolation of partial cDNA sequence encoding enveloped
protein of yellow head virus from *Penaeus monodon*

ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธำรงกุล ไพศาล สิทธิกรกุล
ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2546

บทคัดย่อ

ได้ทำการแยกยีน p135 โดยวิธี RT-PCR (ซึ่งใช้ cDNA ที่สร้างจาก RNA ของ YHV เป็น template) พบว่าได้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 4200 bp และจากการหาลำดับ DNA บางส่วน (1720 bp) ของผลผลิต RT-PCR นี้ พบว่ามีความสอดคล้องกับยีน gp116 ของ YHV ที่รายงานโดย Jitrapakdee และคณะ (2003) จากการแยกยีน p65 และ p65F78 (p65 ที่ปราศจาก transmembrane region) โดยวิธี RT-PCR พบว่าได้แถบ DNA ขนาด 1708 bp และ 1630 bp ตามลำดับ แต่ผลการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ จากความพยายามในการแยกยีน p22 โดยวิธี RT-PCR พบว่าได้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 750 bp และจากการหาลำดับ DNA และการวิเคราะห์ open reading frame (ORF) ของผลผลิต RT-PCR นี้ พบว่าไม่มี ORF ที่สอดคล้องกับโปรตีนขนาด 22 kD ดังนั้นจึงคาดว่า ลำดับ DNA ที่ได้น่าจะเป็นส่วนของ 3' untranslated region ของ YHV

Abstract

Isolation of p135 gene of YHV by RT-PCR using cDNA, synthesized from RNA of YHV, as a template had been performed. The RT-PCR product of 4200 bp was obtained and partial DNA sequence (1720 bp) of this RT-PCR product was elucidated. The comparison of this partial DNA sequence with Genbank database revealed that the partial DNA sequence was identical to gp116 of YHV sequence reported by Jitrapakdee et al., (2003). Isolations of p65 and p65F78 (p65 without transmembrane region) genes were performed by RT-PCR. The RT-PCR products of 1708 bp and 1630 bp were obtained, respectively. Expressions of p65 and p65F78 genes in pQE30 expression vector were not successful yet. The attempt for isolation of p22 gene was employed. The RT-PCR product of 750 bp was obtained. The open reading frame (ORF) analysis of this RT-PCR product did not reveal any 22 kD protein product. Therefore, the 750 bp RT-PCR product could be the 3' untranslated region (3'-UTR) of YHV genome.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการทดลอง	7
การเพิ่มจำนวนไวรัสและการทำให้บริสุทธิ์	8
การสกัด RNA จากไวรัส	8
การสร้าง cDNA ของ YHV	8
การทำ PCR เพื่อแยกยีน p65 และ p65F78	8
การทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative)	9
การทำ RT-PCR เพื่อแยกยีน p22 (putative)	9
การวิเคราะห์ลำดับ DNA	9
การแสดงออกของยีน p65 และ p65F78	9
ผลการทดลอง	11
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	23

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ ที่ใช้ในการแยกยีนของ YHV structural proteins (putatively)	6
2.	PCR product ของยีน p65 และ p65F78	13
3.	ผลการทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative)	14
4.	ลำดับ DNA บางส่วนของ PCR product ที่ได้จากการแยกยีน p135 และ ผลจากการแปลรหัส	16
5.	ผลการทำ RT-PCR เพื่อแยกยีน p22 (putative)	17
6.	ลำดับ DNA ของ PCR product ที่ได้จากการแยกยีน p22 (putative) และผลจากการ วิเคราะห์ open reading frame	19
7.	ผลการทำ SDS-PAGE ของโปรตีน p65 และ p65F78 ที่ผลิตโดย <i>E.coli</i>	20

บทนำ

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย พบว่าสามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศได้อย่างมากมาย อย่างไรก็ตาม ในระยะหลังนี้ การติดเชื้อโรคไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus: YHV) และ โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) ในกุ้งกุลาดำ (Boonyaratpalin et al., 1993 ; Wongteerasupaya et al., 1995) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยพบว่าในปี ค.ศ. 1995 การผลิตกุ้งจากประเทศไทยลดลงจากปี ค.ศ. 1994 ถึงประมาณ 30,000 ตัน โดยคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 9600 ล้านบาท (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการป้องกันและการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำจึงเป็นสิ่งจำเป็น

โรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำเป็นโรคร้ายแรงและเกิดการระบาดในปัจจุบันเป็นอย่างมาก อาการของกุ้งที่เป็นโรคนี้พบว่าบริเวณหัวของกุ้งจะมีสีเหลืองอ่อนผิดจากปกติ บริเวณเหงือกบางครั้งจะพบสีค่อนข้างเหลือง กุ้งที่เป็นโรคจะกินอาหารน้อยลงและตายภายในเวลา 2-3 วัน ในบ่อเลี้ยงที่มีโรคระบาดพบว่าในวันแรกกุ้งจะว่ายน้ำอยู่ที่ผิวน้ำและตายที่ขอบบ่อให้เห็นประปราย ในวันที่ 2 จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และในวันที่ 3 อาจตายหมดบ่อได้

ในปัจจุบันนี้ การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำต้องใช้เทคนิคทาง PCR (polymerase chain reaction) สำหรับวินิจฉัยเชื้อ WSSV และ วิธี RT-PCR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ (Wongteerasupaya et al., 1998 ; Lightner and Redman, 1998) ถึงแม้ว่าทั้งสองเทคนิคนี้จะมีความไวสูงในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัส แต่วิธีเหล่านี้ก็มีข้อจำกัดเมื่อต้องวินิจฉัยตัวอย่างตรวจจำนวนมาก เนื่องจากค่าตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทาง PCR มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 800 บาทต่อตัวอย่าง) นอกจากนี้ YHV เป็น RNA ไวรัส ซึ่ง RNA มีเสถียรภาพต่ำ ต้องตรวจตัวอย่างทันที ไม่ควรเก็บที่ -80°C นานกว่า 12 ชั่วโมง ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลลบเทียมโดยการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ได้ (Wongteerasupaya et al., 1997)

สำหรับวิธีตรวจอื่น ๆ เช่น การตรวจทางชิ้นเนื้อและพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยการดูอาการของโรค (symptomatic diagnosis) ก็ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วตัวอย่างตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและอาการของโรคมักจะมีการเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วย ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ก็จะไม่ให้ผลที่น่าเชื่อถือในทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส YHV และ WSSV

เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีรายงานถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส YHV และ WSSV (Loh et al., 1998) โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำและวิธี Western Blot ก็ไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยตัวอย่างตรวจจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามได้มีรายงานถึงผลสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000, Sithigorngul et al., 2002) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีเฉพาะต่อโปรตีนส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kD 67 kD และ 22 kD ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) capsid

และ matrix ของ YHV (Nadala et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และ ในสภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสโรคหัวเหลืองได้ใน haemolymph และในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้เทคนิค dot-blot, Western blot และ immunocytochemistry

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดที่สามารถรักษากุ้งที่ติดเชื้อ YHV ได้ ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนี้สามารถทำให้กุ้งทั้งหมดในบ่อตายได้ภายใน 3 วัน ภายหลังมีอาการ (Chantanachookin et al., 1993) ดังนั้นวิธีควบคุมการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำที่ดีที่สุดคือ การป้องกันการติดเชื้อ ซึ่งอาจกระทำได้โดยการฆ่าเชื้อในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยใช้คลอรีนที่ความเข้มข้นประมาณ 30 ppm และการกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาจเป็นพาหะของเชื้อ YHV เช่น *P. mergviensis* และ *Palaemon styliferus* (Flegel et al., 1997)

สำหรับการป้องกันการติดเชื้อ YHV โดยการพัฒนาในแง่ของวัคซีน พบว่า ได้มีรายงานขั้นต้น โดย Withyachumnarnkul (unpublished) ซึ่งใช้ YHV ที่ผ่านการฉายรังสี UV ฉีดเข้าไปในกุ้ง และทำให้กุ้งนั้นติดเชื้อ YHV ในภายหลัง (challenged) ผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีด YHV ที่ผ่านการฉายรังสี UV ก่อนทำให้ติดเชื้อ YHV ในภายหลังนั้นมีชีวิตนานกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีด YHV ที่ผ่านการฉายรังสี UV (Flegel et al., 1997)

จะเห็นได้ว่าการใช้วัคซีนเพื่อการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งนั้น น่าจะมีความเป็นไปได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักในโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้คือ การพัฒนาวัคซีน เพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะกระทำโดย นำยีนที่สร้างส่วนประกอบของไวรัสใส่ในยีนพาหะที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน (expression vector) จากนั้นก็จะกระตุ้นให้แบคทีเรียหรือยีสต์ที่มียีนพาหะนี้ผลิตโปรตีนที่ต้องการในปริมาณมาก เพื่อนำไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานในระยะแรกที่กล่าวถึง YHV ว่าเป็นสาเหตุของโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำนั้น ได้มีรายงานจาก Boonyaratpalin et al., (1993) และ Chantanachookin et al., (1993) โดยกล่าวว่า YHV จัดอยู่ในกลุ่มของ Baculoviridae และ เสนอว่า YHV มีจีโนมเป็น DNA เส้นคู่ อย่างไรก็ตามรายงานจาก Wongteerasupaya et al., (1995) พบว่า ความพยายามในการแยก DNA จาก YHV ไม่เป็นผลสำเร็จ จึงได้เบนความสนใจไปที่ RNA และพบว่า YHV นั้นมีจีโนมเป็น RNA เส้นเดี่ยวเนื่องจากกรดนิวคลีอิกจาก YHV จะถูกย่อยสลายได้ด้วย RNase-A นอกจากนี้ยังพบว่า YHV มีขนาดประมาณ 150-170 X 40-50 nm และเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) โดยที่ YHV อาจจะอยู่ในกลุ่มของ Coronaviridae (plus-strand RNA) Rhabdoviridae (minus-strand RNA) หรือ Paramyxoviridae (minus-strand RNA)

การศึกษาถึงโปรตีนส่วนประกอบของ YHV โดยใช้ SDS-PAGE (Nadala et al., 1997) พบว่า YHV มีโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 4 ส่วน ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 175 kD 135 kD 67 kD และ 22 kD โดยพบว่าโปรตีนที่ 135 kD เป็นไกลโคโปรตีนซึ่งน่าจะเป็นส่วนเปลือกหุ้ม (envelope) ของไวรัส ในขณะที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 kD น่าจะเป็น RNA transcriptase โปรตีนที่ 67 kD น่าจะเป็นส่วนของ nucleocapsid และ โปรตีนที่ 22 kD น่าจะเป็นส่วนของ matrix นอกจากนี้ยังพบว่า YHV เป็น RNA เส้นเดี่ยว สายลบ (negative polarity) เมื่อศึกษาโดยใช้วิธีการสังเคราะห์โปรตีนในหลอดทดลอง (*in vitro* translation) โดยใช้ RNA เป็นต้นแบบ (template) ดังนั้นจึงได้คาดว่า YHV น่าจะอยู่ในกลุ่มของ Rhabdovirus ซึ่งมี RNA เป็นสายลบ สำหรับขนาดของ RNA ยีนนั้น พบว่ามีขนาดประมาณ 22 kb (Nadala et al., 1997)

รายงานในระยะหลังโดย Tang & Lightner (1999) ซึ่งทำการหาลำดับของ DNA บางส่วนที่มีความยาว 1161 bp จาก cDNA ที่สร้างจาก RNA ยีนของ YHV พบว่า ยีนของ YHV เป็น RNA สายบวก (positive sense RNA) เมื่อทำการศึกษาโดยใช้วิธี RT-PCR ซึ่งมี RNA ของ YHV เป็นต้นแบบ (template) และใช้ primer ที่สร้างขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับของ cDNA นั้น ดังนั้นข้อมูลนี้จึงขัดแย้งกับข้อมูลที่รายงานโดย Nadala et al., (1997) ที่กล่าวว่า ยีนของ YHV เป็น RNA สายลบ

นอกจากนี้การหาลำดับ DNA จาก cDNA ที่มีขนาด 1161 bp นั้นพบว่ามีส่วนที่สามารถแปลรหัสได้ยาวที่สุด (largest open reading frame) ที่ตำแหน่ง 484 ถึง 1161 โดยพบว่าโปรตีนนั้นประกอบด้วยกรดอะมิโน 226 ตัว และจากการสืบค้นในฐานข้อมูลของ Genbank เพื่อหาความเหมือน (homology) ของ DNA ที่มีความยาว 1161 bp นั้นโดยใช้โปรแกรม Blast พบว่าไม่มีความเหมือนต่อ DNA หรือโปรตีน จากไวรัสหรือจากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) ชนิดใดเลย (Tang & Lightner, 1999)

ในระยะต่อมาได้มีการศึกษาโดย Cowley et al. (1999) ซึ่งพบว่าลำดับ DNA ของยีน ORF 1b หรือยีน replicase ซึ่งมีความยาวประมาณ 7.8 kb ของ gill-associated virus (GAV) มีความเหมือนกับลำดับ DNA ของ YHV ที่มีความยาว 135 bp ที่ได้จากการบวนการ RT-PCR โดยใช้ primer ที่ถูกออกแบบสำหรับการวิเคราะห์โรคไวรัสหัวเหลือง (Wongteerasupaya et al., 1997) โดยมีความเหมือนในระดับ DNA ประมาณ 83% และในระดับกรดอะมิโนประมาณ 86.7% และพบว่ายีน ORF 1b ของ GAV มีความเหมือนกับลำดับ DNA ของ YHV ที่รายงานโดย Tang และ Lightner (1999) ซึ่งมีความยาว 1068 bp โดยพบว่ามีเหมือนในระดับ DNA ประมาณ 80.9% และในระดับกรดอะมิโนประมาณ 86.5%

ต่อมา Cowley และคณะ (2000) ได้รายงานว่า GAV นั้นน่าจะเป็นไวรัสในกลุ่มของ arterivirus หรือ coronavirus และเนื่องจาก YHV และ GAV มีความคล้ายคลึงกันมากทั้งในระดับ DNA และ กรดอะมิโน (Cowley et al., 1999) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า YHV น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มของ arterivirus หรือ coronavirus เช่นกัน

สำหรับการศึกษาถึงการต้านทาน YHV ในกึ่งกุลาดำนั้น เริ่มจากพบข้อสังเกตว่าในฟาร์มเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยบางแห่ง มีกุ้งที่แสดงสภาวะที่เรียกว่า acquired tolerance ต่อการติดเชื้อ YHV โดยพบว่า YHV นั้นยังมีการเพิ่มจำนวน (active replication) ในตัวกุ้งแต่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งแต่อย่างใด (innocuous infection) ซึ่งสภาวะ acquired tolerance นี้จะแตกต่างสภาวะที่เรียกว่า acquired resistance ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่าง แอนติเจน และ แอนติบอดี และมักจะมีการกำจัดเชื้อให้หมดไปจากร่างกาย (Pasharawipas et al., 1997 ; Flegel & Pasharawipas, 1998)

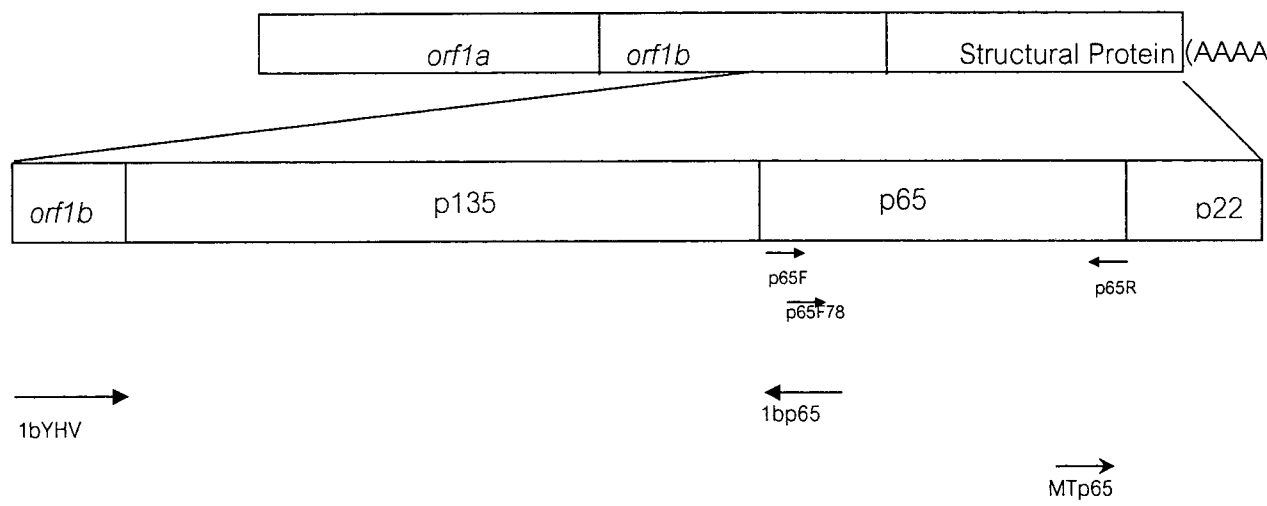
ดังนั้น Pasharawipas et al., (1997) ได้เสนอว่า กุ้งน่าจะมีกลไกการจดจำ (recognition mechanism) ซึ่งจะต้านทาน (tolerance) ต่อการติดเชื้อไวรัสได้ โดยกลไกนี้อาจจะเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาของระยะ larva โดยได้เรียกกลไกนี้ว่า tolerance hypothesis สมมติฐานนี้กล่าวว่า การต้านทานไวรัสนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับการจับของไวรัสในขั้นต้น (initial viral binding) และจะนำไปสู่การจดจำที่จำเพาะ (specific memory) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาเกี่ยวกับการติดเชื้อที่ไม่เป็นอันตรายในภายหลัง (innocuous infection) สำหรับการจับของไวรัสในขั้นต้นนั้นจะไม่เกี่ยวข้อง (independent) กับการจับของไวรัสที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อ (viral infection) และอาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ปราศจากการติดเชื้อ (absence of infection) (Flegel & Pasharawipas, 1998)

สำหรับรายงานที่สนับสนุนสมมติฐานนี้ มาจากการที่พบว่า การติดเชื้อ YHV ในกึ่งกุลาดำในระยะแรกจะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก โดยรวมถึงกุ้งในระยะ larva ที่สัมผัส (exposed) กับ YHV นี้ด้วย แต่ต่อมาพบว่ากุ้งในระยะ early larva (ซึ่งน่าจะมีการแยกได้ระหว่าง self และ nonself) จะดื้อ (refractory) ต่อการติดเชื้อ YHV ในภายหลัง ซึ่งปรากฏการณ์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับของไวรัสที่ก่อให้เกิดการจดจำ และได้พัฒนาการติดเชื้อแต่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (innocuous infection) เมื่อได้รับ YHV ในภายหลัง (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการต้านทาน (tolerance) ต่อไวรัส น่าจะเกี่ยวข้องกับการปรับตัว (accommodation) เพื่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งแต่อย่างใด (Flegel & Pasharawipas, 1998) ถ้าหากสมมติฐานนี้ถูกต้อง การพัฒนาสารที่เรียกว่า tolerines เพื่อใช้ในลักษณะเดียวกันกับการพัฒนาวัคซีน ก็จะเป็นไปได้สูง (Flegel & Pasharawipas, 1998)

จากสมมติฐานดังกล่าวข้างต้น การใช้โปรตีนส่วนเปลือกนอก (envelope) ของไวรัสเพื่อการพัฒนาเป็น tolerines ก็น่าจะนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนได้ โดยโปรตีนส่วนเปลือกนอกนี้เป็นส่วนที่ไวรัสใช้จับกับ (binding) แห่รับ (receptor) ที่อยู่บนเนื้อเยื่อกุ้ง และการใช้โปรตีนส่วนนี้เพื่อเป็น tolerines น่าจะก่อให้เกิดการจดจำที่จำเพาะ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาการต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV ในภายหลังได้

จากรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (2001) ที่ได้ทำการแยกยีนที่สร้างโปรตีน p65 kD ของ YHV ได้ และคาดว่าโปรตีนนี้อาจจะเป็นส่วนของ spike protein ที่ยื่นออกจาก YHV

เนื่องจากมีส่วนของ transmembrane helix อยู่ ดังนั้น โปรตีน p65 นี้อาจมีปฏิสัมพันธ์กับโฮสต์ เช่นกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงอาศัยข้อมูลจากลำดับ DNA ของ p65 นี้มาใช้ในการออกแบบ primer เพื่อแยกยีนของโปรตีน 135 kD และ 22 kD (putative) โดยคาดว่า YHV น่าจะมีการเรียงตัวของจีโนมคล้ายกับ GAV (Cowley et al., 2002) ดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ
ที่ใช้ในการแยกยีนของ YHV structural proteins (putatively)

วิธีการทดลอง

1. การเพิ่มจำนวนไวรัสและการทำให้บริสุทธิ์

นำกึ่งกลาดำขนาด 25-30 กรัม จำนวน 60 ตัว มาฉีดด้วย haemolymph จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV สังเกตการติดเชื้อของกึ่งประมาณ 2-4 วัน เลือกกึ่งที่ติดเชื้อนำมาเจาะเลือดผสมกับน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วน 1:1 ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกที่ 3000 g ทำการตรวจสอบไวรัส YHV ใน haemolymph ด้วยวิธี dot-blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ enveloped protein ของ YHV เป็นตัวตรวจสอบ จากนั้นนำส่วนใสที่ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกแล้วมาตกตะกอนด้วย 33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ นำตะกอนมาละลายใน 2XPBS และนำไปปั่นที่ 3000 g เพื่อแยกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก และนำไปปั่นแยกไวรัสที่ 100 000 g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 2XPBS 2 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 2XPBS เก็บไว้ที่ -70°C

2. การสกัด RNA จากไวรัส

นำไวรัสที่ตกตะกอนได้มาแยก RNA โดยใช้ RNeasy kit (QIAGEN) โดยทำการทดลองตามคู่มือของบริษัท

3. การสร้าง cDNA ของ YHV

นำ RNA ของ YHV มาสร้าง cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (Superscript™ II RNase H⁻; Invitrogen) โดยนำ RNA ประมาณ 1 µg มาผสมกับ oligo dT primer และ 10 mM dNTP จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง ก่อนเติม first-strand buffer DTT และเอนไซม์ reverse transcriptase และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย่อยสลาย RNA ออกจาก DNA-RNA hybrid โดยใช้เอนไซม์ *E. coli* RNase H นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

4. การทำ PCR เพื่อแยกยีน p65 และ p65F78

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน p65 และ p65F78 (p65 ที่ไม่มี signal sequence) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน p65 ใช้ primer p65F (CGGGATCCATGCTCGGTCGAACCTTCTTC) และ primer p65R (TCCCCCGGGCTAGGATCGTTTGGCTTT) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase (Gibco BRL) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 4 นาที denaturation: 94°C 30 วินาที annealing: 55°C 30 วินาที extension: 72°C 2 นาที และ final extension: 72°C 20 นาที

สำหรับการทำ PCR ของยีน p65F78 ใช้ primer p65F78 (CGGGATCCCTCGCTCCACGACAGGCACG) และ primer p65R (TCCCCCGGGCTAGGATCGTTTGGCTTT) ใช้เอนไซม์ *Taq* polymerase (Gibco BRL) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition เหมือนกับการทำ PCR ของ p65

5. การทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative)

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน p135 โดยใช้ primer 1bYHV (GATCGGGGTACCTAAGCTTATGCTATCGACCTA) และ primer 1bp65 (CGTCTGGAACGCCAAGAGAGTATGGTCC) โดยใช้เอนไซม์ *Elongase* (Gibco BRL) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 30 วินาที denaturation: 94°C 30 วินาที annealing: 59°C 30 วินาที extension: 68°C 5 นาที และ final extension: 68°C 20 นาที

นำผลผลิต PCR ที่ได้ ส่งหาลำดับ DNA ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

6. การทำ RT-PCR เพื่อแยกยีน p22 (putative)

นำ RNA ของ YHV มาทำ one step RT-PCR โดยใช้ primer MTp65 (TCCCACTTATGCACGTCCATGAGAACG) และ primer polyTYHV (TCTAGAGGATCCCCGGTACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT) และใช้ RT/*Taq* polymerase enzyme mix (Gibco BRL) โดยมี condition ในการสร้าง cDNA ที่ 42°C 15 นาที 94°C 5 นาที 4°C 5 นาที และการทำ PCR 35 รอบ โดยใช้ denaturation: 94°C 30 วินาที annealing: 55°C 30 วินาที extension: 72°C 50 วินาที และ final extension: 72°C 20 นาที

นำผลผลิต PCR ที่ได้ โคลนเข้าสู่ pGEM T-easy vector และส่งหาลำดับ DNA ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

7. การวิเคราะห์ลำดับ DNA

นำผลของการหาลำดับ DNA มาวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม DNASIS MAX (Hitachi Genetic systems) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST

8. การแสดงออกของยีน p65 และ p65F78

นำ PCR product ของยีน p65 และ p65F78 โคลนเข้าสู่ pQE30 expression vector ที่ตำแหน่ง *Bam*HI และ *Xma*I และ transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) จากนั้น กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ 1 mM IPTG ทำการเตรียม lysate ของแบคทีเรียโดยใช้

lysis buffer ที่มี 8M urea นำ lysate ที่ได้ไปปั่นแยก pellet และ supernatant ออกจากกัน จากนั้นนำ pellet และ supernatant ที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีน โดยการทำให้โปรตีนลดสภาพด้วย SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970)

ผลการทดลอง

1. การเตรียมไวรัส YHV

กึ่งกลาดำจำนวน 60 ตัว นำมาเก็บ haemolymph ได้ 70 มิลลิลิตร เมื่อนำมาตรวจสอบด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ YHV โดยวิธี dot-blot พบว่าได้ผลบวกและเมื่อนำมาแยกไวรัส พบว่าได้ไวรัสประมาณ 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. การสกัด RNA จากไวรัส YHV

จากปริมาณไวรัส YHV ที่ได้ เมื่อนำมาสกัด RNA พบว่าได้ RNA ประมาณ 5 µg เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm.

3. การแยกยีน p65 และ p65F78

จากการแยกยีน p65 และ p65F78 โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ซึ่งมีขนาด 1708 bp และ 1630 bp ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ตรงกับขนาดของ DNA ที่ได้คาดไว้ (รูปที่ 2)

4. การแยกยีน p135 (putative)

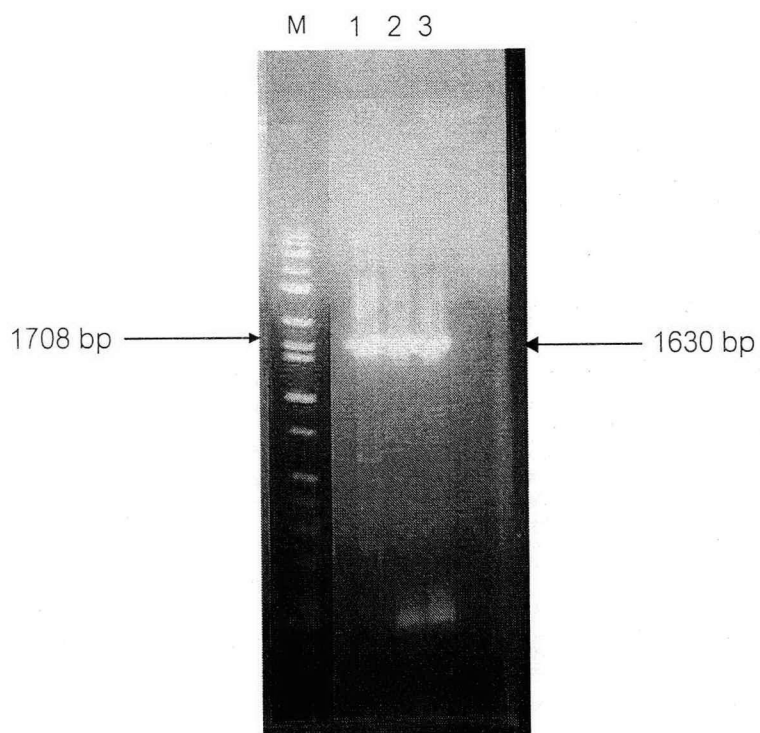
จากการทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative) โดยใช้ cDNA ของ YHV เป็น template พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 4200 bp (รูปที่ 3) เมื่อนำ PCR product นี้ ไปหาลำดับ DNA บางส่วน (1720 bp) ของยีน p135 พบว่าได้ลำดับ DNA ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 เมื่อนำลำดับ DNA นี้ไปแปลรหัส โดยใช้โปรแกรม DNASIS พบว่าได้ open reading frame ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 เช่นกัน

5. การแยกยีน p22 (putative)

จากการทำ RT-PCR โดยใช้ RNA ของ YHV เป็น template พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 750 bp (รูปที่ 5) เมื่อนำ PCR product นี้ ไปหาลำดับ DNA พบว่าได้ลำดับ DNA ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6 เมื่อนำลำดับ DNA นี้ไปวิเคราะห์ open reading frame ทั้ง 6 frame โดยใช้โปรแกรม DNASIS พบว่าได้ผลแสดงไว้ในรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าไม่มี open reading frame ที่น่าจะเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 22 kD

7. การแสดงออกของยีน p65 และ p65F78

จากการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน p65 และ p65F78 ไม่พบว่าการแสดงออกของโปรตีน p65 และ p65F78 เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ *E. coli* ที่ไม่มียีนนี้ (*E. coli* ที่มีเฉพาะ pQE30) (รูปที่ 7)

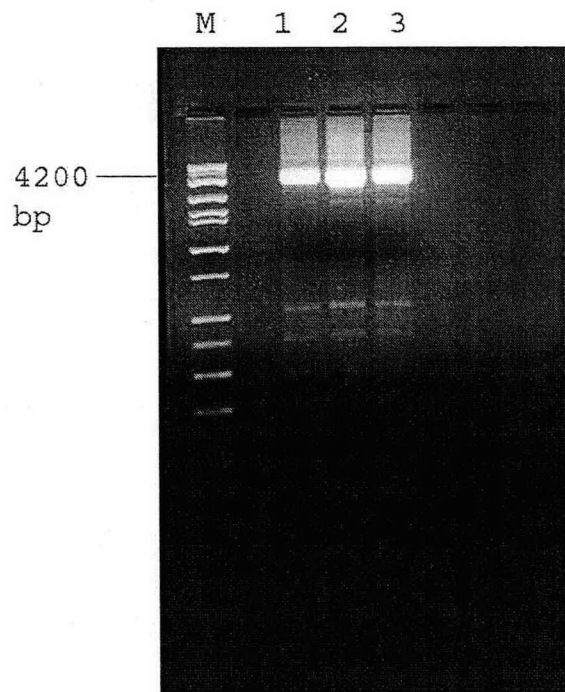


รูปที่ 2 PCR product ของยีน p65 และ p65F78

Lane M : Hi-LoTM DNA Marker

Lane 1 : p65 PCR product

Lane 2-3 : p65F78 PCR product



รูปที่ 3 ผลการทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative)

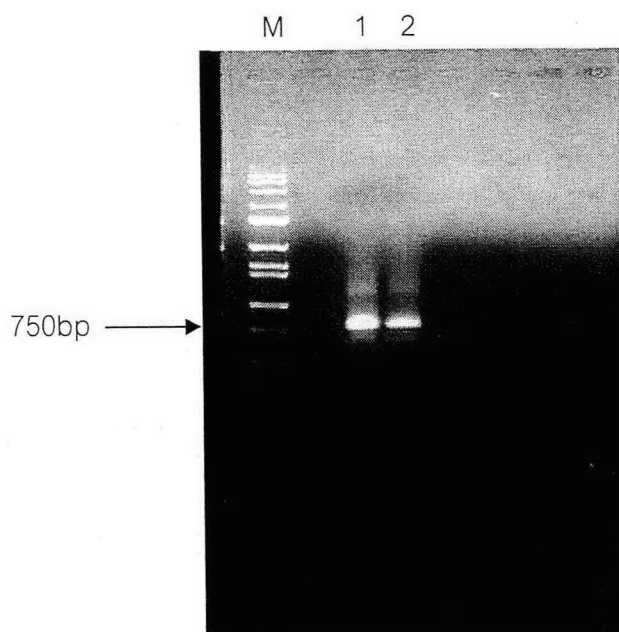
Lane M : Hi-LoTM DNA Marker

Lane 1-3 : p135 PCR product

partial cDNA YHV	Sequence	10 20 30 40 50 60	ATGAATGCAA TCCTAACTAC TGAGCAATTT GAAGAAATGT CTTAGATGA AGCAAGATAC
	Translate		M N A I L T T E Q F E E M S L D E A R Y
partial cDNA YHV	Sequence	70 80 90 100 110 120	TCTGACATTG TATCTTTATA CCGAATCAAT AACATAACAT CAGTCCCTGG CTGTATGTAC
	Translate		S D I V S L Y R I N N I T S V P G C M Y
partial cDNA YHV	Sequence	130 140 150 160 170 180	AATCCAGTAT CATACTATCT CCATGGCGAC TCTGTTCTG TTA CTGTGCC ATCAACACCA
	Translate		N P V S Y Y L H G D S V P V T C P S T P
partial cDNA YHV	Sequence	190 200 210 220 230 240	AGATCTTTCTG GTACAACCTA CAATCATCAA ATCAGTAGTC AAATTTTGTA TAATCACAAA
	Translate		R S F G T T Y N H Q I S S O I L Y N H K
partial cDNA YHV	Sequence	250 260 270 280 290 300	ATGGTAAATG TTACAGTAGA TCAACGTTGC AAAACACATT CTGATAACTG TTGGGCTTAT
	Translate		M V N V T V D Q R C K T H S D N C W A Y
partial cDNA YHV	Sequence	310 320 330 340 350 360	TATAACAAGG CATCGAAAAG CATTTTATC CAATTCCATC CCAGCTATGC TCAGAAGTAT
	Translate		Y N K A S K S I F I Q F H P S Y A Q K Y
partial cDNA YHV	Sequence	370 380 390 400 410 420	CATAATAGAA TATTAGAGCC CACTACATTA ATTATTCCAT TCTATCCTCC CAGAGACACT
	Translate		H N R I L E P T T L I I P F Y P P R D T
partial cDNA YHV	Sequence	430 440 450 460 470 480	AAAACACTAG CCACACATCT TGGTCCTCGC GTTTTCCGTA ATGCCGGTGA TTATCAAATT
	Translate		K T L A T H L G P R V F R N A G D Y Q I
partial cDNA YHV	Sequence	490 500 510 520 530 540	TTCCTTGAAC CTGGCTGGCT CGGTAGAACA TACCTTGACG GTTATTCTTA TCATGAAATT
	Translate		F L E P G W L G R T Y L D G Y S Y H E I
partial cDNA YHV	Sequence	550 560 570 580 590 600	TATGCATCCA CACGTCACGA TTGCCGTTAC AACATGATGT CCGGCGACAA TAAGTATGGT
	Translate		Y A S T R H D C R Y N M M S G D N K Y G
partial cDNA YHV	Sequence	610 620 630 640 650 660	ATAAACCTCG GAGATGACGT CTTTCATGAG ACCATTCCAA CTCCC CGCGG TTATACTCT
	Translate		I N L G D D V L H E T I P T P R G Y T P
partial cDNA YHV	Sequence	670 680 690 700 710 720	AGCGTTGTTG TCTGTGGCAC TACATTTACA TATTATAAAT TACATGACGC AGTTAAACTC
	Translate		S V V V C G T T F T Y Y K L H D A V K L
partial cDNA YHV	Sequence	730 740 750 760 770 780	CCATGGGAAA GCGTTCAATA TACCGATATA GAGGACATTC CTGCCGTTT CCGTGATCCC
	Translate		P W E S V Q Y T D I E D I P A G F R D P
partial cDNA YHV	Sequence	790 800 810 820 830 840	TATGACTTCT CCGTCGATAC TCCATCTGGG CCTGTAAC TAAGTGTCT GGAAGAGTAT
	Translate		Y D F S V D T P S G P V T I S V L E E Y
partial cDNA YHV	Sequence	850 860 870 880 890 900	CATGACGGAG ATTCCATACA GGAGACGGCT CTAAGCGTT TCTTCATCTA CTATCGGATA
	Translate		H D G D S I O E T A P K R F F I Y Y R I
partial cDNA YHV	Sequence	910 920 930 940 950 960	ATGACAGCCC GTCTTACACC CTCACAAGTC GAACATCTTA ATCTATCTAC ACACGCCACA
	Translate		M T A R L T P S Q V E H L N L S T H A T

partial cDNA YHV	Sequence	AGTTCCTGGG CAGCTGAAAA TTACATAAGT AACTGTTACG TTGTTAGACA GCAATTCGTC
	Translate	S S W A A E N Y I S N C Y V V R Q Q F V
partial cDNA YHV	Sequence	AGAAACACTC ACCCATTTTC ATTTGCTCTT TCTTACATTG ACTACAATGT AACAGCTGGT
	Translate	R N T H P F S F A L S Y I D Y N V T A G
partial cDNA YHV	Sequence	AGTGTGTTC GATGCAACGA ATTCAACATA CAAATGGATC TTCTTCTTGC AACCTTTGGT
	Translate	S V V R C N E F N I Q M D L L L A T F G
partial cDNA YHV	Sequence	ACAGCAACAC GTACGTGGGC GGCTGAGTAT CGTCATCTGC CACATTTTCT CACCAAGCGC
	Translate	T A T R T W A A E Y R H L P H F L T K R
partial cDNA YHV	Sequence	GGTTTCTATC CCCTCGAACC TGTTACCGGT TCTGCAATAG ATTACTTGAT AGTCGAATAC
	Translate	G F Y P L E P V T G S A I D Y L I V E Y
partial cDNA YHV	Sequence	AACGCCCATG CTTTCAGTTA CTCACATCAG GCAACTTACC ATCAATTTGG ACATCCAGTT
	Translate	N A H A S R Y S H Q A T Y H Q F G H P V
partial cDNA YHV	Sequence	GCTAAAGCTC AAACCCGTCC CGGCGTCTGT CCCACCCCTC GTTCCATACG CTATCAAGGT
	Translate	A K A Q T R P G V C P T P R S I R Y Q G
partial cDNA YHV	Sequence	CTTGTTATG AAGTAGACTG GTCTGTCCGC TCTCCAACAC CACCTATTAG CGGTTATCCT
	Translate	L C Y E V D W S V R S P T P P I S G Y P
partial cDNA YHV	Sequence	CTTGTTATG AAGTAGACTG GTCTGTCCGC TCTCCAACAC CACCTATTAG CGGTTATCCT
	Translate	L C Y E V D W S V R S P T P P I S G Y P
partial cDNA YHV	Sequence	GACATTGGCA CCTACACTTC TGGCTACATC TTCAGAGACT ATGACTATTA TAGATTCAAA
	Translate	D I G T Y T S G Y I F R D Y D Y Y R F K
partial cDNA YHV	Sequence	CCTAGGTTCT GTAACGGTCT ATATTAGGC AAAGTTTCTG CTGCTGCTTC TATCGGCACT
	Translate	P R F G N G L Y L G K V S A A A S I G T
partial cDNA YHV	Sequence	TATTCTAAGT GCGGTAAGC TCAATCCATC AGTCCATACC ATGATCACGG TATTAATACT
	Translate	Y S K C G K A Q S I S P Y H D H G I N T
partial cDNA YHV	Sequence	GACCTTGGCA CACCGGTTTA TGATAGCGCT TGTGACTCCG CAGCTTATAC AATCCCAGTA
	Translate	D L G T P V Y D S A C D S A A Y T I P V
partial cDNA YHV	Sequence	GTCAAATATA ATGGACCATA CTCTCTTGGC GTTCCAGACG
	Translate	V K Y N G P Y S L G V P D

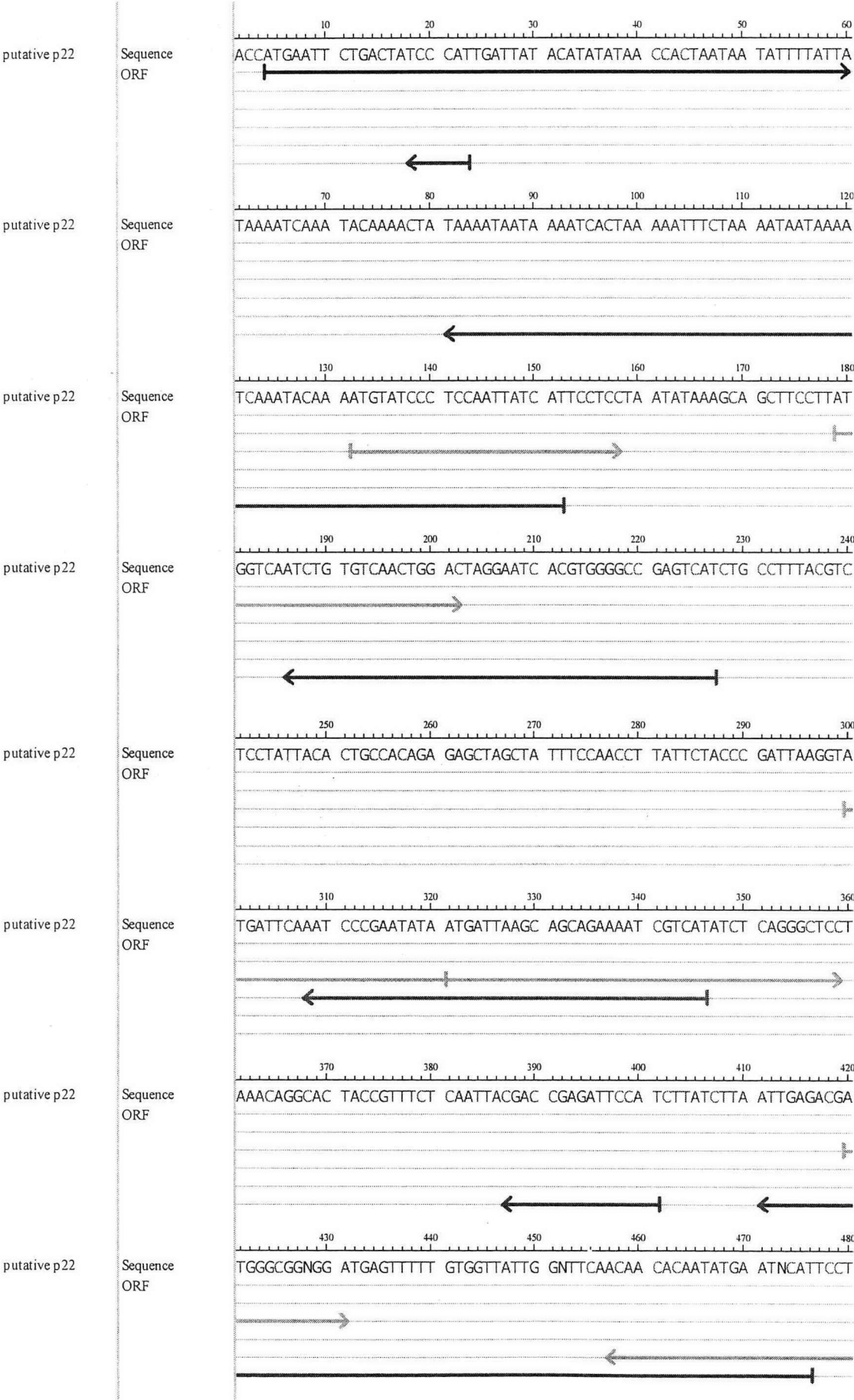
รูปที่ 4 ลำดับ DNA บางส่วนของ PCR product ที่ได้จากการแยกชิ้น p135 และ
ผลจากการแปลรหัส

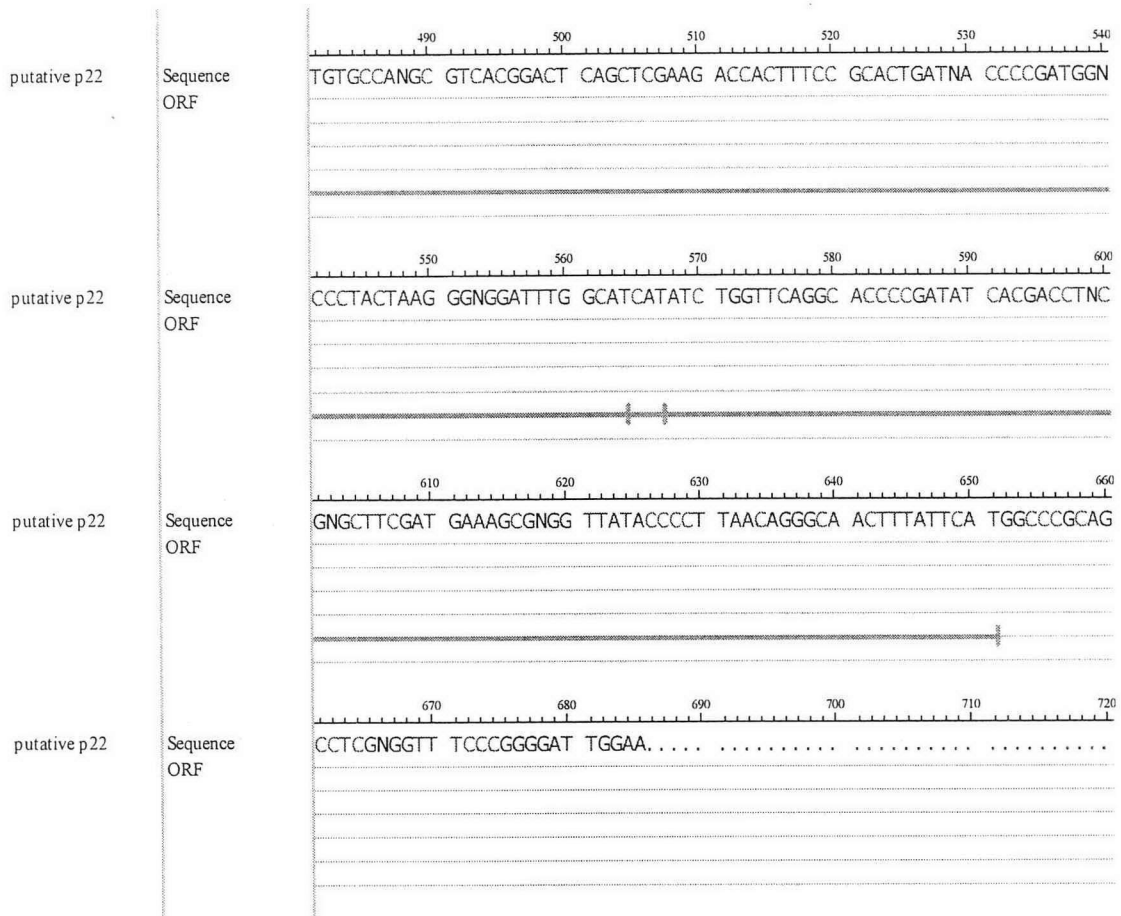


รูปที่ 5 ผลการทำ RT-PCR เพื่อแยกยีน p22 (putative)

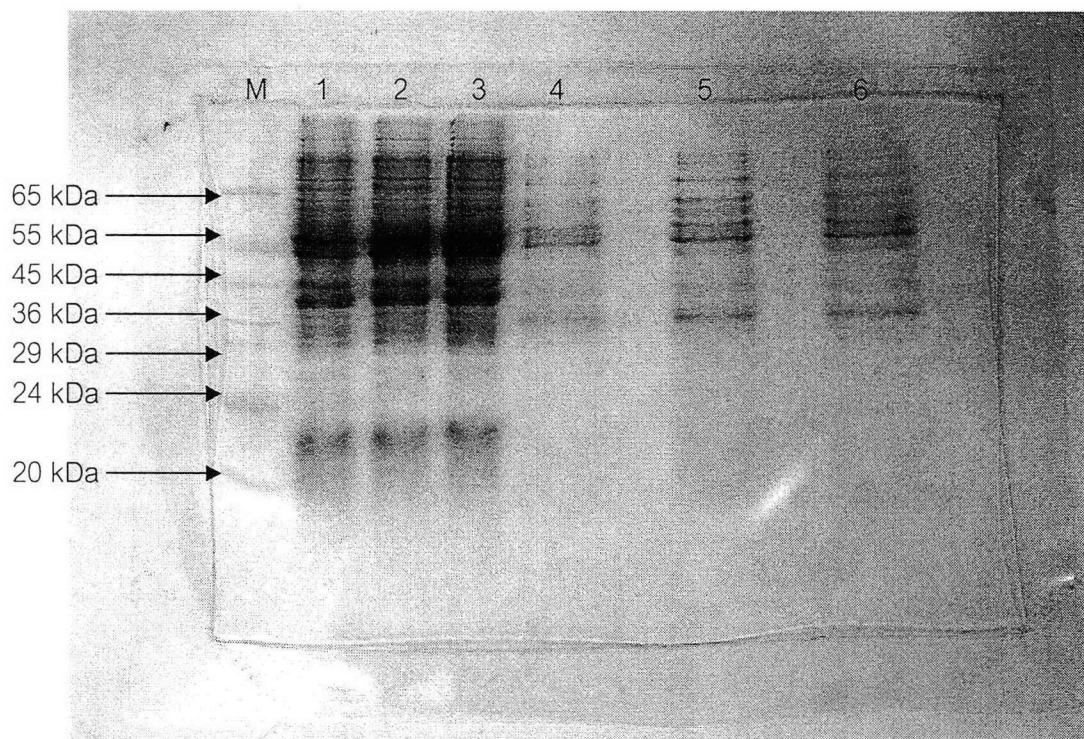
Lane M : Hi-LoTM DNA Marker

Lane 1-2 : p22 RT-PCR product





รูปที่ 6 ลำดับ DNA ของ PCR product ที่ได้จากการแยกยีน p22 (putative) และ ผลจากการวิเคราะห์ open reading frame



รูปที่ 7 ผลการทำ SDS-PAGE ของโปรตีน p65 และ p65F78 ที่ผลิตโดย *E.coli*

Lane M : Low Molecular Weight Range

Lane 1 : Pellet จากแบคทีเรียที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 2 : Pellet จากแบคทีเรียที่มียีน p65 ใน pQE30

Lane 3 : Pellet จากแบคทีเรียที่มียีน p65F78 ใน pQE30

Lane 4 : supernatant จากแบคทีเรียที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 5 : supernatant จากแบคทีเรียที่มียีน p65 ใน pQE30

Lane 6 : supernatant จากแบคทีเรียที่มียีน p65F78 ใน pQE30

สรุปผลการทดลอง

จากการเตรียม YHV และ การสกัด RNA ของ YHV พบว่าได้ RNA ปริมาณมาก เพียงพอแก่การสร้าง cDNA เพื่อใช้เป็น template ในการแยกยีนต่างๆ ของโปรตีนโครงสร้างของ YHV

จากการแยกยีน p65 และ p65F78 โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตาม ในระยะหลังได้มีรายงานจาก Jitrapakdee และคณะ (2003) ซึ่งทำการวิเคราะห์ยีนนี้และพบว่า ยีน p65 นี้ น่าจะเป็นยีน gp64 ซึ่งเป็นยีนของ glycosylated protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 64 kD และพบว่าโปรตีนนี้น่าจะมีส่วนของ transmembrane region ทางปลาย C ของโปรตีน ดังนั้นในอนาคตผู้วิจัยจะทำการแสดงออกโปรตีนนี้ในสภาวะที่ไม่มี transmembrane region เพื่อปรับปรุงให้มีการแสดงออกของโปรตีนให้ดีขึ้น

จากการแยกยีน p135 โดยวิธี PCR และทำการหาลำดับ DNA บางส่วนของยีนนี้พบว่า ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4 และในช่วงเวลาที่ผู้วิจัยกำลังวิเคราะห์ลำดับ DNA ที่ได้นั้น ได้มีรายงานจาก Jitrapakdee (2003) เกี่ยวกับลำดับ DNA ของยีน p135 นี้และรายงานว่ายีนนี้น่าจะเป็นยีน gp116 ซึ่งเป็นยีนของ glycosylated protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 116 kD และพบว่าโปรตีนนี้น่าจะมีส่วนของ transmembrane region 2 ส่วน ทางปลาย C ของโปรตีน และจากการเปรียบเทียบลำดับ DNA ที่ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ กับรายงานจาก Jitrapakdee (2003) พบว่ามีความสอดคล้องกัน ดังนั้นในอนาคตผู้วิจัยจะทำการแสดงออกโปรตีนนี้โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากรายงานของ Jitrapakdee (2003) ต่อไป

จากการแยกยีน p22 โดยวิธี RT-PCR และทำการหาลำดับ DNA บางส่วนของยีนนี้ พบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 6 แต่ผลจากการวิเคราะห์ open reading frame (ORF) ของลำดับ DNA ที่ได้นี้ พบว่าไม่มี ORF ที่สอดคล้องกับโปรตีนขนาด 22 kD ดังนั้นจึงคาดว่าลำดับ DNA ที่ได้น่าจะเป็นส่วนของ 3' untranslated region ของ YHV และในปัจจุบันยังไม่พบว่ามีกรายงานของยีน p22 นี้แต่อย่างใด

โดยสรุปผู้วิจัยสามารถหาลำดับ cDNA บางส่วนของยีน p135 (ปัจจุบันคือ gp116) ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย นอกจากนี้ยังได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมจากที่มีการเสนอไว้คือ ได้ทำการแสดงออกของยีน p65 (ปัจจุบันคือ gp64) และพยายามหาลำดับ DNA ของยีน p22 แต่ผลที่ได้ยังไม่ตรงกับที่ต้องการ ซึ่งจะต้องมีการปรับปรุงการวิจัยต่อไป โดยในปีถัดไปจะทำการแสดงออกของยีน gp116 และ gp64 ซึ่งโปรตีนที่ได้ นอกเหนือจากการนำมาทดสอบความเป็นวัคซีนแล้วยังสามารถนำมาใช้ในการผลิต polyclonal antibodies เพื่อนำ antibody ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงชุดตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ YHV โดยวิธี strip test ให้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Ekpanithanpong, U., Chantanachookin, C., 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol. 28(3), 103-109.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Ekpanithanpong, U., Supamattaya, K., Sriurairatana, S., Flegel, T.W., 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *paneaus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat. Org. 17, 145-157.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Walker, P., 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. Dis. Aquat. Org. 36, 153-157.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M., Walker, P.J., 2001. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen. Virol. 81, 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Walker, P.J., 2002. Gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns transcribes 3'-coterminal subgenomic mRNAs that do not possess 5'-leader sequences. J. Gen. Virol. 83, 927-935.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S., Withyachumnarnkul, B., 1997. Progress in research on yellow head virus and white spot virus in Thailand. In Flegel, T.W., MacRae, I.H. (Eds) Diseases in Asian Aquaculture III. Fish health Section, Asian Fisheries Society, p. 285-296.
- Flegel, T.W., Pasharawipas, T., 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In Flegel, T.W. (Ed) Advance in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. p. 245-250.
- Hameed, A.S.S., Anilkumar, M., Stephen Raj, M.L., Jayaraman, K., 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. Aquaculture. 160 ; 31-45.
- Hunkapillu, M.W., Lujan, E., 1986. Purification of microgram quantities of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. In : Shively, J.(Ed.) Methods of Protein Microcharacterization. Humana Press, Clifton, NJ. p.89-101.

- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Panyim, S., Boonsaeng, V., 2001. Molecular cloning of p65 structural protein of the yellow head virus. งานวิจัยด้านอนุชีววิทยา ประจำปี 2544 เมธีวิจัยอาวุโส สกว. สกล พันธุ์ยิ้ม 14 กันยายน 2544
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P.J., Panyim, S., Boonsaeng, V., 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84; 863-873
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 ; 680-685.
- Lightner, D.V., Redman, R.W., 1998. Shrimp diseases and current diagnosis methods. Aquaculture. 164 ; 201-220.
- Loh, P.C., Cesar, E., Nadala, B., Tapay, L.M., Lu, Y., 1998. Recent development in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogen. Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.255-259.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Follin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193 ; 256-275.
- Nadala, Jr. E.C.B., Tapay, L.M., Loh, P.C., 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 31, 141-146
- Pasharawipas, T., Flegel, T.W. Sriurairatana, S., Morrison, D.J., 1997. Latent yellow-head infections in *Penaeus monodon* and implications regarding disease tolerance or resistance. In Flegel, T.W., Menasaveta, P., Paisarnrat, S. (Eds) Shrimp biotechnology in Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 45-53.
- Sithigorngul, P., Chauyuchwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Menasveta, P., 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 42, 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Menasveta, P., 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 49, 71-76.
- Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. Dis. Aquat. Org. 35, 1++65-173.

- Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Tongchuea, W., Sitdilokratana, N., Kanchanapun, P., Klinputsorn, R., Panyim, S., 1998. Multiplex PCR for detection of yellow-head virus and white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.256.
- Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis. Aqua. Org. 31, 181-186.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Organisms. 21, 69-77.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Dis. Aquat. Org. 22, 45-50.

หน้าว่าง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยวิธี Multiplex RT – PCR

Development of diagnostic kit for detection of
Viruses in *Penaeus monodon* using Multiplex RT – PCR

งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง	II
สารบัญตาราง	III
สารบัญรูปภาพ	IV
กิตติกรรมประกาศ	V
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	VI
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	VII
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ขอบเขตการวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	2
หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	2
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ	2
ระเบียบวิธีวิจัย	3
ผลการทดลอง	12
สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	17

สารบัญตาราง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	3
ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	4
ตาราง 3 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	5
ตาราง 4 แสดงส่วนผสมของ Multiplex PCR reaction ระหว่างเชื้อไวรัสในกลุ่มดีเอ็นเอ	8
ตาราง 5 ส่วนผสมของ Multiplex RT-PCR reaction ของ YHV และ HPV	9
ตาราง 6 ส่วนผสมของ Multiplex RT-PCR reaction ของ YHV และ WSSV	10
ตาราง 7 ส่วนผสมของ Multiplex RT-PCR reaction ของ YHV , WSSV และ HPV	11

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	ผลการศึกษา Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัส WSSV และ HPV	12
รูปที่ 2	ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัส YHV และ HPV	13
รูปที่ 3	ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง	14
รูปที่ 4	ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงจุดขาวและ HPV	15
รูปที่ 5	ตัวอย่างการใช้ชุดตรวจสอบ Multiplex-RT-PCR เพื่อตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง และเชื้อ ไวรัสตัวแดงจุดขาวในภาคสนาม	15

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอแสดงความขอบพระคุณต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้พิจารณาให้รับ
ทุนอุดหนุนวิจัย จากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2545



รศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศ และยังมีส่วนในการจ้างแรงงาน จึงมีผลสำคัญต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าผลผลิตกุ้งกุลาดำมีแนวโน้มลดลง สาเหตุหลักเนื่องจากปัญหาการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ในระยะเวลาที่ผ่านมาได้มีผู้ทำการวิจัยและสร้างวิธีตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อทั้งสองชนิด โดยมีความไวในการตรวจสอบสูงและนำมาใช้ตรวจในภาคสนามได้แล้ว สิ่งสำคัญในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสทั้งสองคือ วิธีการตรวจที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัดเวลา สารเคมี และค่าใช้จ่าย ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคไวรัสที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้พร้อมๆกัน เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า multiplex RT – PCR ได้ทำการออกแบบ primer 3 คู่ จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสามชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 135 เบส และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีน noncoding VP28 และ coding VP28 ขนาด 500 เบส และจาก genomic DNA ของไวรัส HPV ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการทำ multiplex RT – PCR เพียงขั้นตอนเดียว ซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและสะดวก รวมถึงได้พัฒนาเทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิก (Total nucleic) ที่เป็น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้พร้อมกัน ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการตรวจสอบ

อย่างไรก็ดีคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาการตรวจสอบ multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัส gill associated virus (GAV) ที่พบระบาดมากที่ประเทศออสเตรเลียและมีลักษณะพันธุกรรมคล้ายไวรัสหัวเหลืองที่พบระบาดมากในประเทศไทย โดยประสบผลสำเร็จในการทำ multiplex RT-PCR ที่สามารถบ่งบอกว่ากุ้งกุลาดำมีการติดเชื้อจากไวรัสตัวใด หรือมีการติดเชื้อได้มากกว่าหนึ่งชนิดหรือไม่

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำนับว่ามีศักยภาพมากกว่าอุตสาหกรรมทางการเกษตรอื่นๆ ทั้งหมด เห็นได้จากในช่วงสามทศวรรษที่ผ่านมาอัตราการเจริญเติบโตของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยได้มีการขยายตัวมาโดยตลอดจากเดิมใน พ.ศ. 2515 จำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีเพียง 1,154 ฟาร์ม ครอบคลุมพื้นที่เพาะเลี้ยง 56,602 ไร่ มีจำนวนผลผลิตที่ออก 991 ตัน คิดเป็นมูลค่า 20.5 ล้านบาท พอถึงในปี พ.ศ. 2542 จำนวนฟาร์มทั้งหมดทั่วประเทศเพิ่มขึ้นเป็น 25,000 ฟาร์ม การส่งออกกุ้งของประเทศไทยนับเป็นอันดับหนึ่งของโลก ประเทศไทยกว่า 50,000 ล้านบาท จากผลผลิต 220,000 ตัน และก่อให้เกิดการจ้างแรงงานมากถึง 150,000 คน โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานการส่งออกกุ้งกุลาดำในปี 2543 เป็นมูลค่ากว่า 80,000 ล้านบาท

อย่างไรก็ดีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องประสบปัญหาความเสี่ยงในการเพาะเลี้ยงอันเนื่องจากการระบาดของเชื้อไวรัสที่รุนแรง 2 ชนิด คือ ไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัสหัวเหลือง รวมถึงการระบาดของเชื้อไวรัสที่ไม่รุนแรง แต่ทำให้ผลผลิตลดลงคือ ไวรัส HPV

จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส 3 ชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงในกุ้งกุลาดำ และเป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้ผลผลิตลดลง การตรวจวินิจฉัยโรคทั้ง 3 ชนิด จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการตรวจที่ง่าย และรวดเร็ว ประหยัดเวลา สารเคมี และค่าใช้จ่ายคณะผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคไวรัสทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างเดียวกัน และสามารถตรวจสอบไปพร้อมๆ กันได้ โดยจะได้พัฒนาการทำ Multiplex RT – PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อทั้ง 3 ได้พร้อมกัน ซึ่งจะมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดต้นทุนการตรวจเชื้อ เป็นการช่วยสนับสนุนการจัดการเพาะเลี้ยง ควบคุมและป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัส 4 ชนิดได้

วัตถุประสงค์ของชุดโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ

ขอบเขตงานวิจัย

การวิจัยจะมุ่งเน้นการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ไวรัสหัวเหลือง และไวรัส HPV (hepatopancreatic parvovirus) ซึ่งมีรายงานการระบาดในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งบริเวณภาคใต้ เช่น จังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ชุมพร และภาคตะวันออกของประเทศ เช่น จังหวัดจันทบุรี และฉะเชิงเทรา เป็นต้น

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) applied in diagnosis has the very useful advantages of sensitivity and specificity. We have developed a method for the simultaneous detection of both genomic RNA and DNA for two different species of shrimp viruses, yellow – head virus (YHV) white – spot syndrome virus (WSSV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV), which are currently the cause of very serious and widespread losses in the shrimp industry in Thailand and in Asia. We describe a method which allows rapid diagnosis by performing a single step of extraction for both RNA and DNA using CTAB. The co – extract was then used for successful nucleic acid amplification in a multiplex RT – PCR reaction employing the Super Script One multiplex RT – PCR process with primer 10F – 144R for YHV , primer nVP500F - nVP500R for WSSV and HPV305F-HPV305R for HPV . This multiplex RT – PCR assay system is convenient and should be useful to shrimp aquaculturists for simultaneous detection of YHV and WSSV in post – larvae and broodstock of *P. monodon* and in other asymptomatic carriers

A multiplex RT-nested PCR is also described to co-detect and differentiate the closely related prawn okaviruses, gill-associated virus (GAV) from eastern Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand. RT-PCR using primers to conserved sequences in the ORF1b gene amplified a 794 bp region of both GAV and YHV. The usefulness of the test was examined using RNA isolated from healthy and diseased *Penaeus monodon* infected with GAV and from diseased YHV-infected *P. monodon* collected at different locations in eastern Australia and Thailand.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกิ้งกูดาคำ
2. สามารถพัฒนาการป้องกันการติดเชื้อไวรัส
3. สามารถพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตอันเนื่องจากการติดเชื้อไวรัส
4. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและป้องกันโรคไวรัสในกิ้งกูดาคำ

หน่วยงานที่น่าผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการดูแลด้านการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดาคำ เช่น กรมประมง
2. กลุ่มเกษตรกรต่างๆ ที่มีการจัดตั้งศูนย์ตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เช่น กลุ่มชมรมกึ่งสุราษฎร์ธานี
3. สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ เช่น BIOTECH และศูนย์วิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดาคำ
4. สถาบันอุดมศึกษาที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดาคำเช่น มหาวิทยาลัยมหิดล รวมถึงมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
5. หน่วยงาน หริบบริษัทเอกชนที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์การเพาะเลี้ยงกิ้งกูดาคำ เช่น สถาบันวินิจฉัยสัตว์น้ำ เครือเจริญโภคภัณฑ์

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนมากจะเป็นการพัฒนาความไว (Sensitivity) ของการตรวจเชื้อและการเสาะหาโปรตีนเป้าหมายเพื่อนำไปสู่การผลิตวัคซีน รวมถึงการพัฒนาชุดตรวจสอบทางระบาดวิทยา เพื่อป้องกันโรคไวรัส โดยกลุ่มงานวิจัยของ ศ.ดร.วิชัย บุญแสง การศึกษาคุณลักษณะของกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสโดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Peter Walker จากออสเตรเลีย การทำ Polyclonal antibody โดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Philip Lo จากฮาวาย การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิค RT – PCR โดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Lightner จากประเทศสหรัฐอเมริกา และการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแ่งจุดขาวโดยเทคนิค PCR โดยกลุ่มงานวิจัยของ Dr. Lo จากประเทศไต้หวัน

ระเบียบวิธีวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

- 1.1 กุ้งกุลาดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร แปะครีว
- 1.2 กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากการทำให้ติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการต่างๆ

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม (PCR)	MJ Research Inc., U.S.A.
2.2 เครื่องปั่นเนื้อเยื่อ	Warning, U.S.A.
2.3 ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิต่ำ	Sharp, Japan
2.4 เครื่องชั่งวางน้ำหนักด้านบน	Sartorius, Germany
2.5 เครื่องดูดสารละลายปริมาณต่ำ	Gilson Medical Electronics S.A., France
2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก	Hettich, Germany
2.7 ตู้เย็น – 70 องศาเซลเซียส	Revco, U.S.A.
2.8 ไมโครเวฟ	National, Japan
2.9 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส	
2.10 โกร่งบด	Pyrex
2.11 Laboratory sealing film	Whatman
2.12 ชุดถ่ายภาพเจล	Fotodyne

3.เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยเป็นเกรดห้องปฏิบัติการ (Labolatory grade)

ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัท
3.1 thermus aquaticticus (Taq) DNA polymerase	Gibco BRL, U.S.A.
3.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Gibco BRL, U.S.A.
3.3 QIAGEN one step RT-PCR	QIAGEN
3.4 PCR buffer	Gibco BRL, U.S.A.
3.5 SuperSCRIPT one step RT-PCR with PLATINUM <i>Taq</i>	Invitrogen
3.6 MgCl ₂	Gibco BRL, U.S.A.
3.7 Agarose	Sigma chemical Company , U.S.A.
3.8 Ethidium bromide	Sigma chemical Company , U.S.A.
3.9 Phenol	Gibco BRL, U.S.A.
3.10 Chloroform	Merck, Germany
3.11 Lambda DNA – <i>HindIII</i> Marker	Promega, U.S.A.
3.12 100 bp DNA Ladder	Gibco BRL, U.S.A.
3.13 CTAB buffer	
3.14 DEPC-water	
3.15 Dye	
3.16 70 % ethanol	
3.17 10x TBE buffer	

4. วัสดุภัณฑ์

ตาราง 3 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

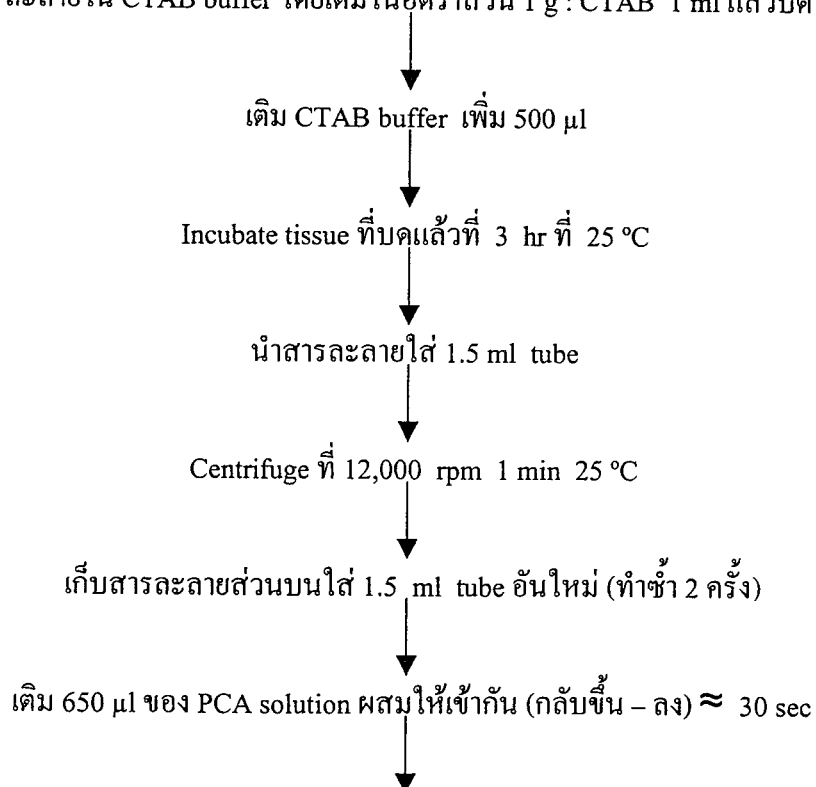
วัสดุภัณฑ์	บริษัท
4.1 Microtube ขนาด 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร	Treff Lab , Switzerland
4.2 Autoclave	Hirayama manufacturing corporation
4.3 Flask 200 ml	Pyrex
4.4 Gravity convection oven	Precision

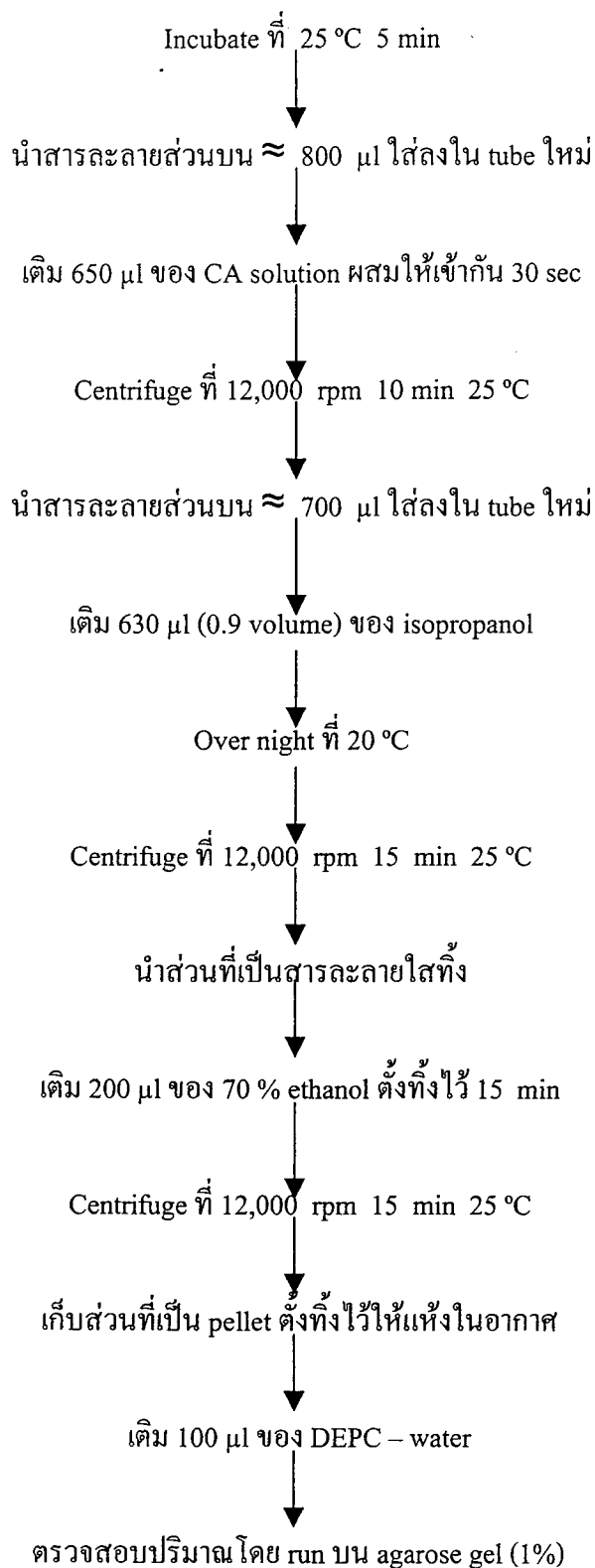
5. การทดลอง

5.1 การสกัดกรดนิวคลีอิก จากเนื้อเยื่อกุ้ง

โดยนำกุ้งที่เก็บได้จากบ่อตามจังหวัดต่างๆ ที่คาดว่าจะติดเชื้อไวรัส นำมาสกัดกรดนิวคลีอิก โดยใช้ CTAB buffer ดังขั้นตอนดังนี้

ทำให้ tissue ละลายใน CTAB buffer โดยเติมในอัตราส่วน 1 g : CTAB 1 ml แล้วบดให้เข้ากัน





5.2 สกัด RNA จากกิ้งที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองโดยใช้ Trizol

ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ให้กับกิ้งที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลอง ติดตามการ
แสดงออกของโรคในกิ้ง และเก็บกิ้งที่ตายและแสดงอาการของโรคมาสกัด RNA โดยใช้ Trizol
สกัดจากส่วนเหงือก และขาวายน้ำ ดังขั้นตอนดังนี้

นำ tissue ใส่ที่บด เติม Trizol reagent ในอัตราส่วน 1 g : Trizol 1 ml บดให้เข้ากัน

นำ tissue ที่ได้ใส่ใน 1.5 ml ของ microfuge tube ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

เติม chloroform 2 เท่าของปริมาณเดิม

Centrifuge ที่ 10,000 rpm 5 min

ดูดเอาชั้น chloroform ทิ้ง

เติม isopropanol 1 เท่า ของ ส.ล.ล

เก็บไว้ที่ -20 °C 12 hr

Centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 min

ล้างด้วย 70 % ethanol 2 ครั้ง

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย DEPC - water

เก็บสารละลายที่ได้ที่ -70 °C

run คูณบน agarose gel

5.3 ออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำการตรวจสอบไวรัสแบบ Multiplex RT – PCR ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ ดังนี้

ไพรเมอร์เพื่อการตรวจสอบไวรัสตัวแค่งูคขาว (ขนาดของผลผลิต 500 เบส)

WSV 500F 5' CAT ATT CTG GCA GCT CAA CCA G

WSV 500R 5' TTT GCC CAA GGT GTC GCT GTC

ไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบไวรัสหัดเหลือง

YHV 135F 5' GAC ATA ACA CCT TAC GAA

YHV 135R 5' AAG GTG TTA TGT CGA GGA AG

ไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบไวรัส hepatopancreatic parvovirus

HPV 305F 5' TGG TTG TGT TCT GAT GTG AC

HPV 305R 5' GAC AAC ATA TCC AAG AGC GA

5.4 การทำ Multiplex PCR

5.4.1 ทดลองทำ Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัสในกลุ่มดีเอ็นเอ

ได้ทดลองว่า Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว และ hepatopancreatic parvovirus ดังนี้

ตาราง 4 แสดงส่วนผสมของ Multiplex PCR reaction ระหว่างเชื้อไวรัสในกลุ่มดีเอ็นเอ

ส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Autoclaved disstilled water	5.5
2x reaction mix	10.0
Primer NVP 500F	0.5
NVP 500R	0.5
HPV305F	0.5
HPV305R	0.5
DNA Template (WSSV)	1.0
DNA Template (HPV)	1.0
Taq mix	0.25
รวม	20

- ✧ นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- ✧ นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

PCR amplification

40 cycles of

Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Annealing step 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Extension step 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Final extension

1 cycles , 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ทำซ้ำ 40 รอบ จากนั้นนำ PCR product เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

✧ นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน

✧ บันทึกภาพโดยชุดถ่ายภาพเจล

5.4.2 ทดลองทำ Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัสหัดเหลือง และ ไวรัส

Hepatopancreatic parvovirus

ได้ทดลองว่า Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัส YHV และ HPV ดังนี้

ตาราง 5 แสดงส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction

ส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Autoclaved disstilled water	5.5
2x reaction mix	10.0
Primer HPV 305F	0.5
HVP 305R	0.5
YHV135F	0.5
YHV135R	0.5
RNA Template (YHV)	1.0
DNA Template (HPV)	1.0
RT – platinum Taq mix	0.25
รวม	20

- ✧ นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- ✧ นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

RT-PCR amplification,

1 cycles , 50 องศาเซลเซียส 45 นาที, 94 องศาเซลเซียส 2 นาที

40 cycles , Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Annealing step 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Extention step 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

Final extention, 1 cycles , 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำ RT- PCR product เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำบางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดย เทียบขนาดกับ DNA มาตรฐานและบันทึกภาพโดยชุดถ่ายภาพเจล

5.4.3 ทดลองทำ Multiplex RT- PCR ระหว่างเชื้อไวรัสหัวเหลือง และ ตัวแดงจุดขาว

ได้ทดลองว่า Multiplex RT-PCR ระหว่างเชื้อไวรัส YHV และ WSSV ดังนี้

ตาราง 6 แสดงส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction

ส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Autoclaved disstilled water	5.5
2x reaction mix	10.0
Primer WSSV 500F	0.5
WSSV 500R	0.5
YHV135F	0.5
YHV135R	0.5
RNA Template (YHV)	1.0
DNA Template (WSSV)	1.0
RT – platinum <i>Taq</i> mix	0.25
รวม	20

- ✧ นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- ✧ นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาและการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต RT-PCR เช่นเดียวกับทดลองที่ 5.4.3

5.4.4 ทดลองทำ Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงจุดขาว ไวรัสและHepatopancreatic parvovirus

ได้ทดลองว่า Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัสYHV WSSV และ HPV ดังนี้

ตาราง 7 แสดงส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction

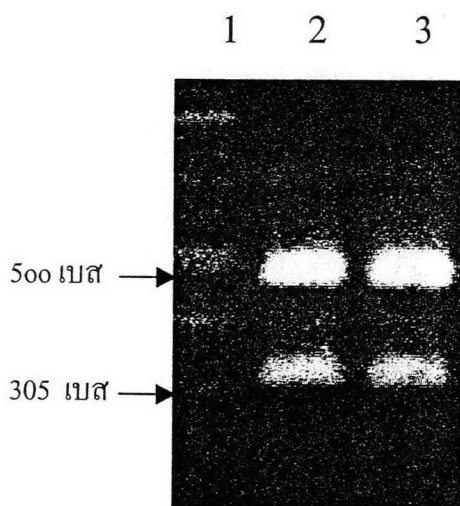
ส่วนผสมของ Multiplex RT – PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Autoclaved distilled water	4.5
2x reaction mix	10.0
Primer	
WSSV 500F	0.5
WSSV 500R	0.5
HPV305F	0.5
HPV305R	0.5
YHV135F	0.5
YHV135R	0.5
RNA Template (YHV)	1.0
DNA Template (WSSV)	1.0
DNA Template (HPV)	1.0
RT – platinum <i>Taq</i> mix	0.25
รวม	20

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- ✧ นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาและการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต RT-PCR เช่นเดียวกับทดลองทำ Multiplex RT- PCR ระหว่างเชื้อไวรัสหัวเหลือง และ ไวรัสตัวแดงจุดขาว

ผลการทดลอง

Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัสในกลุ่มดีเอ็นเอ

ได้ทำการพัฒนาการตรวจสอบไวรัสในกลุ่ม DNA คือ ไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัส HPV โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยทำการออกแบบ primer 2 คู่จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีนสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้ม VP 28 และ nVP28 ขนาด 500 เบส ในบริเวณ conserve sequence และจาก genome ของ HPV ขนาด 305 เบส(รูปที่ 1)



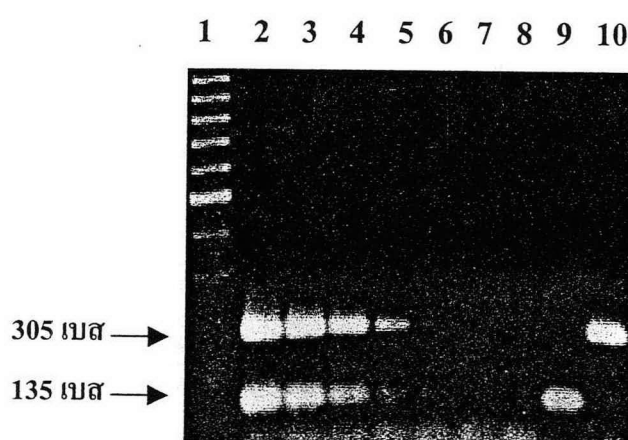
รูปที่ 1 ผลการศึกษา Multiplex PCR ระหว่างเชื้อไวรัส WSSV และ HPV

ช่องที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

ช่องที่ 2-3 ตัวอย่าง mix infection ของเชื้อไวรัส wssv และ HPV. ในกึ่งกลางค่า 2 ตัวอย่าง

Multiplex RT-PCR ระหว่าง YHV และ HPV

คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาการตรวจสอบไวรัสหัดเหลืองและไวรัส HPV โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยทำการออกแบบ primer 2 คู่จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัดเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 135 เบส และจาก genome ของ HPV ขนาด 305 เบส (รูปที่ 2) โดยการทำ RT-PCR เพียงขั้นตอนเดียว และยังสามารถทำการสกัดไวรัสที่เป็น DNA และ RNA ร่วมกันได้ภายในขั้นตอนเดียว

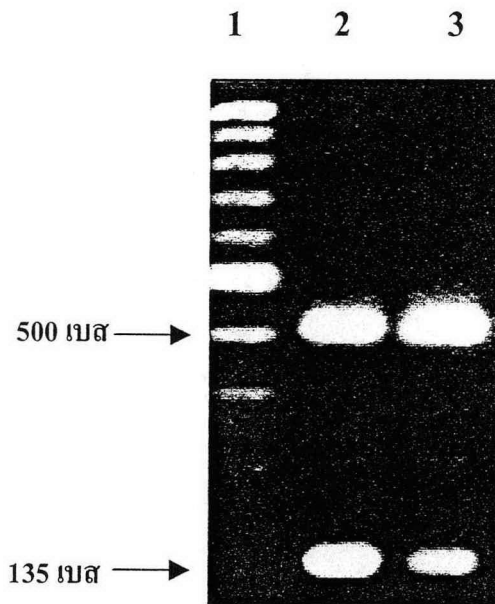


รูปที่ 2 ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัส YHV และ HPV

ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ คือ primer 135F และ 135R กับ primer HPV 305F และ HPV 305R ช่อง 2-8 คือ RNA ของเชื้อ YHV และ DNA ของเชื้อ HPV ปริมาณ 1,000-0.001 pg ตามลำดับ ช่อง 9 และ 10 เป็น 100pg RNA ของ YHV และ DNA ของ HPV ตามลำดับ

3. การทำ Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัดเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

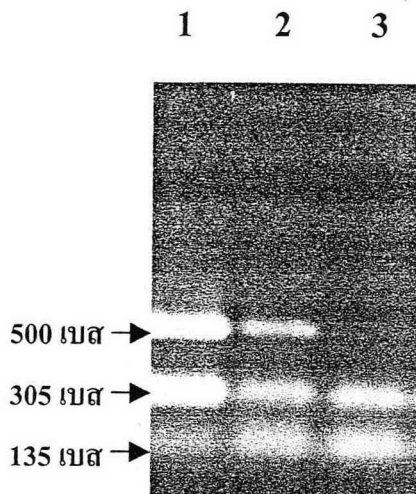
คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการทำ Multiplex RT-PCR ระหว่าง WSSV ซึ่งเป็น DNA virus และ YHV ซึ่งเป็น RNA virus (รูปที่ 3) โดยการทำ RT-PCR เพียงขั้นตอนเดียว และสามารถทำการสกัดไวรัสที่เป็น DNA และ RNA ร่วมกันได้ภายในขั้นตอนเดียว



รูปที่ 3 ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง
ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ คือ primer 135F และ 135R กับ primer NV500F และ VP500R
ช่อง 1-2 คือ DNA ของเชื้อ WSSV และ RNA ของเชื้อ YHV ปริมาณ 1000, 100 pg ตามลำดับ

4. การทำ Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวและ HPV

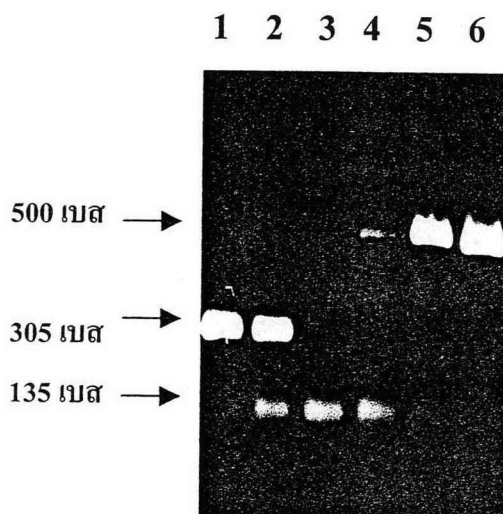
คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาการตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัส HPV โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยทำการออกแบบ primer 3 คู่จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสามชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 135 เบส เชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีนสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้ม VP 28 และ VP28 ขนาด 500 เบส ในบริเวณ conserve sequence และจาก genome ของ HPV ขนาด 305 เบส (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผล multiplex RT-PCR product ของไวรัสหัดเหลือง ไวรัสตัวแดงจุดขาวและ HPV ที่ได้จาก การใช้ primer 2 คู่ คือ primer 135F และ 135R กับ primer NV500F และ VP500R และ primer HPV305F และ HPV 305R ช่อง 1-3 คือ RNA ของเชื้อ YHV DNAของเชื้อ WSSV และ DNA ของไวรัส HPV ปริมาณ 100, 10 และ 1 pg ตามลำดับ

5. Multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัดเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวและ HPV ภาคนาม

คณะผู้วิจัยได้ทำ Multiplex RT-PCR ระหว่าง WSSV และ YHV ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มี รายงานการติดเชื้อจากที่ต่างๆ ซึ่งการใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ผลการตรวจสอบเป็นอย่างดี (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ตัวอย่างการใช้ชุดตรวจสอบ Multiplex-RT-PCR เพื่อตรวจสอบไวรัสหัดเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวในภาคนามจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 2 และ 4 แสดงถึงสภาวะติดเชื้อผสม (Mix infection) ตัวอย่างที่ 5 และ 6 ติดเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวและตัวอย่างที่ 3 ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง และตัวอย่างที่ 1 ติดเชื้อ HPV เพียงอย่างเดียว

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาการตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัส HPV โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยทำการออกแบบ primer 2 คู่จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสามชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 135 เบส เชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีนสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้ม VP 28 และ VP28 ขนาด 500 เบส ในบริเวณ conserve sequence และจาก genome ของ HPV ขนาด 305 เบส

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการทำ Multiplex RT-PCR เพียง 1 ขั้นตอนระหว่างกลุ่ม DNA virus คือ WSSV และ HPV และ RNA virus คือ YHV อีกทั้งยังสามารถทำการสกัดไวรัสที่เป็น DNA และ RNA ร่วมกันได้ภายในขั้นตอนเดียว จึงสามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งได้ถึง 3 เชื้อได้ในเวลาเดียวกันในหลอดทดลองหลอดเดียว ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยประหยัดเวลาในการตรวจสอบสะดวกในการนำไปใช้ทั้งในห้องทดลองและภาคสนาม รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบซึ่งในปัจจุบันการตรวจเชื้อไวรัสจากกุ้งโดยแยกเชื้อที่ใช้อยู่มีราคาสูงมาก รวมไปถึงลดการสูญเสียรายได้จากการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศ

อย่างไรก็ดีคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาการตรวจสอบ multiplex RT-PCR ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัส gill associated virus (GAV) ที่พบระบาดมากที่ประเทศออสเตรเลียและมีลักษณะพันธุกรรมคล้ายไวรัสหัวเหลืองที่พบระบาดมากในประเทศไทย โดยประสบผลสำเร็จในการทำ multiplex RT-PCR ที่สามารถบ่งบอกว่ากุ้งกุลาดำมีการติดเชื้อจากไวรัสตัวใด หรือมีการติดเชื้อได้มากกว่าหนึ่งชนิดหรือไม่ (รายละเอียดใน manuscript ที่แนบมาด้วย)

บรรณานุกรม

- Wongteerasupaya C.**, Pungchai P., Withyachumnarnkul B., Panyim S., and Vichai Boonsaeng.
High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus
(WSSV) isolates from Thailand . *Dis Aquat* 2003, 54(3) : 253-257
- Sukumsirichart W., Kiatpathomchai W., **Wongteerasupaya C.**, Withyachumnarnkul B., Flegel
TW., Boongsang V., and Panyim S. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV)
in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol Cell Probes*. 2002 16(6): 409-413
- Kiatpathomchai W., Boonsaeng V., Tassanakajon A., **Wongteerasupaya C.**, Jitrapakdee S.,
Panyim, S. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity
of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Dis Aquat* 2001, 47(3):235-
239
- Boongsang V., Tongchuea W., Kanchanaphum P., Klingputsorn R., **Wongteerasupaya C.**,
Sittidilokratana N., Jittiwatana K., Tassanakajon A., and Panyim S. PCR-based
detection of shrimp viral disease in Thailand in Molecular Diagnostics for shrimp viruses
in the Asian Region (work shop II) March 2000 , L8/1-5
- Hodgson R., and **Wongteerasupaya C.** One tube RT-PCR for the detection of yellow-head virus
(YHV) in total nucleic acid extracts in Molecular Diagnostics for shrimp viruses in the
Asian Region (workshop I) February 1999 , P9/1-5
- Sukumsirichart W., **Wongteerasupaya C.**, Boongsang V., Panyim S., Sriurairatan S.,
Withyachumnarnkul B., and Flegel TW. Characterization and PCR detection of
Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aqua* 1999,
38:1-10
- Cowley, A.J., Dimmock, C.M., **Wongteerasupaya, C.**, Boonsaeng, V., Panyim, S. and
Walker P.J. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill – associated virus from
Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of Aquatic*

- Kanchanaphum, P., Boonsaeng, V., Panyim, S., **Wongteerasupaya, C.**, Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., and Flegel, T.W. 1998. Experimental transmission of White – spot baculovirus (WSBV) from crabs to shrimp (*penaeus monodon*) *Diseases of Aquatic Organisms*. 34:1-7
- Wongteerasupaya, C.**, Tongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow – head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT – PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31: 181-186
- Wongteerasupaya, C.**, Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* Baculovirus PmNOBII give positive *in situ* hybridization with white – spot virus Infection in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*. 143:23-32
- Wongteerasupaya, C.**, Vickers, J.E., Sriurawatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. A non – occluded, systemic Baculovirus that occurs in cells of Ectodermal and Mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21:69-77
- Wongteerasupaya C.**, Sriurawatana S., Vickers J.E., Akarajamorn A., Boonsaeng V., Panyim S. Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. Yellow – head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22:45-50

A multiplex RT-nested PCR to differentiate gill-associated virus from Australia and yellow head virus from Thailand

Jeff A. Cowley^{1*}, Chainarong Wongteerasupaya², Lee C. Cadogan¹, , Richard A.J. Hodgson¹, Kirsten M. Spann¹, Vichai Boonsaeng³ and Peter J. Walker¹

¹Co-operative Research Centre for Aquaculture, CSIRO Livestock Industries, 120 Meiers Road, Indooroopilly 4068, Australia

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

*** Correspondence to:** Jeff A Cowley PhD

Ph: 61-7-3214-2855 Fax: 61-7-3214-2881

E-mail: Jeff.Cowley@csiro.au

Running Title: Differential detection of GAV and YHV by RT-nested PCR

Summary

A multiplex RT-nested PCR is described to co-detect and differentiate the closely related prawn okaviruses, gill-associated virus (GAV) from eastern Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand. RT-PCR using primers to conserved sequences in the ORF1b gene amplified a 794 bp region of both GAV and YHV. Separate nested PCRs using a generic sense primer and antisense primers targeting a sequence divergent between GAV and YHV differentially amplified a 277 bp region of the primary PCR product. By multiplexing the YHV antisense primer with one complementary to GAV that targeted an alternative divergent sequence, the viruses were distinguished in a single nested PCR. The nested PCRs enhanced detection sensitivity ~1000-fold and could detect GAV or YHV RNA in ~10 fg lymphoid organ total RNA. The RT-PCR/multiplex-nested PCR was also able to distinguish YHV and GAV RNA mixed over a wide range of concentrations to simulate potential dual-infection states. The usefulness of the test was examined using RNA isolated from healthy and diseased *Penaeus monodon* infected with GAV and from diseased YHV-infected *P. monodon* collected at different locations in eastern Australia and Thailand, respectively, between 1994 and 1998. The multiplex nested PCR differentially amplified either GAV (406 bp) or YHV (277 bp) products as predicted and, in the case of YHV, this included 5 RNA samples in which primary RT-PCR products were not detected. Although sequencing of GAV and YHV PCR amplicons identified minor variations in the regions targeted by the differential antisense primers, none critically affected the PCR.

Keywords: yellow head virus, gill-associated virus, RT-PCR, differential detection, *Penaeus monodon*, penaeid shrimp, prawn

1. Introduction

Yellow head virus (YHV) from Thailand and gill-associated virus (GAV) from Australia are morphologically indistinguishable rod-shaped, enveloped viruses that can be highly pathogenic for *Penaeus monodon* (black tiger prawns) (Boonyaratpalin et al., 1993, Chantanachookin et al., 1993, Lu et al., 1995, Spann et al., 1997). GAV and YHV cause similar histopathology in diseased prawns and *in situ* hybridisation (ISH) and transmission electron microscopy (TEM) have detected the viruses throughout the lymphoid organ, gills, haemocytes, cuticular epithelium and in connective tissues of head organs and abdominal muscle and in the eyes (Boonyaratpalin et al., 1993, Chantanachookin et al., 1993, Lu et al., 1995, Spann et al., 1997, Tang and Lightner, 1999, Tang et al., 2002, Smith, 2000). Asymptomatic or chronic infection states in which GAV, originally described as lymphoid organ virus (LOV), is exclusively observed by ISH and TEM within foci of hypertrophied cells or spheroids in the lymphoid organ are also highly prevalent in healthy wild and farmed *P. monodon* in the northeast region of Queensland, Australia (Spann et al., 1995, 2002, Cowley et al., 2000a, Walker et al., 2001).

Penaeid species from Hawaii and the Western hemisphere, including *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus* and *P. vannamei*, are susceptible to experimental YHV infection (Lu et al., 1994, Lightner et al., 1998), while species farmed commercially in Australia, including *P. esculentus*, *P. merguensis* and *P. japonicus*, are similarly susceptible to GAV (Spann et al., 2000). With either virus, however, there are some age/size and species-related differences in the development of disease. Histopathology consistent with YHV infection has been reported in *P. japonicus* in Taiwan (Wang et al., 1996) that also displayed typical signs of severe white spot syndrome virus disease. In Australia, RT-nested PCR has detected GAV in low levels in healthy *P. esculentus* co-cultivated with *P. monodon* (Walker et al., 2001). However, other than these reports, natural infection of penaeid species other than *P. monodon* appears to be uncommon. Nevertheless, the ability to generate acute infection states experimentally suggests YHV and GAV represent significant threats to cultivated prawn species other than *P. monodon*.

YHV contains a >22 kb single-stranded RNA genome (Wongteerasupaya et al., 1995, Nadala et al., 1997) and of likely (+) polarity (Tang and Lightner, 1999) and three major

structural proteins of 110-135 kDa, 63-67 kDa and 20-22 kDa (Nadala *et al.*, 1997, Wang & Chang, 2000). The 2 larger YHV proteins are glycosylated and likely form the virion envelope spikes (Jitrapakdee *et al.*, submitted). The gene organisation of the complete 26.2 kb RNA genome of GAV has recently been reported (Cowley *et al.*, 2000b, 2001, Cowley and Walker, 2002). The 5'-terminal 20 kb of the GAV genome comprises a single gene encoding two long overlapping open reading frames (ORF1a-1b), the second of which is translated by a -1 ribosomal frameshift mechanism, that contain functional motifs related to those also found in the pp1ab replicase polyproteins of vertebrate viruses in the *Coronaviridae* and *Arteriviridae* (Cowley *et al.*, 2000b). GAV also transcribes 3'-coterminal subgenomic RNAs that do not possess 5'-leader sequences in contrast to coronaviruses and arteriviruses (Cowley *et al.*, 2002) and together with the genetically related YHV (Cowley *et al.*, 1999, Sitidilokratana *et al.*, 2002) has been classified as the type species of a new genus, *Okavirus*, of a new family, *Roniviridae*, within the Order *Nidovirales* (De Vries *et al.*, 1997, Cowley *et al.*, 2000b, 2001, Cowley and Walker, 2002).

Sensitive molecular methods such as RT-PCR (Wongteerasupaya *et al.*, 1997, Tang and Lightner, 1999, Cowley *et al.*, 1999, 2000a), ISH (Tang and Lightner, 1999, Tang *et al.*, 2002) and real-time RT-PCR (Dhar *et al.*, 2002) have been used to detect YHV or GAV in clinical samples. In this paper, we have exploited variations in the Thai YHV and Australian GAV genome sequences to develop a multiplex RT-nested PCR to co-detect and distinguishes these viruses.

2. Materials and Methods

2.1. Prawn samples

Healthy *Penaeus monodon* infected asymptomatically with GAV (Spann *et al.*, 1995) and moribund prawns displaying characteristic clinical symptoms, histopathology and TEM evidence of acute GAV infection (Spann *et al.*, 1997) were obtained from hatcheries and farms in northeast and southeast Queensland between February 1996 and March 1998. Experimental infections with a prototype GAV isolate originating from a farm disease episode in north-east Queensland in 1996, were conducted as described previously (Spann *et al.*, 1997) and prawn tissues were collected at 5-7 days post infection when cumulative mortalities had reached ~40%. *P. monodon* were also infected experimentally with a prototype YHV isolate by injecting the tail muscle with haemolymph containing YHV

(Wongteerasupaya et al., 1995, 1997). Lymphoid organs and haemolymph were collected from YHV-infected prawns 3-5 days post infection. Prawns from farm outbreaks of yellow head disease were collected from different locations in Thailand between 1994 and 1998. The origins of prawns representing the sources of GAV and YHV RNA samples are listed in Table 1.

2.2. RNA isolation

For RNA isolation, whole head homogenates (Spann et al., 1997), haemolymph, gill or lymphoid organ tissue were collected using sterilised instruments and either processed immediately or snap frozen on dry ice and stored in liquid nitrogen until used. Lymphoid organ or gill tissue was homogenised in TRIzol-LSTM (Invitrogen) using a pellet pestle. Haemolymph and 0.2 µm filtered head homogenates were dissolved directly in TRIzol-LSTM and RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA was resuspended in DEPC-water, heated at 55°C for 5 min, quantified by spectrophotometry (A_{260nm}) and stored at -70°C. All reagents and tissue samples were handled in a separate laboratory using a laminar flow cabinet and aerosol-resistant barrier pipette tips to prevent contamination with PCR products.

2.3. Primers

The sequences of primers used for generic RT-PCR amplification of GAV and YHV (GY) and specific nested PCR amplification of either GAV (G) or YHV (Y) are listed; GY1 (5'-GACATCACTCCAGACAACATCTG-3'), GY2 (5'-CATCTGTCCAGAAGGCGTCTATGA-3'), G3 (5'-GCGTTCCTTTGTGAGCATAAATGA-3'), Y3 (5'-ACGCTCTGTGA CAAGCATGAAGTT-3'), GY4 (5'-GTGAAGTCCATGTGTGTGAGACG-3'), GY5 (5'-GAGCTGGAATTCAAGTGAGAGAACA-3') and G6 (5'-GTAGTAGAGACGAGTGAC ACCTAT-3'). Lengths (23-24 nt) and melting temperatures ($T_m \pm 4^\circ\text{C}$) of all primers were closely matched. The generic GY2 nested PCR primer was designed with a slightly higher T_m to compensate for a single base mismatch with the prototype GAV sequence (Cowley et al., 2000b). All oligonucleotides were synthesised using an Oligo-1000 DNA Synthesiser (Beckman). RT-PCR with primer pair GY1-GY4 was expected to amplify a 794 bp product. Nested PCRs were designed to amplify products of 277 bp with primer pairs GY2-G3 and GY2-Y3, 293 bp with primer pairs GY1-G3 and GY1-Y3 and 406 bp with the primer pair GY2-G6.

2.4. RT-PCR

Total RNA (100 ng) and 35 pmol primer GY5 were incubated at 70°C for 10 min in 6 µl DEPC-water and chilled on ice. cDNA was synthesised by adding 2 µl Superscript II buffer x 5 (Invitrogen), 1 µl 100 mM DTT and 0.5 µl 10 mM dNTP mix and incubation at 42°C for 2 min prior to adding 0.5 µl 200 U/µl Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and further incubation at 42°C for 1 h. Reverse transcriptase was inactivated at 70°C for 15 min and the reaction quenching on ice. For RT-PCR, 1 µl cDNA reaction was amplified in 50 µl containing 1 x Taq buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 35 pmol each primer GY1 and GY4, 200 µM each dNTP and 2.5 U *Taq* polymerase (Promega). The reaction mixture was overlaid with 50 µl liquid paraffin and heated at 85°C for 3 min prior to adding cDNA (Chou et al., 1992). DNA was amplified by 35 cycles of 95°C/30 sec, 66°C/30 sec, 72°C/45 sec followed by 72°C/7 min final extension using either a FTS-960 (Corbett Research) or PCR Sprint (Hybaid) thermal cycler. All PCRs utilised 0.5 ml thin-walled tubes. PCR products (10 µl) were resolved in 2% agarose-TAE gels containing 0.5 µg/ml ethidium bromide (Sambrook et al., 1989).

2.5. Differential nested PCRs

An aliquot (typically 0.5 µl) of the RT-PCR was amplified by nested PCR using a 50 µl reaction volume and primer sets GY2-G3, GY2-Y3 or GY2-Y3/G6. Semi-nested PCR reactions utilising the primer pairs GY1-G3 or GY1-Y3 were also evaluated. Nested PCR conditions were as for the RT-PCR except that the extension time was reduced to 20 sec and number of cycles reduced to 25. In cases where the nested PCR was negative, the amplification was repeated with up to 10 µl of the RT-PCR to increase sensitivity. Aliquots (10 µl) of the nested PCR were resolved in 2% agarose-TAE gels as above.

To determine the detection sensitivity of the RT-nested PCR, serial 10-fold dilutions of GAV or YHV lymphoid organ total RNA were prepared in DEPC-water containing 10 ng/µl lymphoid organ total RNA from an uninfected *Penaeus japonicus* as a carrier and to maintain a constant amount of RNA in the cDNA synthesis reaction. Aliquots (1 µl) of diluted RNA were reverse transcribed using primer GY5 and amplified by PCR (primer pair GY1-GY4) and nested PCR using various primer sets (ie. GY1-G3, GY1-Y3, GY2-G3, GY2-Y3 or GY2-Y3/G6). To simulate dual GAV/YHV infections, 10-fold dilutions

of one virus RNA were prepared using a diluent comprising either 100 ng/μl or 1 ng/μl of lymphoid organ total RNA from prawns infected with the other virus. To avoid cross-contamination, all PCR mixes were prepared in a laminar flow cabinet using aerosol-resistant tips and in a different laboratory to that used to analyse PCR products.

2.6. Sequencing

Sequences in the G3/Y3 and G6 differential primer regions were determined for RT-PCR products amplified from all 10 GAV and the 9 YHV field RNA samples. PCR products (794 bp) amplified with primer pair GY1-GY4 were purified using QIAquick™ columns (Qiagen). Both DNA strands of GAV and YHV PCR products were sequenced using primers GY1, GY4, Y3 or G6, Big Dye™ reagent (Applied Biosystems Inc., ABI) and automated ABI Model-377 apparatus (ABI) at the Australian Genome Research Facility, University of Queensland. The sequence in the GY4 and GY5 primer regions of some YHV RNA samples was determined similarly using RT-PCR amplicons generated with other primers (R.A.J. Hodgson et al., unpubl.). Nucleotide sequence chromatograms were analysed and aligned using SeqEd 3.1 (ABI).

3. Results

3.1. Selection of generic and specific GAV and YHV primers

The sequences of the ORF1b gene region of GAV and YHV have recently been reported (Tang and Lightner, 1999, Cowley et al., 1999, Sitidilokratana et al., 2002). The nucleotide (nt) sequence in this gene displays 19.5% overall divergence with the majority of differences occurring in codon 'wobble' positions not altering the ORF1b amino acid (aa) sequence. However, disproportionately higher numbers of mismatches occur in some regions, two of which were used as targets for virus-specific PCR primers. The relative locations of the generic and unique GAV and YHV primers used in the differential multiplex RT-nested PCR are shown in Fig. 1. The region targeted by cDNA primer GY5 was conserved in 3 independent YHV sequences (Wongteerasupaya et al., 1997, Tang and Lightner, 1999, Sitidilokratana et al., 2002) and GAV (Cowley et al., 1999). The virus-specific primers G3 and Y3 used in the differential nested PCR were designed to mismatch at 12/24 nt positions, thus significantly reducing their ability to anneal to the non-homologous DNA template. The nucleotide variations in this primer region were associated with 3 aa changes, including one at the primer 3'-end that was divergent at all 3

codon positions. The GAV-specific primer G6 was designed to a sequence that was divergent at 10/24 nt positions, of which 3 occurred at the primer 3'-end and were associated with an amino acid change. The virus-specific primers were designed to mismatch at their 3' terminus, as 2 or more mismatches at this position will prevent DNA amplification by PCR (Kwok et al., 1990).

3.2. *RT-PCR for detecting both GAV and YHV*

cDNA used in the RT-PCR was synthesised from antisense primer GY5 designed to a region 229 nt downstream of PCR primer GY4 that was conserved in the published prototype Australian GAV and Thai YHV isolates. PCR with generic primers GY1 and GY4 amplified the expected 794 bp product from cDNA derived from either GAV or YHV (Fig. 2a). PCR using 3 different annealing temperatures (ie. 64°C, 66°C and 68°C) gave comparable results and 66°C was selected for subsequent amplifications as this temperature generated slightly more product than 68°C and was free of spurious minor products seen at 64°C when higher viral RNA template levels were amplified (data not shown).

3.3. *Nested PCRs to differentiate GAV and YHV*

Initially, separate differential nested PCRs were tested that used a generic sense primer (GY2), which overlapped GY1, in conjunction with either of 2 virus-specific antisense primers (ie G3 or Y3) targeting the same divergent region between GAV and YHV. Each primer pair GY2-G3 and GY2-Y3 specifically amplified a 277 bp fragment of the 794 bp GAV and YHV RT-PCR products, respectively (Fig. 2). An alternative GAV-specific nested PCR was also tested that employed an antisense primer (G6) targeting a different region than primer G3 and which amplified a 406 bp fragment of GAV only. As shown in Fig. 2b, nested PCRs with these primer combinations only yielded products of the expected size when the antisense primer corresponded to the virus amplified in the generic RT-PCR. However, in nested PCRs employing the opposite antisense primer, elevated levels of the 794 bp GY1-GY4 product were detected, presumably amplified by residual primers carried-over from the RT-PCR. A ~400 bp DNA was also detected in the nested PCRs in which virus-specific amplification could not proceed due to the use of the non-homologous antisense primer. However, this DNA was readily distinguishable from the 277 bp virus-specific products amplified by either primer pair GY2-G3 or GY2-Y3. Moreover, it is

unlikely that this DNA would occur in multiplex nested PCRs incorporating both YHV- (Y3) and GAV-specific (G6) antisense primers (see below) as RT-PCR products derived from either virus would be amplified preferentially and thus quench the generation of this presumed non-specific product.

Semi-nested PCRs in which generic primer GY1 was substituted for GY2 gave comparable results to those shown in Fig. 2 except that the viral DNA fragment (293 bp) amplified was slightly larger (data not shown). A larger (~450 bp) non-specific DNA comparable to the 400 bp DNA detected in the semi-nested PCRs utilising primer GY1 in place of GY2 only in reactions employing the non-homologous antisense primer (data not shown).

A multiplex nested PCR using primer GY2 in conjunction with both GAV- (G6) and YHV-specific (Y3) antisense primers was tested for its ability to differentiate the viruses in a single reaction. DNA products of a size expected for GAV (406 bp) and YHV (277 bp) were amplified only from RT-PCR products derived from GAV and YHV, respectively (Fig. 2c). There was no evidence of cross-reactivity of the antisense primers.

3.4. *Sensitivity of the RT-nested PCR*

The sensitivity limits of the RT-PCR and nested PCR was examined using serial 10-fold dilutions of lymphoid organ RNA from GAV- or YHV-infected *P. monodon* (Fig. 3). The 794 bp RT-PCR product was readily detected using 10 pg RNA with either GAV or YHV and products amplified from 1 pg RNA were visible in low quantities. Nested PCR using primer pairs GY2-G3 or GY2-G6 for GAV and GY2-Y3 for YHV extended the detection limit ~1000-fold (ie. 10 fg RNA). Semi-nested PCRs employing GY1 in place of GY2 increased sensitivity to the same extent (data not shown).

To determine whether the presence of the two virus-specific antisense primers (Y3 and G6) might affect the detection sensitivity of the multiplex nested PCR, PCR products amplified from the GAV and YHV RNA dilution series were mixed 1:1 and amplified with the primer set GY2-Y3/G6 (Fig. 3). In this PCR, YHV (277 bp) and GAV (406 bp) PCR products were co-amplified to the same detection limit (10 fg RNA) obtained in the nested PCRs employing primer pair GY2-Y3 or GY2-G6.

3.5. *RT-nested PCR differentiation of GAV and YHV field samples*

Five RNA samples from healthy *P. monodon* broodstock infected subclinically with GAV, 4 from moribund farmed prawns acutely infected with GAV and 8 from moribund farmed prawns acutely infected with YHV were tested in the multiplex RT-nested PCR (Fig. 4). The RNA originated from tissues of individuals or pooled from a small number of prawns collected at different locations in Australia or Thailand between 1994 and 1998 (Table 1). For GAV, slightly less 794 bp product was amplified in the primary RT-PCR using RNA derived from the 2 cephalothorax homogenates than from the lymphoid organ samples (Fig. 4a). In contrast, a high yield of the 794 bp RT-PCR product was only detected in RNA sample YHV-1 and no product was detected in 5/8 other RNA samples derived from haemolymph, gill or cephalothorax tissues. Multiplex nested PCR using the primer set GY2-Y3/G6 readily amplified a 406 bp product from all 10 GAV samples and a 277 bp product from all but one YHV sample (Fig. 4b). Moreover, comparable yields of 277 bp product were amplified from 8/9 YHV samples irrespective of whether or not a primary PCR product was detected. For the 5 YHV samples (ie. 3, 5, 6, 7, 8) in which little or no primary PCR product was detected, the PCR was repeated using 2 μ l instead of 1 μ l cDNA. Increasing the input cDNA only enhanced PCR product yield with sample YHV-6 (data not shown). However, 277 bp nested PCR product yields were visibly enhanced with most samples and a product was detected with the previously negative YHV-8 sample (Fig 4c). The amount of product detected for YHV-8 increased further when either 5 μ l or 10 μ l of the primary PCR was amplified in the nested PCR.

3.6. *Potential detection of mixed GAV and YHV infections*

To simulate mixed GAV and YHV infections at various viral loads, a 10-fold dilution series of the prototype YHV RNA was prepared in a diluent containing 100 ng/ μ l of the prototype GAV RNA. A reciprocal GAV RNA dilution series was prepared similarly in a diluent containing YHV RNA. All dilutions contained at least 100 ng/ μ l RNA for either virus and comparable amounts of 794 bp product were amplified in the primary PCR using cDNA prepared using primer GY5 and the primer pair GY1-GY4 (data not shown). GAV (406 bp) and YHV (277 bp) specific products were detected in multiplex nested PCRs with the primer set GY2-Y3/G6 to a limit in the simulated GAV/YHV co-infections equal to a minor:major viral RNA template ratio of 1:100 (Fig. 5a). This represented a 10^4 -fold reduction in the detection limit of either minor virus RNA species compared to that

obtained when either virus RNA was diluted in uninfected *P. japonicus* RNA (see Fig. 3). The multiplex RT-nested PCR was repeated using RNA dilutions prepared as above but using a diluent containing 1 ng/μl rather than 100 ng/μl of either YHV or GAV RNA. Just detectable but comparable amounts of the 794 bp RT-PCR product was amplified in all samples (data not shown). However, compared to the previous test, detection limit of the minor RNA in the nested PCR increased to include dilutions containing a minor:major RNA species ratio of 1:10⁵ for GAV and 1:10⁶ for YHV (Fig. 5b). These detection limits were equivalent to 100 fg GAV RNA and 10 fg YHV RNA and approached those obtained when either virus RNA was amplified in the absence of competing viral RNA.

3.7. *Sequence differences among GAV and YHV RNA samples*

Primary RT-PCR products amplified from all 10 GAV (including the prototype) RNA samples using the primer pair GY1-GY4 were sequenced to identify nucleotide variations in the virus-specific nested-PCR primer regions. In the 682 nt region immediately downstream of primer GY1, a maximum of 1.8% (12/682 nt) divergence was detected among the different isolates. Sequences spanning primers GY4 and GY5 were determined for 7/8 YHV RNA samples using a 0.7 kb PCR amplicon generated with other primers (R.A.J. Hodgson et al., unpubl.). Sequences in the differential G3/Y3 and G6 primer regions were determined for all 8 YHV RNA samples using semi-nested PCR amplicons generated using the primer pair GY2-GY4. The sequence of the prototype (Cowley et al., 1999, 2000b, Tang and Lightner, 1998, Sitidilokratana et al., 2002) and field isolates of GAV and YHV in regions targeted by the virus-specific primers G3/Y3 and G6 is shown in Fig. 6. All GAV field samples varied from the prototype at a silent position 6 nt from the 3'-end of primer G3 (U > C) and a position 15 nt from the 3'-end of primer G6 (U > C). Six GAV isolates also varied at a silent position 12 nt from the end of G6 (U > C). Sample GAV4 varied at a position 1 nt from the 3'-end of primer G6 that resulted in a amino acid shift (U > C). Sequencing of the GY1-GY4 products also afforded information in the GY2 primer downstream of the region that overlapped GY1. Six of the GAV samples varied at a silent position 15 nt from the 3'-end of GY2 (A > G) (data not shown). Minor (<1.5%) variations to the prototype YHV sequence were evident in a 0.7 kb amplicon spanning the GY4 and GY5 primer regions in 7 field samples for which PCR products were obtained (data not shown). However, none occurred in sequences targeted by primers GY4 or GY5. Little (<1.8%) variation was also detected in GY2-GY4 PCR amplicons generated from the

8 YHV field RNA samples. In this and the YHV amplicon spanning the GY4-GY5 primer regions, some variations were due to 2 nucleotides (most commonly U/C = Y or A/G = R) being amplified in relative equal amounts at a particular position. Four of the 9 YHV RNA samples displayed such variations at single codon wobble positions in sequences targeted by either primer G3/Y3 or G6 (Fig. 6).

4. Discussion

GAV from Australia and YHV from Thailand are significant pathogens of *Penaeus monodon* that threaten the sustainability of the cultured prawn industries in countries that predominantly farm this species. The level (81.5%) of nucleotide sequence conservation in the ORF1b gene of GAV and YHV (Cowley et al., 1999, Sitidilokratana et al., 2002) indicates that they can be considered as geographic topotypes but has allowed their cross-detection by RT-PCR (Cowley et al., 1999) and *in situ* hybridisation (Tang et al., 2002). Moreover, the viruses are morphologically indistinguishable, induce similar pathology (Boonyaratpalin et al., 1993, Chantanachookin et al., 1993, Spann et al., 1997) and have similar tissue tropism as determined by ISH (Tang and Lightner, 1999, Tang et al., 2002, Spann et al., in press). Clinical disparities pertaining to the apparently faster rate at which mortalities accumulate in prawns infected experimentally with YHV or to cephalothorax yellowing with YHV or whole body reddening with GAV have been reported in acutely infected *P. monodon*. However, these are subjective, inconsistent and would be unreliable in distinguishing between these viruses.

Here we have exploited sequence differences to develop an RT-nested PCR to co-detect and distinguish GAV and YHV. The RT-PCR utilises primers to conserved ORF1b gene sequences to amplify RNA of both viruses followed by a nested PCR using multiplexed virus-specific primers to different divergent sequences to distinguish the viruses. The virus-specific primers incorporated 10-12/24 mismatches, including 3 at their 3'-terminus associated with amino acids shifts, to prevent amplification of the non-homologous sequence. Two or more mismatches at the 3'-end of a primer have been shown previously to dramatically inhibit PCR (Sommer and Tautz, 1989, Kwok et al., 1990). Otherwise, all of the 23-24 mer primers were matched to a PCR annealing temperature that would ensure specificity but accommodate mutations expected among different isolates of YHV or GAV.

Such mutations will occur as GAV (Cowley et al., 2000b, Cowley and Walker, 2002) and YHV (Wongteerasupaya et al., 1995, Nadala et al., 1997, Sitidilokratana et al., 2002), like the related coronaviruses and arteriviruses, are likely to possess an RNA-dependent RNA polymerase lack proofreading abilities that will cause relatively high rates of genetic drift and the establishment of virus quasispecies populations (see reviews Steinhauer and Holland, 1987, Holland et al., 1992).

The specificity of the RT-nested PCR was initially evaluated using RNA to prototype GAV and YHV isolates, generic RT (GY5) and primary PCR primers GY1-GY4 and separate nested PCRs using a generic sense primer (GY2) with either a GAV- (G3) or YHV-specific (Y3) antisense primer. The primary RT-PCR amplified both viral RNAs while each nested PCR amplified only GAV or YHV. The nested PCR extended the detection limit of the RT-PCR ~1000-fold and, although we are unable to quantify this to template copies, viral RNA was detectable in ~10 fg total RNA isolated from the lymphoid organ from *P. monodon* infected experimentally with GAV or YHV. This detection limit is consistent with an RT-nested PCR targeting a downstream region of the GAV ORF1b gene (Cowley et al., 2000a). The additional sensitivity afforded by nested PCR is extremely important as prawns can often possess subclinical infections in which viral RNA levels are insufficient to be detected by 1-step RT-PCR (Cowley et al., 2000a, Walker et al., 2001).

To distinguish the GAV and YHV in a single nested PCR, a GAV-specific primer (G6) targeting an alternative divergent sequence to that targeted by primer G3 was multiplexed with the YHV-specific primer Y3. Nested PCR using the multiplexed primer set (ie. GY2-Y3/G6) generated different sized products for GAV (406 bp) and YHV (277 bp). The multiplex nested PCR also extended the detection limit ~1000-fold for both viruses. Moreover, 1:1 mixtures of YHV and GAV PCR products amplified from separate RNA dilution series co-detected both viruses to the same limit, indicated that the nested PCR conditions did not favour either primer pair (ie. GY2-Y3 or GY2-G6) when comparable amounts of either virus DNA template were present.

The multiplex RT-nested PCR was tested using GAV and YHV RNA mixed at various ratios to simulate different co-infection states. This was examined as chronic GAV infection is highly prevalent in wild and farmed *P. monodon* in eastern Australia (Spann et

al., 1995, Cowley et al, 2000a, Walker et al., 2001) and any potential incursion of YHV into this region would likely involve superinfection of GAV-infected prawns. When GAV RNA was diluted in 100 ng RNA from prawns infected with YHV and vice versa, RT-nested PCR detection of the minor viral RNA species was quenched beyond a minor:major RNA ratio of 1:100. This equated to a $\sim 10^4$ -fold decrease in detection sensitivity compared to when the RT-nested PCR was used in the absence of competing viral RNA. We have not determined whether amplification of the minor RNA species was quenched during the reverse transcription or PCR steps or both. However, amplification was dependent on the amount of competing RNA, as when 1 ng rather than 100 ng of competing viral RNA was used as a diluent, the nested PCR detection limits of the minor viral RNAs (ie. 10-100 fg lymphoid organ total RNA) approached those obtained in its absence. Thus, although it may be somewhat dependent on the level of infection, the multiplex RT-nested PCR should be able to co-detect and distinguish GAV and YHV in co-infected prawns where the ratio of minor to major viral RNA is in the range of 1:1 to between 1:100 and 1:100000.

The multiplex RT-nested PCR accurately identified and distinguished GAV and YHV in RNA samples from prawns collected from different locations in Australia and Thailand, respectively, over 2 to 4 year periods. In the case of GAV, this included RNA from both healthy and diseased *P. monodon*. In the case of YHV, all RNA samples were derived from prawns sourced from farm disease episodes. While whole head homogenates or lymphoid organs of GAV-infected prawns contained sufficient viral RNA to be amplified by RT-PCR, YHV was only detected in 4 of the 9 pooled prawn haemolymph, gill or cephalothorax RNA samples tested. Nevertheless, the multiplex nested PCR was able to amplify GAV- or YHV-specific products in all cases, including those YHV samples in which no RT-PCR product was detected. Previous testing of lymphoid organ RNA from individual GAV-infected prawns using a published RT-nested PCR method has identified animals with infections not detectable without the use of nested PCR (Cowley et al., 2000a and unpubl, Walker et al., 2001). Moreover, with GAV, such testing has also provided some evidence that RNA from lymphoid organ and gill tissue provides increased detection sensitivity compared to RNA from haemocytes collected from haemolymph (Cowley et al., 2000a). Unfortunately we were unable to determine whether this is also the case in the YHV-infected prawns as lymphoid organ or separate gill RNA matching the YHV haemolymph or whole cephalothorax RNA samples were not available for testing.

RT-PCR amplicons from the GAV and YHV RNA samples were sequenced to determine whether significant genomic variability might occur particularly in the regions targeted by the differential G3/Y3 and G6 nested PCR primers. Analysis of amplicons from GAV- and YHV-infected prawns collected at different locations over a 2-4 year time period identified minor (<1.8%) nucleotide variations, primarily at codon wobble positions, compared to the genome sequences of the prototype viruses (Cowley et al., 1999, 2000b, Sitidilokratana et al., 2002). Previous data that single primer:template mismatches (other than A:G, G:A, C:C or A:A at the 3' terminal nucleotide of the primer) will not adversely effect PCR product yields (Sommer and Tautz, 1989, Kwok et al., 1990) was substantiated here. Among the GAV samples, 1 to 3 nt changes occurred in regions targeted by the nested PCR primers, including one in which there was an A:C mismatch 1 nt in from the 3'-end of primer G6. However, none of the sequence variations identified appeared to adversely affect nested PCR performance. Among the YHV samples, no variation occurred in sequences targeted by RT-PCR primers GY4 and GY5 while in 4 samples, 2 nucleotides occurred in relatively equal amounts at single positions in the regions targeted by the nested PCR primers Y3 or G6. As these YHV samples originated from tissues pooled from several prawns, it is likely that minor genotypic variants present in different prawns contributed to this situation. In all, the absence of substantial variations in the ORF1b gene region of Australian GAV isolates from either the healthy or diseased prawns and Thai YHV isolates from diseased prawns suggests that the multiplex RT-nested PCR described here should prove to be quite robust in differentiating these genotypes.

Potential mechanisms for the inadvertent introduction of the major viral pathogens, YHV and white spot syndrome virus (WSSV), of Asia into prawn aquaculture industries in other regions of the world are well documented (Lightner et al., 1997, Nunan et al., 1998). Of primary concern is the importation and processing of live or frozen uncooked *P. monodon*. The sequence divergence between Thai YHV and Australian GAV isolates suggests any incursion of these or related viruses may be distinguishable from the virus population indigenous to a particular region and traceable to the origin of the incursion. We are currently sourcing yellow head-complex viruses from different regions in Australia, South-east Asia, India, Central America and elsewhere to determine the extent of genetic diversity among virus populations. Such sequence comparisons should help establish whether these

viruses are endemic to or recently introduced into a particular location. Furthermore, such data should prove to be extremely useful in monitoring any spread of YHV-complex viruses associated with movements of broodstock, postlarvae and frozen commodity shrimp, particularly *P. monodon*, between these regions. The multiplex RT-nested PCR described here provides a rapid and sensitive tool for detecting and differentiating the currently recognised YHV genotype associated with disease episodes in Thailand and GAV genotype ubiquitous among wild and farmed *P. monodon* in Australia. It is recognised, however, that this or similar multiplexed RT-PCR tests could be streamlined further to minimise sample manipulations and modified to accommodate new virus genotypes as they are identified.

Acknowledgments

We thank CSIRO Marine Research and Queensland prawn farm and hatchery operators for supplying prawns. This research was supported in part by the Australian Centre for International Agricultural Research, the National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology of Thailand and the Thailand Research Fund.

References

- Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., Direkbusaracom, S., Aekpanithanpong, U., Cantanachookin, C., 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish. Patho. 128, 103-109.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Sataporn, D., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S., Flegel, T.W., 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulomas-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat. Org. 17, 145-157.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W., 1992. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerisation improves low-copy number amplifications. Nucl. Acids. Res. 20, 1717-1723.
- Cowley, J.A., Walker, P.J., 2002. The complete genome sequence of gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns indicates a gene organisation unique among nidoviruses. Arch. Virol. 147, 1977-1987.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M., Walker, P.J., 2000a. Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. Dis. Aquat. Org. 39, 159-167.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M., Walker, P.J., 2000b. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen. Virol. 81, 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M., Walker, P.J., 2001. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: molecular evidence for the first invertebrate nidovirus. Adv. Exp. Med. Biol. 494, 43-48.

- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Walker, P.J., 2002. Gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns transcribes 3'-coterminial subgenomic mRNAs that do not possess 5'-leader sequences. J. Gen. Virol. 83, 929-937.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., Walker, P.J., 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct viruses. Dis. Aquat. Org. 36, 153-175.
- De Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., De Groot, R.J., 1997. The genome organization of the *Nidovirales*: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. Semin. Virol. 8, 33-47.
- Dhar, A.K., Roux, M.M., Klimpel, K.R., 2002. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. J. Virol. Meth. 104, 69-82.
- Holland, J.J., De La Torre, J.C., Steinhauer, D.A., 1992. RNA virus populations as quasispecies. Current Top. Microbiol. Immunol. 176, 1-20.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucl. Acids Res. 18, 999-1005.
- Lightner, D.V., Hasson, K.W., White, B.L., Redman, R.M., 1998. Experimental infection of western hemisphere Penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. J. Aquat. Animal Health 10, 271-281.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L., Hasson, K.W., 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. 16, 146-160.

- Lu, Y., Tapay, L.M., Brock, J.A., Loh, P.C., 1994. Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish Dis. 17, 649-656.
- Lu, Y., Tapay, L.M., Loh, P.C., Brock, J.A., Gose, R.B., 1995. Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 23, 67-70.
- Nadala, E.C.B. Jr, Tapay, L.M., Loh, P.C., 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 31, 141-146.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T., Lightner, D.V., 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. Aquaculture 160, 19-30.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Šitidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Jitrapakdee, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Walker, P.J., 2002. Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. Dis. Aquat. Org. 50, 87-93.
- Smith, P.T., 2000. Diseases of the eye of farmed shrimp *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Organ. 43, 159-173.
- Sommer, R., Tautz, D., 1989. Minimal homology requirements for PCR primers. Nucl. Acids Res. 17, 6749.
- Spann, K.M., Vickers, J.E., Lester, R.J.G., 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. Dis. Aquat. Org. 23, 127-134.
- Spann K.M., Cowley, J.A., Walker, P.J., Lester, R.J.G., 1997. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. Dis. Aquat. Org. 31, 169-179.

- Spann, K.M., Donaldson, R.A., Cowley, J.A., Walker, P.J., 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.* 42, 221-225.
- Spann, K.M., McCulloch, R.J., Cowley, J.A., East, I.J., Walker, P.J., 2000. Tissue distribution of gill-associated virus during chronic and acute phase infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus japonicus*. *Dis. Aquat. Org.* (in press).
- Steinhauer, D.A., Holland, J.J., 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 409-433.
- Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application to *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 35, 165-173.
- Tang, K.F.J., Spann, K.M., Owens, L., Lightner, D.V., 2002. *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture* 205, 1-5.
- Walker, P.J., Cowley, J.A., Spann, K.M., Hodgson, R.A.J., Hall, M.R., Withyachumnarnkul, B., 2001. Yellow head complex viruses: transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 227-237.
- Wang, Y.C., Chang, P.S., 2000. Yellow head virus infection in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* cultured in Taiwan. *Fish Path.* 35, 1-10.
- Wang, C.S., Tang, K.F.J., Kou, G.H., Chen, S.N., 1996. Yellow head disease-like virus infection in Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in Taiwan. *Fish Path.* 31, 177-182.

- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Akrajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnjul, B., Flegel, T.W., 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Dis. Aquat. Org. 22, 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Tongcheua, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1997. Detection of yellow-head virus of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis. Aquat. Org. 31, 181-186.

Figure Captions

Fig. 1. Relative positions of primers used in RT-PCR and differential nested PCR amplification of GAV and YHV. The nucleotide and deduced amino acid sequences of regions of the GAV ORF1b gene are shown with YHV variations shown below and above, respectively. The sequences targeted by primers are indicated with arrows. Numbering was taken from the GAV-YHV sequence comparison reported previously (Cowley et al., 1999).

Fig. 2. Detection of GAV and YHV RNA by RT-PCR followed by nested PCR with different primer combinations. (a) PCR amplification (primer pair GY1-GY4) of a 794 bp cDNA synthesised from lymphoid organ RNA of *P. monodon* infected with the prototype GAV (lane 1) and YHV (lane 2) RNA samples using primer GY5. (b) Nested PCR amplification of RT-PCR products derived from GAV (lanes 1 - 3) or YHV (lanes 4 - 6) using primer pair GY2-Y3 (lanes 1 and 4), GY2-G3 (lanes 2 and 5) or GY2-G6 (lanes 3 and 6). (c) Nested PCR amplification of either a 406 bp GAV product (lane 1) or 277 bp YHV product (lane 2) using the multiplexed primer set GY2-Y3/G6. PCR products (10 µl) were resolved in a 2% agarose-TAE gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide. M = 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 3. Detection limits of the RT-PCR and different nested PCRs using titrations of lymphoid organ total RNA from *P. monodon* infected experimentally with prototype GAV or YHV isolates. cDNA synthesised from serial 10-fold RNA dilutions (100 ng/µl to 1 fg/µl, lanes 1-9, respectively) with primer GY5 was amplified by PCR with primer pair GY1-GY4. RNA was diluted in 10 ng/µl *P. japonicus* lymphoid organ RNA which was also used as a negative control (lane 10). Nested PCRs were performed with primer pairs GY2-G3 or GY2-G6 for GAV and GY2-Y3 for YHV. A nested PCR was also performed on 1:1 mixtures of GAV and YHV RT-PCR products using the multiplex primer set GY2-Y3/G6. PCR products (10 µl) were resolved as in Fig. 2. M = 1 Kb DNA ladder.

Fig. 4. Detection of different GAV and YHV RNA samples using multiplex RT-nested PCR. The origin of *P. monodon* from which RNA was isolated is described in Table 1. Isolates GAV1 to GAV10 correspond to GAV lanes 1 to 10 and isolates YHV1 to YHV9

correspond to YHV lanes 1 to 9. (a) cDNA synthesised from 100 ng RNA using primer GY5 was amplified by PCR using the primer pair GY1-GY4. GAV lane 11 and YHV lane 10 were negative controls comprising lymphoid organ RNA from uninfected *P. japonicus*. (b) RT-PCR products were amplified by nested PCR using the multiplex primer set GY2-Y3/G6. (c) For selected YHV isolates [ie. 3 (lane 1), 5 (lane 2), 6 (lane 3), 7 (lane 4) and 8 (lanes 5 - 7)] which produced little or no detectable RT-PCR product, 0.5 µl of primary PCRs performed using 2 µl instead of 1 µl of cDNA were amplified in the multiplex nested PCR. cDNA from *P. japonicus* RNA was used as a negative control (lane 8). For isolate YHV8, 5 µl (lane 6) and 10 µl (lane 7) of the primary PCR was amplified in the nested PCR. PCR products (10 µl) were resolved as in Fig. 2. M = 1 Kb or 1 Kb PLUS DNA ladder (Invitrogen).

Fig. 5. Multiplex RT-nested PCR amplification of GAV and YHV RNA mixed at various ratios to simulate dual-infections. GAV and YHV lymphoid organ RNA was mixed 1:1 at concentrations of either (a) 100 ng/µl (lane 5) or (b) 1 ng/µl (lane 6) and serial 10-fold dilutions of virus RNA were prepared in a diluent of reciprocal virus RNA at these concentrations. (a) YHV RNA dilutions 10^{-4} to 10^{-1} (lanes 1-4), GAV RNA dilutions 10^{-1} to 10^{-4} (lanes 6-9) and *P. japonicus* negative control RNA (lane 10). (b) YHV RNA dilutions 10^{-5} to 10^{-1} (lanes 1-5) and GAV RNA dilutions 10^{-1} to 10^{-5} (lanes 7-11). In both experiments, cDNA synthesised with primer GY5 was amplified by PCR (primer pair GY2-GY4) followed by nested PCR with the multiplex primer set GY2-Y3/G6. PCR products (10 µl) were resolved as in Fig. 2. M = 1 Kb DNA ladder.

Fig. 6. Genomic RNA sequences targeted by the G3/Y3 and G6 primer regions in the 9 GAV and 8 YHV field samples compared to the prototype isolates (ie. GAV6 and YHV1). Nucleotide variations are indicated below the sequence of the prototype GAV isolate (Y = C/U). The deduced amino acid sequence is shown above the GAV nucleotide sequence and only variant amino acids are shown above the prototype YHV sequence.

Table 1Origin of *Penaeus monodon* infected with GAV or YHV tested in the multiplex RT-nested PCR

No:	Date	Location	Source	Description ^b	Tissue ^g
GAV1	14-10-97	Jacobs Well, SEQ	Cairns	H,I,B,N	lo
GAV2	13-10-97	Jacobs Well, SEQ	Innisfail	H,I,B,N	lo
GAV3	25-09-97	Cleveland, SEQ	Innisfail	R,I,B,N	lo
GAV4	05-03-98	Innisfail, NQ	Innisfail	W,I,B,N	lo
GAV5	27-03-98	Cardwell, NQ	Townsville	F,B,I,N	lo
GAV6 ^c	12-02-96	Mourilyan, NQ	NK ^f	F,P,M	lo
GAV7	06-03-97	Bundaberg, SEQ ^e	NK	F,P,M	lo
GAV8	18-03-97	Jacobs Well, SEQ	NK	F,P,M	lo
GAV9	17-04-96	Jacobs Well, SEQ	NK	F,P,M	ceph
GAV10	16-04-96	Jacobs Well, SEQ	NK	F,P,M	ceph
YHV ^c	NA-96	NK, Thai			lo
YHV1 #100	NA-94	NK, Thai	CP	R,F,P,M	hae
YHV2 #101	NA-96	NK, Thai	CP	F,P,M	hae
YHV3 #102	13-10-95	Rayong, Thai	AAHRI	R,F,P,M	gill/hae
YHV4 #103	01-02-95	Surattanee, Thai	NK	R,F,I,M	gill/hae
YHV5 #104	18-12-95	Surattanee, Thai	NK	H,P	ceph
YHV6 #105	29-10-94	Surattanee, Thai	CP	R,F,P	gill/hae
YHV7 #106	18-01-96	Chachuengsao, Thai	AAHRI	R,F,P,M	gill/hae
YHV8 #107	NA-97	Bangpakong, Thai	CP	R,F,P,M	gill/hae
YHV9 #108	16-12-97	NK, Thai	CP	F,I,M	hae
YHV10 #109	17-03-98	Banpo, Thai	CP	H,P	ceph
YHV11 #110	17-03-98	Klongsuan, Thai	CP	H,P	ceph

^a All GAV-infected prawns were grown from postlarvae derived from wild broodstock caught at Innisfail, Cairns or Townsville in North Queensland, Australia^b Description code : F = farm stock, H = hatchery broodstock sourced from the wild, W = wild prawn sourced directly from a trawler, R = prawn sourced from research facility, B = broodstock, I = individual, P = pooled from 2-10 prawns, M = stock experiencing mortalities, N = no obvious disease symptoms^c prototype isolate GAV6^d NQ = North Queensland^e SEQ = South-east Queensland^f NK = not known^g Tissues used were gill, lymphoid organ (lo), haemolymph (hae) and whole cephalothorax (ceph)

CP = Shrimp Culture Research Centre of Charoen Pokphand Co. Ltd., Thailand

AAHRI = The Aquatic Animal Health Research Institute, Thailand

Figure 1.

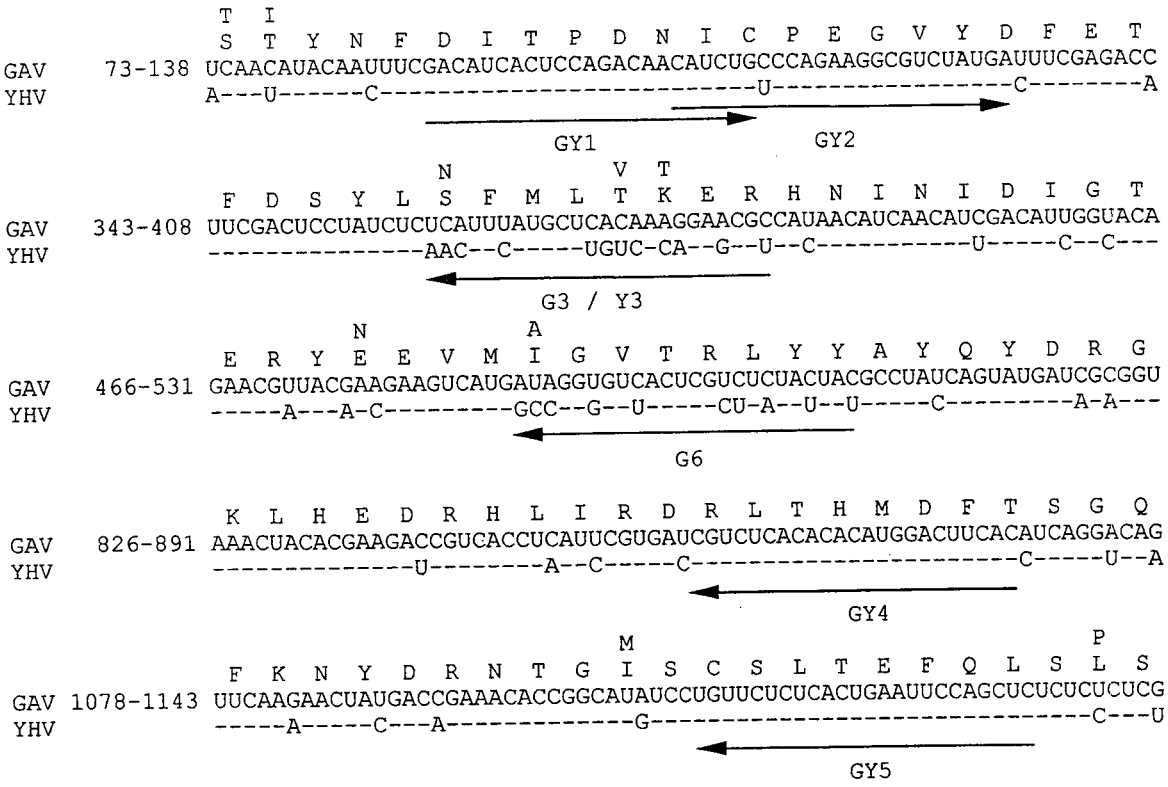


Figure 6.

	G3/Y3									G6							
	S	F	M	L	T	K	E	R		I	G	V	T	R	L	Y	Y
GAV 6	UCA	UUU	AUG	CUC	ACA	AAG	GAA	CGC	-105-AUA	GGU	GUC	ACU	CGU	CUC	UAC	UAC	
GAV 7	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	..C	..C	...	...	...
GAV 8	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	...	..C	...	...	...
GAV 9	...	..C	...	...	...	...	...	...		..C	...	...	..C	..C	...	...	...
GAV 10	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	..C	..C	...	...	...
GAV 1	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	..C	..C	...	...	...
GAV 2	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	..C	..C	...	...	...
GAV 3	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	...	..C	...	...	...
GAV 4	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	..C	..C	...	...	...
GAV 5	...	..C	...	...	...	...	...	...		...	...	...	...	..C	...	...	...
	N				V	T				A							
YHV 1	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U	-105-GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U	
YHV 2	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U
YHV 3	AAC	..C	...	..U	GUY	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U
YHV 4	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	..Y	..C	U.A	..U	..U
YHV 5	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	..Y	..C	U.A	..U	..U
YHV 6	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U
YHV 7	AAC	..C	...	..U	GUY	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U
YHV 8	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U
YHV 9	AAC	..C	...	..U	GUC	.CA	..G	..U		GCC	..G	..U	...	..C	U.A	..U	..U

หน้าว่าง

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก
เงินงบประมาณแผ่นดิน ปี 2545
เรื่อง

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจ
วินิจฉัยไวรัสเฮปาทอแพนแครติคในกุ้งกุลาดำ

**Development of monoclonal antibodies for
diagnosis of hepatopancreatic parvovirus (HPV)
in *Peneus monodon***

หัวหน้าโครงการวิจัย :

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผู้ร่วมวิจัย:

รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล
ดร. ศิวาพร ลงยันต์
ดร. วิสุทธิ ประดิษฐ์อาชีพ

10 กันยายน 2546

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	3
สารบัญรูป	4
กิตติกรรมประกาศ	6
บทคัดย่อไทย	7
บทคัดย่ออังกฤษ	9
บทนำ	10
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยครั้งนี้	13
วัตถุประสงค์	14
ระเบียบวิธีวิจัย	15
ผลการทดลอง	22
สรุปและอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาตรของ urografin และบัฟเฟอร์ NTE ในการเตรียม 20%-40% urografin gradient	16
ตารางที่ 2 แสดง Subtype ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้	30

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงภาพของกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ HPV	11
รูปที่ 2	ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV	11
รูปที่ 3	ภาพแสดงดับกึ่งปกติและดับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัส HPV ที่ย้อมด้วยสี H&E	12
รูปที่ 4	แสดงขั้นตอนการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี	21
รูปที่ 5	การตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV จากดับกึ่งโดย PCR	22
รูปที่ 6	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอไวรัสที่สกัดได้จากดับของกึ่งโดย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	24
รูปที่ 7	การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	26
รูปที่ 8	การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE	27
รูปที่ 9	การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE และการทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Western blot hybridization	29
รูปที่ 10	การคัดเลือกไฮบริโดมาโดย Dot blot assay	31
รูปที่ 11	การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้ จากหนู โดยเทคนิค Western blot hybridization	32
รูปที่ 11	การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Western blot hybridization	33

	หน้า
รูปที่ 13 แสดงผลของ SDS-PAGE และ ผลของ Western blot hybridization ของโปรตีนโครงสร้างของ HPV ที่แยกจากกึ่งกลาดำ	34
รูปที่ 14 Immunohistochemistry โดยใช้ mouse anti-HPV antiserum และ monoclonal antibody HPV1	35

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545 ขอขอบคุณเกษตรกรเจ้าของบ่อกุ้งที่ให้ตัวอย่างกุ้งแคะ เพื่อนร่วมงาน และนิสิตที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างกุ้ง

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีและคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ความสนับสนุนในเรื่องสถานที่และอุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

เฮปาโตแพนكريเอติกพาร์โวไวรัส (Hepatopancreatic parvovirus: HPV) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคงู้งแคะ ซึ่งมีผลกระทบทำให้ผลผลิตงู้งกุลาคำของเกษตรกรลดลงและเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV เพื่อจะนำไปพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ที่ง่าย สะดวก แม่นยำและราคาถูก ในการทำวิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างงู้งแคะจากบ่อต่างๆ ในจังหวัดราชบุรี ชลบุรีและฉะเชิงเทรา ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโดยพีซีอาร์ ทำการสกัดอนุภาคไวรัสจากงู้งแคะโดยเทคนิค urografen gradient ultracentrifugation แยกเอา fraction ที่มีความเข้มข้นของ urografen เท่ากับ 30% และ 35% ซึ่งมีอนุภาคไวรัสไปวิเคราะห์หาโปรตีนโครงสร้างโดย SDS-PAGE จากนั้นนำอนุภาคไวรัสฉีดเข้าไปในหนูขาวเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ตรวจสอบโมโนโคลนอลที่ได้โดย Western blot hybridization, dot blot hybridization และ immunohistochemistry

ผลการวิเคราะห์โปรตีนของไวรัสโดย SDS-PAGE พบโปรตีนหลายแถบ โดยโปรตีนหลักมีขนาด 54 kD เมื่อนำโปรตีนเหล่านี้ไปฉีดเข้าหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถคัดเลือก hybridoma ได้จำนวน 12 โคลนที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบโดย dot blot hybridization และ immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 12 โคลนนี้สามารถจับกับโปรตีนโครงสร้างของ HPV ในสภาพธรรมชาติและถูกทำให้เสียสภาพ โดยทั้งหมดจับกับโปรตีนขนาด 97 kD ซึ่งไม่ใช่โปรตีนหลัก แต่สามารถจับกับเซลล์ของงู้งที่มีลักษณะ hypertrophied nuclei ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความจำเพาะต่อไวรัส HPV อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ยังสามารถจับกับเซลล์ที่ยังไม่แสดงลักษณะของ hypertrophied nuclei เด่นชัด ซึ่งคาดว่าเซลล์อยู่ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ จากการวิเคราะห์ subtype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าส่วนมากเป็นชนิด

IgM มีเพียง 1 ชนิดที่เป็น IgGza ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยต่อไปเพื่อพัฒนาโมโนโคลนอลที่มีความจำเพาะและมีความเสถียรมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ต่อไป

Abstract

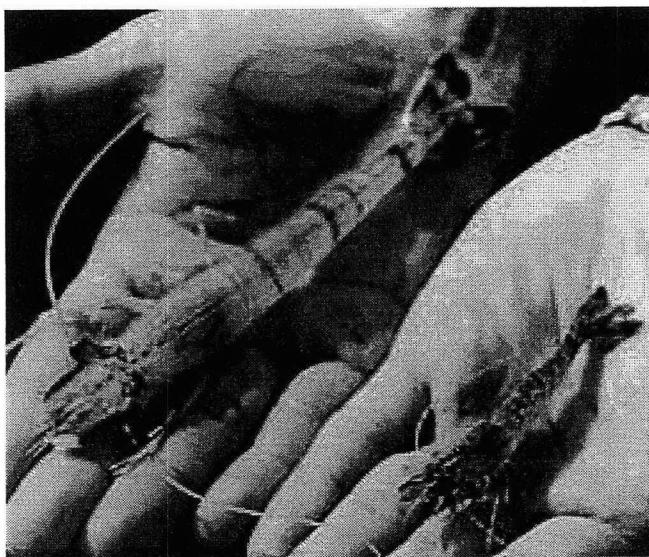
Hepatopancreatic parvovirus (HPV) can cause stunted growth in several penaeid shrimp including *Penaeus monodon* which reduced production for shrimp farmer and cause economic losses. In this study specific monoclonal antibody for detection of HPV infection was developed. The viral particle was isolated from hepatopancreas of *Penaeus monodon* by urografin gradient ultracentrifugation. Fractions 30% and 35% containing high amount of viral particles were analyzed for structural protein by SDS-PAGE. The viral particle was injected into Swiss mouse for production of monoclonal antibodies. The monoclonal antibodies obtained were characterized using Western blot hybridization, dot blot hybridization and immunohistochemistry.

There were several protein bands after SDS-PAGE analysis. The major protein band was appeared at 54 kD. Twelve clones of hybridomas, obtained after the injection of purified viral particle into mice, gave positive results based on dot blot hybridization and immunohistochemistry screening. These 12 clones bind to both native and denatured protein at molecular weight of 97 kD which was not the major protein of viral structural proteins. These monoclonal antibodies reacted with hypertrophied nuclei in hepatopancreatic cell of shrimp showing the specifically for HPV detection. However, they also bind to some nuclei without hypertrophied nuclei as well. It is possible that these antibodies may bind to protein at the early stage of infection. Most of the antibodies were IgM subtype only one was IgG. Thus, the development of monoclonal antibody need to be further study in order to develop a fast, specific and cheap diagnostic kit.

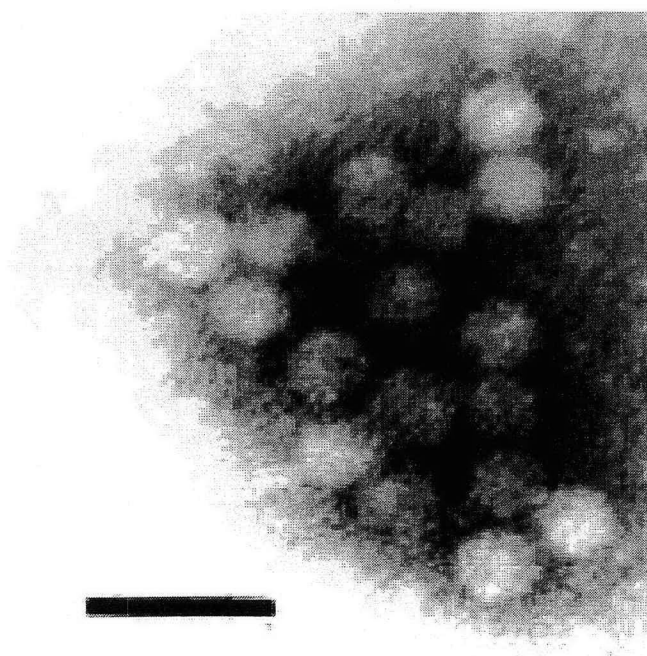
บทนำ

เฮปาโตแพนكريเอติกพาร์ไวรัส (Hepatopancreatic parvovirus : HPV) เป็น ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง *Penaeids* หลาย สปีชีส์ โดยเฉพาะกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ และกุ้งแชบ๊วย การระบาดของไวรัสเหล่านี้พบในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ออสเตรเลีย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จีน ไต้หวัน เกาหลี อิสราเอล อุเวต และประเทศแถบอเมริกาใต้ สำหรับประเทศไทย ได้มีรายงานว่าพบการติดเชื้อไวรัส HPV ในกุ้งกุลาดำครั้งแรกทางภาคใต้ เมื่อปี 2535 โดยทั่วไปแล้วกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV ในระยะเริ่มต้นมักไม่แสดงอาการที่จำเพาะ แต่ในระยะที่มีการติดเชื้อรุนแรงกุ้งมักมีอาการโตช้าหรือแคระแกร็น (รูปที่ 1) ซึ่งเกษตรกรมักเรียกกุ้งนี้ว่า “กุ้งจึกโก้” จากการศึกษาวิจัยพบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัส HPV (% infection) มีความสัมพันธ์กับขนาดของกุ้งและความรุนแรงของโรค โดยพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอชพีวีจะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งปกติมาก (Flegel TW. *et al.*, 1999) ทำให้ไม่คุ้มค่ากับการลงทุนและเป็นการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน จึงต้องอาศัยวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ง่าย รวดเร็วและแม่นยำ เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อในขณะที่กุ้งยังไม่แสดงอาการ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งที่นำมาเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อไวรัส

ไวรัส HPV เป็นไวรัสพาร์โวไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวขนาดประมาณ 6 กิโลเบส มีรูปร่างเป็น icosahedral ที่มีขนาดประมาณ 22-24 นาโนเมตร (รูปที่ 2) การติดเชื้อมักพบที่ตับกุ้ง (hepatopancreas) ลักษณะของเซลล์ตับกุ้งที่ติดเชื้อ HPV จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่มากจนเกือบเต็มเซลล์ (Hypertrophied nuclei) ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยจากการย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H & E staining) ดังแสดงในรูปที่ 3

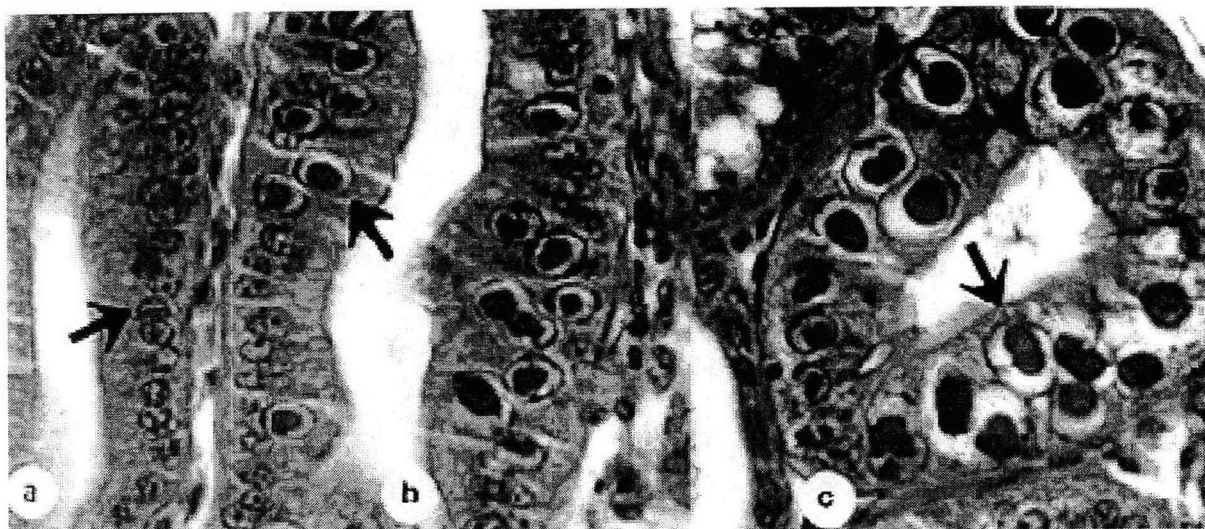


รูปที่ 1 แสดงภาพของกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ HPV



รูปที่ 2 ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV

bar = 50 nm



รูปที่ 3 ภาพแสดงตบักุ้งปกติและตบักุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV ที่ย้อมด้วยสี H&E

a = เซลล์ของตบักุ้งปกติ

b, c = เซลล์ของตบักุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV จะมีลักษณะ hypertrophied nuclei

ในการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากไวรัส อาศัยการตรวจหาไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ ลูกกุ้ง และพาหะซึ่งในปัจจุบันมักใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) เนื่องจากมีความไวสูงและสามารถตรวจสอบการติดเชื้อในขณะที่ยังไม่มีอาการ (Sukhumsirichart *et al.*, 1999 และ Belcher, C.R. and P.R., Young., 1998, Wongteerasupaya *et al.*, 1997, 1998, Kachanaphum *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR มีข้อจำกัด คือต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและบุคลากรต้องได้รับการฝึกฝนเป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาค่าตรวจสอบต่อหนึ่งตัวอย่างค่อนข้างแพง

ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาการตรวจทางด้านอิมมูโนสำหรับการตรวจสอบไวรัสต่างๆ ในกุ้งขึ้น Nadala, Loh และคณะ (1997, 1998) ได้สร้างแอนติบอดีต่อไวรัสหัวเหลือง

และไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่วิธีการตรวจสอบที่ใช้ คือ Western blot analysis มีความไวต่ำและไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ ต่อมาได้พัฒนาการตรวจหาไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassay (Nadala EC Jr and PC Loh, 2000) ซึ่งทำให้การตรวจหาไวรัสทั้งสองง่ายและรวดเร็วขึ้น ต่อมา รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ (Sithikomkul *et al.*, 2000) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAbs) ต่อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ไทยได้สำเร็จ

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการพัฒนาการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV เพื่อนำแอนติบอดีนี้ไปใช้สำหรับพัฒนาวิธีการตรวจหาไวรัสเอชพีวี ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว แม่นยำและราคาถูก ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้บ่อยขึ้นและทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำมักใช้การตรวจโดยใช้เทคนิค PCR เนื่องจากมีความไวและสามารถตรวจในขณะกุ้งไม่มีอาการได้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง และต้องการผู้ปฏิบัติงานที่ได้รับการฝึกเป็นอย่างดี ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการตรวจทางอิมมูโน ซึ่งทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ในการตรวจภาคสนามได้โดยมีการพัฒนาโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่างๆ ได้แก่ Taura syndrome virus (Poulos *et al.*, 1999) หัวเหลืองและ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (Sithikomkul *et al.*, 2000, Nadala *et al.*, 1997, 1998,

2000 และ Loh *et al.*, 1998) โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสในกึ่ง ที่มีการติดเชื้อระดับต่ำจนถึงการติดเชื้อรุนแรงได้ผลเป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส HPV
2. เพื่อใช้เทคนิค dot-ELISA และ immunocytochemistry เพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัส HPV
3. เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาชุดตรวจสอบ HPV ในกึ่งกุลาคำที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ ในโครงการต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างก้างจากบ่อที่มีก้างกระและคาดว่าติดเชื้อไวรัสเอชพีวี จากจังหวัด ชลบุรีและสระบุรี ประมาณ 700 ตัว แยกเอาดักก้างออกมาใส่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำดักก้างที่แช่ในไนโตรเจนเหลวไปเก็บในตู้เย็น -70°C เพื่อใช้ในการสกัดแยกไวรัส นอกจากนี้ทำการเก็บดักก้างประมาณ 20-50 ตัวต่อบ่อ แช่ใน Davidson's fixative เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบทางเนื้อเยื่อ

การตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV จากดักก้างโดยเทคนิค PCR

นำดักก้างที่แช่ใน -70°C ไปละลายน้ำแข็ง บดคัabin สารละลาย 0.05 N NaOH-0.25% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ hand homogenizer นำสารละลายไปต้มเป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ 5,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใส (crude lysate) ใส่หลอดทดลองใหม่ ปิเปิด crude lysate ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ใน PCR mixture ซึ่งประกอบด้วย 10xPCR buffer, 2 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP, 1 μM Primer 121F และ 276R แล้วนำไปทำ PCR ที่ตั้งสภาวะไว้ดังนี้ Pre-denaturation 94°C , 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่ 94°C , 30 วินาที, Annealing ที่ 52°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ นำ PCR product ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (0.8% gel)

การสกัดไวรัสจากตับก้าง

ทำการสกัดเอาไวรัส HPV ออกจากตับก้างโดยวิธี urografin gradient ultracentrifugation ตามวิธีที่เคยมีรายงานมาแล้วโดย วาสนา สุขุมศิริชาติและคณะ (1999) ดังนี้ แบ่งตับก้างออกมาละลายน้ำแข็งแล้วบดคัปให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ NTE (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris, pH 7.4, 0.02 M EDTA) ปริมาตร 40 มล.ต่อ 80 ตับ โดยใช้ hand homogenizer จากนั้นทำการแยกเศษเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง จำนวน 2 รอบ ที่ความเร็ว 7,000 และ 13,000 รอบต่อนาที ตามลำดับ ที่ 4°C ครั้งละ 15 นาที (Sorvall RC 5 C Plus, ss 34 rotor) เก็บสารละลาย(supernatant) ใส่ในหลอด quick-seal (Sorvall tube No. 03987) นำไปปั่นที่ 140,000xg หรือ 46,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ NTE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการละลายตะกอนตลอดทั้งคืนในห้องเย็น เตรียมสารละลายของ urografin แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาตรของ urografin และบัฟเฟอร์ NTE ในการเตรียม 20%-40% urografin gradient

ความเข้มข้นของ urografin	Urografin (76%) มล.	บัฟเฟอร์ NTE มล.
40%	3.158	2.842
35%	2.763	3.237
30%	2.369	3.631
25%	1.974	4.026
20%	1.580	4.420

เตรียม urografin gradient ตั้งแต่ 20%-40% ในหลอด Sorvall Ultra Pro 80 โดยแต่ละความเข้มข้นใช้ urografin แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1.6 มล. ปล่อยให้ตกในช่องเย็นตลอดทั้งคืน เพื่อให้เกิด continuous gradient จากนั้นนำสารละลายไวรัสปริมาตร ประมาณ 1 มล. มาหยอดบน gradient แล้วนำไปปั่นโดยใช้ swinging rotor (Sorvall TH 641 rotor) ที่ความเร็ว 140,000xg หรือ 34,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที แยกเอาแต่ละ fraction ออกมาแล้วใส่ในหลอด Ultra Pro 80 ใหม่ เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ NTE นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างสารละลาย urografin ออก เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ TE

การสกัดดีเอ็นเอของไวรัส

นำสารละลายไวรัสปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 1%SDS แล้วนำไปอุ่นต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อย่อยโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดเอาโปรตีนออกจากสารละลายโดยใช้สารละลายผสมระหว่าง Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol (24:1:1) นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดจำนวน 2 ครั้ง นำสารละลายมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 1 ใน 10 ของสารละลาย 3 M NaOAc, pH 5.2 และ 2 ปริมาตรของ absolute ethanol นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนและปล่อยให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

การวิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-PAGE

นำสารละลายไวรัสปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปทำการระเหิดเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไวรัสและโปรตีน ละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 7 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลาย protein buffer 7 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบ ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% β -mercaptoethanol

การปลูกภูมิคุ้มกัน

หนู Swiss mouse 4 ตัว นำมาฉีดด้วย HPV ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการข้างต้น ประมาณ 0.5 mg/ตัว โดยครั้งแรกผสมกับ complete Freund 's adjuvant ในอัตรา 1 : 1 หลังจากนั้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วย HPV ผสมกับ incomplete Freund 's adjuvant ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บซีรัม นำมาทดสอบเนื้อเยื่อทั้งติดเชื้อ โดย Western blot hybridization และ immunohistochemistry assay หนูตัวที่ตอบสนองดีจะถูกปลูกภูมิคุ้มกันซ้ำก่อนที่จะเริ่มทำ fusion

การผลิต hybridoma

นำหนู และแยก spleen cell นำมาหลอมรวมกับ myeloma cell โดยใช้ polyethelene glycol กระจ่ายเซลล์ออกเลี้ยงใน 96 well microculture plate จำนวน 40 plate/fusion เลือก hybridoma clone ที่สร้าง MAbs ต่อ HPV เซลล์ที่ถูกคัดเลือกนำมา reclone อีกสองครั้ง โดยวิธี limiting dilution method

การคัดเลือก hybridoma

ทำการคัดเลือก hybridoma clone ที่สร้าง MAb จำเพาะต่อ HPV ขั้นตอนแรกโดย dot blotting assay จากนั้นนำมาคัดเลือกต่อโดยวิธี Western blot hybridization และ immunohistochemistry

Dot blotting

ใช้ viral particle ที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วย SDS และ β -mercaptoethanol นำมาหยดบน กระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 μ l/หยด อบที่ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยง เซลล์จาก hybridoma ในแต่ละหลุม (เจือจาง 1: 20 ใน 5 % blotto = 5 % non fat dry milk 0.1 % triton X 100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 4 ช.ม. หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto นำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP; Biorad) เจือจาง 1 : 1500 เป็นเวลา 4- 8 ช.ม. จากนั้นล้างใน 0.5 % blotto และบ่มให้ สารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เลือก hybridoma clone ที่แสดงปฏิกิริยาต่อ viral particle ของกึ่งที่ติดเชื้อ นำมาคัดเลือกต่อโดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry ก่อนนำไป reclone และ cryopreservation สำหรับการศึกษต่อไป

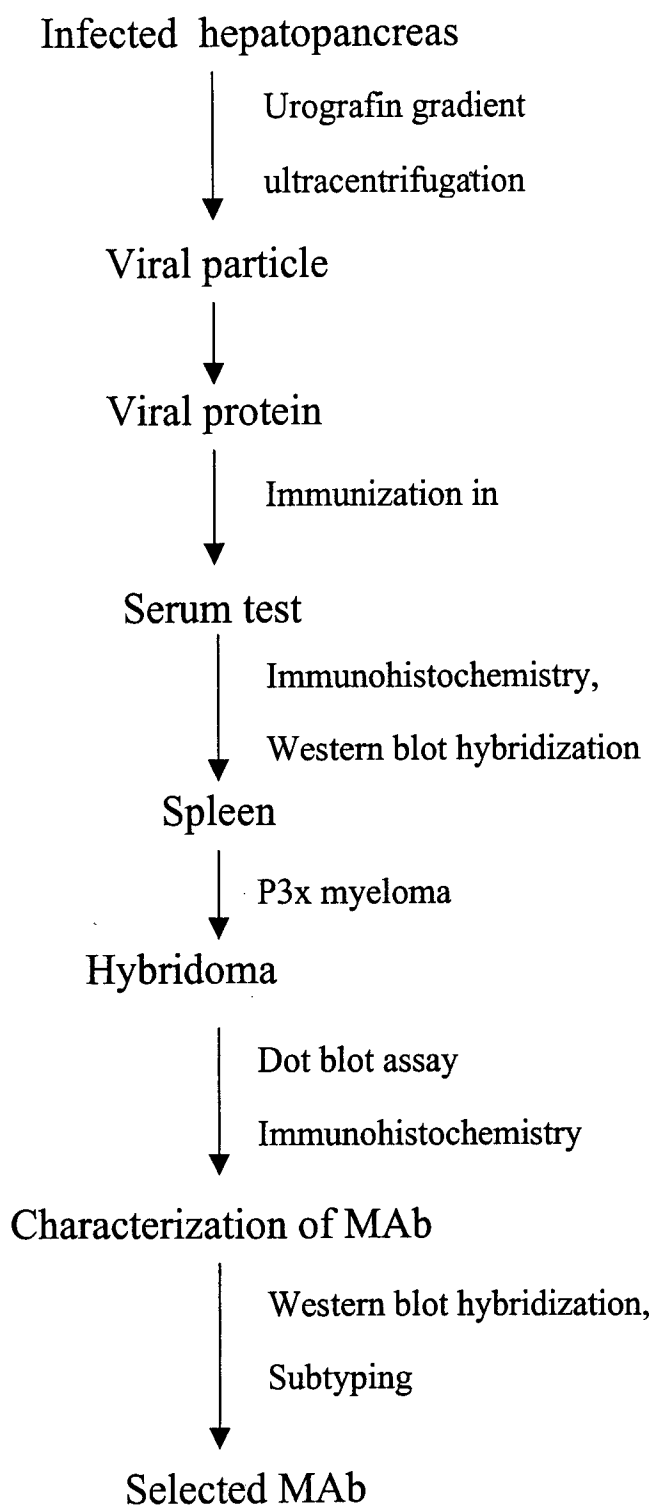
SDS-PAGE และ Western blot hybridization

นำ HPV particle ที่ผสมกับ dye แล้วมาแยกใน 10 % SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยทำอิเล็กโตรฟอเรซิสที่ 30 V เป็นเวลา 6 ช.ม. ส่วนหนึ่งของเจลนำมาย้อมโปรตีนด้วย

coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนนำมาถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่กระดาษ nitrocellulose โดยใช้ Transblot apparatus (Biorad) สำหรับทำ Western blot จากนั้นนำ nitrocellulose membrane จุ่มใน 5 % blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มใน MAbs แต่ละชนิดเจือจาง 1 : 500 ใน 5 % blotto เป็นเวลา 4 ชม. และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot-blot เพื่อหาตำแหน่งของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

Immunohistochemistry

นำตับกึ่งที่ติดเชื้อ HPV เข้าใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 μm ติดบนสไลด์ นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีการทำโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านลง butanol (100 %) 95 %-70 % ethylalcohol และน้ำ บ่มใน MAbs ชนิดต่าง ๆ เจือจางประมาณ 1 : 50 เป็นเวลา 6 ชม. ที่ 37 °C ล้าง section ด้วย PBS บ่มใน GMP-HRP เจือจาง 1 : 1000 เป็นเวลา 6 ชม. และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03 % DAB, 0.006 % H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin Y (H & E) ดึงน้ำด้วย ethyl alcohol เปอร์เซนต์ต่าง ๆ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็น slide ถาวรโดยใช้ permount (Sithigorngul et al., 1999) บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล

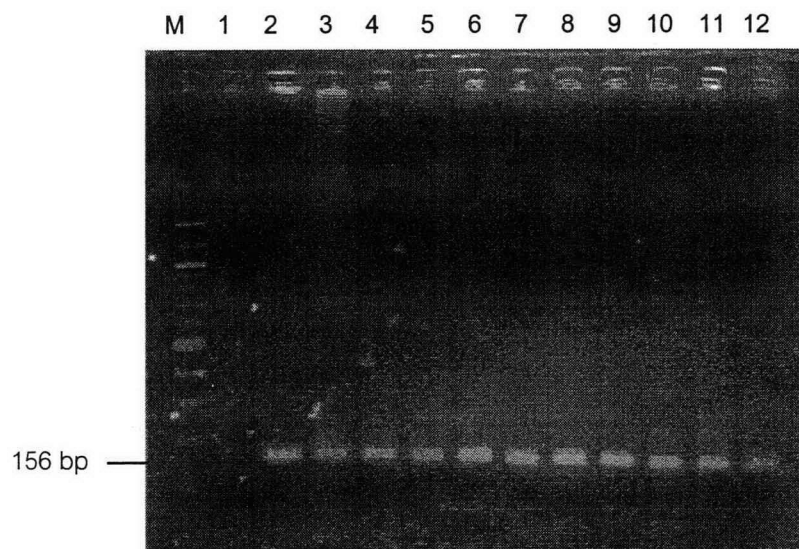


รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผลการวิจัย

การตรวจสอบการติดเชื้อจากตับกึ่งแคะโดย PCR

จากการสุ่มเอาตับของกึ่งแคะที่เก็บจากบ่อต่างๆ จากจังหวัดราชบุรี ชลบุรี และ
ฉะเชิงเทรา มาตรวจสอบว่ามีการติดเชื้อไวรัส HPV หรือไม่ โดยเทคนิค PCR และใช้ไพร
เมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เท่านั้น ผลการวิเคราะห์ด้วย PCR แสดงในรูปที่ 5 ปรากฏว่า
ตับกึ่งที่เก็บจากบ่อต่างๆ มีการติดเชื้อไวรัส HPV ในอัตรา 55-80%



รูปที่ 5 การตรวจการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีจากตับกึ่งที่เก็บจากจังหวัดราชบุรี โดย

เทคนิค PCR

แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐาน

แถวที่ 1 Negative control

แถวที่ 2-11 Crude lysate ที่เตรียมจากตับกึ่ง

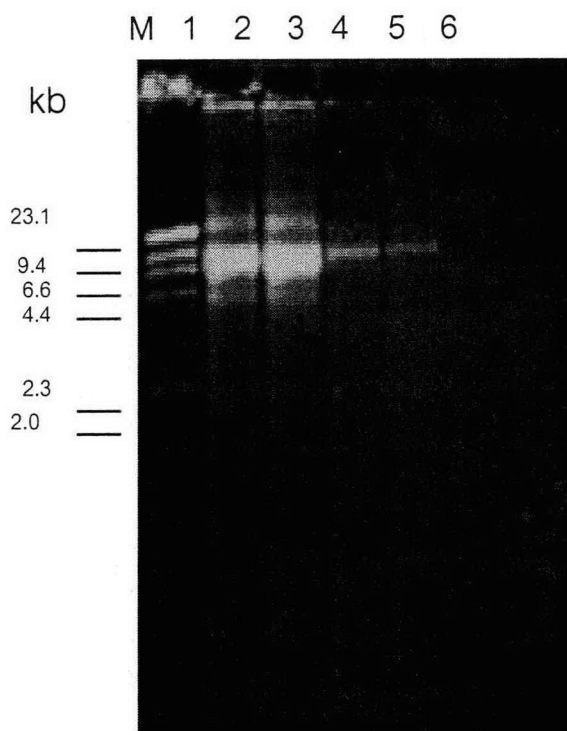
แถวที่ 12 Positive control

การสกัดดีเอ็นเอของไวรัส HPV และการวิเคราะห์

การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส

วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดย *Agarose gel electrophoresis*

เมื่อทำการสกัดอนุภาคไวรัส HPV ออกมาจากตับกึ่ง โดย urografin gradient ultracentrifugation และเก็บสารละลาย urografin ที่มีความเข้มข้นของ urografin ในช่วง 30%, 35% และ 40% ไปวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส โดยทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วพบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสมากที่สุดใน fraction ที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30% และรองลงมาคือทำ 35% ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 6.0 และ 4.2 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 6 ส่วนดีเอ็นเอนาขนาดประมาณ 23 กิโลเบสขึ้นไป คาดว่าเป็นของดีเอ็นเออื่น เช่น ดีเอ็นเอของกึ่ง หรือไวรัส MBV



รูปที่ 6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอไวรัสที่สกัดได้จากตับของกิ้งโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตร-
ฟอริซิส

แถว M = λ -Hind III DNA

แถวที่ 1-2 = ดีเอ็นเอของไวรัสจากชั้น 30% urografin (หลอดที่ 1 และ 2)

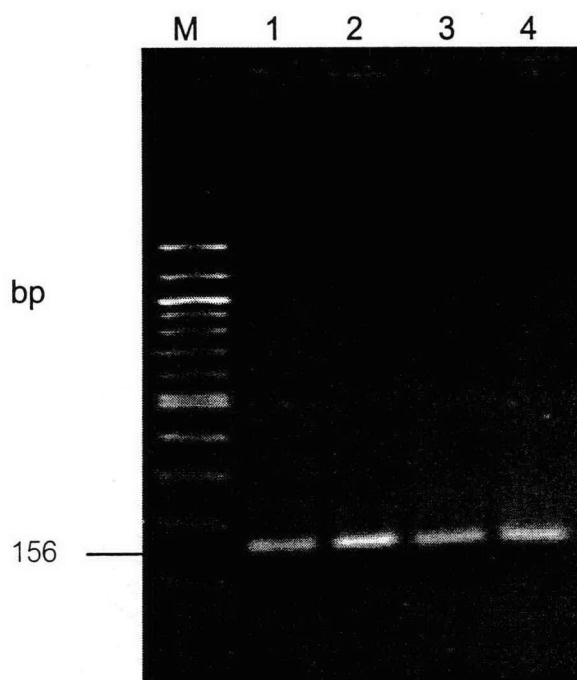
แถวที่ 3-4 = ดีเอ็นเอของไวรัสจากชั้น 35% urografin (หลอดที่ 1 และ 2)

แถวที่ 5-6 = ดีเอ็นเอของไวรัสที่สกัดจากชั้น 40% urografin (หลอดที่ 1 และ 2)

ผลการวิเคราะห์ปรากฏว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาด 6.6 และ 4.2 กิโลเบส ซึ่งเป็น
ลักษณะของดีเอ็นเอของไวรัส HPV แต่อย่างไรก็ตามมีการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นๆ ด้วย
สังเกตจากแถบดีเอ็นเอขนาด 23.1 และ 2.2 กิโลเบส

การตรวจดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ทำการตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV จากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV คือ ไพรมเมอร์ 156F (5'...GCA CTT ATC ACT GTC TCT AC ...3') และ 276R (5'...GTG AAC TTT GTA AAT ACC TTG...3') เมื่อนำผลผลิต PCR ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วปรากฏว่าให้ผลผลิต PCR ขนาด 156 เบส ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เท่านั้น (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่า การสกัดอนุภาคไวรัสโดยเทคนิค urografin gradient ultracentrifugation สามารถสกัดได้ไวรัส HPV ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไปได้



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้
อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1% gel)

แถว M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder DNA)

แถวที่ 1 PCR product ของดีเอ็นเอไวรัสจากชั้น 30% urografin

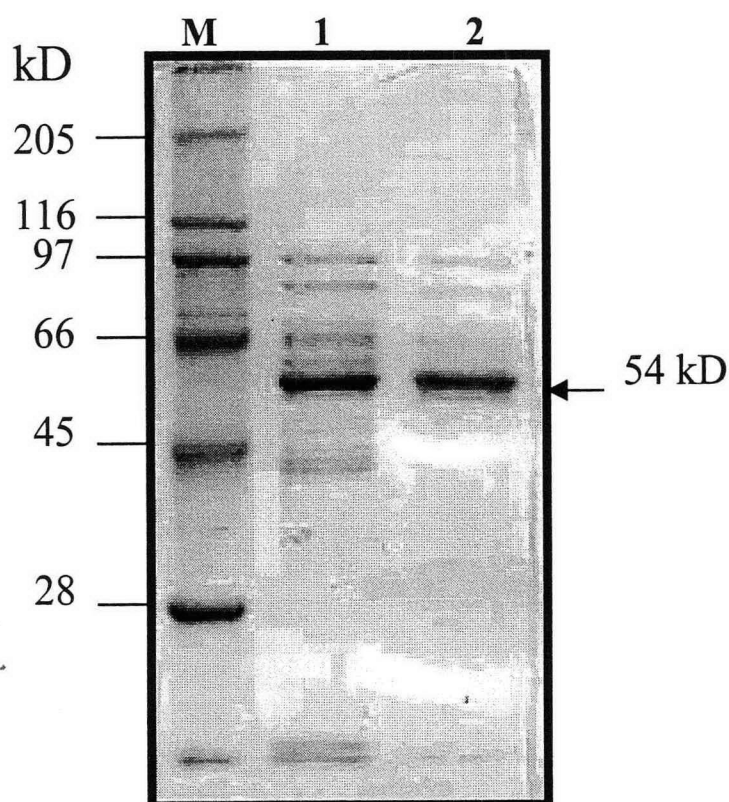
แถวที่ 2 PCR product ของดีเอ็นเอไวรัสจากชั้น 35% urografin

แถวที่ 3 PCR product จากดีเอ็นเอขนาด 4.2 kb

แถวที่ 4 PCR product จากดีเอ็นเอขนาด 6.0 kb

การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง ของไวรัส โดย SDS-PAGE

จากการวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง (capsid protein) ของไอนุภาคไวรัสที่เตรียมได้ โดย SDS-PAGE ผลการวิเคราะห์ในรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่ามีแถบโปรตีนหลายแถบ แต่โปรตีนหลักของไวรัส HPV มีขนาดประมาณ 54 kDa



รูปที่ 8 การวิเคราะห์โครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE

แถวที่ 1 = Molecular mass markers

แถวที่ 2 = โปรตีนของ HPV จาก fraction 30% urografin

แถวที่ 3 = โปรตีนของ HPV จาก fraction 35% urografin

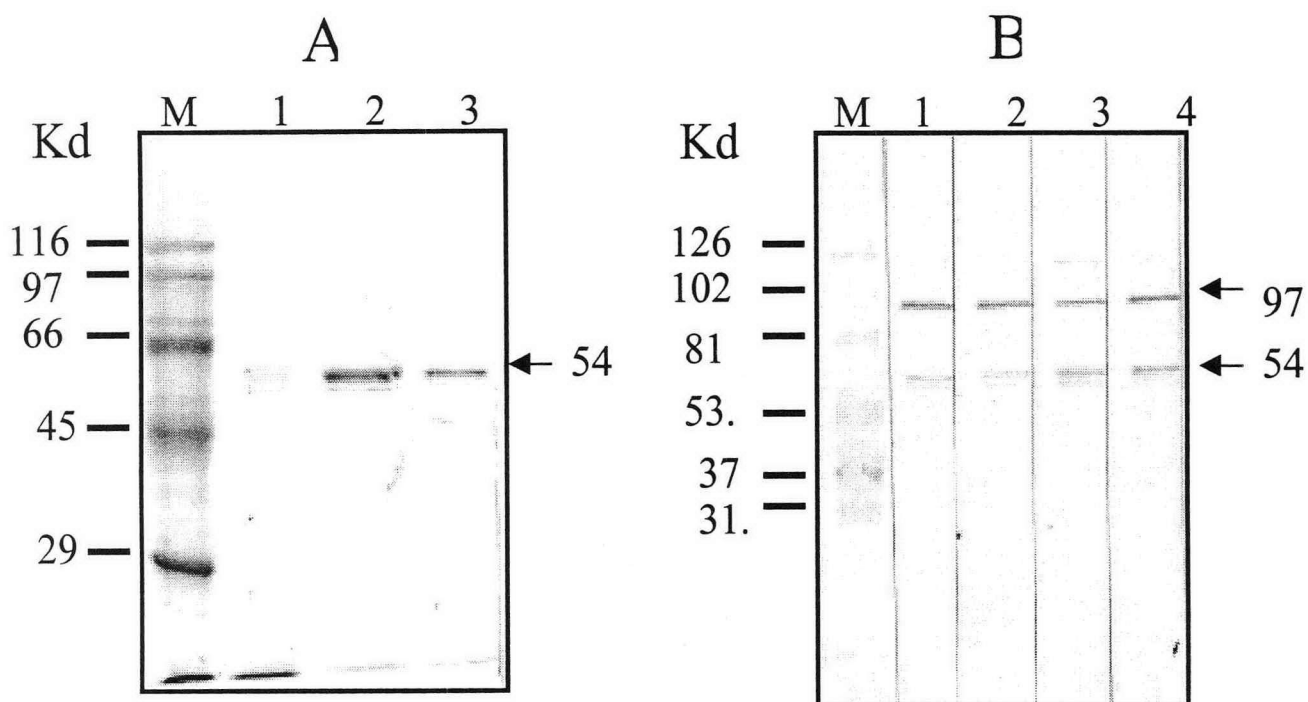
การทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV

หลังจากฉีดอนุภาคไวรัสชนิด เข้าไปในหนูขาว 4 ตัว ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง แล้วเจาะเอาเลือดมาแยกซีรัม แล้วนำไปทดสอบการตอบสนองการสร้างแอนติบอดี (Ab) ต่อไวรัส HPV โดยวิธี Western blot hybridization ปรากฏว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาด 97, 54 และ 52 กิโลดาร์ตัน (Kd) ตามลำดับ โดยแอนติบอดี ที่สร้างจากหนูตัวที่ 4 สามารถจับกับโปรตีนของไวรัส ขนาด 54 Kd ได้ดีที่สุด (ดูรูปที่ 9)

การทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV

เมื่อฉีดอนุภาคไวรัสเข้าไปในหนูขาวทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้งแล้วเจาะเอาเลือดไปแยกซีรัม แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีนของไวรัส HPV โดยเทคนิค Immunohistochemistry และ Western blot หนูตัวที่ 4 ที่ตอบสนองต่อโปรตีนขนาด 54 Kd มากที่สุด ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการ fusion เซลล์ของตับอ่อน เข้ากับ P3X myeloma cell จากการทดลองสามารถคัดเลือก hybridoma ได้ 12 โคลน ซึ่งจับกับโปรตีนของของไวรัส HPV ได้ทั้งในสภาพธรรมชาติหรือสภาพที่ถูกทำให้เสียสภาพ โดย Dot blotting assay (รูปที่ 10)

จากการวิเคราะห์โดย Western blot hybridization พบว่า แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเฉพาะโปรตีนขนาด 97 kD ซึ่งไม่ใช่โปรตีนหลัก (รูปที่ 11) จากการ subtype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgM มีเพียงชนิดเดียวที่เป็น IgG2a (ตารางที่ 2) โดยแอนติบอดีทั้งหมดจับกับโปรตีนขนาด 97 kD เท่านั้น (รูปที่ 12)



รูปที่ 9 การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE และการทดสอบ

โพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิค Western blot hybridization

(A) แสดงผลของ SDS-PAGE ของโปรตีนโครงสร้าง (Structural protein) ของไวรัส HPV

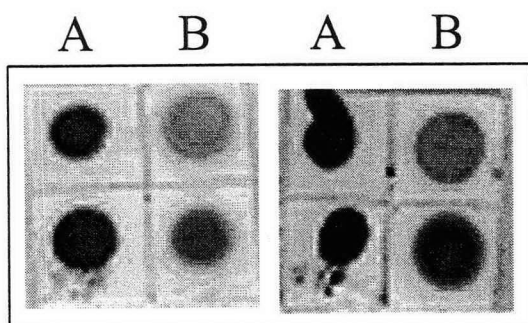
(fraction 35%) จากจังหวัดชลบุรี (แถวที่ 1) และจังหวัดฉะเชิงเทรา (แถวที่ 2 และ 3)

(B) ผลการทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูตัวที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยเทคนิค

Western blot hybridization โดยทำการเจือจางแอนติบอดี เท่ากับ 1 : 5,000

ตารางที่ 2 แสดง Subtype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้

ลำดับที่ 1	รหัสโมโนโคลนอลแอนติบอดี	Subtyping
1	HPV1	IgM
2	HPV 52	IgM
3	HPV 320	IgM
4	HPV 425	IgM
5	HPV 546	IgM
6	HPV 613	IgM
7	HPV 620	IgM
8	HPV 767	IgM
9	HPV 857	IgM
10	HPV 957	IgM
11	HPV 1675	IgM
12	HPV 2032	IgG2a

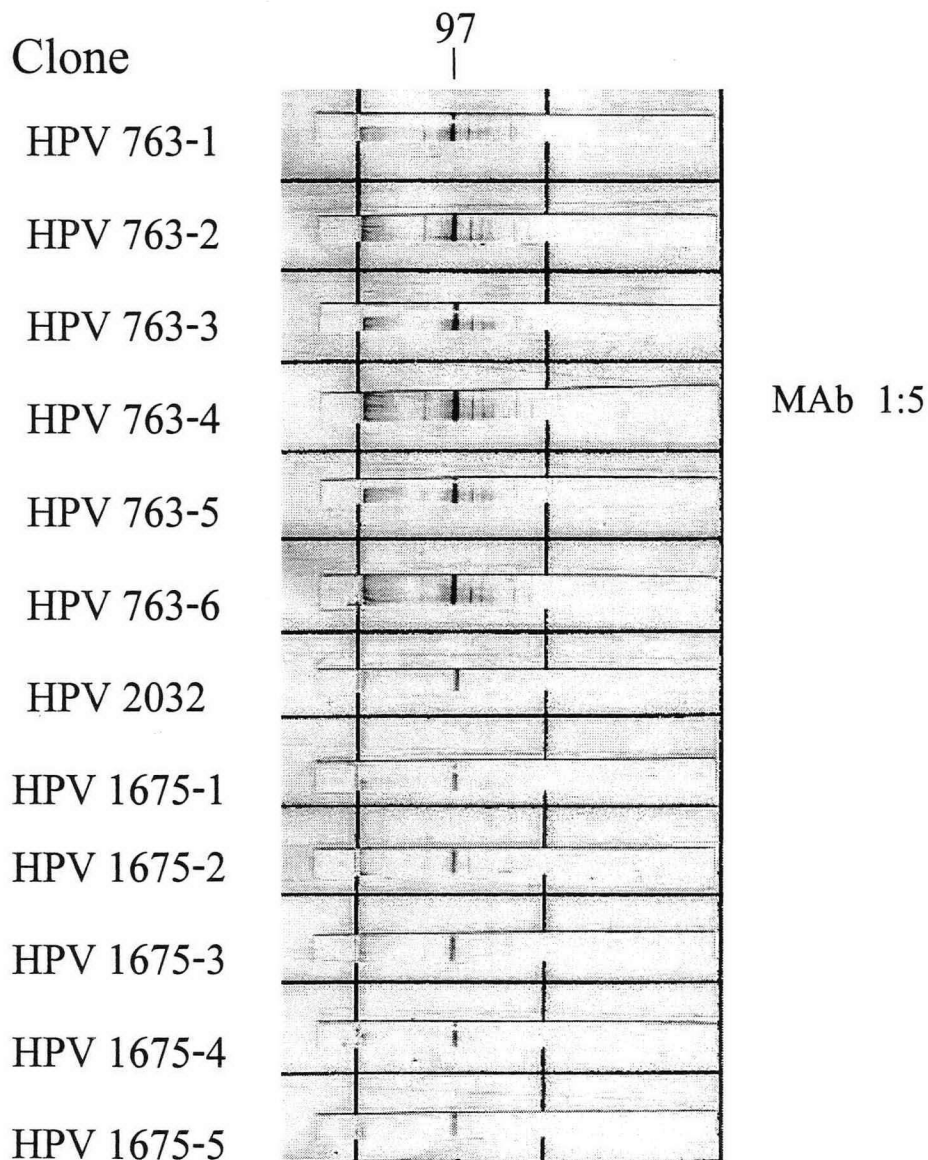


รูปที่ 10 การคัดเลือกไฮบริโดมาโดย Dot blotting assay

A = โปรตีนของไวรัสเมื่อทำให้เสียสภาพ

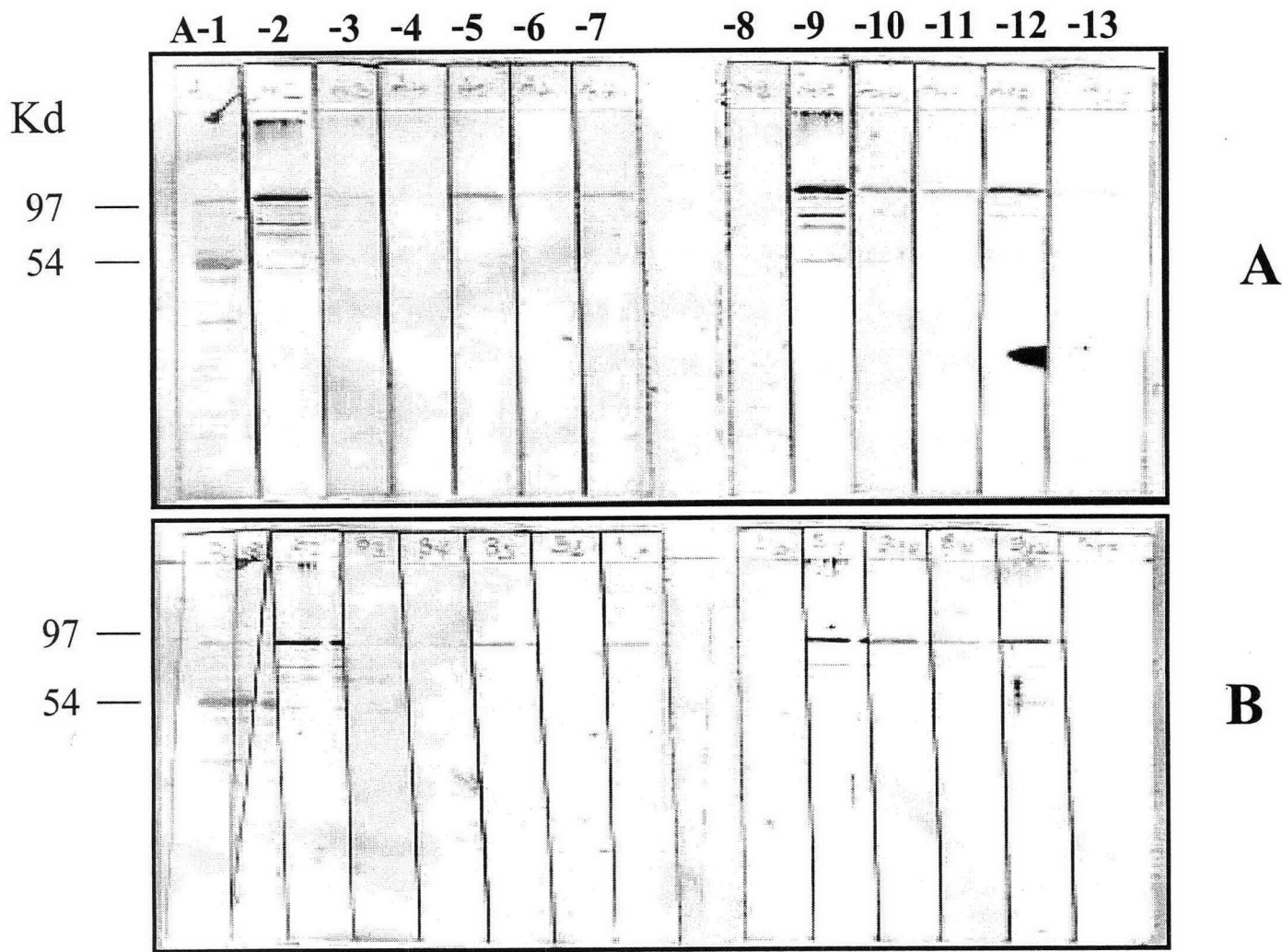
B = โปรตีนของไวรัสเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ

ได้ทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV1 และทดสอบอีกครั้งด้วย Western blot hybridization และ Immunohistochemistry ปรากฏว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV1 สามารถจับกับโปรตีนขนาด 97 kD ได้ดีที่สุด แต่ไม่จับกับโปรตีนขนาด 54 kD (รูปที่ 13) และจากผลของ Immunohistochemistry พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV1 ทำปฏิกิริยากับ inclusion bodies ที่เป็นลักษณะของการติดเชื้อไวรัส HPV นอกจากนี้ยังสามารถจับกับนิวเคลียสของเซลล์ตับกึ่งซึ่งยังไม่แสดงลักษณะของ hyper-trophied nuclei เด่นชัด คาดว่าอาจเป็นระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อไวรัส HPV (รูปที่ 14)



รูปที่ 11 การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้จากหนู 3 โดยเทคนิค

Western blot hybridization



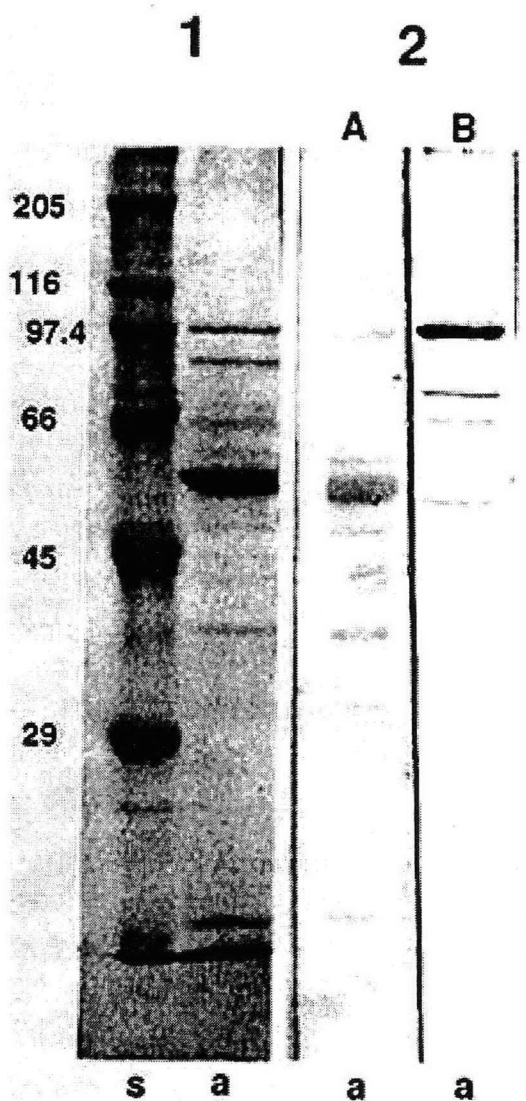
รูปที่ 12 การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Western blot hybridization

แถวที่ 1 : Polyclonal antibody; dilution 1 : 10,000

แถวที่ 2-13 : Monoclon No. 1, 52, 320, 425, 546, 613, 620, 763, 857, 957, 1675, และ 2032; dilution 1:5

A : ใช้ สารละลายโปรตีนจาก HPV 10 ul/well

B : ใช้สารละลาย โปรตีนจาก HPV 5 ul/well

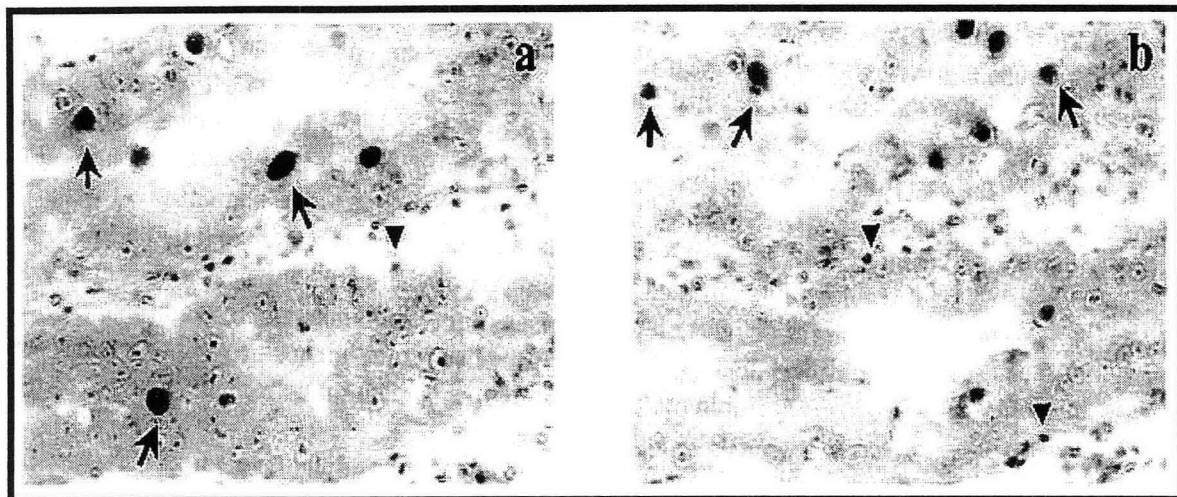


รูปที่ 13 แสดงผลของ SDS-PAGE และ ผลของ Western blot hybridization ของโปรตีนโครงสร้างของ HPV ที่แยกจากกึ่งกลาดำ

(1) Coomassie blue-stained gel ของโปรตีน แถว s = Molecular weight marker;

แถว a = purified HPV

(2) Western blot ของโปรตีนโครงสร้างของ HPV ไฮบริไดซ์กับ (A) mouse anti-HPV antiserum; (B) monoclonal antibody HPV



รูปที่ 14 Immunohistochemistry โดยใช้ (a) mouse anti-HPV antiserum (b) monoclonal antibody HPV1

ลูกศร แสดงตำแหน่งการจับกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโปรตีนในเซลล์ที่มีลักษณะ hypertrophied nuclei

หัวลูกศร แสดงตำแหน่งการจับกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโปรตีนในเซลล์ที่ไม่แสดง ลักษณะของ hypertrophied nuclei เด่นชัด

สรุปและอภิปรายผล

จากการนำเอาโปรตีนของไวรัส HPV ฉีดเข้าไปในหนูขาว แล้วดูเอาซีรั่มไปทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV ปรากฏว่าส่วนที่เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนอย่างน้อย 3 แถบ ซึ่งมีขนาด 97, 54 และ 52 กิโลคาร์ตัน แต่อย่างไรก็ตาม โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 12 โคลนที่ผลิตได้สามารถจับกับโปรตีนขนาด 97 กิโลคาร์ตัน ซึ่งไม่ใช่โปรตีนหลักของไวรัส แต่ผลจากการตรวจสอบในเนื้อเยื่อตับกึ่งที่ติดเชื้อพบว่า ทั้งโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอล สามารถจับกับ inclusion bodies ในนิวเคลียสที่มีลักษณะของการติดเชื้อไวรัส HPV และนิวเคลียสของเซลล์บางเซลล์ ซึ่งยังไม่แสดงลักษณะของ hypertrophied nuclei เด่นชัด คาดว่าอาจเป็นระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ โมโนโคลนอลส่วนใหญ่ที่ผลิตได้ในครั้งนี้ ส่วนใหญ่มี subtype เป็น IgM ซึ่งมีความจำเพาะ และความเสถียรน้อยกว่า IgG ดังนั้น ควรมีการพัฒนา การผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไปเพื่อให้มีความจำเพาะต่อโปรตีนหลักที่มีขนาด 54 กิโลคาร์ตัน และมี subtype เป็น IgG ซึ่งจะทำให้โมโนโคลนอลที่ได้มีความจำเพาะและความเสถียรมากขึ้น และขณะนี้คณะผู้วิจัยกำลังทำการพัฒนาอยู่ นอกจากนี้แล้ว ยังได้ทำการโคลนนิ่งยีนที่สร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV หลังการแสดงออกของยีน จะนำโปรตีนที่ได้ไปฉีดเข้าไปในหนู เพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี คาดว่าจะสามารถผลิตโมโนโคลนอลได้ปริมาณมากและมีความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Belcher, C.R., and P.R. Young. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. J.Virol.Meth.74:21-29.
- Chang, P.S., C.F. Lo., G.H Kou, C.C., Lu and Chen. 1993. Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). J.Invert.Path.62; 116-20.
- Flegel TW. 1997 Special topic overview; major viral diseases of the black tige prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microhiol Biotechnol 13: 433-442
- Flegel TW., V. Thamavit, T. Pasharawipas, V Alday-Sanz. 1999 Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 174: 197-206.
- Hudson, L. and F.C. Hay. 1976 Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, London U.K. p274.
- Kachanaphum P, C. Wonteerassupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel. 1998 Experimental transmission of white-spot syndrome virus (WSSV) from craps to shrimp (*Penaeus monodon*). Dis. Aquat. Org. 34: 1-7.
- Kohler, G. and C. Milstein 1976 Derivative of specific antibody-producing tissue culture and tumor cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-9.
- Lighter, D.V. and R.M. Redman. 1998 Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164: 201-20.

- Loh, P.C., E. Cesar, B. Nadala, L.M. Tapay and Y. lu. 1998 Recent developments in immunological-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In Advance in Shrimp Biotechnology, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p 255-9.
- Mosmann, T.R., R. Bauman and A.R. Wiiliamson. 1979 Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. Eur. J. Immunol 9: 511-6.
- Nadala EC Jr, LM Tapay, PC Loh. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis.Aquat. Org.31:141-146.
- Nadala EC Jr, LM Tapay, PC Loh. 1998. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. Dis.Aquat Org.33:221-229..
- Nadala EC Jr, PC Loh. 2000 Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. J. Virol. Methods; 84(2): 175-9.
- Poulos BT, R kibler, D Bradley-Dunlop, LL Mohny, DV Lightner. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. Dis.Aquat.Org.37:99-106.

Sithikornkul P, P Chauychuwong, W Sithikornkul, S Longyant, P Chaivisuthangkura, P

Menasveta. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 42:27-34.

Sukhumsirichart W, C. Wongteerasupaya , V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B.

Withyachumnarkul, T.W. Flegel 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. Dis. Aquat Or; 38: 1-10

Wongteerasupaya, C, W. Tongchuea, V. Boonsaeng, S. Panyim, A Tassanakajon, B.

Withyachumnarnkul, T.W. Flegel. 1997 Detection of yellow-headvirus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis Aquat. Org.31:181-6.

Wongteerasupaya, C, V. Boonsaeng, W. Tongchuea, N. Sitidilokratana, P. Kanchanaphum, R.

Klinputosrn and S. Panyim. 1998 Multiplex PCR for detection of yellow-head virus and white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*, in Advance in Shrimp Biotechnology, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p 265.