การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ extra small virus (XSV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
สิริจันทรา สานนท์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ extra small virus (XSV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
สิริจันทรา สานนท์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ extra small virus (XSV)

บทคัดย่อ

ของ

สิริจันทรา สานนท์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553

สิริจันทรา สานนท์. (2553). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ extra small virus (XSV)*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์, ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล.

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ extra small virus (XSV) ในกุ้งก้ามกราม โดยกระตุ้นแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และ *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV และ pET15b-XSV ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนสายผสมกับ glutathione-S-transferase (GST) และ 6xHis ตามลำดับ ด้วย 1 mM IPTG เมื่อแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนให้บริสุทธิ์จากการนำไปผ่านการแยกโดย SDS-PAGE และทำให้บริสุทธิ์โดย electroelution พบว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนทั้งสองชนิดที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42 และ 20 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว และเมื่อนำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ XSV ได้ 6 โคลน ได้แก่ XSV1, XSV19E, XSV19G, XSV17, XSV10 และ XSV8 ที่สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนและเชื้อ XSV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Mr*NV, WSSV, TSV,YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และสามารถจับกับแคปซิดโปรตีนธรรมชาติของ XSV ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16 และ 17 กิโลดาลตัน ด้วยวิธี western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa (K) โดยที่ XSV1, XSV8, XSV10 และ XSV17 มีอิพิโทปต่างกัน เมื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่า XSV1 มีความไวสูงสุดในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) และตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:64 ด้วยวิธี dot blotting

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT CAPSID PROTEIN OF EXTRA SMALL VIRUS (XSV)

AN ABSTRACT

BY

SIRIJUNTRA SANONT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degreee in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
September 2010

Sirijuntra Sanont. (2010). *Production of monoclonal antibodies against recombinant capsid protein of extra small virus (XSV).* Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Commitee: Assist. Prof. Dr. Siwaporn Longyant, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies (MAbs) that can be used to detect extra smaii virus (XSV) in *Macrobrachium rosenbergii*. After induction of recombinant plasmid pGEX-6P-1-XSV in *E.coli* strain BL21 and pET15b-XSV in *E.coli* strain BL21 (DE3) with 1mM IPTG ,a glutathione-S-transferase (GST) and 6xHis tagged XSV capsid proteins with a molecular masses of 42 and 20 kDa were obtained, respectively. The recombinant protein was purified by SDS-PAGE, electroeluted and used for immunization into Swiss mice for monoclonal antibody production. Six hybridoma clones (XSV1, XSV19E, XSV19G, XSV17, XSV10 and XSV8) produced antibodies specific to XSV capsid protein. All MAbs bound to the natural XSV protein without cross-reactivity to recombinant proteins of *Mr*NV, WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV and *Pst*DNV as determined by dot blotting. These MAbs bound to natural XSV protein with molecular masses of 16 and 17 kDa as determined by Western blot assay. The monoclonal antibodies belong to IgG with subclass IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b} with kappa (K) light chain. The detection sensitivity of the XSV MAbs (XSV1) was approximately 0.5 µg/ml (10 fmol/microlit) of purified recombinant GST-XSV and 1:64 of XSV infection in *M. rosenbergii* as determined by dot blotting.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ extra small virus (XSV)
ของ
สิริจันทรา สานนท์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน กันยายน พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

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

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

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

..... กรรมการ
(ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน
จาก
หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง
(ทุนส่งเสริมกลุ่มนักวิจัยอาชีพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

ประกาศคุณูประการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิทยาการและจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประวัติ อังประภาพรชัย และ อาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณมังกูล ที่รับเป็นกรรมการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากยิ่งขึ้นและดร.แสงจันทร์ เสนาปิน จาก หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการการสอบปริญญานิพนธ์ อีกทั้งกรุณาอนุเคราะห์ทุนสนับสนุนและตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV รวมทั้งคุณธนัชพร อุทัยรังษี ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ คุณวารุณี หะยีมะสาและ และคุณชลินันท์ เพ็งสุข รวมทั้งรุ่นพี่ทุกท่านในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดีและห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ขอบคุณ คุณประดิษฐ์ หวังมาน และเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา พี่และน้อง ที่เป็นแรงใจ ขอบคุณแรงผลักดันที่ทำให้ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และวิจัยได้เรียนรู้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่สัตว์ทดลอง ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

สิริจันทรา สานนท์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**.....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
	ขอบเขตของการวิจัย.....	3
	สมมติฐานในการวิจัย.....	3
	ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**.....	4
	กุ้งก้ามกราม.....	4
	อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกราม.....	4
	ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม.....	4
	การผสมพันธ์และการวางไข่.....	5
	การพัฒนาของกุ้งวัยอ่อน.....	6
	โรคที่เกิดขึ้นในกุ้งก้ามกราม.....	8
	โรคหางขาว (White tail disease).....	8
	ลักษณะอาการของกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคหางขาว.....	9
	พยาธิสภาพของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ.....	10
	ลักษณะการเรียงตัวของจีโนมของ XSV.....	11
	การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ.....	13
	การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ XSV.....	13
	การตรวจเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	14
	การตรวจเชื้อโดยวิธีทางด้านชีวโมเลกุล.....	15
	การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและจีโนมของเชื้อ XSV.....	18
	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody : MAb).....	20
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**.....	23
	อุปกรณ์และสารเคมี.....	23
	พลาสมิด.....	23
	สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง.....	23
	แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	24
เคมีภัณฑ์	25
วิธีการดำเนินการทดลอง	27
การกระตุ้นการแสดงของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV	28
การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV	28
การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ให้บริสุทธิ์	28
การตรวจการติดเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกราม ด้วยวิธี RT-PCR	29
การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV	31
การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว	31
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV	31
การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	32
การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting	32
การคัดเลือกขั้นที่ 2	33
การคัดเลือกโดยวิธี dot blotting	33
การคัดเลือกโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting	33
การคัดเลือกโดยวิธี immunohistochemistry	33
การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution	34
การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา	34
การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	35
การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	35
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	36
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting	38
การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ *Mr*NV, WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV ด้วยวิธี dot blotting	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3 (ต่อ)

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV,*Pm*DNV และ *Pst*DNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry…….. 38

4 ผลการทดลอง……..…….. 39

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV……... 39

การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ให้บริสุทธิ์……..……... 39

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV ……... 41

การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี……..……...…….. 45

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……. 53

บรรณานุกรม……..... 56

ภาคผนวก……..... 62

ภาคผนวก ก……..……. 63

ภาคผนวก ข……..……..... 65

ภาคผนวก ค……..……..... 68

ภาคผนวก ง……..…….……..…….. 70

ภาคผนวก จ…….……...…... 75

ภาคผนวก ฉ……..……..…….. 79

ภาคผนวก ช……..……..……..…... 81

ประวัติย่อผู้วิจัย..…….....…. 83

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง……	24
2	เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง……...	25
3	ส่วนผสมของการทำ RT-PCR……...	30
4	ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลา สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนของ XSV โดยเอนไซม์ Reverse Transcriptase และ *Taq* DNA polymerase ด้วยวิธี RT-PCR …..	30
5	คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV, class และความไวของการตรวจหาแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry ……..…….	52

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	ลักษณะของลูกกุ้งก้ามกรามระยะคว่ำและกุ้งก้ามกรามโตเต็มวัย…….	5
2	วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม……..……...	8
3	ลักษณะของกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่ป่วยที่ติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV กล้ามเนื้อ มีลักษณะขุ่นขาวคล้ายสีของน้ำนมและกุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยที่ป่วย บริเวณลำตัว รยางค์ จะมีสีแดงอมส้ม ……..……..	10
4	ลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อลายของแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อไวรัส *Mr*NV และ XSV พบลักษณะการหดตัวอัดรวมกันแน่นของนิวเคลียส ภายในกลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อที่ตาย…..……..……...	11
5	ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ XSV genome (a) ลำดับเบสที่มีจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ CP17 กับ CP16 (b) การวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 15% gel พบว่าแคปซิดโปรตีนของ XSV มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 16 และ 17 กิโลดาลตัน……..…….	12
6	อนุภาคไวรัส *Mr*NV และ XSV ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านลักษณะอนุภาคเป็น icosahedral ไม่พบ envelope โดยอนุภาคไวรัส *Mr*NV มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 23 นาโนเมตร (ลูกศรสีขาว) ส่วนอนุภาคไวรัส XSV มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ15 นาโนเมตร (ลูกศรสีแดง)……..….	14
7	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนต่างๆ ที่มีความยาว 402 นิวคลีโอไทด์ของแคปซิดโปรตีนยีน XSV โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง XSVWI กับ XSVIN จากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no.AY247793 และ AM114037 ตามลำดับ)……..	16
8	Phylogenetic analysis ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ XSV genome พบว่าไวรัสกุ้งที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสกุ้งจากประเทศจีนมากกว่าจากประเทศอินเดีย……	19
9	ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน XSV โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ในการออกแบบสำหรับสร้างไพร์เมอร์ โดยเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (CGGGATCC) และ *Sal*I (CGTCGAC) ที่ปลาย 5' ของไพร์เมอร์ XSV70F และ XSVR ตามลำดับ (Genbank accession no: AY247793)……..……..	22

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

10 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้..... 36

11 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwish ELISA ซึ่งลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 โดย 1 คอลัมน์ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 โคลน..... 37

12 การเติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H (ลูกศร)เพื่อใช้ในการจัดจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา..... 37

13 การตรวจสอบผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV โดยนำมาแยกใน 12% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250..... 40

14 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B)..... 42

15 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆโดยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B)..... 43

16 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1 ต่อเชื้อ XSV ด้วยวิธี dot blotting 44

17 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Mr*NV, WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV ด้วยวิธี dot blotting 46

18 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ XSV กับองค์ประกอบต่างๆภายในเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อชนิดต่างๆ..... 47

19 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA 49

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

20 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆด้วยวิธี dot blotting (1) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิพิโทปแตกต่างกัน (2) ในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV บริสุทธิ์ และสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ..... 51

บทที่ 1
บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้นำในด้านการผลิตและการส่งออกกุ้ง ซึ่งการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามนั้นมีมานานกว่า 40 ปีแล้ว จากข้อมูลของสมาคมผู้เลี้ยงกุ้งในพื้นที่น้ำจืดปี ค.ศ.2004 พบว่า มีพื้นที่สำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่ภาคกลางมีประมาณ 80,000 ไร่ และพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามกระจายอยู่ในภูมิภาคอื่นแทบทุกภาคของประเทศอีกประมาณ 50,000 ไร่ (นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. 2548: 65-81) แม้อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยมีมาเป็นเวลานานแล้ว แต่รูปแบบการเลี้ยงของเกษตรกรไม่มีการพัฒนา ส่วนใหญ่ไม่มีบ่อพักน้ำและมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นทำให้ได้ผลผลิตต่ำกว่าประมาณ 300 กิโลกรัม/ไร่/ปี จึงเริ่มมีการส่งเสริมแนวทางการเลี้ยงแบบพัฒนามากขึ้นทดแทนการเลี้ยงแบบดั้งเดิมที่ได้ผลผลิตต่ำ ที่มักมีปัญหายาตกค้าง โดยมีการปล่อยลูกกุ้งน้อยลง มีเครื่องให้อากาศ ใช้อาหารสำเร็จรูปทดแทนอาหารที่เกษตรกรทำเองและมีการเลี้ยงแบบย้ายบ่อเพื่อให้มีโอกาสได้กุ้งก้ามกรามที่มีขนาดใหญ่ แต่ก็พบปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามก็คือ ปัญหาการเกิดโรคโดยเฉพาะในช่วงการเพาะอนุบาลลูกกุ้ง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ; และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล.2547: 206) สาเหตุหลักที่ส่งผลกระทบเชิงลบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก ได้แก่ โรคติดเชื้อในกุ้งที่เกิดการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Radman. 1998: 201-220) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112)

สำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามนั้น เชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงอย่างรุนแรงมีสองชนิดคือ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) และ extra small virus (XSV) มีรายงานการเกิดโรคระบาดจากไวรัสทั้งสองชนิดนี้ครั้งแรกในปี 1994 ในหมู่เกาะ Guadeloupe ของประเทศฝรั่งเศส (Arcier; et al. 1999: 177-181) ต่อมามีการระบาดของโรคนี้ไปยังประเทศไต้หวัน (Tung; Wang; & Chen. 1999: 1-5), ประเทศจีน (Qian; et al. 2003: 521-527), ประเทศอินเดีย (Hameed; et al. 2004: 127-133) จนมาถึงประเทศไทย (Yoganandhan; et al. 2006: 255-258) และเมื่อเร็วๆ นี้ได้พบการระบาดที่ประเทศออสเตรเลีย (Owens; et al. 2009; 175-180) ในประเทศไทยเกิดการระบาดตั้งแต่ปลายปี ค.ศ.2004 จนถึงต้นปี ค.ศ.2005 ความรุนแรงของโรคในระยะแรกยังไม่รุนแรง ต่อมาความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เกิดปัญหาในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสนี้ทำให้กุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนที่ติดเชื้อมีกล้ามเนื้อส่วนหางสีขาวขุ่นโดยจะเห็นลักษณะสีชีดเกิดขึ้นในบริเวณปลายหางจนถึงกล้ามเนื้อบริเวณลำตัว ส่วนกุ้งก้ามกรามที่โตเต็มวัยที่ป่วยเป็นโรคจะอ่อนแอ กินอาหารน้อยลง ลำตัวจะมีสีส้มและมีน้ำเลือดเป็นสีส้มเห็นได้ชัด ว่ายน้ำเฉื่อยชา มักจะลอยหัวอยู่บริเวณขอบบ่อ และ

จะตายในที่สุด พบว่ากุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2-3 วันหลังจากที่พบว่ากุ้งก้ามกรามป่วยมีอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่น (นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. 2548: 65-81) การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนั้นไม่สามารถทำได้ ดังนั้นหากสามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วจะเป็นวิธีเดียวในการจัดการโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้

สำหรับวิธีการตรวจเชื้อ XSV นั้น ได้มีการพัฒนาขึ้นมากมายประกอบด้วย การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (histological examination) และตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) (Qian; et al. 2003: 521-527) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูง อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ใช้เวลามากในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อและไม่สามารถตรวจการติดเชื้อได้ในระยะแรกได้ จึงได้มีการพัฒนาการใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรม (nucleic acid) ของไวรัส โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถตรวจพบไวรัสแม้มีปริมาณน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรก และช่วยลดเวลาในการตรวจวินิจฉัยแบบเดิม (Hameed; et al. 2004: 127-133) ถึงแม้เทคนิคนี้จะสามารถตรวจสอบไวรัสได้แม้มีปริมาณน้อยแต่ไม่สามารถที่จะตรวจสอบหาปริมาณการติดเชื้อเริ่มต้นได้ จึงได้พัฒนาวิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำและความไวสูงสามารถที่จะตรวจปริมาณการติดเชื้อเริ่มต้นได้และแสดงผลได้ทันทีโดยไม่จำเป็นต้องตรวจสอบผลผลิตของ PCR (Zhang; et al. 2006: 11-17) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจเชื้อ XSV เช่นเดียวกัน โดยเป็นเทคนิคที่มีความไวและมีความจำเพาะที่สูงเมื่อเทียบกับวิธี RT-PCR และใช้เวลาน้อยในการทราบผล (Pillai; et al. 2006: 275-283) แต่อย่างไรก็ตามวิธีทางด้านชีวโมเลกุลก็ยังไม่สะดวกในการนำไปใช้ในฟาร์มโดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยมีราคาแพง ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูง

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) มาใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ดังนั้นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีน XSV จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เพียง 1 เซลล์ จึงมีความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนที่ใช้เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น แอนติบอดีจะจดจำโครงสร้างโดยรวมของอิพิโทปบนแอนติเจน และสามารถแยกแยะความแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยที่เกิดบนอิพิโทปได้ ดังนั้นการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการวิเคราะห์จะเป็นประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากมีความไวและความแม่นยำสูง หลังจากพัฒนาไปเป็นชุดตรวจจะทำให้ง่ายและสะดวกต่อการใช้งาน เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมาก ทำให้สามารถตรวจเพื่อติดตามการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลาอันเป็นการลดความเสียหายของเกษตรกร (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

โดยส่วนใหญ่กุ้งที่เป็นโรคหางขาวมักตรวจพบการติดเชื้อ *Mr*NV ร่วมกับเชื้อ XSV ถึงแม้จะมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Mr*NV แล้วก็ตาม (Qian; et al. 2006 : 1144-1150)แต่มีบางตัวอย่างของกุ้งที่เป็นโรคที่ตรวจพบเฉพาะเชื้อ XSV (Hameed; el al. 2004: 127-133) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ XSV ด้วย เพื่อใช้ในการตรวจกุ้งที่เป็นโรคหางขาวแต่ตรวจไม่พบการติดเชื้อ *Mr*NV ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจการติดเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

1. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)
2. การทำให้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* มีความบริสุทธิ์
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ XSV โดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน
4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ XSV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry
5. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยการตรวจสอบอิพิโทป การจำแนก class และ subclass รวมทั้งการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV อาจทำโดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้เป็นแอนติเจนกระตุ้นหนูขาว

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ได้
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กุ้งก้ามกราม

1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกราม

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Matacostraca

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus *Macrobrachium*

Species *Macrobrachium rosenbergii*

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่อาศัยในแหล่งแม่น้ำและลำคลองที่เชื่อมติดกับทะเล จึงสามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำจืด มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย บริเวณเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศไทย พม่า เวียดนาม เขมร มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และเคยมีรายงานว่าพบในมหาสมุทรอินเดีย (Administrator. 2010: Online) กุ้งก้ามกรามมีชื่อหลายชื่อ เช่น กุ้งหลวง กุ้งก้ามเกลี้ยง กุ้งใหญ่ กุ้งแห มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* มีชื่อสามัญเรียกว่า giant fresh water prawn (สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546: 2)

1.2 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งก้ามกราม มีลำตัวเป็นปล้องมีจำนวน 6 ปล้อง ส่วนหัวและอกคลุมด้วยเปลือกชิ้นเดียว กรีมีรูปร่างโค้งขึ้นมีลักษณะหยักเป็นฟันเลื่อย โดยด้านบนมีจำนวน 11-14 ซี่ ด้านล่างมีจำนวน 8-10 ซี่ บริเวณโคนกรีกว้างและหนา ส่วนบริเวณปลายกรียาวและแหลม ลำตัวปกติจะมีสีเขียวหรือสีน้ำตาลเทา แต่บางครั้งพบว่ามีสีน้ำเงินเข้มโดยเฉพาะตัวที่ใหญ่และอายุมากและบริเวณขาว่ายน้ำด้านท้องจะมีสีส้มอ่อน

กุ้งก้ามกรามมีหนวด 2 คู่ หนวดคู่แรกส่วนของโคนหนวดหนา แบ่งเป็น 3 ข้อปล้อง ปล้องที่ 3 แยกเป็นหนวด 2 เส้น หนวดคู่ที่สองยาวกว่าหนวดคู่ที่หนึ่งและแบ่งเป็น 5 ข้อปล้อง

ขาเดินของกุ้งก้ามกรามมี 5 คู่ โดยขาคู่ที่หนึ่งและที่สองตรงปลายมีลักษณะเป็นก้าม ส่วนขาเดินคู่ที่สาม สี่ และห้า ตรงปลายมีลักษณะเป็นปลายแหลมธรรมดา ขาเดินคู่ที่สองในกุ้งตัวผู้มีลักษณะเป็นก้ามใหญ่มาก โดยทั่วไปส่วนของก้ามทำหน้าที่จับอาหารเข้าปากและไว้สำหรับต่อสู้กับศัตรู

ขาว่ายน้ำของกุ้งก้ามกรามมี 5 คู่ ส่วนแพนหางมีลักษณะแหลมตรงปลายด้านข้างแยกเป็นแพนสองแพน ซึ่งช่วยในการว่ายน้ำและควบคุมทิศทางในการเคลื่อนไหว (ภาพประกอบ 1) (สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546: 2-3)

(ก) **(ข)**

ภาพประกอบ 1 กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* หรือ giant freshwater prawn
(ก) ลูกกุ้งก้ามกรามระยะคว่ำ (ข) กุ้งก้ามกรามตัวโตเต็มวัย

ที่มา: (ก) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (2010). *อุตสาหกรรมกุ้งไทย*. (ออนไลน์) (ข) ศิริคุณ.แสงสุขเอี่ยม (2007). *Sirikhun group: Fish and seafood: ความรู้ตัวสินค้า หมวดกุ้ง*. (ออนไลน์)

1.3 การผสมพันธุ์และวางไข่

กุ้งก้ามกรามสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดปี การผสมพันธุ์เริ่มขึ้นเมื่อกุ้งตัวเมียลอกคราบและเปลือกยังอ่อน ตัวผู้จะเข้าผสมพันธุ์โดยปล่อยน้ำเชื้อตัวผู้ ซึ่งมีลักษณะคล้ายสารเหนียวไปติดกับส่วนหน้าอกระหว่างขาเดินของตัวเมีย หลังจากการผสมพันธุ์ 2-3 ชั่วโมงตัวเมียเริ่มวางไข่ ไข่ที่ปล่อยออกมาจะถูกนำไปเก็บอยู่บริเวณส่วนท้องระหว่างขาว่ายน้ำ โดยขาว่ายน้ำจะทำหน้าที่โบกพัดน้ำให้ไหลผ่าน เพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้แก่ไข่ ไข่ที่ได้รับการผสมในระยะแรกมีสีเหลืองอมส้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-0.8 มิลลิเมตร Ling (1962) รายงานว่า ไข่ของกุ้งก้ามกรามมีการพัฒนาหลังจากการผสมพันธุ์แล้วจนมีอวัยวะครบทุกส่วนภายในเปลือกไข่ ขณะเดียวกันถ้าสังเกตจากภายนอกจะเห็นสีของไข่เปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองเข้มมากขึ้น จนระยะสุดท้ายไข่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ โดยรูปร่างกุ้งพับงอภายในเปลือกไข่ สามารถมองเห็นด้วยตาได้อย่างชัดเจน และใช้เวลาการพัฒนาของไข่จนเป็นตัวกุ้งวัยอ่อน (larvae) ประมาณ 17-21 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่

กับอุณหภูมิ นอกจากนี้ถ้ามีการเพิ่มความเค็มของน้ำประมาณ 2-5 ppt (part per thousand) จะทำให้ไข่พัฒนาเร็วขึ้นกว่าปกติ (สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546: 5)

1.4 การพัฒนาของกุ้งวัยอ่อน

หลังจากไข่ได้รับการผสมจากเชื้อตัวผู้แล้วจะมีการแบ่งตัวของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นอวัยวะต่างๆเกือบสมบูรณ์ แล้วจึงฟักออกจากไข่ ใช้ระยะเวลาประมาณ 19 วัน จากนั้นจะเจริญเติบโตด้วยการลอกคราบอีก 12 ครั้ง การลอกคราบแต่ละครั้งนั้นลูกกุ้งจะมีรูปร่างเปลี่ยนไป (Administrator. 2010: Online) ดังนี้ (ภาพประกอบ 2)

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 1 เป็นลูกกุ้งที่มีอายุ 1-3 วัน หลังจากฟักออกจากไข่ มีความยาวจากปลายกรีถึงปลายหาง 1.8-1.9 มิลลิเมตร ตาทั้งสองข้างมีขนาดใหญ่เบียดชิดกัน ยังไม่มีก้านตา กรีมีลักษณะคล้ายหนามแหลมอยู่ระหว่างตา ปลายกรีชี้ขึ้นเล็กน้อยไม่มีฟันกรี หางเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายเว้าขอบหางมีขน 6 คู่ ตรงปลาย 5 คู่ และด้านข้างอีก 1 คู่ มีรยางค์อก 5 คู่ ซึ่งใช้ในการว่ายน้ำ

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 2 เป็นลูกกุ้งอายุ 2-4 วันความยาวเพิ่มเป็น 2.1-2.2 มิลลิเมตร ตาแยกออกจากกัน มีก้านตา มุมเปลือกหัวบริเวณหลังตาที่หนามแหลมด้านละอัน ที่กรีไม่มีฟันกรี หางเป็นรูปสามเหลี่ยม ขนขอบหางเพิ่มเป็น 7 คู่ตอนปลายและ 2 คู่ด้านข้าง ขนทุกคู่มีขนอ่อนแตกแขนงออกมาสองข้างคล้ายขนนก แต่ขนคู่ตรงกลางโคนหางไม่มีขนอ่อน

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 3 เป็นลูกกุ้งอายุ 3-6 วัน ความยาว 2.3-2.5 มิลลิเมตร ตาและก้านตาเจริญดีขึ้น แข็งแรงกลอกกลิ้งไปมาได้ กรียาวขึ้น โคนสันกรีมีหนาม 1 อัน หางเปลี่ยนเป็นรูปสามเหลี่ยมทรงสูง มีขนปลายหาง 5 คู่ และด้านข้างอีก 3 คู่ ปรากฏแพนหางอันนอกแยกออกมามีขนรอบ ๆ แพนหางข้างละ 6 เส้น เป็นขนชนิดที่มีขนอ่อน แพนหางอันในเริ่มปรากฏเป็นแนว

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 4 เป็นลูกกุ้งอายุ 4-7 วัน มีความยาว 2.5-2.8 มิลลิเมตร หนามกรีเพิ่มขึ้นเป็น 2 อัน หางเปลี่ยนรูปเป็นสามเหลี่ยมฐานโค้ง ขนปลายหาง 5 คู่ ด้านข้างอีก 3 คู่ แพนหางอันในแยกตัวออกมา ขอบแพนหางมีขนชนิดที่มีขนอ่อนข้างละ 7-8 เส้น ขอบของแพนหางอันนอกมีขนชนิดที่มีขนอ่อนข้างละ 12 เส้น

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 5 ลูกกุ้งมีอายุ 5-9 วัน มีความยาว 3.4-3.5 มิลลิเมตร กรียาวออกเกือบถึงปลายสุดของตา มีหนามบนสันกรีด้านบน 2 อัน หางเปลี่ยนเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนปลายหาง 5 คู่ และด้านข้างอีก 3 คู่ แพนหางอันนอกมีความยาวเท่ากับแพนหางอันใน มีขนข้างละ 15-16 เส้น แพนหางอันในมีขนปลายหางข้างละ 11-12 เส้น ปล้องท้องด้านล่างเริ่มปรากฏฐานของขาว่ายน้ำ

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 6 ลูกกุ้งอายุ 6-11 วัน มีความยาว 3.5-3.9 มิลลิเมตร ยังไม่มีฟันกรีทั้งบนสันกรีบนและสันกรีล่าง หางยาวออก ปลายเรียวแคบลง มีขนข้างละ 18-19 เส้น และแพนหางด้านนอกมีขนข้างละ 16-18 เส้น ฐานของขาว่ายน้ำปรากฏชัดขึ้น

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 7 ลูกกุ้งอายุ 7-14 วัน มีความยาว 3.9-4.1 มิลลิเมตร กรีขยายยาวเลยหน้าตาออกไปเล็กน้อย หางเรียวเล็กไปทางปลาย จำนวนขนเท่าเดิม แพนหางอันนอกและอันในขยายยาวเลยปลายหางออกไปเล็กน้อย แพนหางอันนอกมีขนข้างละ 21-22 เส้น และแพนหางอันในมีขนข้างละ 19-20 เส้น เริ่มปรากฏขาว่ายน้ำ

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 8 ลูกกุ้งอายุ 8-17 วัน มีความยาว 5.1-5.3 มิลลิเมตร มีหนามกรี 2 อัน ส่วนปลายเป็นหยัก ขาเดินเจริญดีขึ้น หางเรียวยาว ส่วนปลายแหลม มีขนด้านข้าง 3 คู่ และที่ปลายหาง 5 คู่ แพนหางอันนอกและแพนหางอันใน ขยายยาวออกและยาวกว่าความยาวของหาง แพนหางอันนอกมีขนข้างละ 29-30 เส้นและแพนหางด้านในมีขนข้างละ 26-29 เส้น ขาว่ายน้ำเจริญขึ้น และแยกเป็น 2 แฉก

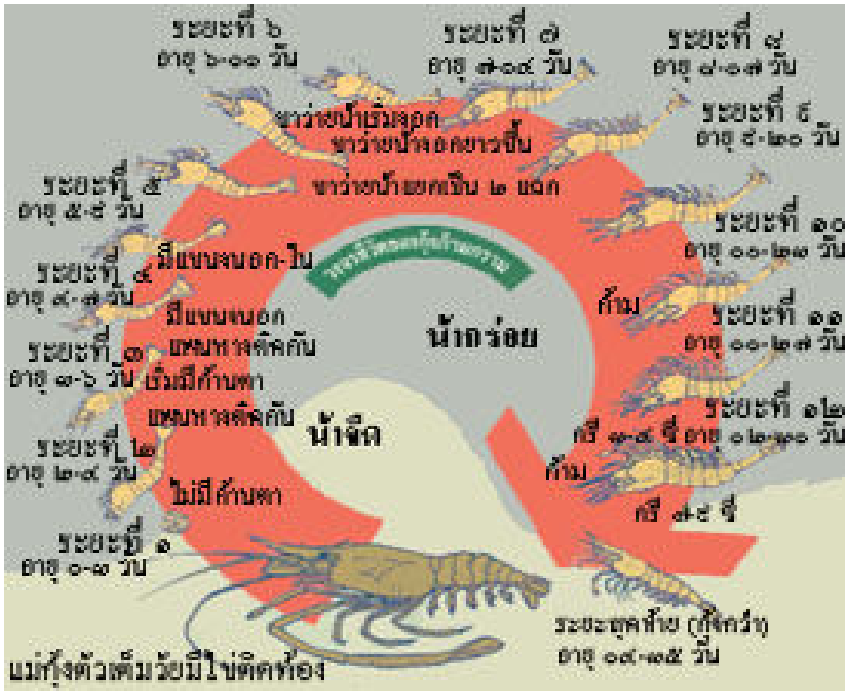
กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 9 ลูกกุ้งอายุ 10-20 วัน มีความยาว 6.3-6.7 มิลลิเมตร แพนหางอันนอก มีขนข้างละ 31-32 เส้นและแพนหางอันในมีขนข้างละ 27-28 เส้น ขาว่ายน้ำเจริญดีขึ้น ส่วนปลายที่แยกเป็น 2 แฉกมีขนอ่อนปรากฏอยู่ทั่วไป แข็งแรงขึ้น สามารถใช้ว่ายน้ำได้

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 10 ลูกกุ้งอายุ 12-23 วัน มีความยาว 6.3-6.8 มิลลิเมตร ขาเดินคู่ที่ 2 เจริญมากขึ้นเปลี่ยนเป็นก้าม ขนบนขอบหางด้านข้างหายไป เหลือเฉพาะขนที่ปลายหาง 5 คู่ ขนบนแพนหางอันนอกเพิ่มขึ้นเป็น 36-37 เส้น และที่แพนหางอันในเพิ่มขึ้นเป็น 32-33 เส้น

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 11 ลูกกุ้งอายุ 14-27 วัน มีความยาว 6.6-6.8 มิลลิเมตร มีหนามโคนกรี 2 ชั้น และมีฟันกรีบนสันกรีด้านบน 3-4 อัน หางเรียวเล็กยาวออก ขนบนขอบแพนหางอันนอกเพิ่มขึ้นเป็น 41-42 เส้น และที่แพนหางอันในเพิ่มขึ้นเป็น 37-38 เส้น ขาว่ายน้ำเจริญดี ว่ายน้ำได้อย่างสมบูรณ์

กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 12 ลูกกุ้งอายุ 16-31 วัน เป็นขั้นการเจริญขั้นสุดท้ายของกุ้งวัยอ่อน ลูกกุ้งมีอายุในช่วย 36-48 วัน มีความยาว 6.7-6.9 มิลลิเมตร หนามที่โคนกรีหายไปมีฟันกรีบนสันกรีด้านบน 7-8 อัน ส่วนสันกรีล่างยังไม่มีฟันกรี ขนของแพนหางอันนอกและอันในเพิ่มขึ้นเป็น 42-43 เส้น เท่ากัน

กุ้งวัยรุ่น (Juvenile) เป็นกุ้งที่เลยระยะวัยอ่อนไปแล้ว จะว่ายน้ำในลักษณะคว่ำตัวเหมือนกุ้งที่เจริญเต็มวัยทั่วไป มีอายุในช่วง 20-35 วัน มีความยาวจากปลายกรีถึงปลายหาง 6.8-7.4 มิลลิเมตร มีฟันกรีบนสันกรีด้านบน 11-12 อัน และที่สันกรีด้านล่าง 3-5 อัน ขนปลายหางเปลี่ยนสภาพไปเป็นหนามแข็งจำนวน 4 คู่ ขนบนขอบแพนหางเพิ่มขึ้นจำนวนมากขาว่ายน้ำเจริญเต็มที่ว่ายน้ำได้รวดเร็ว ขาเดินพัฒนาขึ้นเต็มที่ ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นก้ามจับอาหารได้



ภาพประกอบ 2 วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม

ที่มา: สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 13. (2010). *วิธีเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกราม.* (ออนไลน์).

2. โรคที่เกิดขึ้นในกุ้งก้ามกราม

2.1 โรคหางขาว (White tail disease)

โรคหางขาวพบการระบาดครั้งแรกในปี 1994 ในหมู่เกาะ Guadeloupe ของประเทศฝรั่งเศส (Arcier; et al. 1999: 177-181) ต่อมามีการระบาดของโรคนี้ไปยังประเทศไต้หวัน (Tung; Wang; & Chen. 1999: 1-5), ประเทศจีน (Qian; et al. 2003: 521-527), ประเทศอินเดีย (Hameed; et al. 2004: 127-133) จนมาถึงประเทศไทย (Yoganandhan; et al. 2006: 255-258) และเมื่อเร็วๆ นี้ได้พบการระบาดที่ประเทศออสเตรเลีย (Owens; et al. 2009: 175-180) ในประเทศไทยพบการระบาดตั้งแต่ปลายปี ค.ศ.2004 จนถึงต้นปี ค.ศ.2005 ซึ่งทำให้โรงเพาะฟักและอนุบาลกุ้งก้ามกรามในหลายพื้นที่ของประเทศประสบปัญหาการตายของลูกกุ้งระยะวัยอ่อนอย่างรวดเร็ว โดยไม่ทราบสาเหตุสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอย่างมาก จนทำให้โรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามต้องหยุดกิจการชั่วคราว โดยเฉพาะในเขตจังหวัดราชบุรีและจังหวัดสุพรรณบุรี นอกจากนี้ยังพบการตายของกุ้งก้ามกรามระยะโตเต็มวัยโดยไม่ทราบสาเหตุด้วยเช่นกัน โดยพบอัตราการตายสะสมขึ้นอย่างผิดปกติ จากการตรวจสอบในเบื้องต้นยังไม่ทราบสาเหตุที่ทำให้เกิดการตาย และจากปัญหานี้มีผู้วิจัยได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าสาเหตุการตายอาจจะมาจากการติดเชื้อ

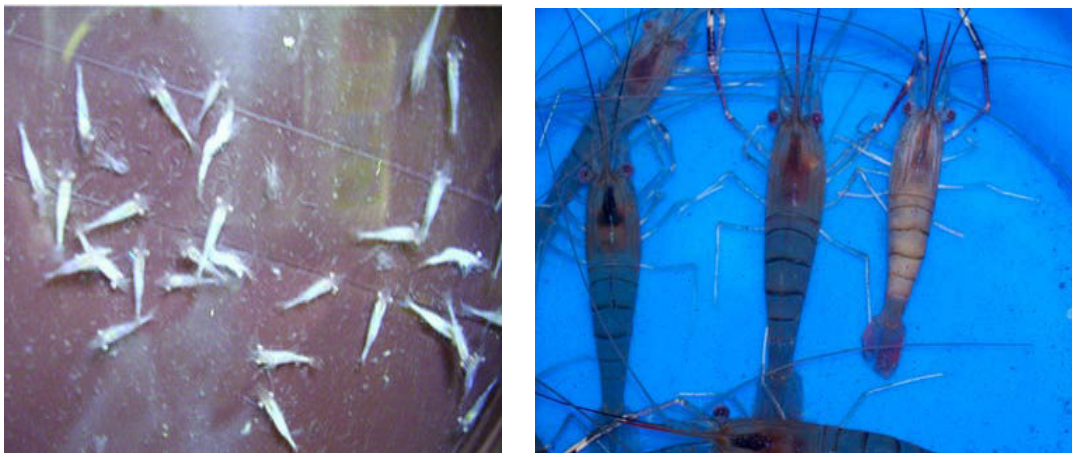
ก่อโรคในกุ้งก้ามกราม โดยเฉพาะในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน จากการพบการตายของกุ้งก้ามกรามในหลายพื้นที่ของหลายจังหวัดในช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกันจึงสันนิษฐานว่าเกิดจากโรคระบาดที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและไวรัส จึงได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและตายแต่ไม่พบเชื้อที่ก่อโรครุนแรงและทำให้มีการระบาดในระยะเวลาอันสั้น (ชัยวุฒิ สุดทองคง. 2005: 293-301)

โรคหางขาวหรือกล้ามเนื้อขุ่นขาวมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) และ extra small virus (XSV) (Qian; et al. 2003, Bonami; et al. 2005) โดยปัจจัยการระบาดของไวรัสทั้งสองนี้มาจากการติดเชื้อจากแม่พันธุ์ทำให้ลูกกุ้งที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ลูกกุ้งที่ป่วยมีลักษณะกล้ามเนื้อสีขาวโดยเฉพาะบริเวณหาง (Hameed; et al. 2004: 127-133)

2.2 ลักษณะอาการของกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคหางขาว

โรคหางขาวที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส *Mr*NV และ XSV โดยเชื้อไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในบริเวณกล้ามเนื้อต่างๆ และส่วน cephalothoraxaes ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายในการติดเชื้อไวรัส ลักษณะอาการของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนที่ติดเชื้อ พบว่ากล้ามเนื้อส่วนหางมีลักษณะขาวขุ่นโดยจะเห็นลักษณะสีซีดเกิดขึ้นในบริเวณปลายหางจนถึงกล้ามเนื้อบริเวณลำตัว และบางส่วนที่ตรวจพบเชื้อกลับไม่พบลักษณะขุ่นขาวในกล้ามเนื้อซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสสามารถทำให้กุ้งตายได้อย่างรวดเร็วโดยกุ้งยังไม่แสดงลักษณะอาการของโรคโดยเฉพาะใน ช่วงก่อนหรือหลังการลอกคราบของกุ้งใหญ่และช่วงหลังหรือก่อนระยะคว่ำตัวของลูกกุ้ง (ชัยวุฒิ สุดทองคง. 2550: 293-301) กุ้งก้ามกรามที่โตเต็มวัยที่ป่วยเป็นโรคจะอ่อนแอ กินอาหารน้อยลง ลำตัวจะมีสีส้มและมีน้ำเลือดเป็นสีส้มเห็นได้ชัด ว่ายน้ำเฉื่อยชามักจะลอยหัวอยู่บริเวณขอบบ่อ และจะตายในที่สุด พบว่ากุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2-3 วันหลังจากที่พบว่ากุ้งก้ามกรามป่วยมีอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่น (ภาพประกอบ 3) (นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. 2548: 65-81)

(ก) (ข)

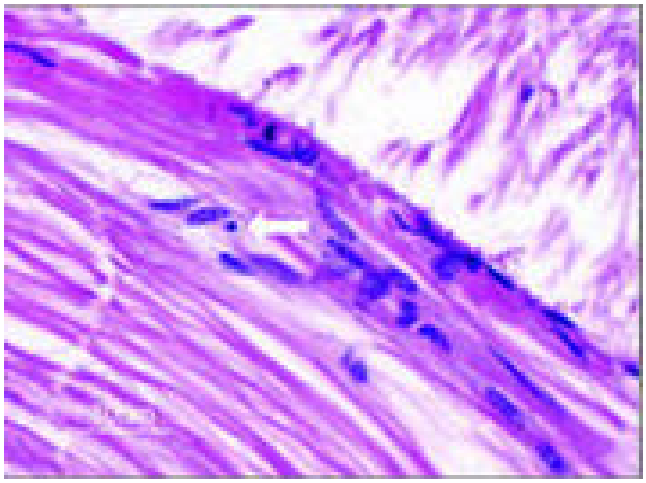


ภาพประกอบ 3 (ก) กุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่ป่วยที่ติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV กล้ามเนื้อมีลักษณะขุ่นขาวคล้ายสีของน้ำนม (ข) กุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยที่ป่วยบริเวณลำตัว รยางค์ จะมีสีแดงอมส้ม

ที่มา: (ก) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2010). *อุตสาหกรรมกุ้งไทย*. (ออนไลน์) (ข) Hameed, S. (2008). *White tail disease of Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture Division, Department of Zoology.

2.3 พยาธิสภาพของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ

*Mr*NV และ XSV จะมีการเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในบริเวณกล้ามเนื้อต่างๆ และส่วน cephalothoraxaes พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV พบการตายของกล้ามเนื้อลาย (striated muscle necrosis) ที่บริเวณส่วนหัว ส่วนท้อง ส่วนหาง และรยางค์ของลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ และมีการรวมตัวกันของเม็ดเลือด (haemocyte infiltration) ในหลายๆ ส่วนของกล้ามเนื้อ พบการเกิด inclusion bodies ที่ติดสีน้ำเงิน (basophilic inclusions) ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันตามเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ บางครั้งจะพบลักษณะการหดตัวอัดรวมกันแน่นของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) ภายในกลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อที่ตาย (ภาพประกอบ 4) (จักรพงศ์ นีละมนต์. 2549: 32)

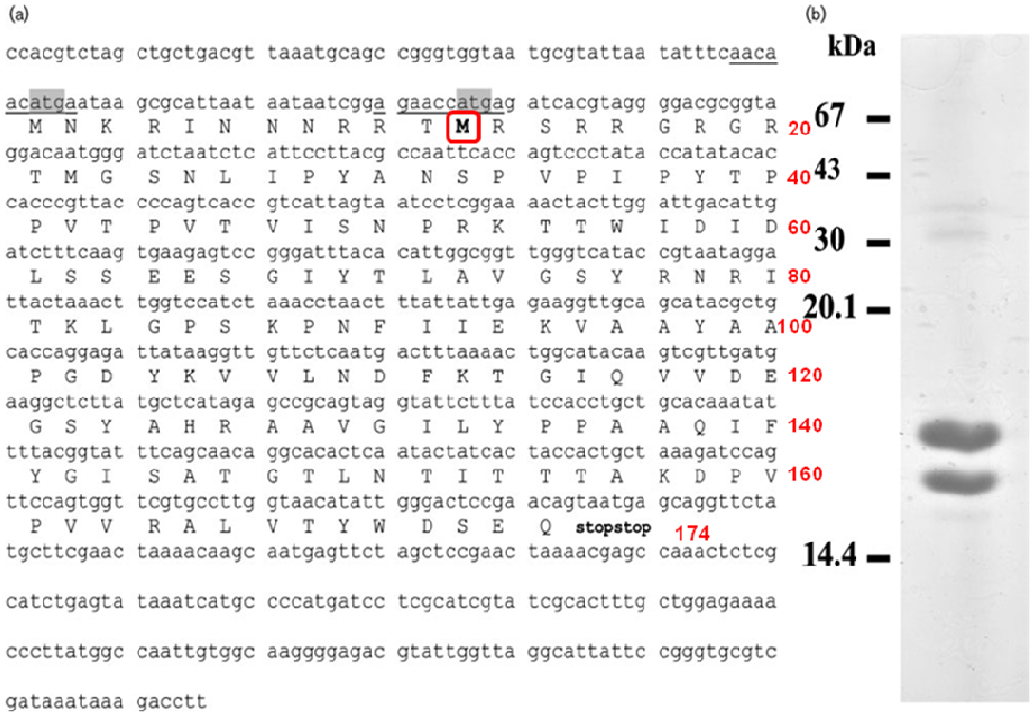


ภาพประกอบ 4 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อลายของแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม ที่ติดเชื้อไวรัส *Mr*NV และ XSV พบลักษณะการหดตัวอัดรวมกันแน่นของนิวเคลียส ภายในกลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อที่ตาย (ลูกศรชี้)

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2010). *อุตสาหกรรมกุ้งไทย*. (ออนไลน์).

3. ลักษณะการเรียงตัวของจีโนมของ XSV

การศึกษาลักษณะอนุภาคของไวรัส XSV พบว่ามีลักษณะรูปร่างเป็น icosahedral ไม่มี envelope เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA; ssRNA) ความยาวประมาณ 0.7 กิโลเบส (kb) เป็น monocistronic messenger ใน sense orientation และมี 1 open reading frame (ORF) โดยมี 2 stop codons ที่ถอดรหัสได้กรดอะมิโน 174 หน่วย เมื่อวิเคราะห์โปรตีนของอนุภาคไวรัส XSV ด้วย sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel eletrophorasis (SDS-PAGE) พบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 16 และ 17 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่ง CP17 ถูกแปลรหัสโดยลำดับกรดอะมิโนของยีน XSV ที่ประกอบด้วยMNKRINNNRRTMRSR เข้าคู่กันกับกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ปลาย N ของ CP16 คือ MRSR เพราะฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่า CP16 truncated จาก CP17 ซึ่งขาดกรดอะมิโน 11 ตัวแรกที่ปลาย N ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1 กิโลดาลตัน ปลาย N ของ CP16 จึงเป็น methionine (ภาพประกอบ 5) เนื่องจากไวรัส XSV มีขนาดที่เล็กมาก และไม่มี gene-encoding enzyme ที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ที่เป็นตัวช่วยในการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมซึ่งจำเป็นต่อการขยายพันธุ์จึงไม่สามารถติดเชื้อได้ด้วยตัวเอง จำเป็นต้องอาศัยร่วมกับไวรัสตัวอื่น จึงเรียกไวรัส XSV ว่าเป็น satellite virus โดยส่วนใหญ่จะตรวจพบการติดเชื้อ XSV ร่วมกับ *Mr*NV ที่ทำหน้าที่เป็น helper virus ซึ่งไวรัสทั้งสองต่างก็มีบทบาทในการก่อให้เกิดโรคหางขาว (Widada; & Bonami. 2004: 643-646)



ภาพประกอบ 5 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของจีโนม XSV (a) ลำดับเบสที่มีจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ CP17 กับ CP16 (b) การวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 15% gel พบว่าแคปซิดโปรตีนของ XSV มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 16 และ 17 กิโลดาลตัน

ที่มา: Widada, J. S.; & Bonomi, J-R. (2004). Characteristics of the monocistronic genome of extra small virus, a virus-like particle associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: possible candidate for a new species of satellite virus. *Journal of General Virology*. (85): p.64

4. การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ

4.1 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ XSV

ในปี 2003 ได้มีการศึกษาการถ่ายทอดการติดเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวา โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 นำกุ้งก้ามกรามมาเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อไวรัสที่สกัดจากกุ้งที่ติดเชื้อด้วย phosphate buffered saline (PBS) กลุ่มที่ 2 นำมาเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อไวรัสที่สกัดจากกุ้งที่ติดเชื้อด้วย chloroform และกลุ่มที่ 3 นำมาเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อไวรัสที่ให้ความร้อน พบว่ากุ้งที่ผ่านการแช่น้ำที่มีเชื้อไวรัสที่สกัดด้วย PBS ที่เจือจาง 1:50 และ 1:250 พบว่ากุ้งแสดงอาการกล้ามเนื้อขาวขุ่นและมีอัตราการตาย 43 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลุ่มของกุ้งที่ผ่านการแช่น้ำที่มีเชื้อไวรัสที่สกัดด้วย chloroform ทำให้กุ้งมีอัตราการตายที่สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ผ่านการแช่น้ำที่มีเชื้อไวรัสที่ให้ความร้อน มีอัตราการตายเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้ทำให้ทราบว่า chloroform มีความสามารถในการสกัดเชื้อจากเนื้อเยื่อกุ้งที่เป็นโรคจึงเพิ่มความรุนแรงของการทำให้เกิดโรค ส่วนความร้อนนั้นก็สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ (Qian; et al. 2003: 521-527)

ในปี 2006 ได้ศึกษาการติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV ในกุ้งทะเล 3 ชนิดคือ *Penaeus indicus*, *P. japonicas* และ *P. monodon* โดยการเหนี่ยวนำให้กุ้งติดเชื้อด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและให้กุ้งเหล่านี้กินกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่ติดเชื้อ จากนั้นทำการทดลองการติดเชื้อไวรัส *Mr*NV และ XSV โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้ออีกครั้งกับกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่ปกติด้วยการแช่ในสารละลายที่มีเชื้อไวรัสที่เตรียมจากเนื้อเยื่อบริเวณส่วนเหงือกและส่วนกล้ามเนื้อของกุ้งทะเลที่ได้ทำการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ พบว่ากุ้งก้ามกรามมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วันหลังจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ และให้ผลเป็นบวกของ *Mr*NV และ XSV ด้วยวิธี RT-PCR (Sudhakaran; et al. 2006: 136-141)

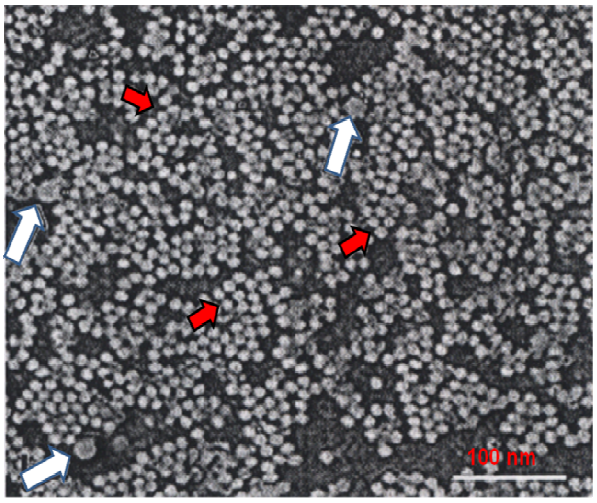
ในปี 2007 ได้มีการทดลองการถ่ายทอดเชื้อของ *Mr*NV และ XSV ในลักษณะ vertical transmission ที่เกิดจากการติดต่อผ่านทางแม่พันธุ์ที่เป็นพาหะสู่ลูกกุ้งก้ามกราม และอาร์ทีเมีย พบว่า แม่พันธุ์กุ้งที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อด้วยการกินและการแช่ในสารละลายที่มีเชื้อ *Mr*NV และ XSV สามารถอยู่รอดได้โดยที่ไม่แสดงลักษณะอาการของโรคหางขาว และมีการวางไข่ 5-7 วันหลังการแช่ในสารละลายที่มีเชื้อ ไข่มีการพัฒนาปกติ แต่อัตราการอยู่รอดจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ในระยะโพสต์ลาวาและสังเกตเห็นลักษณะอาการของโรคหางขาว โดยพบว่าเนื้อเยื่อรังไข่ (ovarian tissue) และไข่ที่ปฏิสนธิ (fertilized eggs) ให้ผลเป็นบวกของ *Mr*NV และ XSV เมื่อตรวจด้วยวิธี RT-PCR และกุ้งก้ามกรามระยะลาวา ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี nested RT-PCR ส่วนในอาร์ทีเมีย ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเช่นเดียวกับแม่พันธุ์กุ้ง พบว่า reproductive cysts และ nauplii ไม่พบการตายและไม่แสดงลักษณะอาการของโรคหางขาว เมื่อทดลองด้วยวิธี RT-PCR พบว่า reproductive cysts ให้ผลเป็นบวก และ nauplii ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี nested RT-PCR จากการทดลองการให้ nauplii ที่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อเป็นอาหาร

แก่กุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวา พบว่ากุ้งมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 9 วันหลังให้กิน nauplii ที่ติดเชื้อ และแสดงลักษณะอาการของการเกิดโรคหางขาว (Sudhakaran; et al. 2007: 27-35)

ในปี 2008 ได้มีการศึกษาแมลงน้ำ (aquatic insect) ชนิดต่างๆ ที่คาดว่าเป็นพาหะของ*Mr*NV และ XSV พบว่ามวนตะพาบน้ำ (*Belostoma* sp.), ตัวอ่อนแมลงปอ (*Aeshna* sp.), ตัวอ่อนด้วงดิ่ง (*Cybister* sp.) และ มวนกรรเชียง (*Notonecta* sp.) ให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี RT-PCR ในขณะที่มวนแมงป่องน้ำ (*Nepa* sp.) ให้ผลเป็นลบ ชี้ให้เห็นว่าแมลงน้ำอาจจะสามารถถ่ายทอดเชื้อ *Mr*NV และ XSV ให้แก่กุ้งก้ามกรามได้ (Sudhakaran; et al. 2008: 141-145)

4.2 การตรวจเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การตรวจเชื้อโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเป็นวิธีที่ช่วยในการยืนยันผลการตรวจการติดเชื้อร่วมกับวิธีอื่นๆ โดยการย้อมสี negative stain ในการเตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่แสดงลักษณะอาการโรคหางขาว พบอนุภาคไวรัสจำนวนมากที่ไม่มี envelope มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 26-27 นาโนเมตร เรียกว่า *Mr*NV ในขณะที่ไวรัสอีกชนิดหนึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 นาโนเมตร เรียกว่า XSV รวมตัวกันมีลักษณะโครงสร้างเป็น crystalline ในบางเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพประกอบ 6) (Qian; et al. 2003: 521-527)



ภาพประกอบ 6 อนุภาคไวรัส *Mr*NV และ XSV ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านลักษณะอนุภาคเป็น icosahedral ไม่พบ envelope โดยอนุภาคไวรัส *Mr*NV มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 23 นาโนเมตร (ลูกศรสีขาว) ส่วนอนุภาคไวรัส XSV มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 นาโนเมตร (ลูกศรสีแดง)

ที่มา: Zhang, H.; et al. (2006). Quantiative relationship of two viruses (*Mr*NV and XSV) in white-tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (71): p.14

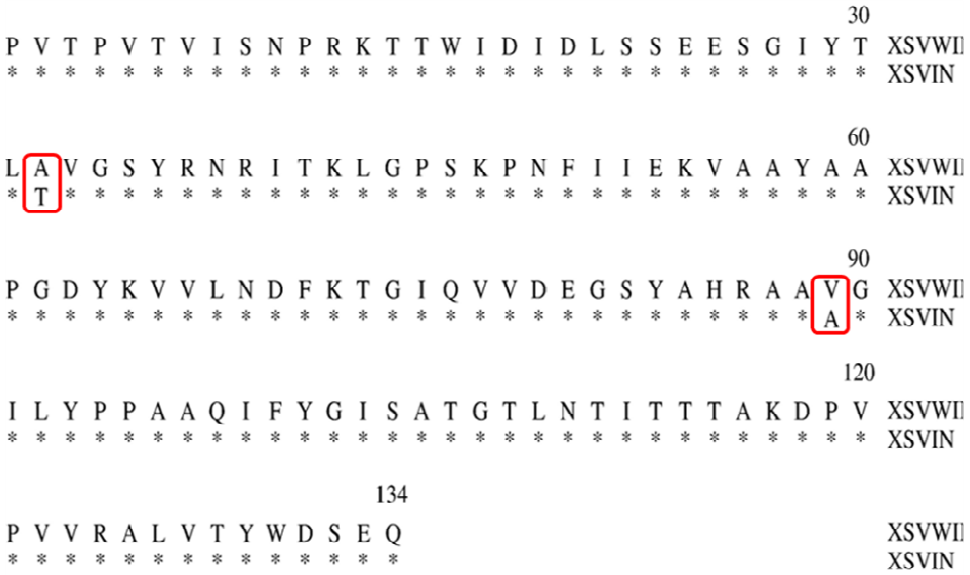
4.3 การตรวจเชื้อโดยวิธีทางด้านชีววิทยาโมเลกุล

ในปี 2004 ได้มีการนำกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวา, ชิ้นส่วนอวัยวะต่างๆ และเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามที่โตเต็มวัยที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ในประเทศอินเดีย นำมาใช้สกัดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบของ *Mr*NV และ XSV โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาจากงานวิจัยของ Widada และคนอื่นๆ (2003 และ 2004) ซึ่งให้ผลผลิต PCR ขนาด 850 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าในตัวอย่างส่วนใหญ่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ *Mr*NV และ XSV แต่ยังมีตัวอย่างอีก 2-3 ตัวอย่างจาก Chennai ที่ให้ผลเป็นบวกกับ XSV แต่ให้ผลเป็นลบกับ *Mr*NV ส่วนไพร์เมอร์คู่ที่ 2 และไพร์เมอร์คู่ที่ 3 กับ 4 ออกแบบจากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no. AY222839 และ AY222840 ตามลำดับ) ให้ผลผลิต PCR ขนาด 590 , 681 และ 425 คู่เบส ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความไวในการตรวจเชื้อของไพร์เมอร์ทั้ง 4 ของ *Mr*NV พบว่าไพร์เมอร์คู่ที่ 2 และ 4 สามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับปริมาณ 0.25 เฟมโตกรัมของอาร์เอ็นเอ ในขณะที่ไพร์เมอร์คู่ที่ 1 และ 3 สามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับปริมาณ 25 เฟมโตกรัมของอาร์เอ็นเอ (Hameed; et al. 2004: 127-133)

ในปี 2005 ได้มีการพัฒนาการตรวจเชื้อ *Mr*NV และ XSV พร้อมกันด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR โดยนำกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่แสดงลักษณะอาการกล้ามเนื้อส่วนท้องขาวขุ่นโดยเก็บตัวอย่างจากโรงเพาะฟักใกล้บริเวณ Nellore, Vijayawada, Andhra Pradesh, Chennai, Tamil Nadu ประเทศอินเดีย และนำชิ้นส่วนอวัยวะต่างๆ ของกุ้งก้ามกรามที่โตเต็มวัยที่ทำการฉีดเชื้อ *Mr*NV และ XSV ได้แก่บริเวณเหงือก ตับ หัวใจ กระเพาะอาหาร ลำไส้ แพนหาง เม็ดเลือด ก้านตา กล้ามเนื้อบริเวณส่วนหัว ลำตัว และหาง มาใช้สกัดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยออกแบบไพร์เมอร์แคปซิดโปรตีนของ *Mr*NV RNA 2 จากฐานข้อมูลของ GenBank acc no. AY222840) (Widada; et al. 2003; Hameed; et al. 2004) และ XSV (Widada; et al. 2004) ซึ่งให้ผลผลิต PCR ขนาด 681 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ พบว่าสามารถตรวจสอบตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV ได้ แต่ไม่พบการติดเชื้อบริเวณส่วนของตับและก้านตาของกุ้ง ส่วนตัวอย่างที่เก็บจาก Chennai นั่นให้ผลเป็นบวกเฉพาะ XSV เท่านั้น และสามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับปริมาณ 25 เฟมโตกรัมของอาร์เอ็นเอ เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบเชื้อได้พร้อมกันทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าวิธี RT-PCR (Yoganandhan; et al. 2005: 65-69)

ในปี 2006 ได้มีการตรวจเชื้อ *Mr*NV และ XSV ด้วยวิธี multiplex RT-PCR เช่นเดียวกัน โดยออกแบบไพร์เมอร์แคปซิดโปรตีนของ *Mr*NV (RNA 2) และ XSV จากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no.AY222840 และ AY247793 ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลผลิต PCR ขนาด 1,136 และ 447 คู่เบส

ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี multiplex RT-PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ *Mr*NV และ XSV ได้ในตัวอย่างกุ้งที่มีการติดเชื้อที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ในประเทศอินเดีย และสามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับปริมาณ 1 เฟมโตกรัมของอาร์เอ็นเอ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนยีน *Mr*NV นั้นไม่แตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no. AM114036) แต่สำหรับลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนยีน XSV พบตำแหน่งที่แตกต่างกัน 10 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no.AM114037) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 72 และ 129 ของแคปซิดโปรตีน จากที่เป็น Alanine และ Valine นั้นถูกแทนที่ด้วย Threonine และ Alanine ตามลำดับ (ภาพประกอบ 7) (Tripathy; et al. 2006: 134-139)



ภาพประกอบ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนต่างๆ ที่มีความยาว 402 นิวคลีโอไทด์ของแคปซิดโปรตีนยีน XSV โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง XSVWI กับ XSVIN จากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no. AY247793 และ AM114037 ตามลำดับ)

ที่มา: Tripathy, S.; et al. (2006). Multiplex RT-PCR detection and sequence comparison of viruses *Mr*NV and XSV associated with white tail disease disease in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. (258): p.137

ถึงแม้การตรวจสอบการติดเชื้อ XSV โดยการทำ RT-PCR เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบไวรัสได้แม้มีปริมาณน้อย แต่ไม่สามารถที่จะตรวจสอบหาปริมาณการติดเชื้อ XSV ระยะแรกได้และไม่สามารถแสดงผลการตรวจสอบผลผลิตของ PCR ได้ทันที จึงได้มีการพัฒนาวิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ในการตรวจเชื้อ *Mr*NV และ XSV โดยใช้ *Taq*Man probes และออกแบบไพร์เมอร์จาก RNA polymerase gene (RNA-1) ของไวรัส *Mr*NV และแคปซิดโปรตีนยีนของ XSV (GenBank acc no. AY231436 และ DQ174318 ตามลำดับ) และออกแบบไพร์เมอร์ของ 18S rRNA จาก *Macrobrachium rosenbergii* 18S rRNA (GenBank acc no.AY461599) ซึ่งให้ ผลผลิต PCR ขนาด 75, 69 และ 213 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจสอบกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาจากโรงเพาะฟักใน Wuhan ประเทศจีน ที่ติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV ซึ่งนำมากระตุ้นการติดเชื้อด้วยไวรัสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิด โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีปริมาณ *Mr*NV 3.49 x 10^{13} กับ XSV 9.82 x 10^{11} ml^{-1} (*Mr*NV:XSV = 36:1) กลุ่มที่ 2 มีปริมาณ *Mr*NV 1.75 x 10^{13} กับ XSV 2.23 x 10^{12} ml^{-1}(*Mr*NV:XSV = 8:1) และกลุ่มที่ 3 มีปริมาณ *Mr*NV 4.20 x 10^{9} กับ XSV 3.48 x 10^{12} ml^{-1} (*Mr*NV:XSV = 1:830) พบว่าจำนวนจีโนมของไวรัสทั้งสองชนิดที่ตรวจได้ในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ และในการเปรียบเทียบจำนวนจีโนมของ *Mr*NV ในกลุ่มที่ 2 ระหว่างกุ้งที่แสดงลักษณะอาการของโรคหางขาว มีค่าเท่ากับ 6.1 x 10^{7} ซึ่งมากกว่าประมาณ 10 เท่าของกุ้งที่ไม่แสดงอาการ ส่วน XSV มีจำนวนจีโนมของไวรัสในกุ้งที่แสดงลักษณะอาการของโรคหางขาว มีค่าเท่ากับ 9.7 x 10^{9} ในขณะที่กุ้งที่ไม่แสดงอาการมีค่าเท่ากับ 6.9 x 10^{8} มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Zhang; et al. 2006: 11-17)

ต่อมาได้มีการพัฒนาการตรวจเชื้อ *Mr*NV และ XSV ด้วยวิธี Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลิอิก โดยการใช้ *Bst* DNA polymerase large fragment โดยออกแบบไพร์เมอร์ของ *Mr*NV 2 คู่ และ XSV 1 คู่ จากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no. AY222839, AY222840 และ AY247793 ตามลำดับ) ซึ่งแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยไพร์เมอร์ 4 ไพร์เมอร์ ที่มี 2 outer primers และ 2 inner primers ที่มีความจำเพาะกับ 6 บริเวณบนดีเอ็นเอต้นแบบ และมีการเพิ่มไพร์เมอร์อีก 1 คู่ คือ loop primers มาช่วยในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้มีความจำเพาะมากขึ้น พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิต คือ 63 องศาเซลเซียส ที่เวลา 60-90 นาที สำหรับการตรวจการติดเชื้อ *Mr*NV ด้วย set I primer และ XSV ด้วย set II primer ที่มีการเพิ่ม loop primers โดยทำการยืนยันด้วยการนำผลผลิตของ RT-LAMP มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ FIP (Forward Inner Primer) และ BIP (Backward Inner Primer) จากนั้นโคลนเข้าสู่ PCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen Life Technologies) และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการเปรียบเทียบความไวระหว่างวิธี RT-LAMP และวิธี RT-PCR พบว่าวิธี RT-LAMP ของ *Mr*NV ที่ไม่มี loop primers มีความไวมากกว่าวิธี RT-PCR เพียง 10 เท่า ในขณะที่วิธี RT-LAMP ของ XSV ที่ไม่มี loop primers จะมี

ความไวที่ใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR แต่เมื่อเติม loop primers ทำให้วิธี RT-LAMP ของ XSV มีความไวเพิ่มมากถึง 10,000 เท่าของวิธี RT-PCR (Pillai; Bonami; & Widada. 2006: 275-283)

ในปี 2007 ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง(cell culture inoculation) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของไวรัสและกลไกการก่อให้เกิดการติดเชื้อในกุ้ง แต่เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยงจากกุ้ง (shrimp cell line) สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส จึงทำให้มีการเพาะเลี้ยงไวรัสใน mosquito cell line (C6/36) สำหรับใช้เพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส *Mr*NV และ XSV ซึ่งทำการยืนยันผลด้วยวิธี RT-PCR, การย้อมสี acridine orange และการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบช่องว่าง (vacuolation) เป็นจำนวนมากและพบอนุภาคไวรัสกระจายอยู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า ribonucleic acid (RNA) ติดสีย้อม acridine orange ในไซโตพลาสซึม สำหรับการศึกษาการติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวา พบว่ากุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายที่มีเชื้อไวรัสซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ (C6/36) ที่ติดเชื้อ พบว่ากุ้งจะมีอาการเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร กล้ามเนื้อบริเวณลำตัวมีสีขาวขุ่น และมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังการติดเชื้อได้ 6 วัน (Sudhakaran; Parameswaran; & Hameed. 2007: 112-118)

4. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและจีโนมของเชื้อ XSV

การศึกษาจีโนมของเชื้อ XSV ที่แยกจากกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวา ที่แสดงลักษณะอาการของการเกิดโรคหางขาวใน Kaohsiung และ Pington ทางใต้ของประเทศไต้หวัน โดยใช้ไพร์เมอร์ XSV-1 และ XSV-772 ที่ออกแบบจากฐานข้อมูลของ GenBank (acc no. AY247793) สำหรับตรวจเชื้อ XSV ซึ่งให้ผลผลิตของ PCR ขนาด 772 คู่เบส จากการศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของ XSV มี unique ORF 522 นิวคลีโอไทด์ และสามารถแปลรหัสโครงสร้างโปรตีนได้กรดอะมิโน 174 หน่วย จากการใช้โปรแกรม Blast เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนแต่ละคู่ของไวรัสจากกุ้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไต้หวันกับประเทศจีนและประเทศอินเดียมีความเหมือน (identity) 98 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Clustal W นั้นให้ผลเหมือนกับโปรแกรม Blast (Wang; et al. 2007:127-132) จากรายงานในปี 2006 ของ Yoganandhan และคนอื่นๆ ได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส XSV ที่แยกได้จากกุ้งในประเทศไทยที่มีขนาด 490 คู่เบส นั้นมีความเหมือนกับไวรัสที่แยกได้จากประเทศอินเดียถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไวรัส XSV ในประเทศไต้หวันมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสกุ้งจากประเทศจีนและประเทศอินเดียสูง และพบว่ามีบริเวณที่ต่างกันของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 139 จาก Isoleucine (I) เปลี่ยนเป็น Methionine (M) ของไวรัสกุ้งจากประเทศจีน และไวรัสกุ้งจากประเทศอินเดียมี 4 ตำแหน่งที่มีแตกต่างกัน คือ ตำแหน่ง 49 ที่ Serine (S) เปลี่ยนเป็น Glycine (G), 72 ที่ Alanine (A) เปลี่ยนเป็น Threonine (T), 129 ที่ Valine (V) เปลี่ยนเป็น Alanine (A) และ 139 ที่ Isoleucine (I) เปลี่ยนเป็น Methionine (M)

ทำให้ทราบว่าไวรัสกุ้งที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสกุ้งจากประเทศจีนมากกว่าจากประเทศอินเดีย (ภาพประกอบที่ 8)

จากการศึกษาจีโนมของเชื้อ XSV และ *Mr*NV ที่แยกได้จากกล้ามเนื้อส่วนหางของกุ้งก้ามกรามที่แสดงอาการของโรคหางขาวจากแม่น้ำ Flinders ทางตะวันตกของประเทศออสเตรเลีย และการใช้โปรแกรม Blast พบว่ามีบริเวณของไวรัสที่คล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mr*NV จากประเทศฝรั่งเศสและประเทศจีน ที่มีผลผลิต PCR ขนาด 861 คู่เบส ที่ออกแบบจากแคปซิดโปรตีนยีนของไวรัส *Mr*NV (RNA-2) ของ Widada; et al. (2003) เท่ากับ 91.0 และ 90.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีบริเวณของไวรัสที่คล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mr*NV จากประเทศฝรั่งเศสและบางบริเวณของจีโนมจากประเทศอินเดีย ที่มีผลผลิต PCR ขนาด 682 คู่เบส ที่ออกแบบจาก RNA polymerase gene (RNA-1) ของไวรัส *Mr*NV ของ Yoganandhan; et al. (2003) เท่ากับ 95.6 และ 95.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีบริเวณของไวรัสที่คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส XSV จากประเทศไทย ที่มีผลผลิต PCR ขนาด 508 คู่เบส ที่ออกแบบจากแคปซิดโปรตีนยีนของ Widada; et al. (2004) เท่ากับ 99.4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ทราบว่าไวรัส *Mr*NV ที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลียมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสที่แยกได้จากประเทศจีน (Owens; et al. 2009: 175-180)

ภาพประกอบ 8 Phylogenetic analysis ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ XSV genome พบว่าไวรัสกุ้งที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสกุ้งจากประเทศจีนมากกว่าจากประเทศอินเดีย

ที่มา: Wang, C.S.; et al. (2007). RT-PCR amplification and sequence analysis of extra small virus associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases.* (30): p 131.

5. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody : MAb)

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ลิมโฟซัยท์ชนิด B (B cell) จำนวนมากจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และมีการพัฒนาต่อไปจนกระทั่งทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ลิมโฟซัยท์ชนิด B แต่ละเซลล์จะผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันไป แอนติบอดีเหล่านี้เรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เพราะว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมามีความจำเพาะต่ออิพิโทป (epitope) ต่างๆ ที่อยู่บนผิวของแอนติเจนได้ในเวลาเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามโมโนโคลนอลของเซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) ที่ผลิตได้ทั้งหมดนี้จะมีความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนเพียงอิพิโทปเดียวเหมือนๆกัน (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ; และคนอื่นๆ. 2537)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คิดค้นโดย G.kohler และ C.Milstein ในช่วงกลางปี 1970 จากผลงานดังกล่าวทำให้ทั้งสองท่านได้รับรางวัลโนเบลสาขาการแพทย์ในปี 1984 สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นทำได้โดยฉีดแอนติเจนที่สนใจเข้าไปในหนู จากนั้นนำลิมโฟซัยท์ชนิด B จากม้ามของหนูที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจน มาผสมกับ myeloma cell (malignant B cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด นำเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาหลอมรวมกันได้เซลล์ใหม่เรียกว่า เซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma cell)

ไฮบริโดมามีคุณสมบัติของเซลล์ myeloma cell คือสามารถแบ่งตัวและเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีวันตาย ขณะเดียวกันคุณสมบัติของเซลล์ม้าม ทำให้ไฮบริโดมาสามารถหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนเพียงชนิดเดียวซึ่งเรียกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี การหลอมรวม myeloma cell กับ ลิมโฟซัยท์ชนิด B จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการใช้พอลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่ การใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ myeloma cell ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่าง myeloma cell กับลิมโฟซัยท์ชนิด B เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอดเพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากลิมโฟซัยท์ชนิด B ส่วนลิมโฟซัยท์ชนิด B ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

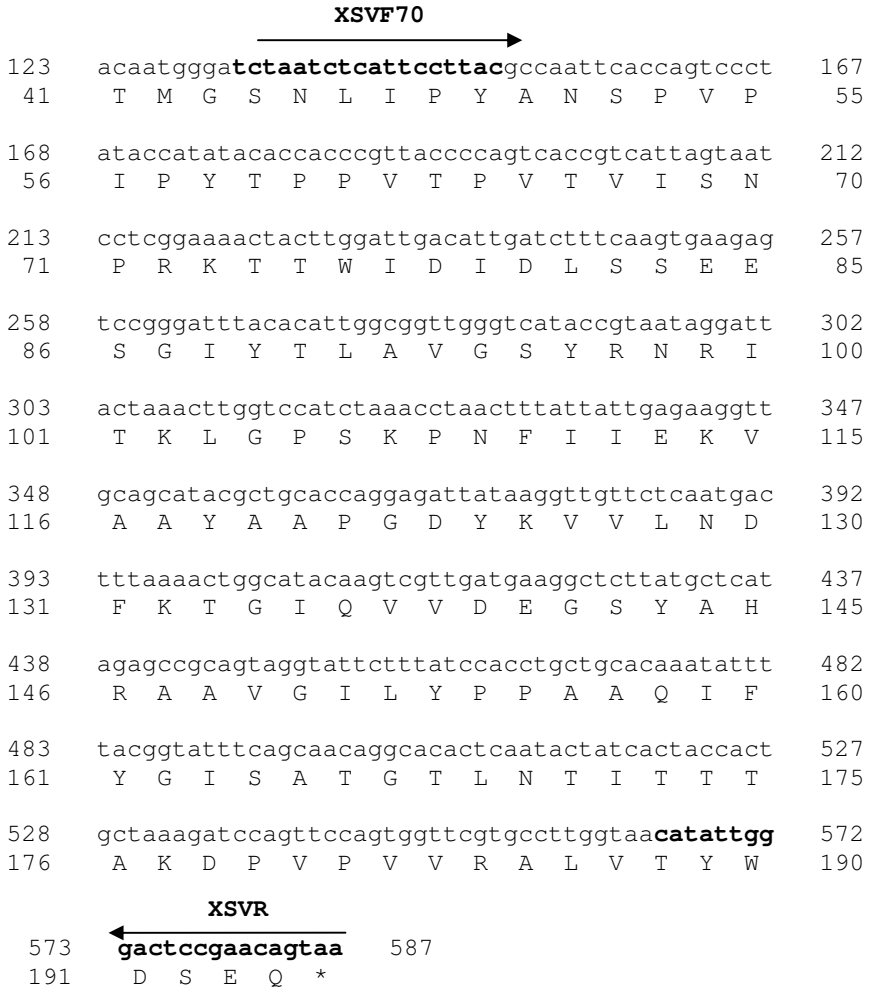
การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig^-) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีน

ของเซลล์ม้ามและ myeloma cell เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันรูปแบบต่างๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

ไฮบริโดมามากมายหลายชนิดสามารถผลิตขึ้นได้โดยวิธีการเดียวกันนี้ ถ้าหากต้องการแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งก็สามารถทำการผลิตและทดสอบเพื่อหาไฮบริโดมาที่ต้องการจากนั้นก็ทำการเพิ่มจำนวน, คัดเลือกและทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

ถึงแม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกในปี 1975 และสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์หลายๆ ด้านโดยเฉพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคและการบำบัดโรค การตรวจวินิจฉัยโรคในหลายๆ กรณีได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างได้ผล โดยทั่วๆไปวิธีการเหล่านี้มีความไวและมีความแม่นยำมากกว่าวิธีการที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของ XSV นี้จึงเป็นประโยชน์ในการนำลำดับดีเอ็นเอของยีนแคปซิดโปรตีนมาโคลนและแสดงออกเพื่อใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของเชื้อ XSV เป็นแอนติเจนในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียว จึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมแก่การตรวจวินิจฉัยกุ้งที่ติดเชื้อ XSV นอกจากนี้การใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อจากกุ้งที่ติดเชื้อจึงสามารถใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ จึงได้มีการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างแคปซิดโปรตีนของ XSV โดยออกแบบไพร์เมอร์ที่มีบริเวณ ตัดจำเพาะ (restriction site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal*I (ภาพประกอบ 9) เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัส สำหรับสร้างแคปซิดโปรตีนของ XSV โดยไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ XSV ให้ผลผลิต PCR ขนาด 471 คู่เบส จากนั้นโคลนยีนแคปซิดโปรตีนของ XSV ที่บริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal*I เข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ทำการคัดเลือกโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21



ภาพประกอบ 9 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน XSV โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ในการออกแบบสำหรับสร้างไพร์เมอร์ โดยเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (CGGGATCC) และ *Sal*I (CGTCGAC) ที่ปลาย 5' ของไพร์เมอร์ XSV70F และ XSVR ตามลำดับ (Genbank accession no: AY247793)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พลาสมิด

พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV ที่มียีนของแคปซิดโปรตีนของ XSV ซึ่งภายหลังการกระตุ้นการแสดงออกจะได้โปรตีน glutathione-S-transferase (GST-XSV) ได้รับการอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พลาสมิด pET15b-XSV ที่มียีนของแคปซิดโปรตีน ของ XSV ซึ่งภายหลังการกระตุ้นการแสดงออกจะได้โปรตีน 6xHis-XSV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง มหาวิทยาลัยมหิดล

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หนูขาว (Swiss mice) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

2.2 กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ที่ติดเชื้อ *Mr*NV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง มหาวิทยาลัยมหิดล

2.3 homogenate ของ PL ที่ติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV

3. แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

3.2 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (LB broth)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar)

4. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง elctrophoresis apparatus และ อุปกรณ์	Bio-Rad.,U.S.A.
2. ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad.,U.S.A.
3. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad.,U.S.A.
4. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
5. เครื่องผสมสาร (vortex mixter) รุ่น G560E	Scientific Industries, Inc.,Switzerland
6. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinate)	NUAIRE.,U.S.A.
7. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO_2 incubator)	NUAIRE.,U.S.A.
8. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JANWAY
9. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135	LEICA
10. แท่งอุ่นสไลด์ (Slide warmer)	Medax
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
12. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70	Olympus

5. เคมีภัณฑ์

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

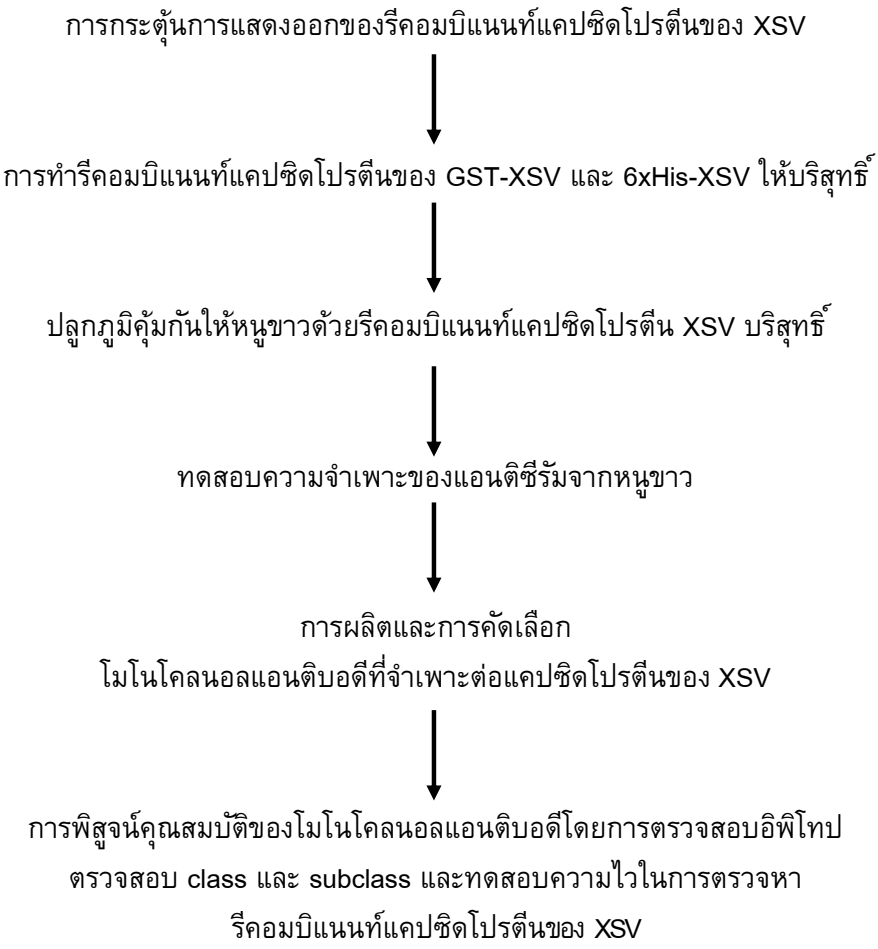
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ	New England Biolab, Promega
2. pGEX-6P-1 expression vector	Amersham
3. ยาปฏิชีวนะ (Ampicillin และ Kanamycin)	Sigma.,U.S.A.
4. Fetal bovine serum	Starrate.,Australia
5. Polyethylene glycol (PEG)	Sigma.,U.S.A.
6. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma.,U.S.A.
7. Hypoxanthine	Gibco.,U.S.A.
8. Aminopterin	Sigma.,U.S.A.
9. Nitrocellulose membrane	Sigma.,U.S.A.
10. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
11. Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad.,U.S.A.
12. Calf bovine serum	Starrate.,Australia
13. D-glucose	Gibco.,U.S.A.
14. L-glutamine	Gibco.,U.S.A.
15. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$)	Sigma.,U.S.A.
16. $NaHCO_3$	Amresco
17. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	Amresco
18. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$)	Gibco.,U.S.A.
19. HT supplement	Gibco.,U.S.A.
20. Acrylamide	Bio-Rad.,U.S.A.
21. Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	Bio-Rad.,U.S.A.
22. Tris (hydroxymetryl) aminomethane	Bio-Rad.,U.S.A.
23. SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Bio-Rad.,U.S.A.
24. Ammonium persulfate	Bio-Rad.,U.S.A.
25. SDS molecular weight markers	Sigma.,U.S.A.

ตาราง 2 (ต่อ)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
26. เอทิลแอลกอฮอล์(ethyl alcohol)70%,80%,90%,95%	BDH
27. N-butyl alcohol	Univar
28. ไซลีน (Xylene)	Carlo Erba
29. Formaldehyde	Carlo Erba
30. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) 0.15M pH 7.2	ดูภาคผนวก
31. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10)	ดูภาคผนวก
32. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)	Sigma.,U.S.A.
33. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide)	Sigma.,U.S.A.
34. สีอีโอซิน (Eosin Y) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95%	Harleco (ภาคผนวก)
35. ฮีมาทอกไซลีน (haematoxylin)	Harleco (ภาคผนวก)
40. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (paraplast plus paraffin)	Sherwood
41. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution)	DIFCO (ภาคผนวก)
42. Davidson’s fixative	ดูภาคผนวก
36. Permount	Ficther Scientific

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้



1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-XSV และ 6xHis-XSV โดยนำแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1-XSV หรือที่มีพลาสมิด pET15b-XSV มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรผสมอยู่) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาทีข้ามคืน จากนั้นแบ่งแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรและมี ampicilin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที วัดความขุ่นของเชื้อ (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนมีค่าประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้นโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำแบคทีเรียไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที เทน้ำเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้ง จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติมบัฟเฟอร์ B (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

2. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาผสมกับบัฟเฟอร์ 2X SDS-treatment ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งจะผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 กิโลดาลตัน เป็น positive control (เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่) และแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด เป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV เทียบกับโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

3. การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ให้บริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV และ 6xHis-XSV ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาแยกโดยใช้ 12% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 แล้วแช่เจล ใน 0.3M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที ตัดแถบที่เป็นรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV นำไปแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน แล้วนำเจลใส่ถุง dialysis ก่อนที่จะไปผ่านกระแสไฟฟ้าใน Towbin buffer ที่ 50

โวลต์ อย่างน้อย 8 ชั่วโมงเพื่อดึงโปรตีนออกจากเจล เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis อันใหม่ แล้วแช่ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่องSpeed-Vac (Savant) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี (วารุณี หะยีมะสาและ,2552:23-24)

4. การตรวจการติดเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ด้วยวิธี RT-PCR

4.1 การเตรียม RNA ของ XSV

นำขาว่ายน้ำหรือเนื้อเยื่อส่วนลำตัวของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV มาบดใน lysis buffer นำสารละลายที่บดได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรมาสกัด RNA โดยใช้ high pure viral nucleic acid kit (Roche Molecular Biochemicals) ตามขั้นตอนต่างๆ ที่ระบุไว้ในคู่มือ RNA ที่ได้จะเป็นสารละลายใน elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจสอบการติดเชื้อ XSV ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจการติดเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี RT-PCR ทำโดยการสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มจำนวนยีนของ XSV โดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase และ *Taq* DNA polymerase ตามลำดับ โดยผสมสารต่างๆ (ตาราง 3) ใส่ลงในหลอด thin wall ขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนของ XSV (ตาราง 4)

Primer ที่ใช้มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer (XSVF 70): 5'-CGGGATCCTCTAATCTCATTCCTTAC-3'

Reverse primer (XSVR) : 5'-CGTCGACTTACTGTTCGGAGTCCCAATATG-3'

ตาราง 3 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR

ส่วนผสมของ RT-PCR reaction	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกราม	5
RT/Platinum®*Taq* Mix	1
2X Reaction Mix (0.4mM dNTP, 2.4mM $MgSO_4$)	25
XSVF 70 primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
XSVR primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Deionized Water	17
ปริมาณสุทธิ	50

ตาราง 4 ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลา สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนของ XSV โดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase และ *Taq* DNA polymerase ด้วยวิธี RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
1. cDNA synthesis	50	30.00	
2. pre-denaturation	95	5.00	ทำซ้ำขั้นตอนที่
3. denaturation	95	1.00	(3)-(5)
4. annealing	55	00.45	เป็นจำนวน 34 รอบ
5. extension	72	00.40	
6. final extension	72	15.00	

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิตของ RT-PCR มีขนาด 471 คู่เบส

5. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV

5.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน GST-XSV และ 6xHis-XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 เช่นกัน จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จำนวน 4 ตัว ตัวละ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทุกๆ 2 สัปดาห์ฉีดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV และ 6xHis-XSV ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ทำการเก็บซีรัมหนูแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV และ 6xHis-XSV โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ XSV โดยวิธี immunohistochemistry เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV และ 6xHis-XSV ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี 1979 (Mosmann; Bauman; & Williamson. 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ pGEX-6P-1-XSV และ pET15b-XSV ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell เป็น fusion parther โดยฆ่าหนู ผ่าตัดม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ 40% polyethylene glycol (PEG) หลังจากนั้นนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ (selective medium - HAT medium)ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal bovine serum ใน RPMI medium และมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plates บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่างๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมา ไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry โคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อ XSV จะนำมา reclone ด้วยวิธี limited dilution เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์เดี่ยวๆ จริง และทดสอบ ด้วยวิธี dot blotting จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ในปริมาณตามที่ต้องการและเก็บเซลล์แช่ใน

ไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะเก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป และตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี sandwich ELISA (วารุณี หะยีมะสาและ. 2552:25)

5.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

การคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ XSV ในขั้นตอนแรกนั้นเนื่องจากการผลิตไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plates ทำให้ได้ไฮบริโดมาจำนวนมาก ทำโดยวิธี dot blotting ก่อน จากนั้นนำโคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting ในขั้นที่ 1 มาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry ต่อไป (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้พลาสมิด pGEX-6P-1 ในการผลิตโปรตีนทำให้ได้โปรตีนลูกผสมของ GST จากพลาสมิดกับโปรตีนที่ต้องการ ดังนั้นในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting จึงต้องหยด lysate ของโปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 สองส่วนคือ (1) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV โดยผสมกันระหว่าง GST-XSV กับ 6xHis-XSV, (2) lysate ของ *E.coli* ที่มี เฉพาะ GST ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV เท่านั้น อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที นำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto = 1% non fat dry milk 0.1% tritonX 100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP ; Biorad) เจือจาง 1:1,500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase โดยบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV แต่ไม่จำเพาะต่อ GST นำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และ immunohistochemistry ต่อไป

5.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี dot blotting, SDS-PAGE, Western blotting และ immunohistochemistry

5.3.2.1 วิธี dot blotting

การคัดเลือกในขั้นตอนนี้จะคล้ายคลึงกับในขั้นตอนที่ 1 โดยจะแตกต่างที่การหยด lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV จะทำการหยดแยกกันในแต่ละส่วนคือ GST-XSV กับ 6xHis-XSV และหยดสารสกัดจากเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติเพิ่ม จากนั้นนำไปบ่มกับน้ำเลี้ยงเซลล์ และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV และเชื้อ XSV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ แต่ไม่จำเพาะต่อ GST และเนื้อเยื่อกุ้งปกติ

5.3.2.2 วิธี SDS-PAGE และ Western blotting

นำ lysate ของโปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 3 ชนิด คือ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มี GST-XSV, 6xHis-XSV, GST และสารสกัดจากเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV มาแยกบน 12% SDS-PAGE ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของเจลนำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจล ลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus (Biorad) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:10 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

5.3.2.3 วิธี Immunohistochemistry

นำตัวอย่างกุ้งก้ามกรามระยะโพสต์ลาวาที่ปกติและที่ติดเชื้อ XSV มาแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งเพื่อกำจัด fixative ออก แล้วนำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และไซลีน ตามลำดับ และนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินแล้วนำไปอบที่ตู้อบ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene (deparaffination) แล้วนำมาผ่าน butanol และแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากมากไปน้อย ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่นและ PBS และ block ด้วยสารละลาย P_1^+ (calf bovine

serum เข้มข้น 10% ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 ในสารละลาย P_1^+ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin Y (H & E) ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากน้อยไปมาก และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายของกุ้งที่ติดเชื้อ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

5.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ XSV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ขั้นจะนำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar. 1985: 1-42) โดยนำเซลล์ไฮบริโดมามากระจายในหลุมโดยใช้ปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง หยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 ไมโครลิตร ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ โดยนำไปตรวจดูภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นเติม HT RPMI medium ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, 1% เม็ดเลือดแดง) ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน 96 wells microculture plate ใน 48 หลุมแรก (แถว 1-6) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม medium เพิ่มในจานเลี้ยงเชื้ออีก 2.5 มิลลิลิตร แล้วดูดลงใน 48 หลุมหลัง (แถว 7-12) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มใน CO_2 incubator ประมาณ 10-12 วัน ตรวจสอบหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายใต้กล้อง inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี dot blotting และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์

5.5 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum กระจายและดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอด ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกจากเซลล์ไฮบริโดมาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป จากนั้นเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12% (DMSO) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดสำหรับเซลล์แช่แข็ง (cryopreservation tube) เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

6. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการโคลนซ้ำไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA การตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ด้วยวิธี dot blotting ดังต่อไปนี้

6.1 การตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

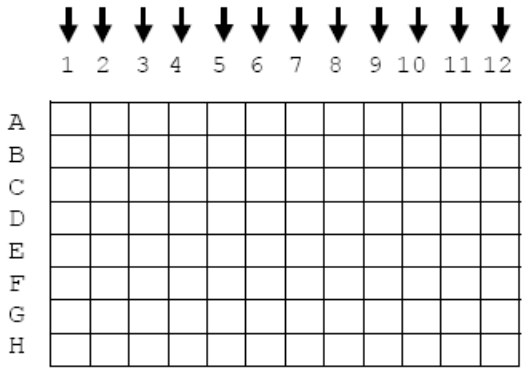
ทำการเคลือบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 0.5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่างๆ ของ 96 wells microculture plate ดังตัวอย่างตามภาพประกอบ 10 จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto จากนั้นเติม GAM–HRP เจือจาง 1:1,500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N H_2SO_4 ลงในทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader (อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. 2548:24)

MAbs	1 XSV1	2 XSV19E	3 XSV19G	4 XSV17	5 XSV10	6 XSV8
1 XSV1	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6
2 XSV19E		2+2	2+3	2+4	2+5	2+6
3 XSV19G			3+3	3+4	3+5	3+6
4 XSV17				4+4	4+5	4+6
5 XSV10					5+5	5+6
6 XSV8						6+6

ภาพประกอบ 10 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ)

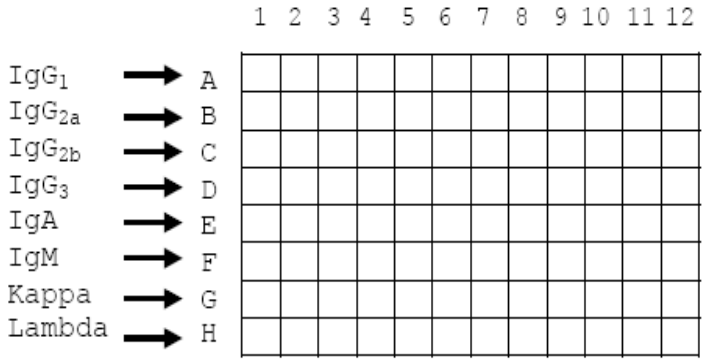
6.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) ดังนี้ ทำการเคลือบก้นหลุม 96 wells microculture plate ด้วย goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1 : 20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA ซึ่งลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 โดย 1 คอลัมน์ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 โคลน

เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1 : 50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 12) จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม HRP-goat anti-rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1 : 1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ 10 นาที และผ่านกระบวนการ immunoperoxidase เช่นเดียวกับข้อ 5.1



ภาพประกอบ 12 การเติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถวตั้งแต่ แถว A-H (ลูกศร) เพื่อใช้ในการจัดจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากและโคลนของไฮบริโดมา

6.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV และสารสกัดของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ โดยนำมาเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน โดยเจือจาง 1:10 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูระดับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

6.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ *Mr*NV, WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV ด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ *Mr*NV, WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV มาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ XSV แต่ละโคลนเจือจาง 1:20 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ XSV กับเชื้อ *Mr*NV, WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8), *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) และ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก

6.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ XSV กับเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV ด้วยวิธี immunohistochemistry

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ XSV ที่คัดเลือกไว้นำมาทดสอบกับเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยนำมาผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 5.3.2.3 จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาบริเวณที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายของกุ้งที่ติดเชื้อ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) และ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก

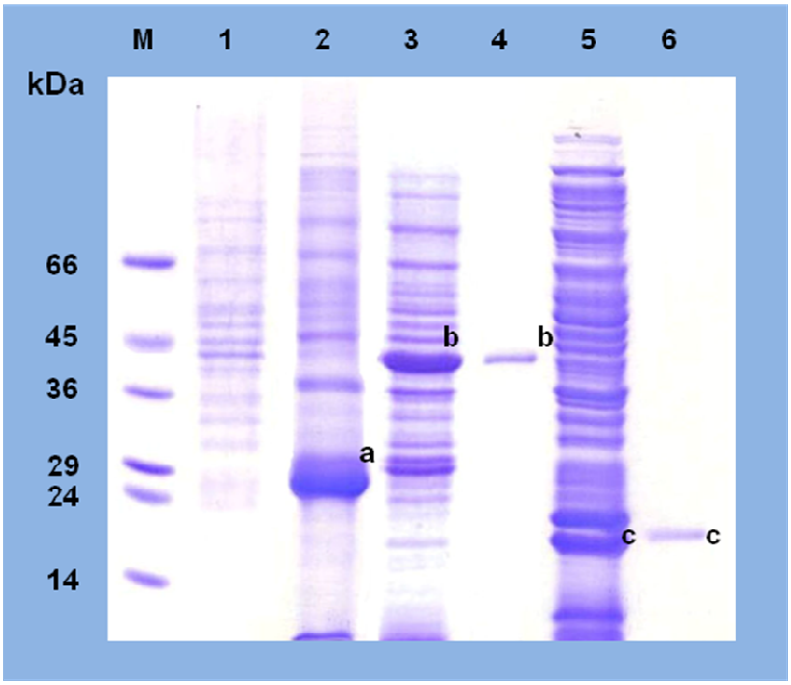
บทที่ 4
ผลการทดลอง

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV

หลังจากนำแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV และแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b-XSV มากระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV โดยใช้ 1mM IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ *tac* promoter จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงและวิเคราะห์การสร้างรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนโดยแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV และ pET15b-XSV สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน GST-XSV เท่ากับ 42 กิโลดาลตันและโปรตีน 6xHis-XSV เท่ากับ 20 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 3 และ 5) ซึ่งรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV ที่ได้จะมีโปรตีน GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N โดยที่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่พบโปรตีนดังกล่าว (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 1) ส่วนแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 จะมีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 2)

การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ให้บริสุทธิ์

จากการทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ให้บริสุทธิ์ ทำได้โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV และแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b-XSV มาแยกด้วย 12% SDS-PAGE และแช่เจลใน 0.3M KCl จะเห็นแถบโปรตีนเป็นสีขาวขุ่น จากนั้นตัดแถบเจลบริเวณที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV และแยกโปรตีนออกจากเจลโดยแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย เก็บสารละลายที่ได้ในถุง dialysis ชะโปรตีนออกจากเจล โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ ประมาณ 8 ชั่วโมง ใน Transblot apparatus (BioRad) และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง Speed-Vac (Savant) พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงได้ เมื่อนำมาทดสอบด้วย 12% SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนอื่นๆ นอกจากรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน GST-XSV เท่ากับ 42 กิโลดาลตันและโปรตีน 6xHis-XSV เท่ากับ 20 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 4 และ 6)



ภาพประกอบ 13 การตรวจสอบผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV โดยนำมาแยกใน 12% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน GST-XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 5 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b-XSV

แถวที่ 6 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน 6xHis-XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

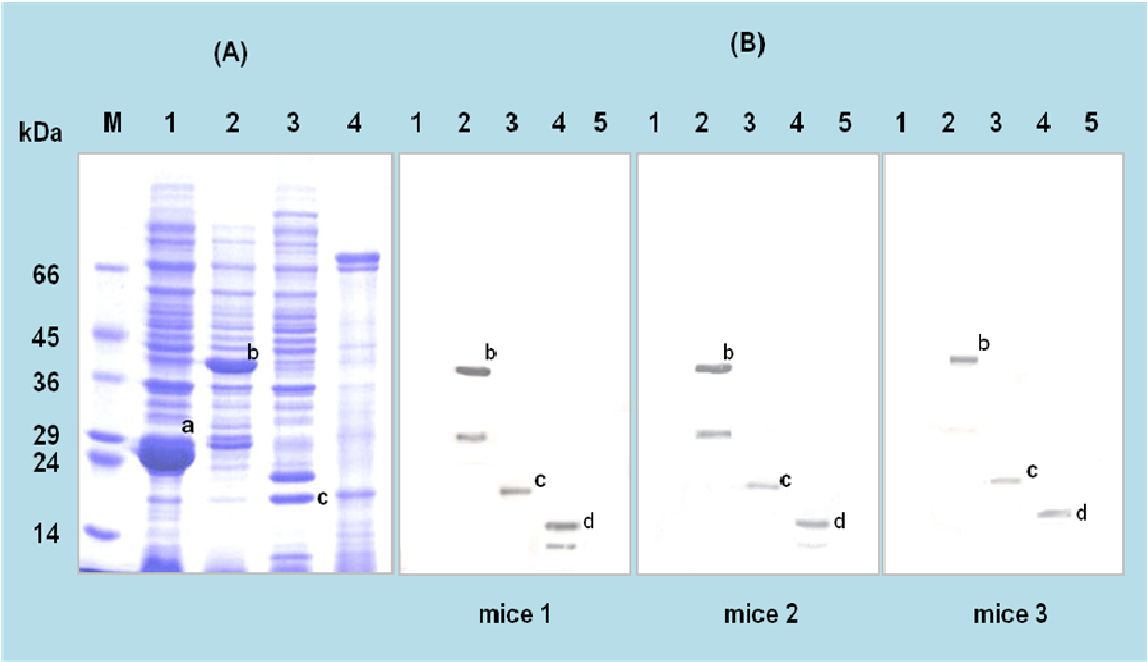
a คือโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

b คือรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV ขนาดประมาณ 42 กิโลดาลตัน

c คือรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ 6xHis -XSV ขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV

จากการนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีโปรตีนมีความเข้มข้นประมาณ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว โดยฉีดสลับระหว่างรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน GST-XSV และโปรตีน 6xHis-XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ให้หนูขาว 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร/ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนได้ 3 ตัวในระดับที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting โดยแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV และสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ และสามารถจับกับโปรตีนขนาดเล็กกว่าแถบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน คาดว่าอาจเกิดจากการสลายของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในระหว่างการเตรียม (ภาพประกอบ 14B) เลือกหนูตัวที่สามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ดีที่สุด มาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV และโปรตีน 6xHis-XSV ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ XSV โดยวิธี dot blotting และวิธี Western blotting พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ XSV ได้ 6 โคลน ได้แก่ XSV1, XSV8, XSV10, XSV17, XSV19E และ XSV19G (ตาราง 5) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับแคปซิดโปรตีนขนาด 16 และ 17 กิโลดาลตันของ XSV ที่ได้จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 15B) และ dot blotting (ภาพประกอบ 16) สำหรับการตรวจเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *Mr*NV ตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry นั้นยังไม่สามารถหาตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อ XSV ได้



ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B) โดยแอนติซีรัมจะถูกดูดซับแอนติบอดีที่เจือปนก่อน (preabsorption) ด้วย Lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน ซึ่งพบว่าหนูขาว 3 ตัว สามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV ได้ โดย

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b-XSV

แถวที่ 4 สารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ

แถวที่ 5 สารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามปกติ

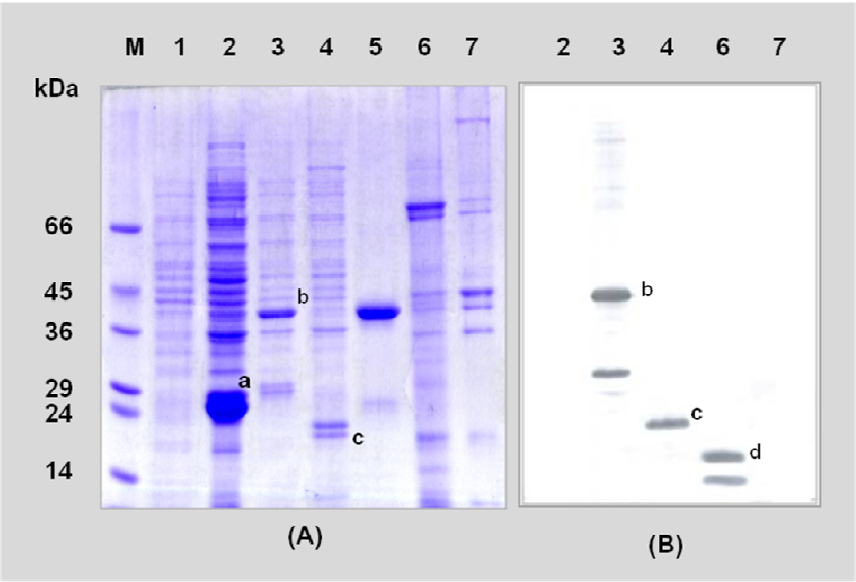
โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

a คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

b คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV ขนาดประมาณ 42 กิโลดาลตัน

c คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ 6xHis-XSV ขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน

d คือ แคปซิดโปรตีนของ XSV



ภาพประกอบ 15 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting โดยแยกโปรตีนด้วย (A) 12% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 เจลอีกส่วนนำมาทำ (B) Western blotting โดยทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1 ตามลำดับ โดย

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV

แถวที่ 4 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b-XSV

แถวที่ 5 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน GST-XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 6 สารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ

แถวที่ 7 สารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามปกติ

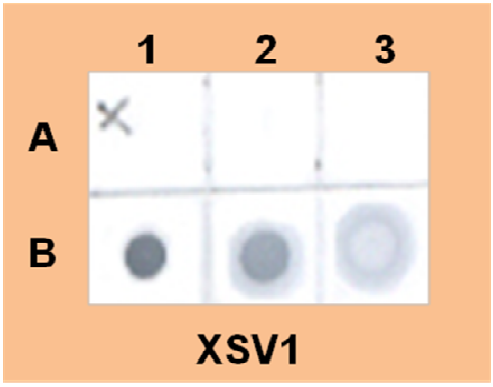
โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

a คือโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

b คือรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV ขนาดประมาณ 42 กิโลดาลตัน

c คือรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ 6xHis -XSV ขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน

d คือแคปซิดโปรตีนของ XSV



ภาพประกอบ 16 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ XSV ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยดและทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1 ดังนี้

แถว A (1) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

(2) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

(3) สารสกัดเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามปกติ

แถว B (1) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-XSV

(2) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b-XSV

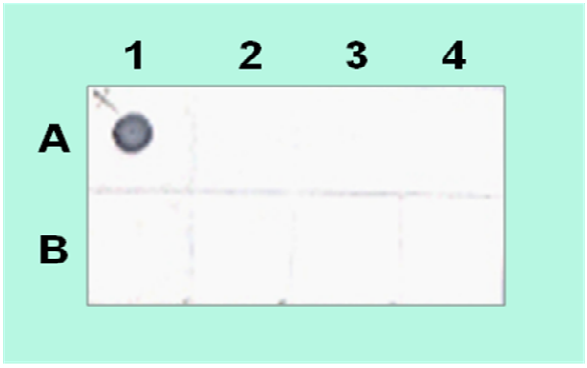
(3) สารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ

การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนของไวรัสกุ้งชนิดต่างๆ และวิธี immunohistochemistry โดยใช้เนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ *Mr*NV, WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8), *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) และ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 17) และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆของเชื้อ WSSV, TSV, YHV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV และ *Pst*DNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry (ภาพประกอบ 18)

เมื่อตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับได้โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV แต่ละโคลนที่ผลิตได้มาผสมรวมกันที่ละคู่ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV จำนวน 6 โคลน มีอิพิโทปที่ต่างกันแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ XSV1, XSV19E และ XSV19G กลุ่มที่ 2 คือ XSV17 กลุ่มที่ 3 คือ XSV10 และกลุ่มที่ 4 คือ XSV8 เนื่องจากผลรวมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละกลุ่มทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดเดียว ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 3 โคลน ทุกโคลนมีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน เนื่องจากผลรวมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละคู่มีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีไม่เพิ่มขึ้นหรือมีการลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดเดียว (ภาพประกอบ 19)

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) พบโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6 โคลน คือ XSV1, XSV8, XSV10, XSV17, XSV19E และ XSV19G ที่ผลิตได้มี class เป็น IgG นั่นคือ IgG_1, IgG_{2a} และ IgG_{2b} และโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดมี light chain เป็น kappa (K) (ตาราง 5)



ภาพประกอบ 17 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Mr*NV, WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8), *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) และ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนต่างๆ บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้

แถว A (1) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน pGEX-6P-1-XSV

(2) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

(3) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132)

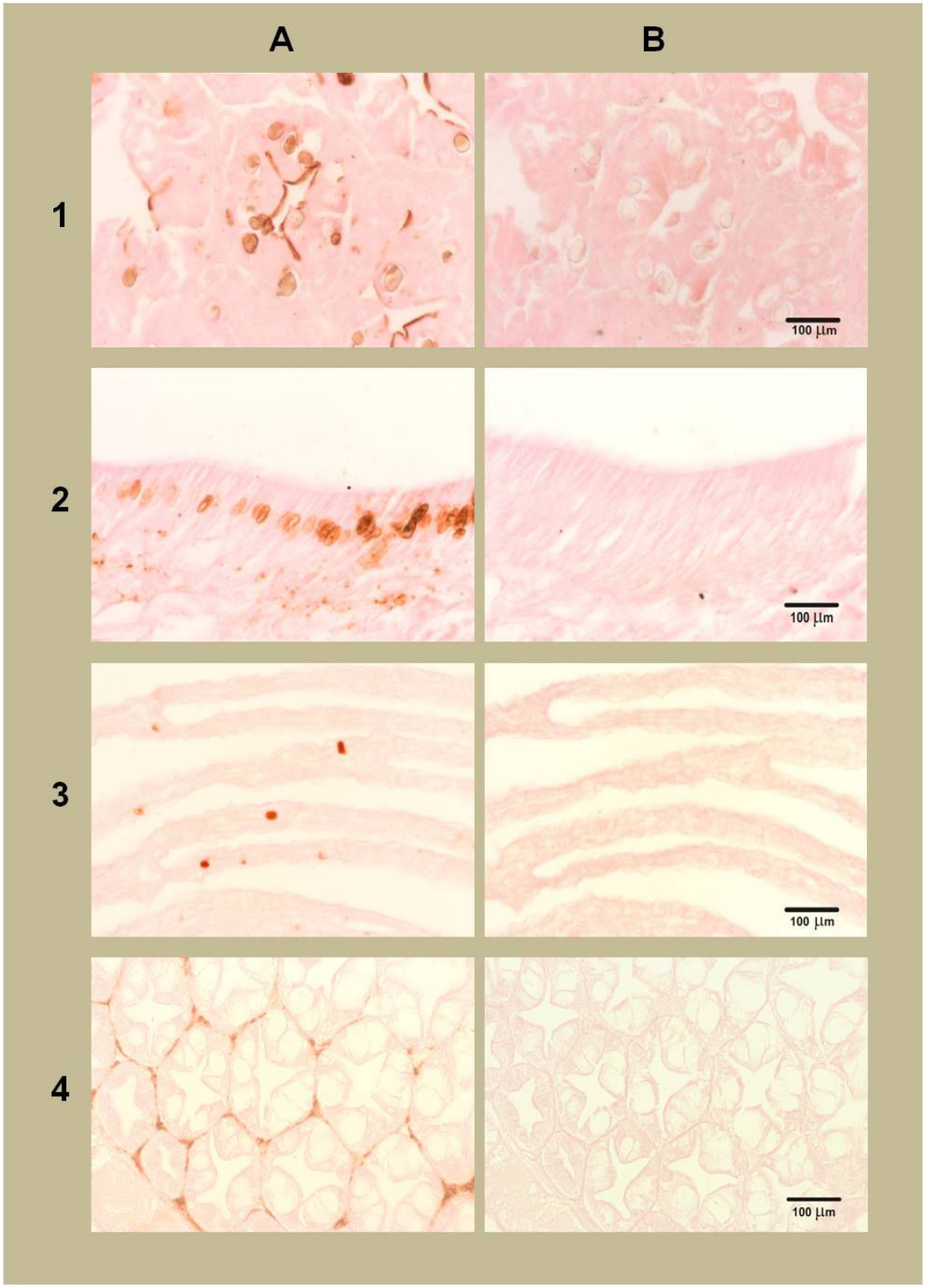
(4) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน polyhedron (OBC) ของ *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267)

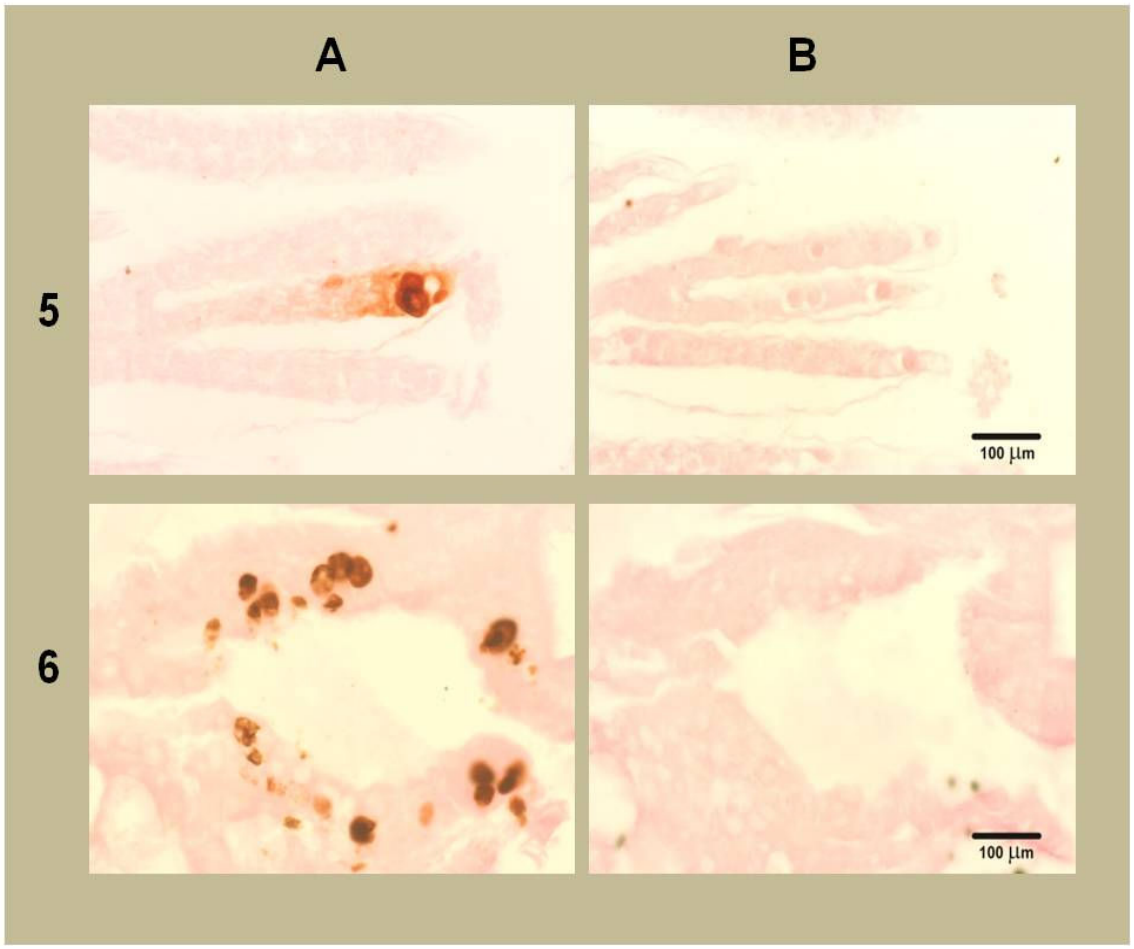
แถว B (1) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน pGEX-6P-1-*Mr*NV

(2) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP3 ซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81)

(3) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือก (envelope) ของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363)

(4) lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ gp116N ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8)


A
B
1
2
3
4
100 µm
100 µm
100 µm
100 µm



ภาพประกอบ 18 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry กับองค์ประกอบต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อชนิดต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV ได้แก่ (1) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ *Pm*DNV (2) เนื้อเยื่อบุผิวที่ติดเชื้อ *Pst*DNV (3) เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (4) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ YHV (5) เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ TSV และ (6) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ *Pemo*NPV โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (1A) HPV3-3H ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) (2A) IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) (3A) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) (4A) Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) (5A) TSV3-97 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81) (6A) MBV5-3H ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267)

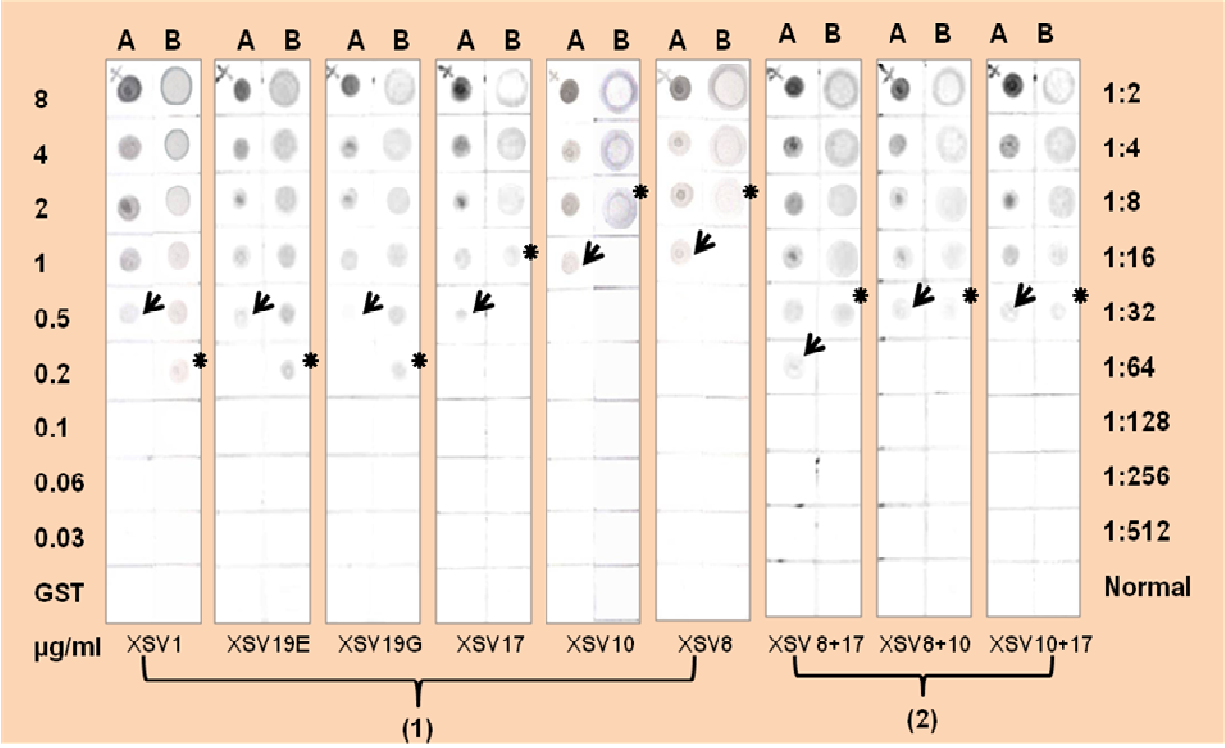
MAbs	XSV 1	XSV 19E	XSV 19G	XSV 17	XSV 10	XSV 8
XSV 1	0.877 [1]	0.786	0.837	0.887	0.937	1.030
XSV 19E		0.766 [1]	0.779	0.814	0.904	0.938
XSV19G			0.808 [1]	0.885	0.934	0.984
XSV 17				0.544 [2]	0.687	0.807
XSV 10					0.512 [3]	0.880
XSV 8						0.720 [4]

ภาพประกอบ 19 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA (ตัวเลขเหมือนกันเหนือค่า OD คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆที่จับกับอิพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน)

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1, XSV17, XSV19E และ XSV19G สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยความไวสูงสุดในระดับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร), ส่วน XSV10 และ XSV8 ด้วยความไวในระดับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (20 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1, XSV19E และ XSV19G สามารถตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:64 โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV17 สามารถตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:32 ได้ XSV10 และ XSV8 สามารถตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:8 (ภาพประกอบ 20)

จากการเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปต่างกัน และมีความไวสูงสุด คือ XSV1, XSV17, XSV10 และ XSV8 มาทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting ในการตรวจหาเชื้อ XSV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ พบว่า

เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV8 ร่วมกับ XSV17 หรือ XSV8 ร่วมกับ XSV10 หรือ XSV10 ร่วมกับ XSV17 จะทำให้มีความไวเพิ่มมากขึ้นโดยตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:32 และโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV8 ร่วมกับ XSV17 สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยความไวสูงสุดในระดับ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV8 ร่วมกับ XSV10 หรือ XSV10 ร่วมกับ XSV17 สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยความไวสูงสุดในระดับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) (ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 20 การทดสอบความไวด้วยวิธี dot blotting ของ (1) โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ และ (2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิพิโทปแตกต่างกันในการจับกับ (A) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 8 ถึง 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (B) สารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ เจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

โดย ➹ คือ แสดงความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตได้ของ lysate *ของ E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1-XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์

* คือ แสดงความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตได้ของสารสกัดจากลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ XSV ตามธรรมชาติ

ตาราง 5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV, class, และความไวของการตรวจหาแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

MAbs (class)	ความไวของการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี dot blotting (เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี Western blotting (สารสกัด XSV บริสุทธิ์)	IHC
XSV1,XSV19E, XSV19G (IgG_{2b})	5	+++	ND
XSV17 (IgG_{2b})	5	+++	ND
XSV8 (IgG_{2a})	10	+++	ND
XSV10 (IgG_1)	10	++	ND

หมายเหตุ

ND	ไม่ได้ทดสอบ
-	โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่สามารถจับกับโปรตีนหรือเชื้อ XSV ได้
+	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ XSV ได้เล็กน้อย
++	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ XSV ได้ชัดเจน
+++	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ XSV ได้ชัดเจนมาก
IHC	immunohistochemistry
MAbs	โมโนโคลนอลแอนติบอดี

บทที่ 5
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ GST-XSV และ 6xHis-XSV จากแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และสายพันธุ์ BL21 (DE3) ได้โปรตีนมีขนาด 42 และ 20 กิโลดาลตัน ตามลำดับ หลังจากทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยพบแถบของโปรตีนที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาฉีดให้หนูขาวและทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนทั้งสอง และต่อเชื้อ XSV ในกุ้งก้ามกรามที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี Western blotting พบว่าหนูขาว 3 ตัว สามารถตอบสนองต่อโปรตีน GST-XSV และ 6xHis-XSV และสามารถจับกับเชื้อ XSV ในระดับที่แตกต่างกัน โดยหนูตัวที่ 1 ตอบสนองดีที่สุดจึงนำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 6 โคลน ได้แก่ XSV1, XSV8, XSV10, XSV17, XSV19E และ XSV19G ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_1, IgG_{2a} และ IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa (K) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting และสามารถจับกับเชื้อ XSV ขนาด 16 และ 17 กิโลดาลตัน ได้ด้วยวิธี Western blotting แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวยังไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ได้เนื่องมาจากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *Mr*NV ที่รวบรวมได้ไม่พบการติดเชื้อ XSV เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR จึงยังไม่สามารถทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ lysate ของ *E.coli* ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Mr*NV, รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP3 ซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-81), รีคอมบิแนนท์โปรตีน polyhedrin ของ *Pemo*NPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267),รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Pm*DNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89), รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Pst*DNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) และรีคอมบิแนนท์โปรตีน gp116N ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) จึงสามารถนำไปตรวจการติดเชื้อ XSV ด้วยวิธีดังกล่าวได้ และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆของเชื้อ WSSV, TSV, *Pemo*NPV, *Pm*DNV, *Pst*DNV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี immunohistochemistry (ภาพประกอบ 20)

จากการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ XSV ทั้ง 6 โคลน สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มที่จับอิพิโทปต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ XSV1, XSV19E

และ XSV19G มีความไวสูงสุด และจากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV ด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1, XSV19E และ XSV19G สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน XSV ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:64 ซึ่งมีความสามารถในการตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ดีกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนอื่นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ XSV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามใดๆกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆและองค์ประกอบต่างๆของกุ้งปกติโดยวิธี dot blotting

จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับอิพิโทปต่างกันร่วมกัน คือ XSV1 ที่มีความไวสูงสุด, XSV17, XSV10 และ XSV8 มาทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting ในการตรวจหาเชื้อ XSV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ พบว่า เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV8 ร่วมกับ XSV17 หรือ XSV8 ร่วมกับ XSV10 หรือ XSV10 ร่วมกับ XSV17 จะทำให้มีความไวเพิ่มมากขึ้นโดยตรวจหาเชื้อ XSV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:32 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการใช้ XSV8, XSV10 เพียงตัวเดียว 4 เท่า และเพิ่มขึ้นจากการใช้ XSV17 เพียงตัวเดียว 2 เท่า แต่อย่างไรก็ตามความไวที่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวรวมกันยังมีความไวน้อยกว่าการใช้ XSV1 เพียงตัวเดียว และโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV8 ร่วมกับ XSV17 สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยความไวสูงสุดในระดับ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (5 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) ซึ่งมีความไวเพิ่มขึ้นมากกว่า XSV1 ที่มีความไวสูงสุด 2 เท่า ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV8 ร่วมกับ XSV10 และ XSV10 ร่วมกับ XSV17 สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ XSV ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยความไวสูงสุดในระดับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) ซึ่งเพิ่มจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้เพียงตัวเดียว 2-4 เท่า แต่มีความไวน้อยกว่า XSV1 เพียงตัวเดียว ดังนั้นการรวมโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1 จึงไม่สามารถเพิ่มความไวในการตรวจ XSV เนื่องจากความไวในการตรวจ XSV ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ต่ำกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี XSV1 มาก

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV เป็นแอนติเจน เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อและช่วยลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆในเนื้อเยื่อกุ้ง และสามารถใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจโรคหางขาวในกุ้งที่เกิดการติดเชื้อ XSV ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting ได้

การตรวจเชื้อ XSV ด้วยวิธี immunohistochemistry ต้องหาตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ คาดหวังว่าจะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถ

นำไปใช้พัฒนาชุดตรวจอย่างง่าย เช่น strip test ที่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียได้ง่าย เมื่อเทียบกับการใช้วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่น dot blotting หรือ Western blotting โดยใช้เวลาเพียง 15 นาที (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียของกุ้งก้ามกรามที่มีการติดเชื้อในฟาร์มเพาะเลี้ยงได้อย่างทันท่วงที เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดเมื่อนำลูกกุ้งก้ามกรามไปเพาะเลี้ยง ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จักรพงศ์ นีละมนต์. (2549). *ผลของไวรัส Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV) และ extra small virus (XSV) ในแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อคุณภาพลูกกุ้ง*. กรุงเทพฯ: สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง.

ชัยวุฒิ สุดทองคง. (2550). *การศึกษาชนิดของไวรัสที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาประมง.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. (2547). *อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: บริษัท เมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย*. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

วารุณี หะยีมะสาและ. (2552). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

ศิริคุณ.แสงสุขเอี่ยม (2007). *Sirikhun group Fish and seafood: ความรู้ตัวสินค้า หมวดกุ้ง*. สืบค้นเมื่อ 23 กุมภาพันธ์ 2553, จาก http://www.sirikhun.com/k-2-product.htm

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ; และคนอื่นๆ. (2537). *อิมมูโนวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: เค.พี. พริ้นติ้ง จำกัด.

สมพงษ์ สุวรรณทศ. (2546). *กลวิธีการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย*. (เอกสารแนะนำ กรมประมง).

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (2553). *อุตสาหกรรมกุ้งไทย*. สืบค้นเมื่อ 4 มีนาคม 2553. จาก http://www.thailandshrimp.com/home.html

นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. (2548). *การศึกษาการติดเชื้อไวรัส Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV) และ extra small virus (XSV) ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบพัฒนาในประเทศไทย*. ว.วช.(วิทย์). (39): 65-81.

อภิรัก ตันศิริสิทธิกุล. (2548). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

Administrator. (2010). *การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม*. สืบค้นเมื่อ 23 กุมภาพันธ์ 2553, จาก http://www.aquatoyou.com

Anonymous. (2008). *White Tail in freshwater prawn*. Retrieved February 23, 2010, from www.TheFishSite.com

Arcier, J. M.; et al. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (38): 177–181.

Bonami, J-R, et al. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of *Mr*NV as a new type of nodavirus. *Journal of Fish Diseases*. (28): 23-31.

Chaivisuthangkura, P.; et al. (2004). Monoclonal antibody against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia*. (30): 359-363.

Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology*. (381): 261-267.

Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Preferential suppression of yellow head virus (YHV) envelope protein gp116 in shrimp that survive challenge with YHV.. *Diseases of Aquatic Organisms*. (79): 1-8.

Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and thechnique. *In T.A. springer (ed), Hydridoma Technology in Bioscience and Medicine*. New York: Plenum Press.

Flegel, T. W.; et al. (1992). Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL (eds) Diseases of cutured penaeid shrimp in Asia and the United States. *Oceanic Institute, Honolulu*: 57-112.

Hameed, A. S. S.; et al. (2004). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*. (238): 127-133.

Hameed, A. S. S. (2008). White tail disease of *Macrobrachium rosenbergii. Aquaculture Division, Department of Zoology, C. Abdul Hakeem College*.

Köhler, G; & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusio. *European Journal of Immunology*. (6): 511-519.

Lightner, D. V.; & Redman, R.M. (1998). Shrimp Diseases and Current Diagnostic Methods. *Aquaculture*. (164): 201-220.

Loh, P. C.; et al. (1997). Viral Pathogens of the Penaeid Shrimp. *Advances in Virus Research*. (48): 263-312.

Longyant, S.; et al. (2008). Specific monoclonal antibodies raised against Taura syndrome virus (TSV) capsid protein VP3 detect TSV in single and dual infections with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms.* (79): 75-81.

Madrid, R. M. (2005b). A Crise Economic da Carcinicultura. *Panorama da Aquicultura*. (90): 22-29.

Owens, L.; et al. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*. (85): 175-180.

Pillai, D.; et al. (2005). Gross sing and histopathology of branchiostegal blister disease (balloon disease): idiopathic disease of farmed *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Journal of Fish Diseases*. (28):473-478.

Pillai, D.; Bonami, J-R; & Widada J. S. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases*. (29): 275-283.

Qian, D.; et al. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fish Diseases*. (26): 521-527.

Qian, D.; et al. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000-2004. *Aquaculture*. (261):1144-1150.

Romestand, B.;& Bonami, J-R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *Mr*NV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Journal of Fish Diseases*. (26):71-75.

Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of monoclonal antibodies specific to hepatpancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms.* (65): 85-89.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; & Maniatis, T. (2000). Molecular cloning: A laboratory manual (Third Edition). New York.

Shekhar, M.S.; et al. (2006). RT-PCR and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: Indian isolate. *Aquaculture.* (252):128-132.

Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to yellow-head Virus (YHV) of *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms*. (49): 71-76.

Sithigorngul, P.; et al. (2009). Simple immunoblot and immunohistochemical detection of Penaeus stylirotris densovirus using monoclonal antibodies to viral capsid protein expressed heterologously. *Journal of Virological Methods*. 126-132.

Sudhakaran, R.; et al. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus, Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*. (257): 136-141.

Sudhakaran, R.; et al. (2007). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and Artemia. *Journal of Fish Diseases.* (30): 27-35.

Sudhakaran, R.; Parameswaran, V.; & Hameed, A.S.S. (2007). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in C6/36 mosquito cell line. *Journal of Virology Methods.* (146): 112-118.

Sudhakaran, R.; et al. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) and extra small virus (XSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. (79): 141-145.

Tripathy, S.; et al. (2006). Multiplex RT-PCR detection and sequence comparison of viruses *Mr*NV and XSV associated with white tail disease disease in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. (258): 134-139.

Tung, C. W.; Wang, C. S.; & Chen, S. N. (1999). Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases.* (22): 1–5.

Wang, C. S.; et al. (2007). RT-PCR amplification and sequence analysis of extra small virus associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases.* (30): 127-132.

Wang, J-m; Zhang, H-j; & Shi, Z-l. (2008). Expression and assembly mechanism of the capsid proteins of a satellite Virus (XSV) associated with *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus. *Virologica Sinica*. (23): 73-77.

Widada, J. S.; & Bonomi, J-R. (2004). Characteristics of the monocistronic genome of extra small virus, a virus-like particle associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: possible candidate for a new species of satellite virus. *Journal of General Virology*. (85): 643-646.

Yoganandhan, K.; et al. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube,one-step multiplex RT-PCR assay. *Journal of Fish Diseases*. (28): 65-69.

Yoganandhan, K.; et al. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms.* (69): 255-258.

Zhang, H.; et al. (2006). Quantiative relationship of two viruses (*Mr*NV and XSV) in white-tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (71): 11-17.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

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

2. LB agar

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

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1.10X TBE buffer

Tris-HCL (ปรับ pH 8.3)	108.0	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
EDTA	9.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

2. 100 mM IPTG

IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

3. Buffer B (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea pH 6.3)

NaH_2PO_4	1.38	กรัม
Tris-HCl (ปรับ pH 6.3)	0.12	กรัม
Urea	48.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

4. 100 mM PMSF

PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol	1.0	มิลลิลิตร

5. 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

6. 5% Blotto

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

7. 1% Merthiolate

Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

8. 1 M KCl

KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

9. 1% SDS

sodium dodecyl sulfate (SDS)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. RPMI medium

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
$C_3H_3O_3Na$	1.1005	กรัม
$NaHCO_3$	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
Penicillin G	20,000	units
Streptomycin	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000	มิลลิลิตร

กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 20% Fetal bovine serum

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

3. HAT medium

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

4. 40% Polyethylene glycol

Polyethylene glycol	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มิลลิลิตร

เติม RPMI (1) ลงในพอลิเอธิลีนไกลคอลที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

5. 12% Dimethylsulfoxide

Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium	88.0	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) และ WESTERN BLOT

1. Stock solution

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

Acrylamide	58.4	กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	1.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

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

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

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

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

1.4 10% SDS

sodium dodecyl sulfate	50.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

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

1.7 2X Treatment buffer

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

น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 12% separating gel (12% T 2.7% C_{Bis})

Monomer solution (1.1)	10.0	มิลลิลิตร
0.15 M Tris-HCl pH 8.8 (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.1	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

2.2 4% Stacking gel (4% T 2.7% C_{Bis})

Monomer solution (1.1)	2.7	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

ตาราง 1 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	12% T 2.7% C_{Bis}	4% T 2.7% C_{Bis}
30% T 2.7% C_{Bis}	10.0 มิลลิลิตร	2.66 มิลลิลิตร
Tris-Cl เข้มข้น 5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มิลลิลิตร	-
Tris-Cl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5.0 มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10%	0.3 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.1 มิลลิลิตร	12.2 มิลลิลิตร
ผสมและใช้ปั๊มสุญญากาศดึงอากาศออกจากสารละลาย		
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
ผสมและเทอย่างรวดเร็วลงในช่องว่างระหว่างกระจก		

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

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

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

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

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 Destain 1

Methanol	500.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 Destain 2

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

วิธีการย้อมและล้างสีเจล

ถอดเจลจากกระจกแช่ในสี Coomassie blue (4.1.2) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ล้างเจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆเป็นเวลา ½-1 ชั่วโมง จนเห็นแถบโปรตีน จากนั้นแช่เจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 2 (4.2.2) จนกระทั่งสีพื้นใสปราศจากจากสี

5. Towbin transfer buffer pH 8.8

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

ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด

6. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma) ประกอบด้วย

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

ภาคผนวก จ

สารคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ1 chain specific)
2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ2a chain specific)
3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ2b chain specific)
4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ3 chain specific)
5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
9) Normal Rabbit Serum, (Negative Control)
10) Positive Control, Monoclonal Mouse IgG1
    (Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
11) Substrate Buffer, Concentration (10X)
    (1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H_2O_2)
12) ABTS Substrate, Concentrated (50X)
    (2,2–azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
13) Blocking Solution, Concentration (50X)
    (25% BSA in PBS and 0.05% NaN_3)
14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
15) Goat anti-Mouse IgGAM, Concentrated (50X)
    (0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
16) 50% Tween 20

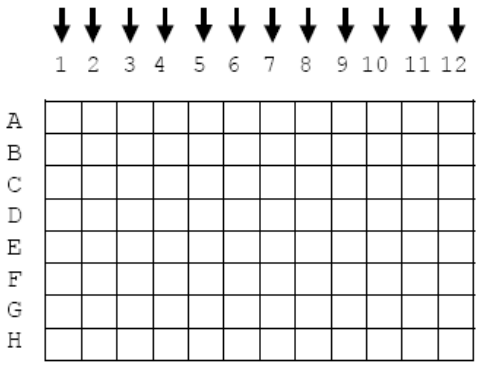
วิธีการตรวจสอบ isotype และ subisotype ขอโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548: 202)

1) เคลือบถาดหลุม 96 หลุมด้วย goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

2) สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

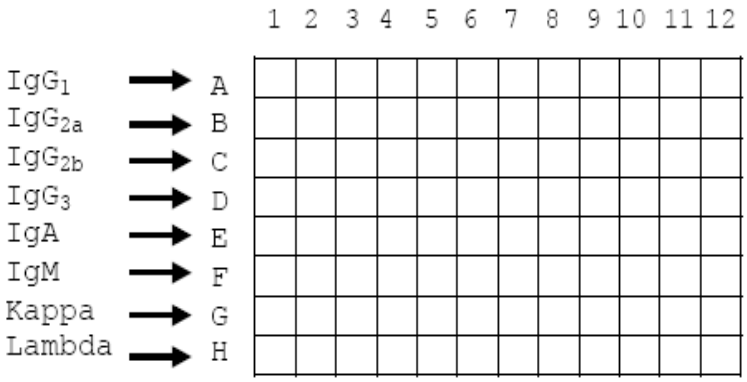
3) เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ลิตร ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

MAbs



4) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที

5) เติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด (1-8) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ A-H



6) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที

7) เติม HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ 10 นาที

8) เติมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.006% ใน citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม

9) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก ฉ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. 0.1 M Citrate buffer, pH 4.5

Sodium citrate	29.41	กรัม
1% Merthiolate	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

2. 1 N H_2SO_4

H_2SO_4 (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

3. O-Phenylenediamine (OPD)

ภาคผนวก ซ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. coated slide solution

Gelatin	1.0	กรัม
$CrK(SO_4)_2.12H_2O$	50.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. Davidson's fixative

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

3. Calf serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

4. สี Enrilich's acid hematoxylin

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

5. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวสิริจันทรา สานนท์
วันเดือนปีเกิด	28 กันยายน 2528
สถานที่เกิด	อุบลราชธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	244 หมู่ 15 ถนนแม่ชี ตำบลขามใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2547	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบ็ญจะมะมหาราช จากจังหวัดอุบลราชธานี
พ.ศ.2551	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จากจังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ.2553	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จากจังหวัดกรุงเทพฯ