

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28
ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ปริญญานิพนธ์
ของ
จรัสพร ตั้งขบวนบุตร

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2547
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

595.384

จุฬาลงกรณ์

ร.2

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28
ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

บทคัดย่อ

ของ

จรัสพร ตั้งขบวนบุตร

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2547

h 257734

จุฬาลงกรณ์ 595.384

จรัสพร ตั้งขบวนบุตร. (2547). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล.

การศึกษานี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้น เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) โดยได้นำยีนของโปรตีน VP28 และ VP28F118 (โปรตีน VP28 ที่ปราศจากส่วน transmembrane) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนส่วนเปลือก (envelope) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวมาโคลนเข้าสู่ expression vector (pQE30) และนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) สามารถสร้างโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 ที่มีขนาดประมาณ 28 และ 23 kDa ตามลำดับ และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE สามารถผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งนำไปฉีดให้หนูขาวสำหรับนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rVP28 พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 9 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถจับกับโปรตีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในเลือดกุ้งที่มีการติดเชื้อโดยวิธี dot blot และ Western blot และสามารถนำมาใช้ตรวจหาการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธี immunohistochemistry ได้ และคาดว่าจะสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้พัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสที่ใช้ง่าย มีความไวและแม่นยำสูง ในราคาไม่แพงต่อไปได้

**PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST VP28 ENVELOPE PROTEIN
OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)**

**AN ABSTRACT
BY
JARASPORN TANGKHABUANBUTRA**

**Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree of Biology
At Srinakharinwirot University
October 2004**

Jarasporn Tangkhabuanbutra. (2004). *Production of Monoclonal Antibodies Against VP28 Envelope Protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV)*. Master thesis, M.Sc. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Parin Chaivisuthangkura, Assoc. Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul.

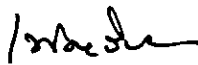
The objective of this study is to produce monoclonal antibodies that can be used to detect white spot syndrome virus infection. The VP28 and VP28F118 (VP28 protein lacking the N-terminal transmembrane region) genes of white spot syndrome virus were cloned into expression vector (pQE30) and transformed into *E. coli* strain M15 (pREP4). After induction the recombinant proteins, rVP28 and rVP28F118 at molecular weight of 28 and 23 kDa, respectively were produced. The rVP28 and rVP28F118 proteins were purified by SDS-PAGE and used for immunization in Swiss mice for monoclonal antibody production. Nine hybridoma clones producing antibodies specific to VP28 were obtained. The antibodies bind particularly well to the VP28 protein of WSSV and can be used to detect WSSV infection in tissue by immunohistochemistry and in gill extract by dot-blotting. It is quite promising to use these monoclonal antibodies for development of a simple immuno-based test kit for WSSV detection with high accuracy and sensitivity at low cost.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

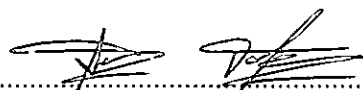
ของ
นางสาวจรัสพร ตั้งขบวนบุตร

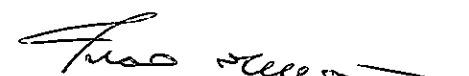
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)
วันที่ 13 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

 ประธาน
(อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

 กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

 กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. ประวิติ อังประภาพรชัย)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ และ อาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย คณะกรรมการแต่งตั้งเพิ่มเติม ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในการปฏิบัติงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริจิ และ คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำต่างๆในงานวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. โกสุม จันทรศิริ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้ใช้เครื่องสลายเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูง ขอบคุณพี่ น้อง ในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี และห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณย่า บิดา มารดา และคุณอาทุกท่านที่ให้การสนับสนุน รวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัย

จรัสพร ตั้งขบวนบุตร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
และ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ความสำคัญของการวิจัย	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
อุปกรณ์และสารเคมี	24
วิธีดำเนินการทดลอง	30
4 ผลการทดลอง	49
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	62
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	68
ประวัติย่อผู้วิจัย	75

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	26
3 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	28
4 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	29
5 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง	29
6 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับยีน VP28 และ VP28F118	32
7 แสดงส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pCR®Blunt vector.....	34
8 แสดงส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ใน pCR®Blunt vector ด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Kpn</i> I	37
9 แสดงส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ใน pCR®Blunt vector ด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Pst</i> I	39
10 แสดงส่วนผสมของการทำ ligation ของยีน VP28 หรือ VP28F118 กับ pQE30 expression vector	40
11 แสดงโคลนของ MAb จำเพาะต่อโปรตีน VP28 (rVP28 และ rVP28F118) ของ WSSV ที่ได้	56
12 การติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำที่ชักนำโดยการฉีดที่เวลาต่างๆ	61

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน VP28	8
2 กราฟแสดงการวิเคราะห์ Protein's Hydropathic Profile ของโปรตีน VP28	9
3 แสดงโครงสร้างของ pCR [®] Blunt plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะ เอนไซม์ต่างๆ (restriction site)	35
4 แสดงโครงสร้างของ pQE30 expression vector และตำแหน่ง ตัดจำเพาะเอนไซม์ต่างๆ (restriction site)	38
5 แสดงโครงสร้างของ pREP-4 plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ต่างๆ (restriction site)	41
6 โครงสร้างของ pQE40 plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ (restriction site)	44
7 แสดงตัวอย่างการหยอดตัวอย่างสำหรับแยกโดยวิธี SDS-PAGE	45
8 PCR product ของ VP28 และ VP28F118	50
9 การวิเคราะห์การเชื่อมยีนโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Kpn</i> I	51
10 15% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue ของ VP28 และ VP28F118	53
11 SDS-PAGE และ Western blot โดยใช้ mouse anti rVP28 antiserum และ MAb โคลน W1-7D และ W14-8A	55
12 Immunohistochemistry ของ WSSV	58
13 Immunohistochemistry โดยใช้ MAb W14-8A ต่อเนื้อเยื่อต่างๆ จากกิ้งกูดำ ที่ได้รับ WSSV เป็นเวลา 12 ชม.	59
14 Dot blot ของ haemolymph จากกิ้งกูดำที่ได้รับการฉีด WSSV เป็นเวลา 12 18 24 และ 36 ชม.	60
14 One step PCR ของ haemolymph จากกิ้งกูดำที่ได้รับการฉีด WSSV เป็นเวลา 12 18 24 36 ชม.	60

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา ได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp : *Penaeus monodon*) เป็นจำนวนมากในประเทศต่าง ๆ ของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย เวียดนาม ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน และประเทศไทย สำหรับประเทศไทยเริ่มทำการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2529 โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวออกไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วตามพื้นที่จังหวัดต่างๆที่ติดต่อกับชายทะเล ในปัจจุบันนี้มีพื้นที่การเลี้ยงกุ้งประมาณ 450,000 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 200,000-250,000 ตันต่อปี ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2534 จนถึงปัจจุบัน ประเทศไทยเป็นผู้นำในด้านการผลิตและส่งออกกุ้งกุลาดำ โดยสามารถสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศปีละกว่า 100,000 ล้านบาท (สิริ ทุกขวินาศ; และ ชุตินา ชมวิสัย. 2545 : ออนไลน์) ซึ่งกุ้งกุลาดำจะส่งออกในลักษณะของกุ้งแช่เย็น กุ้งแช่แข็ง กุ้งกระป๋อง และแปรรูปเป็นกุ้งต้มสุกแช่เย็น โดยตลาดหลักของกุ้งสดแช่แข็งได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ส่วนการส่งออกกุ้งต้มสุกแช่เย็นมีตลาดหลักได้แก่ สิงคโปร์ และสหภาพยุโรป ถึงแม้ว่าอุตสาหกรรมนี้จะพัฒนาเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ก็ยังต้องประสบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ เช่น ปัญหามลพิษและความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม ปัญหาทางการค้าและการตลาด และปัญหาที่เกิดจากการระบาดของโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ (Flegel; et al. 1995 : 65-79) โดยปัญหาโรคระบาดจัดเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุด ก่อให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตกุ้งอย่างมาก สาเหตุเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและไวรัส รวมถึงโปรโตซัว ซึ่งการเกิดโรคนั้น อาจเกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว หรือสองชนิด หรือหลายๆ ชนิดร่วมกัน จุลินทรีย์เหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายกับอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งมากที่สุด (Flegel; et al. 1997 : 285-296) โดยเฉพาะโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัส สำหรับไวรัสที่เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ได้แก่ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) ไวรัสเอ็มบีวี (*monodon baculovirus* : MBV) ไวรัสเฮชพีวี (hepatopancreatic parvo-like virus : HPV) และไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus : YHV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งสกุล *Penaeus* ซึ่งเป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการเพาะเลี้ยงหลายชนิด สามารถทำให้กุ้งตายหมดทั้งบ่อภายในเวลา 3-10 วัน หลังจากการตรวจพบการติดเชื้อ โดยมีรายงานการเกิดโรคนี้ครั้งแรกที่ไต้หวัน ในปี 1992 (Chou; et al. 1995 : 133-141) จากนั้นได้มีรายงานการระบาดทั่วไปในส่วนต่างๆของโลก สำหรับประเทศไทยพบการระบาดของไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในแถบอำเภอรอนดอ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา และอำเภอบะเหลียน จังหวัดตรัง (Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994 : 9-11) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแพร่ระบาดในจังหวัดสตูล กระบี่ ปัตตานี ภูเก็ต สุราษฎร์ธานี

นครศรีธรรมราช จันทบุรี ระยองและตราด เป็นต้น (Limsuwan. 1994 : 12-14) ; (Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994 : 9-11) เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญทางเศรษฐกิจเกือบทุกชนิด (Lightner. 1996) และสามารถตรวจพบในครัสเตเชียชนิดต่างๆทั้งที่อาศัยในทะเลและในน้ำจืด เช่น crayfish ปู ลอบสเตอร์ กุ้งทะเล และกุ้งน้ำจืด (Supamattaya; et al. 1998 : 79-85) ซึ่งสัตว์เหล่านี้สามารถเป็นพาหะนำโรค และก่อให้เกิดความเสียหายกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมาก (Kanchanaphum; et al. 1998 : 1-7)

โรคตัวแดงดวงขาวเป็นโรคที่ยังไม่มียาหรือสารเคมีใดๆรักษาได้ วิธีป้องกันที่นักวิชาการมักแนะนำเกษตรกร ได้แก่ การเตรียมบ่อที่ดี ทำความสะอาดพื้นบ่อให้สะอาด ไม่ปล่อยกุ้งแน่นเกินไป และป้องกันพาหะตามธรรมชาติ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรพอด หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสด เช่น ปู สด ปลาสด หรือหอยสดที่อาจเป็นสัตว์พาหะ ทำการเพาะเลี้ยงในระบบปิด และการตรวจคุณภาพน้ำ เป็นต้น (Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994 : 9-11) ; (Limsuwan. 1994 : 12-14) แต่วิธีป้องกันนี้ก็มิใช่วิธีที่ดีที่สุด เนื่องจากกุ้งที่เกษตรกรนำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อตัวแดงดวงขาวจากพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยกุ้งก่อนที่จะนำมาเลี้ยง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้น

ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ WSSV ขึ้น โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส (nucleic acid) ได้แก่ วิธี Polymerase chain reactions (PCR) (Chang; et al. 1996 : 131-139) ; (Lightner; & Redman. 1998 : 201-220) ; (Kasornchandra; et al. 2000 : 32-41) ; (Chen; et al. 2000 : 157-161) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ซึ่งสามารถตรวจพบไวรัส แม้มีปริมาณน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรก ช่วยลดเวลาในการตรวจวินิจฉัยแบบเดิม ได้แก่ การวินิจฉัยจากอาการที่ปรากฏ (symptomatic diagnosis) และการตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histological examination) (Wongteerasupaya; et al. 1995 : 69-77) ; (Lightner; & Redman. 1998 : 201-220) ; (Mohan; et al. 1998 : 9-12) ; (Park; et al. 1998 : 71-75) ซึ่งนอกจากต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์แล้ว การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระยะแรกก็ทำได้ยาก นอกจากนี้อาการของโรคที่ปรากฏอาจมาจากมีสาเหตุอื่น เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย ที่อาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ แม้การวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR จะเป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในทางปฏิบัติ ทั้งนี้เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์พิเศษและบุคลากรที่มีความรู้ทาง PCR นอกจากนี้ค่าตรวจวิเคราะห์ยังมีราคาสูง เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ รวมทั้งไม่สามารถรับรองความแม่นยำ และไม่สามารถนำผลมาเทียบเคียงระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน อาจทำให้เกิดความสับสนหากผลการตรวจมีความขัดแย้งกัน

ได้มีนักวิชาการหลายกลุ่มพยายามใช้กระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำสูง มาใช้สำหรับตรวจ WSSV โดยการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) โดยใช้ไวรัสเป็นแอนติเจน (Nadala; et al. 1997 : 141-146 ; 2000 : 175-179) แต่ประสิทธิภาพการใช้งานยังไม่ดีนัก เนื่องจากแอนติบอดียังสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกุ้งและความไวในการตรวจยังค่อนข้างต่ำ ในปัจจุบันได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอล

แอนติบอดี (monoclonal antibody : MAb) โดยใช้ไวรัส WSSV บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้เหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจไวรัส WSSV ด้วยวิธี dot blot, western blot และตรวจเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry และ immunofluorescence ได้ดี แต่แอนติบอดีเหล่านี้ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของไวรัสสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆได้ (Poulos; et al. 2001 : 13-23) ; (Anil; et al. 2002 : 67-75)

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ทำให้ทราบถึงยีนต่างๆ ของไวรัส (Van Hulten; et al. 2000a : 227-236) และสามารถจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของไวรัสได้ 5 ชนิดด้วยกัน คือ VP28, VP26, VP24, VP19 และ VP15 โดย VP26 VP24 และ VP15 เป็นองค์ประกอบของ nucleocapsid ของไวรัส ส่วน VP28 และ VP19 เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเปลือกนอกของไวรัส (enveloped protein) (Van Hulten; et al. 2000b : 100-110) ; (Van Hulten; et al. 2002 : 257-265) และมีการใช้ recombinant protein ขององค์ประกอบส่วนเปลือกของไวรัส ได้แก่ VP28 มาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตำแหน่ง (epitope) ที่ต่างกัน ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเทคนิค antigen-capture ELISA สำหรับตรวจไวรัสจากเลือด (haemolymph) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อที่ให้ผลความไวของการตรวจเทียบเคียงกับวิธี PCR (Liu; et al. 2002 : 11-18)

จะเห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีประโยชน์อย่างมาก ในการพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อให้มีความไวใกล้เคียงกับวิธี PCR และยังสามารถปรับปรุงวิธีการให้ใช้ได้ง่ายในรูปแบบต่างๆ เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เอง โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมาก ทำให้สามารถตรวจเพื่อติดตามการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลา อันเป็นการลดความเสียหายของเกษตรกรในการสูญเสียกุ้งในนาครด

ความมุ่งหมายการวิจัย

เพื่อทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มาใช้ตรวจวิเคราะห์โรคตัวแดงดวงขาวในกุ่มกุลาดำ
2. เพื่อสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มาพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์โรคตัวแดงดวงขาวให้ง่าย และรวดเร็วต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน VP28 และ VP28 F118 (VP28 ที่ปราศจากส่วน transmembrane)
2. การโคลนและกระตุ้นการแสดงออกของ recombinant protein ของยีน VP28 และ VP28 F118 ใน *E. coli*
3. การทำให้บริสุทธิ์ recombinant protein ที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli*
4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้ recombinant protein ที่ผลิตได้จากยีน VP28 และ VP28 F118
5. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี dot blot วิธี immunohistochemistry และ Western blot
6. การทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจวิเคราะห์กุ่มที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี immunohistochemistry และ dot blot

สมมติฐานการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกนอกของไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP28) อาจทำได้โดยใช้ recombinant protein ที่สร้างจากยีน VP28 ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์โปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสเป็นแอนติเจนกระตุ้นหนูขาว

บทที่ 2

เอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome : WSS)

โรคตัวแดงดวงขาวเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อไวรัสนี้จะทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว โดยจะส่งผลให้เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงกุ้งได้รับความเสียหาย (Takahashi; et al. 1994 :121-125) ; (Chou; et al. 1995 : 133-141) ; (Wongteerasupaya; et al. 1995: 69-77) ; (Lightner. 1996) ; (Lo et al. 1996a : 133-141, 1996b : 215-225) ; (Flegel. 1997 : 285-296) ในปี ค.ศ. 1993 ได้มีการตรวจพบโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ red-tail shrimp (*Panaeus penicillatus*) (Chou; et al. 1995 : 133-141) พบว่ากุ้งจะมีอาการตัวแดงและมีจุดขาวในเปลือกและผิวหนังของกุ้ง การที่กุ้งปรากฏอาการดวงขาวนั้น ไม่ได้เป็นอาการที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของการได้รับเชื้อไวรัสไวรัสตัวแดงดวงขาวเสมอไป ตัวอย่างเช่น กุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและมีอาการลำตัวเป็นดวงขาวอาจจะมีชีวิตอยู่รอดได้ ถ้าเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดอาการเครียดแก่กุ้ง อย่างไรก็ตาม ถ้ากุ้งได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น กุ้งมีอาการเนือยชา ไม่กระปรี้กระเปร่า เชื่องซึม ลำตัวมีสีชมพูถึงสีน้ำตาลแดง รวมทั้งลอยตัวอยู่ริมขอบบ่อ นอกจากนี้ ในระหว่างที่ได้รับเชื้อกุ้งจะกินอาหารได้น้อยลง ต่อมาก็จะมีอัตราการตายสูงซึ่งสังเกตเห็นได้ภายใน 2-3 วันหลังจากได้รับเชื้อ และสามารถทำให้กุ้งตายได้ทั้งหมด ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก และจนกระทั่งบัดนี้ ยังไม่มีรายงานการต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ของกุ้งสปีชีส์ต่างๆ ทั้งในได้หวนหรือจากแหล่งอื่นๆ (Lightner. 1996) ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดเชื้อในโฮสต์ได้หลายชนิดไม่ใช่เฉพาะกุ้งเท่านั้น แต่ยังรวมถึงปู และอาร์โทรพอดอื่นๆ ด้วย เช่น copepods แมลง และ pest prawns (Lo; et al. 1996a : 133-141) ; (Chen; et al. 2000 :157-161)

ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) จัดเป็นไวรัสที่มีขนาดใหญ่ มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่เชื่อมต่อกันเป็นวง (dsDNA) พบการติดเชื้อในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียหลายชนิดตั้งแต่กุ้งและปูที่อาศัยในน้ำเค็มและน้ำกร่อย รวมไปถึงกุ้ง crayfish ที่อาศัยในน้ำจืด โฮสต์ที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดนี้จะถูกโจมตีและตายลงอย่างรวดเร็ว (Chou; et al. 1995 : 133-141) ; (Chang; et al.1996 : 131-139) อวัยวะเป้าหมายในการติดเชื้อคือเนื้อเยื่อต่างๆที่มีกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชนิด mesoderm และ

ectoderm ได้แก่ เหงือก (gill) เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid organ) และเนื้อเยื่อได้เปลือก (cuticular epithelium) โดยไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนและประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่ภายในนิวเคลียส และถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสนั้นแตกออก (Chang; et al. 1996 : 133-141) ; (Lo; et al. 1996b : 215-225 ; 1997 : 53-72) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) โครงสร้าง และองค์ประกอบต่างๆ ของจีโนม (genomic structure and composition) และสายวิวัฒนาการ (evolution) จำแนกไวรัสได้ดังนี้

Genus	Whispovirus
Family	Nimaviridae
Species	White spot syndrome virus

ไวรัสตัวแดงดวงขาวจัดอยู่ใน Family Nimaviridae เนื่องจากอนุภาคไวรัสมีส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (Nima เป็นภาษาลาตินหมายถึงหาง) และเป็น species เดียวของ family นี้ ชื่ออื่นๆ ที่มีรายงานในการวิจัยต่างๆ นอกจาก WSSV (White spot syndrome virus) คือ HHNBV (Hypodermic and hematopoietic necrosis baculovirus), RV-JP (Rod shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*), SEMBV (Systemic ectodermal mesodermal baculovirus) และ WSBV (White spot baculovirus)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีอนุภาคขนาดใหญ่ รูปไข่ (Chou; et al. 1995 : 133-141) ; (Wang; et al. 1995 : 297-302) ; (Lo; et al. 1996a : 133-141) มีขนาดประมาณ 275 X 120 nm ที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาคไวรัสมีส่วนของระยางค์ที่ยื่นออกมาลักษณะคล้ายหาง (tail like) อนุภาคไวรัสประกอบด้วยนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) รูปท่อนซึ่งอัดตัวแน่น ภายใตเยื่อหุ้ม 3 ชั้น (trilaminar envelope) นิวคลีโอแคปซิดที่ปราศจากเยื่อหุ้มมีขนาด 300 X 70 nm องค์ประกอบของ capsid จะเกิดจาก capsomere ที่เรียงตัวแบบ parallel cross striations ดังนั้น capsid จึงคล้ายประกอบด้วยวงแหวนของ subunits เรียงตัวตั้งฉากกับความยาวของแกนของ capsid ความหนาของวงแหวนประมาณ 20 nm (Wang; et al. 1995 : 239-242) ภายในนิวคลีโอแคปซิดบรรจุด้วย DNA เส้นคู่ที่เชื่อมต่อกันเป็นวง อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย polypeptide สำคัญๆ อย่างน้อย 5 ชนิด ที่มีขนาดต่างๆ ระหว่าง 15-28 kDa โดยเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีขนาด 28 และ 19 kDa ในขณะที่นิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ 3 ชนิด ที่มีขนาด 26, 24 และ 15 kDa โดยโปรตีนที่มีขนาด 28 kDa (VP28) ที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัสมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของไวรัส (Van Hulten; et al. 2001b : 228-233) สำหรับโปรตีนขนาด 15 kDa จะทำหน้าที่เป็น DNA-binding protein เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีประจุบวกสูง (highly basic protein) และไม่มีส่วนที่เป็น hydrophobic เช่นเดียวกับโปรตีนที่เป็น histone-like protein นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่นๆ ของไวรัสที่ได้จัดจำแนกไว้แล้วอีก

14 ชนิดรวมทั้ง collagen-like ORF ด้วย (Van Hulten; et al. 2001a : 7-22) ; (Van Hulten; et al. 2002 : 1069-1074)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวจัดเป็นไวรัสสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด จากการศึกษาลำดับเบสในจีโนม (genome) ที่มีรายงานไว้แล้ว พบว่า จีโนมของไวรัสมีขนาดประมาณ 300 kb ประกอบด้วยยีนที่เป็นรหัส (open reading frame) อยู่ 184 ORFs โดย 94% ของ ORFs ทั้งหมดยังไม่ทราบหน้าที่ เนื่องจากไม่มีส่วนคล้ายคลึงกัน (homology) กับโปรตีนอื่นๆที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลต่างๆ พบลักษณะพิเศษของยีนในไวรัสตัวแดงดวงขาวคือมี ORF ขนาด 18,234 นิวคลีโอไทด์ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (เป็น collagen-like ORF) และมีส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส 9 ชิ้น กระจายอยู่ทั่วไปใน genome โดยแต่ละชิ้นจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeats) ขนาด 250 bp (Van Hulten; et al. 2001a : 7-22)

โปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 28 kDa (white spot syndrome virus envelope protein 28 kDa)

โปรตีน VP28 เป็นโปรตีนหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบเป็นองค์ประกอบบนเปลือกหุ้มอนุภาคของไวรัส และมีส่วนช่วยในการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง โดย Van Hulten และคนอื่นๆ (2001b : 228-233) ได้ศึกษาผลของโปรตีน VP28 (ซึ่งได้จากการแสดงออกของยีน vp28 โดยใช้ baculovirus system) ต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าโพลีโคลนอนแอนติบอดีของกระต่ายที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 ที่ผสมกับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวก่อนนำไปฉีดให้กุ้ง สามารถ neutralize เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยทำให้กุ้งไม่ตาย จึงเชื่อว่าโปรตีน VP28 นี้จะอยู่บน spike บนเปลือกหุ้มอนุภาคของไวรัสตัวแดงดวงขาว และเกี่ยวข้องกับ การเกิด initiation infection ของเชื้อ

ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน VP28 คือยีน vp28 ยีนมีความยาว 615 bp (ภาพประกอบ 1) กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 204 ตัว ขนาดของโปรตีนที่ได้จากการคำนวณ (deduced molecular weight) คือ 22 kDa แต่ขนาดจริงที่ได้จากการแยกบน Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) มีขนาดประมาณ 28 kDa โดยมีบริเวณที่เป็น strong hydrophobic region 2 บริเวณซึ่งจัดเรียงตัวแบบ α -helix คือ บริเวณปลาย N ลำดับอะมิโนที่ 9-27 และบริเวณ ปลาย C ลำดับอะมิโนที่ 89-99 (ภาพประกอบ 2) จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ายีน VP28 จัดเป็น late gene โดยเริ่มมีการแสดงออกของ RNA และ โปรตีนหลังจากกุ้งได้รับเชื้อแล้ว 6 และ 18 ชม. ตามลำดับ (Zhang; et al. 2002 : 1069-1074)

VP28

VP28F
1: ATGGATCTTTCTTTCACTCTTTTCGGTCGTGTCGGCCATCCTCGCCATCACT
1: M D L S F T L S V V S A I L A I T

52: GCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTATAGGTATCACAACACTGTGACC
18: A V I A V F I V I F R Y H N T V T

VP28F118
103: AAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAAC
35: K T I E T H T D N I E T N M D E N

154: CTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACT
52: L R I P V T A E V G S G Y F K M T

205: GATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGA
69: D V S F D S D T L G K I K I R N G

256: AAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCACTCCC
86: K S D A Q M K E E D A D L V I T P

307: GTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAG
103: V E G R A L E V T V G Q N L T F E

358: GGAACATTCAAGGTGTGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGT
120: G T F K V W N N T S R K I N I T G

409: ATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCTTTTGTCGGTAGCTCC
137: M Q M V P K I N P S K A F V G S S

460: AACACCTCCTCCTTCACCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACC
154: N T S S F T P V S I D E D E V G T

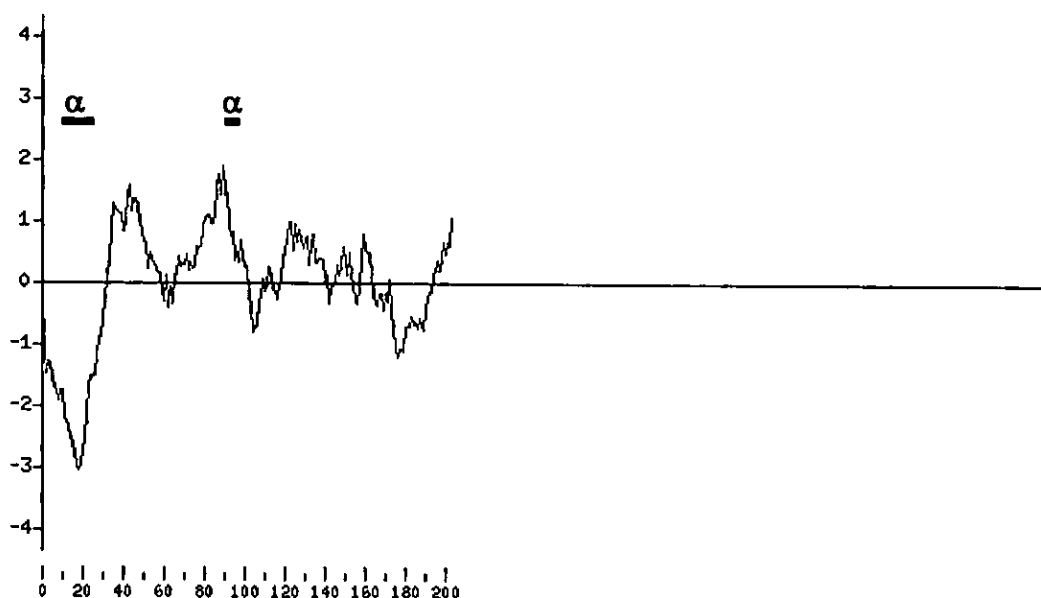
511: TTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGA
171: F V C G T T F G A P I A A T A G G

VP28R
562: AATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTACCTACTCTGGCACTGAGACCGAG
188: N L F D M Y V H V T Y S G T E T E

613: TAA
: *

ภาพประกอบ 1 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน VP28 โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่ง และทิศทางของลำดับเบสของยีน *vp28* ที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง primer ที่ใช้ในการ ทดลอง โดยชื่อของ primer กำกับอยู่บนลูกศร (Van Hulten; et al. 2000b : 227-236 ; Genbank accession no: AF380842)

Protein : VP28



ภาพประกอบ 2 แสดงการวิเคราะห์ Protein's Hydropathic Profile ของโปรตีน VP28 โดยคำนวณตามวิธีของ Kyte-Doolittle (Van Hulten; et al. 2000b : 227-236) พบว่าโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N ตำแหน่งที่ 9-27 และ ตำแหน่งที่ 89-99 ทางปลาย C มีแนวโน้มเป็น hydrophobic part โดยแกน X แสดงลำดับอะมิโน และแกน Y แสดงค่า hydrophilicity ของกรดอะมิโน

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibodies : MAb)

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายลิมโฟไซต์ชนิด B (B cell) จำนวนมากจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และมีการพัฒนาต่อไปจนกระทั่งทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ลิมโฟไซต์ชนิด B แต่ละเซลล์จะผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันไป แอนติบอดีผสมเหล่านี้เรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เพราะว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมามีความจำเพาะต่อ epitope ต่างๆที่อยู่บนผิวของแอนติเจนได้ในเวลาเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามโมโนโคลนของเซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่ผลิตได้ทั้งหมดนี้จะมีความจำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจนเพียง epitope เดียวเหมือนกัน (สุทธิพันธ์; และคนอื่นๆ. 2537)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คิดค้นโดย G.kohler และ C.Milstein ในช่วงกลางปี 1970 จากผลงานดังกล่าวทำให้ทั้งสองท่านได้รับรางวัลโนเบลสาขาการแพทย์ในปี 1984 สำหรับวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นทำได้โดยฉีดแอนติเจนที่สนใจเข้าไปในหนู จากนั้นหนูก็น่าจะมีการตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกัน โดยการที่ม้ามของหนูจะกระตุ้นลิมโฟไซต์ชนิด B ให้จดจำแอนติเจน นำลิมโฟไซต์ชนิด B จากม้ามของหนูมาผสมกับ myeloma cell (malignant B cell หรือ myeloma cells เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด) เมื่อเซลล์ 2 ชนิดเชื่อมเข้าด้วยกัน ก็จะมีการหลอมรวมกันได้เซลล์ใหม่เรียกว่า hybridoma

Hybridoma cell มีส่วนหนึ่งของเซลล์เป็น myeloma cell สามารถแบ่งตัวซ้ำๆ กันได้ ขณะเดียวกันอีกส่วนหนึ่งก็เป็น spleen cell ทำให้ hybridoma cell สามารถหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเพียงชนิดเดียวได้ซึ่งเรียกว่า monoclonal antibody Hybridoma มากมายหลายชนิดสามารถผลิตขึ้นได้โดยวิธีการเดียวกันนี้ ถ้าหากต้องการแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งก็สามารถทำการผลิตและทดสอบเพื่อหา hybridoma ที่ต้องการจากนั้นก็ทำการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกและทำการเพาะเลี้ยงไว้ใช้ต่อไป

ถึงแม้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกในปี 1975 และใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัย นักวิทยาศาสตร์ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในหลายๆ ด้านโดยเฉพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคและการบำบัดโรค การตรวจวินิจฉัยโรคในหลายๆ กรณีได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างได้ผล โดยทั่วไปวิธีการเหล่านี้มีความไวกว่า และมีความแม่นยำมากกว่าวิธีการที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ ตัวอย่างการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตั้งครรภ์ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้แม้จะมีการตั้งครรภ์เพียง 10 วันเท่านั้น ส่วนตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบ (hepatitis) ไข้หวัดใหญ่ (influenza) เริม (herpes) รวมทั้งการติดเชื้อ *Streptococcus* และ *Chlamydia* เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้ออื่นๆ รวมทั้งอาการแพ้ต่างๆ ขึ้นมาอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังได้มีความก้าวหน้าในการใช้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมาตรฐานวินิจฉัยมะเร็งชนิดต่างๆ โดยใช้ตรวจสอบ malignant cells ก่อนที่เซลล์นั้นจะเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นก้อนเนื้ออกหรือมะเร็ง (Black. 1996)

การศึกษาเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวและการวิเคราะห์การติดเชื้อ

Anderson และ Prior (1992 : 265-273) ได้ตรวจพบ non-occluded baculovirus ในปูทะเล (*Scylla serrata*) และกุ้ง crayfish (*Cherax quadricarinatus*) จากประเทศออสเตรเลียทั้งในระยะวัยรุ่น (juvenile) และตัวเต็มวัย จากการรวบรวมกุ้ง crayfish จากฟาร์มในรัฐ Queensland ทั้งหมด 61 ตัวมาทำการศึกษา พบว่า 32 ตัว (52%) ได้รับเชื้อ baculovirus จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา โดยนำ hepatopancreas มา fixed ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการทาง histology โดยตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และย้อมด้วยสีอีมาท็อกไซลินและอีโอซิน (H&E) นอกจากนี้ยังได้มีการนำสี Giemsa, Calcian blue, Gram, Feulgen และ periodic acid-Schiff (PAS) มาย้อมเนื้อเยื่อตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาคุณลักษณะของ inclusion พบว่า ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนของ crayfish มี eosinophilic inclusions และพบว่าเซลล์เยื่อบุของตับและตับอ่อนที่ได้รับเชื้อไวรัสมีนิวเคลียสขยายใหญ่กว่าเดิมถึง 2.5 เท่าของเซลล์ปกติอินคลูชันมีสีแดง แต่บางอินคลูชันก็มีสีม่วงแดง และไม่ถูกย้อมด้วย PAS, Giemsa, Gram, Feulgen และ alcian blue และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า นิวคลีโอแคปซิดมีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก (cylindrical) มีขนาดโดยเฉลี่ย 34 x 154 nm อนุภาคไวรัสมีความยาว 172-220 nm และมี เปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส ปกคลุมอยู่อย่างหลวมๆ ในปูทะเล (*S. serrata*) ตรวจพบว่า 27% ของตัวอย่างที่รวบรวมได้ได้รับเชื้อ baculovirus และมี basophilic inclusions ภายในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวของตับและตับอ่อนขยายใหญ่ขึ้นถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ นิวคลีโอแคปซิดมีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก เช่นเดียวกับที่พบใน crayfish (*Cherax*) มีขนาดโดยเฉลี่ย 24 x 205 nm อนุภาคของไวรัสมีความยาว 24-253 nm มีเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและมีโครงสร้างคล้ายเส้นใย (filament-like structure) ยื่นออกมาจากเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสด้วย

ต่อมา Kasornchandra และ Boonyaratpalin (1994 : 9-12) ได้รายงานถึงการตายของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในแถบอำเภอรโนด และอำเภोजะนะ จังหวัดสงขลา รวมทั้งในอำเภอะะเหลียน จังหวัดตรัง ในช่วงปลายเดือนพฤศจิกายนถึงปลายเดือนธันวาคม 1994 ลักษณะอาการที่พบคือ กุ้งจะกินอาหารน้อยลง กุ้งลอยขึ้นมาเกยขอบบ่อ และมีอาการตัวแดงเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นจะพบว่ากุ้งจะตายหมดในเวลา 3.5 วัน กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคในครั้งนี้มีอายุประมาณ 40-95 วัน จากการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ลิมฟอยด์ออร์แกน (lymphoid organs) เหงือก ขาเดิน อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับ

การสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic organs) กระเพาะอาหารและทางเดินอาหาร แต่ไม่พบในเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน นิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวของอวัยวะต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยกเว้นตับและตับอ่อนจะมีการขยายตัวใหญ่ขึ้น (hypertrophied nuclei) โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุผิว subcuticular epithelium ของ stomach lining นิวเคลียสของเซลล์ดังกล่าวจะย้อมติดสีแดง (eosinophilic type) เมื่อย้อมด้วยสีอีมาทอกไซลินและอีโอซิน (H&E) การติดสีของนิวเคลียสดังกล่าวจะมีการพัฒนาไปตามการขยายตัวใหญ่ขึ้นของนิวเคลียสที่ผิดปกติ กล่าวคือในระยะแรกนิวเคลียสจะติดสีแดงแล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นติดสีน้ำเงินอ่อนๆ (lightly basophilic) นอกจากนั้นยังพบนิวเคลียสที่ติดสีแดงและมีแถบสีน้ำเงินของโครมาติน (chromatin) ล้อมรอบอยู่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับนิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ IHNV (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus) ที่พบในกุ้งหลายชนิดรวมทั้งกุ้งกุลาดำด้วย

ในปีเดียวกัน Kasomchandra และ Boonyaratpalin (1994 : 1-11) ได้ทดลองฉีดสารสกัดจากเหงือกของกุ้งกุลาดำที่มีอาการตัวแดงขาวเข้าไปในกุ้งกุลาดำปกติ ซึ่งสารสกัดนี้กรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน พบว่า กุ้งปกติเมื่อได้รับสารสกัดจะแสดงอาการของโรคตัวแดงขาวและจะตายภายใน 3 วัน เมื่อนำตัวอย่างกุ้งดังกล่าวมาตรวจสอบความผิดปกติของเนื้อเยื่อและเซลล์ พบว่ามีความผิดปกติเช่นเดียวกับกุ้งที่เป็นโรคจากบ่อเลี้ยง จะแตกต่างกันตรงที่ไม่พบอาการตัวขาวที่เปลือกร่วมอยู่ด้วย ซึ่งลักษณะตัวแดงดังกล่าวก็พบใน กุ้งบางตัวจากบ่อเลี้ยงเช่นกัน เมื่อนำตัวอย่างชิ้นส่วนเหงือก หัวใจ และลิมฟอยด์ออร์แกนไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ในส่วนของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้นภายในเต็มไปด้วยอนุภาคไวรัสที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (bacilliform morphology) มีขนาดความยาวประมาณ 300-340 nm และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 120 nm ซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาดใหญ่กว่าไวรัสหัวเหลืองประมาณ 1 เท่า จากภาพตัดขวางของอนุภาคไวรัสเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่านิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) และเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (envelope) ส่วนที่หุ้มอนุภาคของไวรัสชนิดนี้เป็นชนิด trilaminar envelope เหมือนกับไวรัสหัวเหลือง และไวรัสในกลุ่ม Baculoviridae ทั่วไป เช่น ไวรัส MBV เป็นต้น และเมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยสีพิเศษคือ acridine orange ที่ใช้สำหรับแยกชนิดสารพันธุกรรม พบว่านิวเคลียสที่ผิดปกตินั้นย้อมติดสีเขียว แสดงว่า ไวรัสที่อยู่ภายในนิวเคลียสนั้นเป็นชนิด DNA

ปีต่อมา Chou และคนอื่นๆ (1995 : 133-141) ได้ทำการศึกษาพบว่า มีโรคแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในกุ้งเพาะเลี้ยงตระกูล penaeid หลายชนิดในประเทศไต้หวัน รวมทั้งกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งกุลามา (*Penaeus Japonicus*) และกุ้งหางแดง (*Penaeus penicillatus*) กุ้งที่เป็นโรคเหล่านี้จะมีอาการปรากฏให้เห็นคือ เป็นดวงขาวบนแผ่นแก้มปิดเหงือก (carapace) บนระยางค์ (appendages) และที่ผิวลำตัว ลักษณะอาการที่ปรากฏนี้เรียกว่า white spot syndrome (WSS) กุ้งกุลามาปกติ (*P. Japonicus*) จะแสดงอาการตัวขาวเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำกรองได้จากการเพาะเลี้ยง

กึ่งคูรูมา (*P. Japonicus*) และกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรค กึ่งที่เป็นโรคนี้จะมีอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5-7 วัน โดยเป็นผลมาจากความเครียดจากการจับ และอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมด้วย จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีอนุภาคของไวรัสซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อน (non-occluded rod-shaped viral particle) อยู่ที่ผิวหนัง (epidermis) ของกึ่งคูรูมาที่ได้รับเชื้อเองตามธรรมชาติ และจากการได้รับเชื้อในห้องทดลอง อนุภาคของไวรัสเหล่านี้ถูกปกคลุมด้วยเปลือกหุ้มอนุภาคมีความยาว 330 ± 20 nm และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 87 ± 7 nm ลักษณะอาการที่ปรากฏภายนอกและสัณฐานวิทยาของไวรัส มีความคล้ายคลึงกันทั้งในกึ่งที่ได้รับเชื้อเองตามธรรมชาติและกึ่งที่ถูกทำให้ได้รับเชื้อในห้องทดลอง ซึ่งข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า ไวรัสรูปท่อนชนิดนี้อาจจะเป็นสาเหตุหลักของการที่กึ่งเป็นโรค white spot syndrome ในประเทศไต้หวัน

Wang และคนอื่นๆ (1995 : 239-242) ได้เก็บรวบรวมกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรคทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันแล้วนำมาตรวจลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ประกอบกับการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า กึ่งกุลาดำที่เป็นโรคมีลักษณะเป็นดวงขาวบริเวณเปลือกกระพุ้งแก้มที่ปิดเหงือก ขณะที่ผลจากการศึกษาทางด้าน histology พบว่า ผิวหนังของกึ่งที่เป็นโรคได้รับเชื้อไวรัส และเซลล์ของเนื้อเยื่อนี้จะสลายตัว (degenerated cell) นิวเคลียสขยายใหญ่ และเมื่อนำเยื่อบุผิวของกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวไปทำ ultrathin section แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ปรากฏว่าพบ non-occluded baculo-like viral particles จำนวนมากในบริเวณที่มีการตายของเนื้อเยื่อ (necrotic areas) นิวเคลียสที่มีการขยายใหญ่จะเต็มไปด้วยอนุภาคของไวรัส อนุภาคของไวรัสมีรูปร่างเป็น fusiform หรือ rod shaped บริเวณปลายของอนุภาคกลมมนคล้ายลูกปิง เมื่อย้อมสีแบบ negative stained พบว่า อนุภาคไวรัสมีความกว้าง 70-150 nm มีความยาว 250-380 nm บางอนุภาคมี tail-like projection ยื่นออกมาจากปลายด้านหนึ่งของอนุภาค ส่วนที่เป็นนิวคลีโอแคปซิดไม่มีเปลือกหุ้ม อนุภาคไวรัสมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 58-67 nm และมีความยาว 330-350 nm ขณะที่นิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วยวงแหวนของ subunits เรียงต่อกันเป็นอนุกรม ความหนาของวงแหวนค่อนข้างคงที่คือ 20 nm สัณฐานวิทยาของไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) คล้ายกับ SEMBV (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus) แต่แตกต่างจาก BMN (Baculoviral midgut gland necrosis virus) และ PmSNPV (*P. monodon* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus = MBV)

ในปีเดียวกัน Wang และคนอื่นๆ (1995 : 239-242) ได้ทำการแยกไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคและทำบริสุทธิ์ โดยนำกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวมาล้างด้วย TE buffer ที่เย็น จากนั้นผ่าตัดเอาผิวหนังหุ้มลำตัวออกมาขณะที่กึ่งยังมีชีวิตอยู่ นำมาสกัดด้วย extraction buffer ที่เย็น นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยปั่นหมุนเหวี่ยงใน sucrose gradient 3.5-6.5% (w/w) ที่ความเร็ว 74,700 g เป็นเวลา 60 นาที แถบของไวรัสจะปรากฏอยู่ที่บริเวณตรงกลางของ gradient นำแถบของไวรัสออกมาและนำตะกอนส่วนนี้ไปปั่นหมุนเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 74,700 g

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างตะกอนที่ได้ 2 ครั้งด้วย TE buffer ที่เย็น และละลายตะกอนใน TE buffer นำตะกอนที่บริสุทธิ์นี้ไปสกัด DNA สำหรับการสกัด genomic DNA ของไวรัสกระทำโดยย่อยด้วย proteinase K และ *N*-acetyl *N,N,N*-triethylammonium bromide (CTAB) และสกัดโปรตีนออกจากด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม และตกตะกอน DNA ที่สกัดได้ด้วย เอทานอล ส่วนการประมาณขนาดของจีโนมของไวรัสกระทำโดยย่อย genomic DNA ด้วย *Hind*III จากนั้นแยก restriction fragments ที่ได้จากการย่อยด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ 0.8% agarose gel ใน Tris-acetate buffer (TAE) และใช้ λ -phage DNA *Hind*III fragments เป็น marker จากผลการทดลอง พบว่า genomic DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อย่อยด้วย *Hind*III จะได้อย่างน้อย 22 fragments ใน agarose gel ซึ่งมีขนาดต่างๆ กัน ดังนี้ 19.4, 16.9, 14.9, 12.5, 10.0, 9.6, 8.4, 8.0, 7.3, 6.1, 5.5, 4.8, 4.3, 3.9, 3.6, 3.3, 3.0, 2.5, 2.0, 1.6, 1.4 และ 1.1 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งเมื่อประมาณความยาว DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาว คาดว่าจะยาวกว่า 150 กิโลเบส และจากการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงจัดไวรัสตัวแดงดวงขาวไว้ในจีนัส non-occluded Baculovirus (NOB) และให้ชื่อว่า PmNOB

Lo และคนอื่นๆ (1996: 131-141) ได้ตรวจพบไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome baculovirus : WSBV) ในกุ้งหลายชนิดในประเทศต่างๆ ของทวีปเอเชียโดยใช้ 1-step PCR reaction นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย WSBV ที่มีความไวสูง คือการใช้ 2-step PCR amplification โดยใช้ nested primers ที่มีความไวสำหรับตรวจหา WSBV โดยใช้เทคนิค PCR ความไวของการตรวจวินิจฉัยโดยใช้ 2-step PCR สูงกว่า 1-step PCR ประมาณ 10^3 - 10^4 เท่า และจากการใช้ 2 เทคนิคนี้คือ 1 และ 2-step PCR ทำให้ประสบความสำเร็จในการตรวจหา DNA ของ WSBV ในกุ้งที่เพาะเลี้ยง ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กุ้งกุลูมา (*P. japonicus*) กุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) และกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) พบว่า กุ้งเหล่านี้มีอาการตัวแดงดวงขาว ซึ่งกุ้งเหล่านี้เก็บรวบรวมได้จากฟาร์มกุ้งบริเวณต่างๆ กัน จากการตรวจวิเคราะห์ DNA ที่สกัดได้จากกุ้งที่เก็บรวบรวมได้โดยใช้ 1-step PCR amplification พบว่า ให้ PCR product ขนาด 1477 bp นอกจากนี้ยังพบว่ามีบางตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์คือ ปูทะเล (*Scylla serrata*) ที่เพาะเลี้ยงได้รับเชื้อ WSBV ด้วย เมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1-step PCR ขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ จะให้ผลบวกเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 2-step PCR amplification ในการตรวจหา WSBV specific DNA fragment ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่า กุ้งชนิดนี้ได้รับเชื้อ WSBV ด้วย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ทำให้คณะผู้วิจัยยืนยันว่า กุ้งที่จับได้จากธรรมชาตินั้น ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งกุลูมา กุ้ง *Penaeus semisulcatus* กุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) ปูกางเขน (*Charybdis feriatius*) ปูม้า (*Portunas pelagicus*) และ ปูสามจุด (*Portunus sanguinolentus*) ซึ่งรวบรวมได้จากชายฝั่งทางใต้ของประเทศได้วันได้รับเชื้อ WSBV ด้วย และจากการตรวจหา WSBV ในอาร์โทรพอดซึ่งรวบรวมได้จากฟาร์มกุ้งที่ได้รับเชื้อ WSBV ปรากฏว่า

โรน้า (*Helice tridens*) small pest (Palaemonidae shrimp) และตัวอ่อนของ Ephyridae insect เป็นโฮสต์ของ WSBV ด้วย

Chang และคนอื่นๆ (1996: 131-139) ได้ทำการตรวจหาอวัยวะเป้าหมายของ WSBV โดยตัดเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อเข้าไปที่เวลา 0 16 22 40 52 และ 64 ชั่วโมงมาตรวจหา WSBV โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization โดยทำการ hybridized เนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อซึ่งผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้วด้วย PmNOBIII (*P. monodon* non-occluded baculovirus III) DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin พบว่า เซลล์ที่เริ่มให้ผลบวกกับการตรวจหา WSBV โดยเทคนิคนี้คือ 16 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อคือ เซลล์ของกระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis และตับ-ตับอ่อน ขณะที่เวลา 22 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ จะพบ WSBV ที่อวัยวะน้ำเหลือง antennal gland เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด กล้ามเนื้อ midgut และ hindgut ส่วนเนื้อเยื่อประสาทและตาประกอบ (compound eyes) จะพบ WSBV หลังจากได้รับเชื้อเข้าไปแล้ว 40 ชั่วโมง เนื้อเยื่อต่างๆ ที่พัฒนามาจาก mesoderm และ ectoderm เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อบุผิว เนื้อเยื่อประสาท และกล้ามเนื้อ สามารถถูก infected ได้โดย WSBV และที่เวลา 52 และ 64 ชั่วโมงหลังจากการได้รับเชื้อ พบว่า กระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด และ antennal gland ได้รับเชื้อ WSBV อย่างรุนแรงจนกระทั่งเนื้อเยื่อเหล่านี้กลายเป็น necrotic ส่วนอาการตัวแดงตัวขาวจะสังเกตเห็นเมื่อได้รับเชื้อ WSBV เข้าไปแล้ว 40 ชั่วโมง และกุ้งจะเริ่มตายที่เวลา 64 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ขณะที่ probe ไม่ให้ผลบวกกับเนื้อเยื่อของปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ WSBV

Lo และคนอื่นๆ (1997 : 53-72) ได้ทำการตรวจหา WSBV และชนิดของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ (tissue tropism) ของไวรัสชนิดนี้ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) โดยเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์จากชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันระหว่างเดือนกรกฎาคม 1995 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 1996 นำมาแยกเอา pleopods ออกแล้วสกัด DNA เพื่อใช้เป็น template ในการตรวจหา WSBV โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า กุ้งกุลาดำเพศผู้ 40% ให้ผลบวกกับขั้นตอนแรกของการ amplified ทั้ง 2 ขั้นตอน นอกจากนี้ยังพบว่าการแพร่กระจายของ WSBV ในพ่อแม่พันธุ์จะมีแพร่กระจายมากในช่วงฤดูร้อนถึงฤดูใบไม้ร่วง (กรกฎาคมถึงพฤศจิกายน) ส่วนฤดูหนาว (ธันวาคมถึงกุมภาพันธ์) จะพบ WSBV ได้น้อย จากการศึกษาความชอบเนื้อเยื่อของ WSBV ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค PCR และตรวจดูเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านร่วมกัน เพื่อตรวจหาตำแหน่งที่มีการเพิ่มจำนวนไวรัส พบว่า pleopods เหงือก กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อท้อง เลือด midgut หัวใจ pereopods ลิมฟอยด์ออร์แกน เปลือกหุ้มลำตัว เนื้อเยื่อประสาท ตับและตับอ่อน อัณฑะ รังไข่ spermatophore และ ก้านตาเป็นแหล่งที่ WSBV มีการเพิ่มจำนวน และจากการตรวจด้วย *in situ* hybridization ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า มี WSBV อยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organs) ของกุ้งกุลาดำ โดยในอัณฑะ เซลล์ที่ตรวจพบ WSBV อยู่ที่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ล้อมรอบหลอด

สร้างตัวอสุจิ (seminiferous tubules) แต่ไม่พบใน germ cells ในเนื้อเยื่อของ spermatophore เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อเยื่อ spermatophore เท่านั้นที่พบ WSBV ส่วนในรังไข่พบ WSBV ในเซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cells) โอโอโกเนีย (oogonia) โอโอไซด์ (oocytes) และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่าเซลล์ปกติ 2-3 เท่า และเป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ที่มี WSBV ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ epidermis อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจพบว่ามี mature eggs ถูก infected ด้วย WSBV อาจเป็นไปได้ว่า เซลล์ไข่ที่ได้รับ WSBV ถูกฆ่าโดยไวรัสก่อนที่จะถึง maturation นอกจากนี้ยังตรวจพบ WSBV ในปูสามจุด (*P. sanguinolentus*) ที่ใช้เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำโดยเทคนิค PCR เมื่อตรวจผลซ้ำด้วยวิธีทาง histology เช่น *in situ* hybridization และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า มีอวัยวะ 3 ชนิดที่ได้รับเชื้อ WSBV ได้แก่ หัวใจ กระเพาะอาหาร และ midgut ซึ่งภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสามารถเห็นอนุภาคของไวรัสชนิดนี้ในเซลล์ทั่วไป และไม่มี ความแตกต่างระหว่าง WSBV ที่พบครั้งนี้เทียบกับการศึกษาของคนอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน

Tapay และคนอื่นๆ (1997 : 285-292) ได้ทำการแยก chinese baculovirus-like virus (CBV) จาก cephalothorax ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus japonicus*) ที่เป็นโรคซึ่งนำมาจากประเทศจีน โดยบด cephalothorax ใน antibiotic incubation medium (AIM) ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลิน เจนตามัยซิน สเตربتอมัยซิน และ แอมโฟเทอริซิน แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง รวบรวมส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.2 ไมครอน นำไวรัสที่เตรียมได้มาฉีดเข้ากล้ามเนื้อของกุ้ง *P. stylirostris* (blue shrimp) และ *P. vannamei* (white shrimp) ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 4-20 กรัม ปริมาตร 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อตัว ขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุมเป็นกุ้งปกติที่ไม่ได้รับเชื้อมาก่อนโดยฉีดด้วย TNE buffer (pH 7.4) ทำการเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ทุกวัน บันทึกจำนวนกุ้งที่ตาย ส่วนกุ้งที่กำลังจะตายจะถูกแยกออกจากอ่างเพาะเลี้ยงและนำมาศึกษาทาง histopathology พบว่ากุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ที่ได้รับเชื้อ CBV จะเริ่มตายภายใน 2 วัน และ ตายลงทั้งหมดภายในเวลา 4 วัน อัตราการตายสะสมของกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ ที่เวลา 2 วันหลังจากได้รับเชื้อคือ 14% สำหรับ white shrimp และ 17% สำหรับ blue shrimp ส่วนอัตราการตายสะสมของกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ที่เวลา 3 วันหลังจากได้รับเชื้อคือ 57% สำหรับ white shrimp และ 73% สำหรับ blue shrimp และกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์จะตายลงทั้งหมด (100%) หลังจากได้รับเชื้อ 4 วัน ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุม ไม่พบการตาย และจากการศึกษาทางด้าน histopathology โดยนำเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของกุ้งที่ได้รับเชื้อและกุ้งกลุ่มควบคุมมา fixed ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการต่างๆ แล้วนำส่งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า กุ้งทั้ง 2 สปีชีส์แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อคล้ายๆ กัน โดยพบใน loose connective tissue ทุกบริเวณ cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด antennal gland ของกุ้งที่ได้รับเชื้อ CBV ปรากฏอาการ necrosis ลักษณะของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ CBV จะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ ส่วนการศึกษาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยนำชิ้นส่วนของเหงือก ตับและตับอ่อน ของกุ้งตัวอย่างที่ได้รับเชื้อ CBV

และกึ่งกลุ่มควบคุมมา fixed ด้วย 3% glutaraldehyde ใน 0.5 M cacodylate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำตัวอย่างไป fixed อีกครั้งใน 1.33-1.5% osmium tetroxide ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า CBV ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้ง มีรูปร่างเป็นแท่ง นิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ CBV มีการขยายตัว อนุภาคของไวรัสมีเปลือกหุ้มหลายชั้น มีความยาวเฉลี่ย 265 ± 20 nm และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 120 ± 10 nm (จำนวนตัวอย่าง 20 ตัว) ความยาวของนิวคลีโอแคปซิด 205 ± 12 nm และเส้นผ่าศูนย์กลาง 78 ± 5 nm ช่องว่างระหว่างเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและนิวคลีโอแคปซิด 12 ± 2 nm ส่วนดับและดับอ่อนของกุ้งที่ได้รับเชื้อไม่ปรากฏอาการเช่นที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกเช่นเดียวกับกึ่งกลุ่มควบคุม

ในปีต่อมา Kanchanaphum และคนอื่นๆ (1998 : 1-7) ได้ทำการศึกษาปู 3 ชนิดที่คาดว่า จะเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวปูทั้ง 3 ชนิดนี้ได้แก่ ปูแสม (*Sesarma* sp.) ปูทะเล (*S. serrata*) และปูก้ามดาบ (*Uca pugilator*) ปูทั้งหมดนี้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดเข้าไป แต่ปูเหล่านี้ก็ยังไม่แสดงอาการออกมาให้เห็น และไม่มีการตายเกิดขึ้นตลอดช่วง 45 วันของการทดลองแต่จะมีไวรัสแฝงตัวอยู่เป็นจำนวนมาก (แต่จะตรวจพบเมื่อวินิจฉัยทาง histology, specific *in situ* hybridization และ PCR amplification) ปูทุกชนิดที่เป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวนี้สามารถถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งกุลาดำได้โดยผ่านทางน้ำที่อยู่ในบ่อเพาะเลี้ยง หรือที่กักขังสัตว์น้ำซึ่งมีการเลี้ยงทั้งกุ้งและปูร่วมกัน การถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งถูกตรวจพบโดยใช้ *in situ* DNA hybridization และเทคนิค PCR หลังจากให้ปูและกุ้งอยู่ร่วมกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่เมื่อให้กุ้งและปูก้ามดาบอยู่ร่วมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้โดยใช้ PCR amplification และหลังจากการอยู่ร่วมกัน 60 ชั่วโมงจึงจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้ *in situ* hybridization ขณะที่ปูทะเล (*S. serrata*) เมื่ออยู่ร่วมกับกุ้ง พบว่า จะมีการถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งหลังจากที่อยู่ร่วมกันเป็นเวลา 36 ชั่วโมงเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ PCR และตรวจพบที่ 60 ชั่วโมงเมื่อวิเคราะห์ด้วย *in situ* hybridization ส่วนปูแสม (*Sesarma* sp.) เมื่อเลี้ยงรวมกับกุ้งกุลาดำจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาว หลังจาก 48 ชั่วโมงเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ PCR และ 72 ชั่วโมงเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ *in situ* hybridization จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปูเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาว

Supamattaya และคนอื่นๆ (1998 : 79-85) ได้ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวไปยังสัตว์ครึ่งตัวเขี่ยน 3 ชนิดที่มักพบเป็นประจำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปูม้า (*P. pelagicus*) ปูทะเล (*S. serrata*) และกุ้งเคย (*Acetes* sp.) สำหรับการเตรียมสารสกัดจากเหงือก กระทำโดยนำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมาบดใน lobster haemolymph medium (LHM), pH 7.4 อัตราส่วนเนื้อเยื่อต่อ LHM เท่ากับ 1:10 บดแยกตะกอนทิ้งที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสนำมากรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร ย้อมสีแบบ negative

staining ด้วย phosphotungstic acid ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด สารสกัดที่ได้จะนำไปฉีดและจุ่ม (immersion) สัตว์ทดลอง ทำการทดลองโดยให้กึ่งเคยได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีด การจุ่ม และการกินเนื้อเยื่อของกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคเข้าไปในเวลาต่างๆ กัน ส่วนปูทั้ง 2 ชนิดทำให้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดและการกินเท่านั้น จากนั้นนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์ครึ่งตะเขยทั้ง 3 ชนิด โดยวิธีการทาง histology กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ *in situ* hybridization โดยใช้เนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำปกติที่ไม่ติดเชื้อและเนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็น negative และ positive control ตามลำดับ พบว่า กึ่งเคยมีลำตัวสีแดงภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังจากฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว และการให้ได้รับเชื้อโดยการฉีดจะให้ผลดีที่สุดคืออัตราการตายเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 วัน รองลงมาคือ การจุ่มกึ่งเคยในสารสกัดจากเนื้อเยื่อเหงือกของกึ่งกุลาดำที่เป็นโรค ซึ่งจะมีการตายทั้งหมดภายในเวลา 5 วัน และการให้กินเนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคจะทำให้กึ่งเคยตายลง 20 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 9 วัน สำหรับปูทั้ง 2 ชนิด การฉีดจะให้ผลดีที่สุด โดยที่การฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว ให้ปูม้าจะทำให้ปูม้าตายลงทั้งหมดภายในเวลา 8 วัน ส่วนปูทะเลตายลงเพียง 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นภายในเวลา 9 วัน การให้ปูทั้ง 2 ชนิดกินเนื้อเยื่อของกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคปูทั้ง 2 ชนิดยังสามารถดำรงชีวิตได้มากกว่า 9 วัน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการที่สัตว์ทดลองได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวก็ไม่จำเป็นที่สัตว์ทดลองนั้นจะต้องตายลงทั้งหมด จึงเป็นไปได้ว่ากึ่งเคยและปูทั้ง 2 ชนิด เป็นแหล่งพาหะของไวรัส และนำเชื้อไวรัสจากบ่อหนึ่งไปยังอีกบ่อหนึ่งได้ และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ผลการศึกษาทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยังพบว่า เซลล์เม็ดเลือด เซลล์เหงือก และเซลล์เยื่อบุผิวของกึ่งเคยที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ ลักษณะเช่นนี้ก็พบในปูทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเชื้อไวรัสด้วยเช่นกัน และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า อนุภาคของไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อนเช่นเดียวกับที่พบในกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อโดยใช้ *in situ* hybridization ที่ใช้ probe ขนาด 4.2 กิโลเบสที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิดที่มีนิวเคลียสขยายใหญ่ให้ผลบวกกับ *in situ* hybridization ในทางตรงกันข้ามเซลล์ของเนื้อเยื่อกึ่งและปูปกติไม่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้

Nadala และคนอื่นๆ (1998 : 221-229) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสัณฐานวิทยา (morphology) คุณลักษณะทางชีวเคมี และจีโนม (genome) ของไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว 3 ไอโซเลต (isolate) ซึ่งแยกได้จากกึ่งทะเลทรายกุล penaeid 3 ชนิดที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ กัน โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเมื่อย้อมตัวอย่างแบบ negative stain การวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสด้วย sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) การวิเคราะห์ด้วย Western blot และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ไวรัส

ทั้ง 3 ไอโซเลต มีโครงสร้างคล้ายกับ baculovirus ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว ความกว้างยาวของนิวคลีโอโปรตีนเหมือนกันทั้ง 3 ไอโซเลต กล่าวคือ มีความยาวประมาณ 316-350 nm และจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE พบว่า ไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลตมีแถบโปรตีนอย่างน้อย 3 แถบ (band) ที่ตรงกับโปรตีนที่พบในไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 23.5 และ 27.5 กิโลดาลตันตามลำดับ ขณะที่ผลจากการวิเคราะห์ด้วย western blot ปรากฏว่า โปรตีนทั้ง 3 แถบที่พบในทั้ง 3 ไอโซเลตมีตำแหน่งตรงกัน และจากการวิเคราะห์จีโนมของไวรัสด้วยเทคนิค RFLP โดยตัด DNA ของไวรัสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ปรากฏว่า ถึงแม้ว่า 3 ไอโซเลตจะเหมือนกันเมื่อตัดด้วย *EcoRI* แต่ไวรัสที่แยกได้จากกึ่งคูรูมา (*P. japonicus*) ซึ่งเก็บรวบรวมมาจากประเทศจีน จะมีจีโนมที่แตกต่างจากไวรัสอีก 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) ซึ่งรวบรวมมาจากประเทศอินโดนีเซีย และกึ่ง *Penaeus setiferus* ซึ่งรวบรวมมาจากประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อตัดด้วย *HindIII*

ในปีเดียวกัน Nadala และคนอื่นๆ (1998 : 221-229) ได้แยก non-occluded baculovirus จากกึ่งคูรูมา (*P. japonicus*) ซึ่งรวบรวมได้จากประเทศจีนและเรียกไวรัสชนิดนี้ว่า Chinese baculovirus (CBV) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะ จากการนำอนุภาคไวรัสมาย้อมแบบ negative stain แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า CBV มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shaped) ห่อหุ้มด้วย lipid envelope มีความยาวประมาณ 322-378 nm และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 130-159 nm นิวคลีโอโปรตีนยาว 316-350 nm และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 65-66 nm มี DNA เป็นสารพันธุกรรมจับอยู่กับโปรตีนโมเลกุลต่ำ ผลจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนเด่นๆ อย่างน้อย 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 19 23.5 27.5 และ 75 กิโลดาลตัน จากการวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัสด้วย Western blot โดยใช้ polyclonal hyperimmune serum ต่อ CBV พบว่า โปรตีนโครงสร้างของไวรัสคือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19 27.5 และ 75 กิโลดาลตัน และโปรตีนเหล่านี้ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (non-glycosylated components) ขณะที่โปรตีนโครงสร้างของไวรัสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23.5 กิโลดาลตันก็ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเช่นกัน และโปรตีนชนิดนี้เป็นองค์ประกอบของ capsid protein เมื่อนำ genomic DNA ของไวรัส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ปรากฏว่า DNA ของไวรัสประกอบด้วย 29 fragments ซึ่งมีจำนวนเบสรวมกันแล้วอย่างน้อย 183 กิโลเบส โครงสร้างนิวคลีโอแคปซิดของ CBV ที่ศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากไวรัสชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่ม *Baculoviridae*

Kasornchandra และคนอื่นๆ (2000 : 32-41) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) จากพ่อแม่กึ่งกุลาดำโดยตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างพ่อแม่กึ่งและลูกกึ่งระยะต่างๆ ที่ได้จากการเพาะฟักด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบ่งพ่อแม่กึ่งที่ผ่านการตรวจเชื้อไวรัส SEMBV ออกเป็น 5 กลุ่ม โดยให้กึ่งทดลองแต่ละกลุ่มกินเนื้อปูติดเชื้อไวรัสวันละ 1 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วันตาม

ลำดับ ส่วนกึ่งกลุ่มควบคุมให้กินเนื้อปูปกติที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส SEMBV ในแม่กุ้งก่อนวางไข่ 1 วันด้วย one และ two-step PCR ปรากฏว่าแม่กุ้งที่กินเนื้อปู 2 วัน ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี two-step PCR ในขณะที่แม่กุ้งที่ให้กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 3 4 และ 5 วันให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี one-step PCR และจากการตรวจยืนยันผลการติดเชื้อไวรัส SEMBV ในแม่กุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และวิธี *in situ* hybridization พบเชื้อไวรัส SEMBV ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) follicle cells และเซลล์ไข่อ่อน (perinucleolus oocyte) และไข่ที่กำลังพัฒนา (yolk oocyte) จากนั้นนำไข่กุ้งที่รวบรวมได้ ไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วจึงย้ายไปลงถึงเพาะฟักเพื่อให้เกิดการฟักตัวต่อไป ทำการอนุบาลลูกกุ้งต่อไปจนกระทั่งได้ลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา ในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้ง ทำการเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะต่างๆ คือ นอเพลียส ชูเอีย ไมซิส และโพสต์ลาร์วา เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส SEMBV ด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization ปรากฏว่าลูกกุ้งระยะนอเพลียส และชูเอียที่ได้จากแม่กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV เพียงเล็กน้อย (two-step PCR positive) ให้ผลเป็นบวกกับวิธี two-step PCR สำหรับลูกกุ้งกลุ่มที่เหลือทั้งหมดให้ผลบวกกับวิธี One-step PCR ส่วนแม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน ไข่กุ้งจะไม่ฟักเป็นนอเพลียส ขณะที่แม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ไข่กุ้งจะฝ่อเนื่องจากไข่กุ้งดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาเป็นไข่ที่สมบูรณ์ได้ สำหรับการตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization พบเชื้อไวรัส SEMBV ในลูกกุ้งระยะไมซิส และโพสต์ลาร์วา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัส SEMBV สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูกกุ้งกุลาดำ (vertical transmission) โดยเชื้อไวรัสจะเกาะติดที่ผิวไข่ สำหรับไข่อ่อน และไข่ที่กำลังพัฒนาเชื้อไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสและเพิ่มจำนวนอนุภาค ทำให้ไข่ของกุ้งไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ มีเพียงเฉพาะไข่ที่พัฒนาเป็นไข่แก่แล้ว และมีเชื้อไวรัสเกาะอยู่ที่ผิวไข่เท่านั้นที่ฟักเป็นนอเพลียสที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV

Chen และคนอื่นๆ (2000 : 157-161) ได้ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน benthic larvae ของปูทะเล (*S. serrata*) ซึ่งจับได้จากบริเวณชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศไต้หวัน โดยใช้เทคนิค PCR และ *in situ* hybridization พบว่า ตัวอ่อนของปูทะเลประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ มีไวรัสตัวแดงดวงขาวแฝงอยู่ และถึงแม้ว่าจะย้ายตัวอ่อนเหล่านี้ไปเลี้ยงในบ่อพักเลี้ยงที่มีการให้อากาศร่วมด้วยในห้องปฏิบัติการก็ยังคงตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวอีกเช่นเดิม จากการทดลองนำตัวอ่อนของปูทะเลจำนวน 180 ตัว ซึ่งฟักออกจากไข่ที่ปราศจากไวรัสตัวแดงดวงขาวไปแช่น้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาว เจือจาง 1:50 ปนอยู่ ซึ่งน้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาว เจือปนอยู่เตรียมได้จากแผ่นแก้วปิดเหงือกและเปลือกหุ้มลำตัว (integument) น้ำหนักประมาณ 5 กรัมของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว อย่างรุนแรง (ให้ผลบวกกับ 1-step PCR) นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำทะเลปลอดเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 g และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใส (supernatant) ผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน ส่วนตัวอ่อนของปูทะเล

กลุ่มควบคุมจำนวน 260 ตัวปฏิบัติเหมือนกัน แต่แช่น้ำทะเลปลอดเชื้อแทน (blank inoculation) หลังจากนำสัตว์ทดลองแช่น้ำ ตัวอย่างที่เตรียมไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วนำมาล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้ออีก 2 ครั้ง จากนั้นแบ่งสัตว์ทดลองแต่ละชุดออกเป็น 3 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มพักเลี้ยงในอ่างพลาสติกที่มีการให้อากาศอุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 15 วัน บันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายลงในแต่ละกลุ่ม และเก็บออกจากอ่างเพาะเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ตายทั้งหมด จะถูกนำมาตรวจวินิจฉัยว่าได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือไม่ โดยสกัด DNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์ทดลองและตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 2-step PCR และ *in situ* hybridization รวมทั้ง H&E staining ร่วมกัน ผลจากการทดลอง พบว่า ตัวอ่อนของปูทะเลที่แช่น้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาว เจือปนอยู่จะมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 43 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายสะสมเพียง 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค PCR ทั้งในปูที่ใกล้จะตายและปูที่ยังมีชีวิตอยู่ บ่งชี้ว่า ไวรัสนี้เป็นสาเหตุของการตายของตัวอ่อนของ mud crab มากที่สุด และจากการคัดเลือกตัวอย่างปูที่แช่น้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวปนอยู่เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมาเลี้ยงในสภาวะปกติในเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง 2 4 6 8 10 และ 12 วัน ซึ่งใกล้จะตายแบบสุมจากตัวอย่างปูแต่ละกลุ่ม นำมา fixed ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อและผ่านกระบวนการต่างๆ สำหรับการศึกษาทาง histology และย้อมด้วย H&E นอกจากนี้ยังนำเนื้อเยื่อที่เตรียมได้มา hybridization โดย DNA probe ที่ใช้เตรียมจาก 146 bp PCR product ตามวิธีของ Lo และคนอื่นๆ (1996b : 215-225) ซึ่ง probe นี้จะติดฉลากด้วย digoxigenin-dNTP (Boehringer mannheim Biochemical) โดยวิธี random priming method พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบในตัวอ่อนของปูทะเล (*S. serrata*) มีความชอบเนื้อเยื่อเหมือนกับที่พบในกุ้งต่างๆ ไป คืออวัยวะภายนอก (external organs) เช่น เหงือก และเปลือกหุ้มลำตัว และเซลล์ที่ถูก infected จะสลายตัว นอกจากนี้ยังตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในอวัยวะอื่นๆ อีก ได้แก่ กระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อน หัวใจ และเนื้อเยื่อประสาท โดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเนื้อเยื่อบุผิวของอวัยวะเหล่านั้น

Nadala และ Loh (2000 : 175-179) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาทั้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ ไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) โดยวิธี dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays (DB-NC-EIA) โดยนำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้ง *P. vannamei* ซึ่งมีน้ำหนักตัวประมาณ 40-60 กรัม มาบดใน phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) จากนั้นนำเนื้อเยื่อเหงือกที่บดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วไปตรวจหาไวรัสโดยใช้เทคนิค DB-NC-EIA นอกจากนี้ยังนำไวรัสตัวแดงดวงขาว isolates ต่างๆ ที่แยกได้จากกุ้งชนิดต่างๆ มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนี้ด้วย ได้แก่ไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่แยกได้จากกุ้ง *P. vannamei* ในประเทศจีน อินโดนีเซีย สหรัฐอเมริกา และจากกุ้งครุมา (*P. japonicus*) จากประเทศญี่ปุ่น สำหรับการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสโรคหัวเหลือง กระทำดังนี้ นำตัวอย่างที่บดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วมาหยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหยด จากนั้นนำไปบ่มใน blocking solution (5% nonfat dry milk/PBS)

เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้ายเมมเบรนไปบ่มใน rabbit anti-YHV Ig-HRP (1:250 ใน 1% nonfat dry milk/PBS) ส่วนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่งย้ายไปบ่มใน rabbit anti-YHV Ig-HRP (1:500 ใน 1% nonfat dry milk/PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้งๆ ละ 50 นาที ด้วย PBS-T (0.05% Tween-20/PBS) จากนั้นเติม substrate เป็นเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้เห็นตรงจุดผลที่เกิดขึ้น พบว่า อัตราการเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้ anti-WSSV IgG-HRP คือ 1:250 ขณะที่อัตราการเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสโรคหัวเหลือง โดยใช้ anti-WSSV IgG-HRP คือ 1:500 และการใช้เทคนิค DB-NC-EIA สามารถตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสโรคหัวเหลืองในสารสกัดหยาบของตัวอย่างกุ้งชนิดต่างๆ ที่ได้รับเชื้อไวรัสได้เป็นอย่างดีแม้ว่าจะมีอัตราการเจือจางเป็น 1:10 ก็ตาม ในทางตรงกันข้ามไม่พบไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสโรคหัวเหลืองในตัวอย่างสารสกัดหยาบของกุ้งปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เมื่อตรวจหาด้วยวิธีการเดียวกัน จากผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาครั้งก่อนๆ ซึ่งตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค PCR และ Western blot ผลจากการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ บ่งชี้ว่า เทคนิค DB-NC-EIA เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องการตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูงก็สามารถตรวจพบได้ เป็นเทคนิคที่ให้ผลเร็ว ประหยัดเวลา ง่าย และราคาถูก แต่ความไวในการตรวจหาไวรัสยังต่ำ และพบปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปกติ

การใช้กระบวนการทางภูมิคุ้มกันโดยผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งใช้ไวรัสเป็นแอนติเจนนั้น มีประสิทธิภาพการใช้งานยังไม่ดีนัก เนื่องจากแอนติบอดียังคงแสดง nonspecific background ก่อนข้างสูงและมีความไวในการตรวจค่อนข้างต่ำ (Nadala; et al. 1997 : 27-34, 2000 : 175-179)

Poulos และคนอื่นๆ (2001) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์เป็นแอนติเจน สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนโปรตีน VP28 จำนวน 4 clones ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี dot blot western blot และตรวจการติดเชื้อเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry และ immunofluorescence ได้ดี แต่แอนติบอดีเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของไวรัสตัวแดงดวงขาวสายพันธุ์ต่างๆที่ได้จาก จีน ไทย อินเดีย Texas South Carolina และ Panama ได้ ต่อมา Anil และคนอื่นๆ (2002 : 67-75) ก็ทำการผลิต monoclonal antibody ได้โดยใช้ไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์เช่นกัน โดยผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนได้ 4 clones มี 1 clone ที่จำเพาะต่อ VP28 และอีก 3 clone จับกับ VP28 และ VP18 (VP19 ในปัจจุบัน) แอนติบอดีทั้ง 4 สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ปริมาณ 500 pg โดยวิธี dot ELISA และสามารถใช้ตรวจไวรัสในกุ้งที่ยังไม่แสดงลักษณะจุดขาวได้ด้วย

จากที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางถึงจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาว Van Hulten และคนอื่นๆ (2001a : 7-22) ได้ทำการศึกษา พบว่าจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาว ประกอบด้วย 184 open reading frame และสามารถ identify ยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของไวรัส 5 ชนิดด้วยกัน คือ VP28 VP26 VP24 VP19 และ VP15 โดย VP26 VP24 และ VP15 เป็นองค์ประกอบของ นิวคลีโอแคปซิด ส่วน VP28 และ VP19 เป็นส่วนประกอบของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (Van Hulten; et al. 2000b : 227-236) ; (Van Hulten; et al. 2002 : 257-265) Liu และคนอื่นๆ (2002 : 11-18) ได้นำ recombinant protein ของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสได้แก่ VP28 มาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน โดยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 clones ที่จับ epitope ต่างๆ กัน และสามารถนำมาพัฒนาเทคนิค antigen-capture ELISA สำหรับตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว จาก haemolymph และสารสกัดจากเนื้อเยื่อให้ผลความไวของการตรวจเทียบเคียงกับ PCR

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ได้จากเหือกปูที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสิทธิศักดิ์ เหมือนสิน จ.ภูเก็ต) และจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณเลขา ปานจันทร์ อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช)

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หนูขาว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล ศาลายา

2.2 กุ้งกุลาดำ

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.1 เครื่อง thermal cycler	eppendorf
2.2 เครื่อง ultraviolet transilluminator	Spectroline
2.3 เครื่อง electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์	Bio-Rad
2.4 เครื่องเขย่าผสมสาร shaker	Biosan
2.5 เครื่องซังสาร	Denver instrument company
2.6 เครื่อง microwave	Turbora
2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)	Spectrafuge
2.8 กล้อง polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม (Fuji)	
2.9 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)	Huxley
2.10 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ	New Brunswick scientific
2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ	Sorvall
2.12 ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (Laminar flow)	NUAIRE
2.13 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ Incubator)	NUAIRE

ตาราง 1 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.14 กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ส (Inverted microscope)	Olympus
2.15 ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
2.16 ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
2.17 เครื่อง vacuum concentrater	Savant
2.18 ตู้อบ (hot air oven)	Sanyo
2.19 เตาไฟฟ้า (hot plate)	
2.20 แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)	
2.21 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo
2.22 ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	Sanyo
2.23 ถังไนโตรเจนเหลว	International Cryogenics, Inc.
2.24 กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ	
2.25 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)	Olympus
2.26 ตู้ดูดควัน (chemical fume hood)	New lab
2.27 เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์	Gest.
2.28 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome)	Leica

4. เคมีภัณฑ์

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
3.1 ชุด high pure viral nucleic acid kit working solution proteinase K inhibitor removal buffer washing buffer elution buffer	Roche Molecular Biochemicals (Cat no.1858874)
3.2 ชุด Platinum [®] Pfx DNA Polymerase เอนไซม์ Pfx DNA Polymerase 10X Pfx Amplification buffer 10X PCR Enhancer solution 50 mM MgSO ₄	Invitrogen
3.3 lysis buffer	Flegel pers. Comm.,1988
3.4 primer VP28F VP28F118 และ primer VP28R	BSU
3.5 TBE buffer	
3.6 เจล Agarose	Gibco
3.7 Blue/Orange 6x Loading dye	Promega
3.8 Hi-Lo DNA marker	Minnesota Molecular
3.9 ethidium bromide	Bio-Rad
3.10 isopropanol	Merck
3.11 เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I และ <i>Kpn</i> I	New England Biolab และ Promega
3.12 T4 DNA ligase	Invitrogen
3.13 ชุด PCR Blunt Cloning kit	Invitrogen
3.14 ชุด pQE30 expression vector	Qiagen
3.15 ชุด Mini elute gel extraction kit	Qiagen
3.16 ชุด QIAprep [®] Spin Miniprep kit	Qiagen
3.17 LB medium	ดูภาคผนวก
3.18 ยาปฏิชีวนะ (Ampicillin และ Tetracyclin)	Sigma

ตาราง 2 (ต่อ)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
3.19 RPMI IV medium	ดูภาคผนวก
3.20 Fetal bovine serum	Starrate
3.21 polyethylene glycol (PEG)	Sigma
3.22 12% DMSO	Sigma
3.23 hypoxanthine	Gibco
3.24 aminopterin	Sigma
3.25 nitrocellulose membrane	Sigma
3.26 สีสี Coomassie brilliant Blue	ดูภาคผนวก
3.27 ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
3.28 เอทานอล (Absolute ethanol)	Merck
3.29 นอร์มัลบิวทานอล (n-buthanol)	Univar
3.31 ไซลีน (xylene)	Univar
3.32 0.15 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2	ดูภาคผนวก
3.33 สารละลาย P_1^+ (10 % calf bovine serum ใน PBS)	ดูภาคผนวก
3.34 ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride; DAB)	Sigma
3.35 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide; H_2O_2) 30 %	
3.36 สีสียโอซิน 0.02% ในเอทานอล 95 %	ดูภาคผนวก
3.37 สีสียมาทอกไซลีน (Hematoxylin)	ดูภาคผนวก
3.38 พาราพลาสต์ (paraplast)	Sherwood medical
3.39 สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution)	ดูภาคผนวก
3.40 Davidson's fixative	ดูภาคผนวก
3.41 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH)	Merck
3.42 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; HCl)	Merck
3.43 สารตัวกลางผนัง (permount)	FisherChemical
3.44 GAM-HRP	Bio-Rad

5. วัสดุภัณฑ์

ตาราง 3 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
4.1 โกร่งเคลือบสำหรับบดเนื้อเยื่อผ่านการฆ่าเชื้อ	Eppendroff Gilson และ Axygen Axygen Pyrex
4.2 หลอด thin wall สำหรับ PCR	
4.3 ไมโครปิเปต และ ทิป	
4.4 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	
4.5 ชุดเครื่องใช้พลาสติกปลอดเชื้อสำหรับงาน culture	
4.6 ชุดเครื่องมือผ่าตัด	
4.7 ชุดเครื่องแก้วต่างๆ	
4.8 กล้องใสสไลด์	
4.9 ขวดแก้วปากตรง (vial)	
4.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์	
4.11 โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (couplin jar)	
4.12 ตะกร้าแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)	
4.13 สไลด์ (slide)	
4.14 กระจกปิดสไลด์ (cover slide)	
4.15 กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา	
	Sail Brand Menzel-glaser Terumo

6. สายพันธุ์แบคทีเรียและชนิดของพลาสมิด

ตาราง 4 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

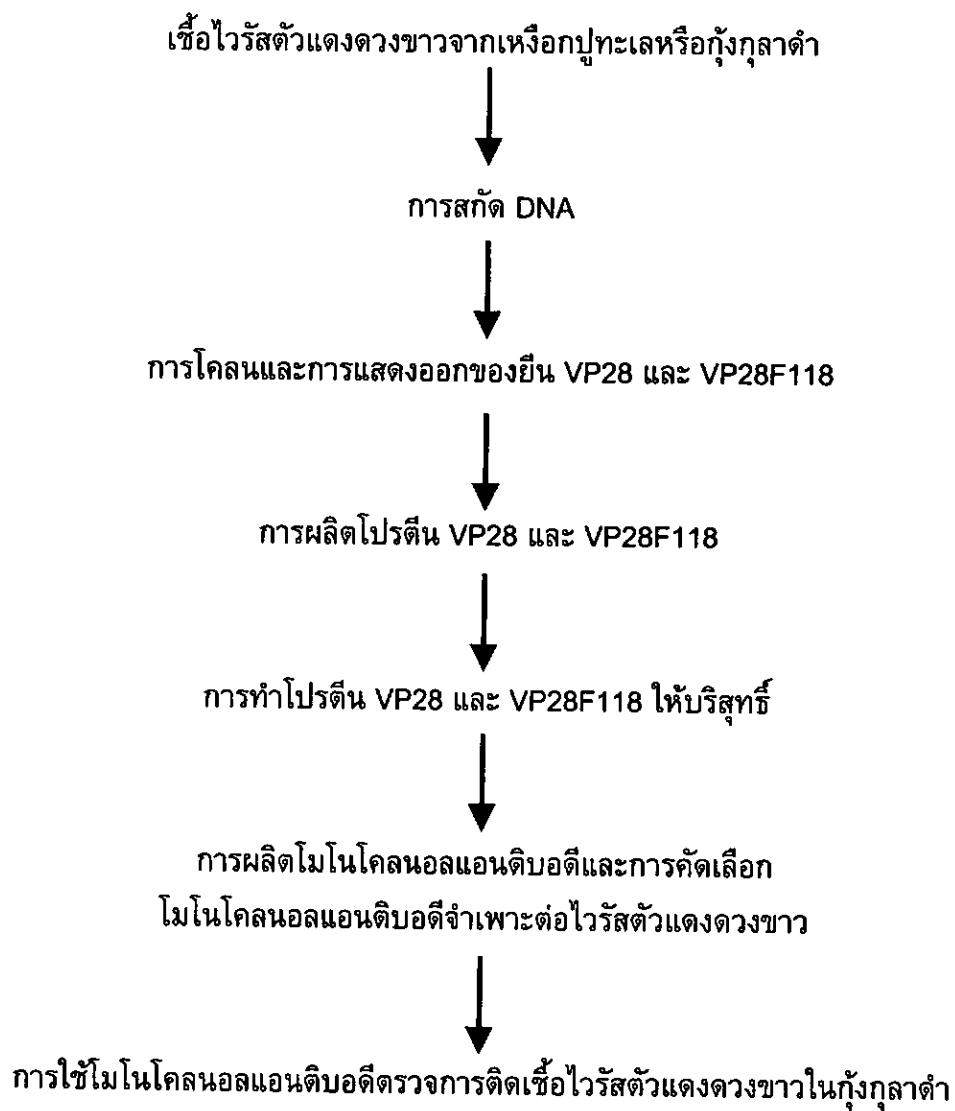
สายพันธุ์ของ <i>E. coli</i>	คุณสมบัติ
1. One Shot <i>E. coli</i> Top10	F^- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
2. <i>E. coli</i> XL1 blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB</i> <i>lacI^f</i> ZM15 Tn10 (<i>Tet^r</i>)]
3. <i>E. coli</i> M15 (pREP4)	<i>Nal^s</i> <i>Str^s</i> <i>Rif^s</i> <i>lac</i> <i>ara</i> <i>gal</i> <i>mtl</i> <i>F</i> <i>recA⁺</i> <i>uvr⁺</i> [pREP4; <i>lacI</i> , <i>kan^r</i>]

ตาราง 5 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของพลาสมิด	คุณสมบัติ
1. pCR [®] Blunt (Invitrogen)	P_{lac} , <i>lacZ</i> α - <i>ccdB</i> fusion gene, Multiple cloning site, T7 promoter, T7, M13 Forward (-20), M13 Reverse priming sites, <i>Kan^r</i> , <i>Sh ble</i> (Zeocin [™] resistance factor) และ pUC origin
2. pQE30 (Qiagen)	<i>Amp^r</i> , T5 promoter, six His tag coding sequence, ColE1 และ multiple cloning site downstream of T5 Promoter
3. pQE40 (Qiagen)	<i>Amp^r</i> , T5 promoter, six His tag coding sequence, ColE1, DHFR และ multiple cloning site downstream of T5 promoter

วิธีดำเนินการทดลอง

ดำเนินการโดยภาพรวม



1. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV)

เตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยนำเห็อกปูทะเลที่ติดเชื้อ ซึ่งได้รับมาจากจังหวัดภูเก็ต และกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากอำเภอบางสะพาน จังหวัดนครศรีธรรมราช มาบดใน 2XPBS (เห็อกปู 3 ชิ้นต่อมิลลิลิตร หรือ เห็อกกุ้ง 1 ตัวต่อ 1 มิลลิลิตร) บดใน 3,000 g แยกส่วนใสออก และแบ่งเก็บเป็นส่วนใหญ่ไว้ที่ -70°C สำหรับใช้ฉีดกุ้งกุลาดำต่อไป

2. การสกัด DNA จากไวรัสตัวแดงดวงขาว

สกัด DNA จากสารละลายที่ได้จากการบดเห็อกกุ้งหรือปูกับ Lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl pH 9.0 100 mM EDTA 50 mM NaCl และ 2% SDS (Flegel pers. Comm., 1988) ในอัตราส่วนจากเห็อกปู 3 ชิ้นต่อมิลลิลิตร และจากเห็อกกุ้ง 1 ตัวต่อมิลลิลิตร โดยใช้ชุด High pure viral nucleic acid kit จาก Roche Molecular Biochemical โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำสารสกัดจากเห็อกที่เตรียมไว้ 200 μl ใส่ในหลอด microcentrifuge tube เติม working solution (binding buffer 250 μl ผสมกับ Poly A carrier RNA 50 μl) 200 μl แล้วเติม Proteinase K 50 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที เติม isopropanol 100 μl แล้วผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน high pure filter นำไปปั่นที่ 800 รอบต่อนาที (rpm) ทิ้งสารละลายที่ผ่าน filter ออกมา เติม inhibitor removal buffer 500 μl นำไปปั่นที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที ล้าง filter 2 ครั้งด้วย wash buffer ครั้งละ 400 μl ปั่นที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นปั่นซ้ำอีกครั้งที่ 13,000 rpm ประมาณ 10 วินาที เพื่อกำจัด wash buffer ที่ตกค้างอยู่ทิ้ง ประกอบ filter tube ใส่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ แล้วเติม elution buffer 50 μl ปั่นที่ 8,000 rpm ประมาณ 1 นาทีเพื่อชะ DNA ออกจาก filter แล้วเก็บสารละลาย DNA ที่ -20°C

3. การโคลนยีนและการแสดงออกของโปรตีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว

3.1 การแยกยีน VP28 ด้วยวิธี PCR

ได้ทำการออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน VP28 และ VP28F118 ด้วยวิธี PCR จากลำดับเบสของยีน VP28 (Genbank accession no: AF380842) ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีขนาดโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน (kDa) โดยออกแบบ primer ที่ใช้สำหรับทำ PCR ของยีน VP28 3 ชิ้น คือ VP28F VP28F118 และ VP28R ซึ่ง primer ที่ออกแบบได้จะใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน VP28

ใน 2 ลักษณะคือ การเพิ่มจำนวนยีน VP28 ทั้งยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสขนาด 28 kD โดยใช้ primer VP28F และ VP28R และการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน VP28 ที่ปราศจากส่วน transmembrane โดยออกแบบ primer ถัดจากเบสแรกของ start codon ไปเป็นจำนวน 118 bp ทางด้าน downstream primer ที่ใช้คือ VP28F118 และ VP28R เรียก PCR product ที่ได้นี้ว่า VP28F118 นอกจากนี้ primer ที่สร้างขึ้นยังมีการออกแบบเพื่อเติมบริเวณที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อใช้สำหรับการนำยีน VP28 นี้เข้าสู่พลาสมิดที่เป็น expression vector ด้วย โดย primer VP28F และ VP28F118 จะเติม *Bam*HI restriction site ส่วน primer VP28R ได้ทำการเติม *Pst*II site ที่ปลาย 5' ของ primer เหล่านั้น

Primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีน VP28 มีลำดับเบสดังนี้

VP28F 5'-CGGGATCCATGGATCTTTCTTTCACTCTTTTCG- 3'

VP28F118 5'-CGGGATCCCACACAGACAATATCGA- 3'

VP28R 5'-TGCACTGCAGTTACTCGGTCTCAGTGCCAG- 3'

ทำการเพิ่มชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้เอนไซม์ Platinum[®]Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) โดยผสมสารต่างๆที่ใช้ในการทำ PCR ลงในหลอด thin wall ที่มีขนาดปริมาตร 200 μ l ดังตาราง 6

ตาราง 6 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับยีน VP28 และ VP28F118

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร(μ l)
1. DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สกัดเตรียมไว้	5.0
2. 10x Pfx amplification buffer	5.0
3. 10x PCR enhancer solution	5.0
4. 50 mM MgSO ₄	1.0 (1 mM)
5. 2.5 mM dNTP	4.0 (200 μ M)
6. Primer VP28F หรือ VP28F118	1.0 (50 pmol)
7. Primer VP28R	1.0 (50 pmol)
8. Platinum [®] Pfx Polymerase	0.4 (1 U)
9. ddH ₂ O	22.6
ปริมาตรสุทธิ	50.0

แล้วนำหลอด thin wall ที่ผสมสารต่างๆเรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycle (eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีน VP28 ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 (initial denaturation) อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที
- ขั้นตอนที่ 2 (denaturation) อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 15 วินาที
- ขั้นตอนที่ 3 (annealing) อุณหภูมิ 57°C เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 4 (elongation) อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 45 วินาที
- ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอนที่ 6 (final extension) อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 20 นาที
- ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4°C คงที่ตลอด

สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน VP28F118 ทำเช่นเดียวกับการทำ PCR ของยีน VP28 แต่เปลี่ยน primer จาก VP28F เป็น VP28F118 และปรับอุณหภูมิในขั้นตอนที่ 3 (annealing temperature) จาก 57°C เป็น 59°C แทน แล้วนำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR นี้มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV และถ่ายรูปไว้ สำหรับผลผลิต PCR ของ VP28 มีขนาด 633 bp และผลผลิต PCR ของ VP28F118 มีขนาด 516 bp จากนั้นใช้ไบโอมิตัดตัด แยก DNA ที่ต้องการและสกัด DNA ออกจากเจลโดยใช้ชุด Minelute gel extraction kit (QIAGEN) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ตัดเจลรอบๆ band ที่ต้องการภายใต้แสง UV ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติม buffer QG 300 μ l ต่อ 100 mg ของน้ำหนักเจล (3 เท่า) บ่ม tube ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 10 นาที สีของสารละลายจะเหมือนกับสีของ buffer QG (หากเปลี่ยนสีเติม 3M sodium acetate 10 μ l) จากนั้นเติม buffer QG 500 μ l แล้วดูดสารละลายใส่ใน column (มีใน kit) นำไปปั่นที่ 3,000 rpm นาน 1 นาที ที่สารละลายที่ผ่านออกมา และเติม buffer QG 500 μ l แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาทีที่ทั้งสารละลาย ล้างสารที่ปนเปื้อนทิ้งโดยเติม buffer PE 750 μ l จากนั้นปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที ปั่นแยก buffer PE ที่ตกค้างอยู่ที่ปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที แล้วเติม buffer EB solution เพื่อชะเอา DNA ที่ต้องการออก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที แล้วเก็บสารละลายที่ได้สุดท้ายนี้ที่ -20 °C

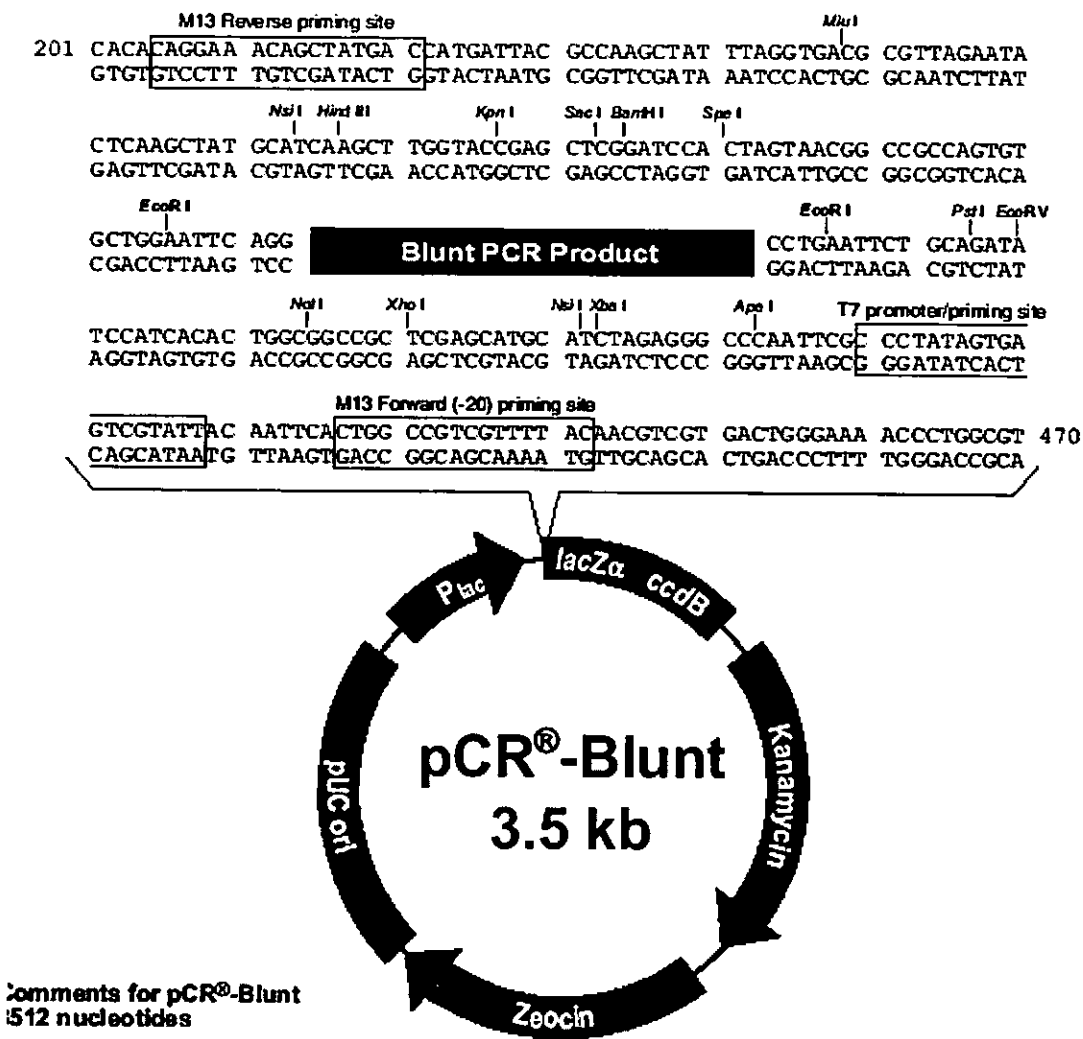
3.2 การโคลนยีน VP28 เข้าสู่ pCR blunt vector

ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน VP28 เข้าสู่ pCR®Blunt vector (ภาพประกอบ 3) เนื่องจากผลผลิต PCR ของยีน VP28 และ VP28F118 ที่สังเคราะห์โดยใช้ Pfx®Polymerase (เป็นเอนไซม์ที่มี proof reading activity) จะให้ผลผลิตที่มีปลายทุ่ทั้ง 2 ด้านจึงต้องโคลน PCR product นี้ เข้าสู่ plasmid ที่มีปลายทุ่เช่นกันก่อน โดยทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR®Blunt vector จาก ZeroBlunt® PCR Blunt Cloning kit โดยผสมสารต่างๆ ดังตาราง 7

ตาราง 7 แสดงส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pCR®Blunt vector

ส่วนผสมของการ ligation	ปริมาตร (µl)
1. พลาสมิด pCR®Blunt (25 ng; 10 fmol)	1.0
2. ยีน VP28 หรือ VP28F118 (40 ng; 100 fmol)	1.0
3. 10x ligation buffer (ที่มี ATP)	1.0
4. T4 DNA ligase (4 U/µl)	1.0
5. ddH ₂ O	6.0
ปริมาตรสุทธิ	10.0

เมื่อผสมแล้วทำการบ่มที่ 16°C ชั่วครู่ เพื่อให้ DNA เชื่อมต่อกัน หลังจากนั้นจึงนำมาวางบนน้ำแข็ง เพื่อเตรียม transform เข้าสู่ One shot®Top 10 cells (หรือเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้งาน) มีขั้นตอนดังนี้ นำ One shot®Top 10 cells (50 µl/หลอด) ออกมาละลายบนน้ำแข็ง จากนั้นดูด recombinant plasmid ที่เตรียมไว้ในหลอด Top 10 cells แล้วใช้ปิเปตคนสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที ทำ heat-shock โดยย้ายลงไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 45 วินาที แล้วรีบนำกลับไปแช่น้ำแข็งต่ออีก 2 นาที และเติม SOC medium ซึ่งอุ่นที่ 37°C 250 µl นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วในการหมุน 225 rpm นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาแช่บนน้ำแข็งอีกครั้ง แบ่ง Top 10 cells spread บน LB agar ที่มี Kanamycin 50 µg/ml จำนวน 2 plate plate ละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ชั่วครู่



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างของ pCR®Blunt plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะ เอนไซม์ต่างๆ (restriction site) (Invitrogen)

3.3 การคัดเลือกโคลนที่มีการ insert ยีน VP28

การคัดเลือกโคลนที่มี insert ทำโดยสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วย restriction enzyme คือ *Bam*HI และ *Kpn*I โดย *Kpn*I จะตัดในยีน VP28 หรือ VP28F118 และ *Bam*HI จะตัดใน pCR[®] Blunt plasmid ถ้ามีการ insert ของยีนควรจะได้อินเอ 2 ชิ้น ที่มีขนาด ~ 3.5 kb ของพลาสมิด (pCR[®] Blunt) และขนาด ~ 542 kb ของ VP 28 หรือ ขนาด 406 bp ของ VP28F118 ซึ่งสามารถสังเกตได้เมื่อทำการแยกโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ นาน 60 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบบนแหล่งกำเนิดแสง UV

สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Miniplasmid preparation โดยนำเชื้อที่เตรียมไว้มาปั่นที่ 6,000 rpm นาน 5 นาที เก็บตะกอนเชื้อมา resuspend ใน GTE 100 μ l ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม 1% SDS ใน 0.2 N NaOH 200 μ l เขย่าเบาๆวางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติม 5 M KAc 150 μ l เขย่าแรงๆ 3-4 ครั้ง แล้ววางบนน้ำแข็ง 7 นาที นำไปปั่นที่ 3,000 rpm 5 นาทีเพื่อแยกเอาโปรตีนและดีเอ็นเอของแบคทีเรียออก เก็บ supernatant นมา ตกตะกอน plasmid โดยเติม absolute ethanol 900 μ l แล้วนำไปแช่เย็นที่ -70°C เป็นเวลา 5 นาที ปั่นแยกตะกอนพลาสมิดที่ความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น ปั่นอีกครั้งที่ความเร็วเท่าเดิม จากนั้นดูด 70% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่น 15 μ l และ TE 5 μ l เก็บไว้ที่ -20°C จากนั้นนำ recombinant plasmid ของยีน VP28 และ VP28F118 ที่ได้มาตัดด้วย restriction enzyme คือ *Bam*HI และ *Kpn*I ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชม. โดยทำการผสมสารต่างๆดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ที่โคลนอยู่ใน pCR®Blunt vector ด้วย *Bam*HI และ *Kpn*I

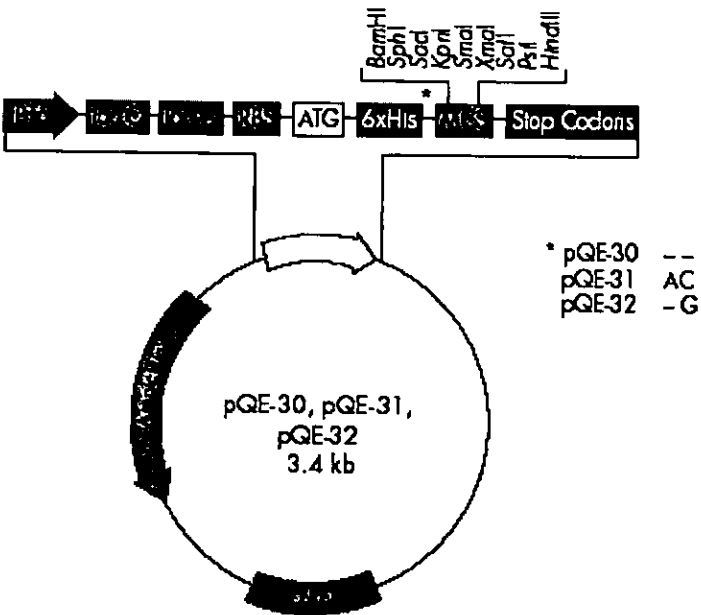
ส่วนผสมของการตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Kpn</i> I	ปริมาตร(μl)
Recombinant plasmid (VP28 หรือ VP28F118)	9.0
<i>Bam</i> HI (10U/μl)	0.5
<i>Kpn</i> I (10U/μl)	0.5
10X buffer 1	1.5
10X BSA	1.5
RNase A (10 mg/ml)	1.0
ddH ₂ O	1.0
ปริมาตรสุทธิ	15

ทำการวิเคราะห์ผลการตัดด้วย restriction enzyme โดยแยกใน 1% agarose gel ใน TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับ DNA marker

3.4 การโคลนยีน VP28 เข้าสู่ pQE30 expression vector

เลือก clone ของ Top 10 cell ที่มี recombinant plasmid ของ VP28 หรือ VP28F118 ใน pCR-Blunt vector มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี Kanamycin 50μg/ml ข้ามคืน แล้วทำการสกัดพลาสมิด จากนั้นนำพลาสมิดที่เตรียมได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Pst*I ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำยีน VP28 และ VP28F118 ที่ตัดได้โคลนเข้าสู่ pQE 30 ซึ่งเป็น expression vector

การตัด recombinant plasmid ของ VP28 หรือ VP25F118 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Pst*I จะทำการผสมส่วนต่างๆ ดังตาราง 9



ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างของ pQE30 expression vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ (restriction site) (Qiagen)

ตาราง 9 แสดงส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ใน pCR®Blunt vector ด้วย *Bam*HI และ *Pst*II

ส่วนผสมของการตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Pst</i> II	ปริมาตร(μl)
Recombinant plasmid (VP28 หรือ VP28F118)	20
<i>Bam</i> HI (10U/μl)	0.5
<i>Pst</i> II (10U/μl)	0.5
10X buffer 1	3
10X BSA	3
RNase A (10 mg/ml)	1
ddH ₂ O	2
ปริมาตรสุทธิ	30

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แล้วมาแยกใน 1% agarose gel ใน TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วใช้ไบมิตตัดแถบ DNA ที่มีขนาดตามที่ต้องการ นำมาสกัดด้วยชุด Minelute gel extraction kit (Qiagen) เช่นเดียวกันกับการสกัด PCR product ออกจากเจล

สำหรับ expression vector ที่ใช้ในการโคลนยีน VP28 และ VP28F118 เข้าไปนั้นจะใช้ pQE30 ซึ่งจะทำการตัดด้วย *Bam*HI และ *Pst*II เช่นกัน และนำไปแยกใน 1% agarose gel ตัดแถบ DNA ที่ต้องการและสกัด DNA ออกจากเจลโดยใช้ Minelute gel extraction kit (Qiagen) เช่นกัน

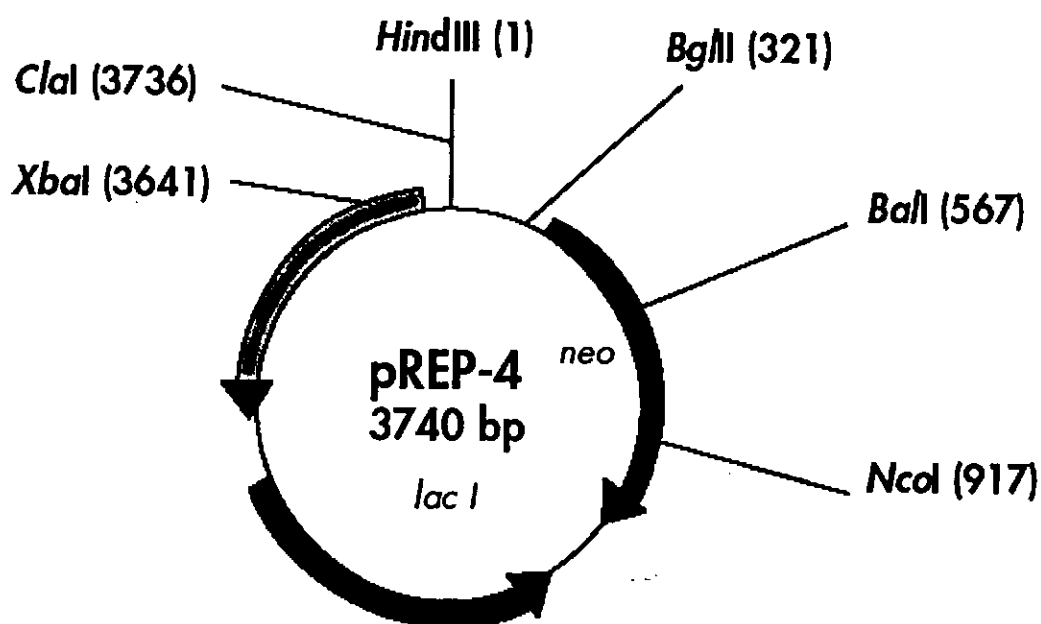
จากนั้นทำการโคลนยีน VP28 และ VP28F118 ที่ตัดด้วย *Bam*HI และ *Pst*II เข้ากับ pQE30 ซึ่งถูกตัดไว้ด้วย enzyme ชนิดเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (GIBCO) ซึ่งใช้อัตราส่วนของ VP28 หรือ VP28F118 ต่อ pQE30 expression vector ดังตาราง 10

ตาราง 10 แสดงส่วนผสมของการทำ ligation ของยีน VP28 หรือ VP28F118 กับ pQE30 expression vector ดังนี้

ส่วนผสมของการ ligation	ปริมาตร (μl)
1. พลาสมิด pQE30 ที่ตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Pst</i> II (10 fmol)	<u>X</u>
2. ยีน VP28 หรือ VP28F118 ที่ตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Pst</i> II (50 fmol)	<u>X</u>
3. T4-DNA ligase (Gibco; 3U/μl)	1
4. 5X ligation buffer	2
5. ddH ₂ O	
ปริมาตรสุทธิ	10

บ่มที่อุณหภูมิ 16°C ชำมคืน แล้วเติม 0.5 M EDTA 0.5 μl เพื่อหยุดปฏิกิริยา ก่อนที่จะนำ plasmid เข้าสู่แบคทีเรียโดยวิธี transformation

การนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* เพื่อทำการกระตุ้นการสร้าง recombinant protein นั้น ในครั้งแรกจะใช้ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-B เพื่อเพิ่มจำนวน plasmid และทำการคัดเลือกโคลนที่มี recombinant plasmid ของ VP28-pQE30 หรือ VP28F118-pQE30 โดยใช้ *Bam*HI และ *Kpn*I ตัดและแยกวิเคราะห์บน 1% agarose โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการคัดเลือกโคลนของ VP28 และ VP28F118 ที่อยู่ใน plasmid pCR® Blunt ซึ่งเมื่อหาโคลนที่มี recombinant plasmid ได้แล้ว จึงจะทำการสกัด plasmid ออกจาก bacteria สายพันธุ์ XL1-B ที่มียีน VP28 หรือ VP28F118 ออกมา โดย plasmid ส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับ DNA ของยีนที่โคลนได้เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame (ORF) สำหรับ plasmid อีกส่วนหนึ่งจะนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) (ดู pREP4 พลาสมิดในภาพประกอบ 5) เพื่อใช้สำหรับกระตุ้นการสร้าง recombinant protein โดย M15 (pREP4) จะมี plasmid pREP4 ซึ่งทำหน้าที่สร้าง repressor ในปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน VP28 และ VP28F118



ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างของ pREP-4 plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ต่างๆ (restriction site) ซึ่งพบอยู่ในสั *E.coli* สายพันธุ์ M15 ที่ใช้สำหรับ กระตุ้นการสร้าง recombinant protein โดย plasmid pREP4 สร้าง repressor ใน ปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของ recombinant plasmid ของ VP28-pQE30 หรือ VP28F118-pQE30

3.5 การเตรียม competent cell ของ bacteria สำหรับทำ transformation

แบคทีเรียที่นำมาใช้คือ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue (XL1-B) และ M15 (pREP4) ซึ่งจะถูกนำมาเตรียมเป็น competent cell เพื่อใช้ในการ transform recombinant plasmid โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

นำ *E. coli* สายพันธุ์ที่ต้องการ [XL1-B หรือ M15 (pREP4)] มาเลี้ยงไว้ใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะอยู่ โดย XL1-B จะเลี้ยงใน LB broth ที่เติม tetracyclin 12.5 µg/ml ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 จะเลี้ยงใน LB broth ที่เติม kanamycin 25 µg/ml ข้ามคืน แล้วแบ่งเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลง flask ขนาด 250 ml โดยให้เติมเชื้อ 1.5 ml ในอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแล้ว 100 ml นำไปเลี้ยงใน shaker ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 ชม. คอยวัด O.D. ของเชื้อที่ 600 nm ทุก ½-1 ชม. รอจนได้ O.D. ประมาณ 0.5-0.6 จากนั้นนำ flask แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วถ่ายเชื้อใส่หลอด polypropylene หลอดละ 30 ml นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4000 rpm ที่ 4°C นาน 15 นาที เท media ทิ้ง และเติมสารละลาย 0.1 M MgCl₂ ที่แช่เย็น 15 ml แล้ว resuspend นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 4000 rpm ที่ 4°C นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ที่แช่เย็น 1.2 ml resuspend แบ่งใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 150 µl และเติม 80% glycerol หลอดละ 50 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่ -70°C จนกว่าจะใช้งาน

3.6 การนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* (transformation)

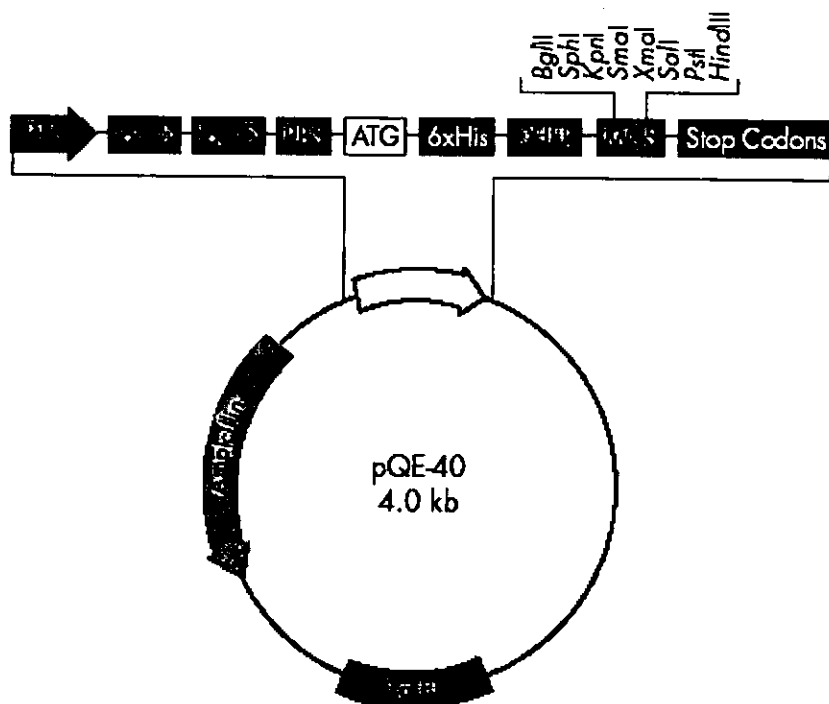
นำ XL1-B competent cell จาก -70°C มาละลายบนน้ำแข็งประมาณ 10-15 นาที แล้วดูดสารละลาย ligation ระหว่าง VP28 และ VP28F118 กับ pQE30 ใส่ในหลอด competent cell ใช้มือเคาะ tube เบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที ทำ heat shock โดยใส่ลงใน water bath อุณหภูมิ 42°C นาน 2 นาที แล้วนำขึ้นมาแช่ในน้ำแข็งทันที ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เติม LB medium ใส่ในหลอด competent cell แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่ 6000 rpm 5 นาที ดูด media ด้านบนทิ้ง โดยเหลือ media ไว้ใน tube ประมาณ 100 µl resuspend เชื้อในหลอดให้กระจายโดยทั่ว ปิเปิดใส่ plate ที่มี 100 mg/ml ของ Ampicillin ที่เตรียมไว้แล้ว spread ให้ทั่ว บ่มที่ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน สังเกตดูโคโลนี

4. การผลิตโปรตีนโครงสร้าง VP28 และ VP28F118

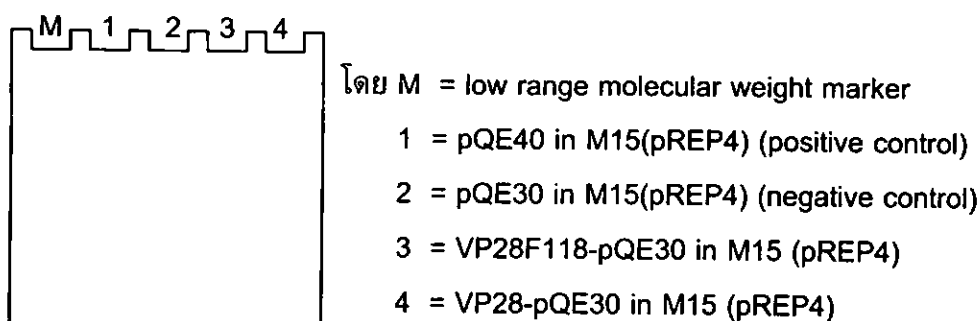
นำ bacteria clone ที่มี recombinant plasmid มาเลี้ยงใน LB broth 5 ml (ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ kanamycin 25 µg/ml ผสมอยู่) บ่มข้ามคืนใน shaker ที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นแบ่งเชื้อที่เตรียมไว้ 5 ml ใส่ลงใน flask ขนาด 250 ml ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 200 rpm วัดความขุ่นของเชื้อ (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 600 nm จนมีค่า O.D. ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้น โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 g ประมาณ 20 นาที เทน้ำเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้ง แล้วแช่เซลล์ให้แข็งใน dry ice หรือ liquid nitrogen หรืออาจเก็บตะกอนของเซลล์ที่ -20°C ข้ามคืนก็ได้ จากนั้นนำ cell ที่เก็บได้ออกมาละลายแล้วเติมสารละลาย 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, pH 8.0 จำนวน 4 ml และเติม 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) แล้วนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) บนน้ำแข็งหลายๆครั้ง จน lysate ของแบคทีเรียใส แล้วปั่นเพื่อแยกผนังเซลล์ของแบคทีเรียออกที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ตูดเก็บส่วนน้ำใสแบ่งไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

5. การตรวจสอบหา recombinant protein

นำสารละลายที่ได้จากการกระตุ้น *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มี recombinant plasmid คือ VP28-pQE30 และ VP28F118-pQE30 มาผสมกับ 5X SDS-treatment buffer ในอัตราส่วน 4 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 15% SDS-PAGE ตามวิธีของ Lammler 1970 (วิธีเตรียมดูจากภาคผนวก) โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีเฉพาะ plasmid pQE30 เป็น negative control และ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มี plasmid pQE40 (ภาพประกอบ 6) เป็น positive control เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่ ซึ่งจะพบ recombinant protein 6xHistag-DHFR แล้วนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาหยอดลงบนหลุมที่เตรียมไว้ (ภาพประกอบ 7) แล้วแยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 volt ประมาณ 1 ชั่วโมง จนสีเคลื่อนที่เกือบสุดปลายเจล แกะแผ่นเจลออกจากกระจก แล้วย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 สังเกต band ของ recombinant protein 6xHistag-VP28 และ 6xHistag-VP28F118 เมื่อเทียบกับโปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิดเฉพาะ pQE30 และโปรตีน 6xHistag-DHFR จาก *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มี plasmid pQE40



ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างของ pQE40 plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ต่างๆ (restriction site) ที่ใช้เป็น positive control เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ที่มีการสร้างโปรตีน 6xHistag-DHFR ขนาด 26 kDa เมื่อใส่เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) (Qiagen)



ภาพประกอบ 7 แสดงตัวอย่างการหยอดตัวอย่างสำหรับแยกโดยวิธี SDS-PAGE

6. การทำให้โปรตีน VP28 และ VP28F118 บริสุทธิ์

ทำได้โดยนำ clone ของ bacteria ที่สร้าง recombinant protein มาทำให้เซลล์แตกตามขั้นตอนในข้อ 4 จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาแยกโดยใช้ 15% SDS-PAGE เช่นเดียวกับข้อ 5 แล้วย้อมสี gel ด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออก ตัดแถบโปรตีนที่เป็น recombinant protein ออกมา ล้างสีออกให้สีหมด ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ใน 0.1% SDS แล้วนำ gel ใส่ลงในถุง dialysis ก่อนที่จะไปผ่านกระแสไฟฟ้าใน Towbin buffer ที่ 70 volt อย่างน้อย 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายใส่ถุง dialysis อันใหม่ แล้วแช่ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชม. เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วจึงนำมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Vacuum concentrator (Speed-Vac.) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น แบ่งเป็นส่วนๆ เก็บไว้ที่ -70°C โดยส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก hybridoma cells

7. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว

7.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำ recombinant protein VP28 หรือ VP28F118 (rVP28 และ rVP28F118) ที่ได้จากข้อ 6 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว (0.1 มิลลิกรัมของโปรตีนต่อตัว) ต่อจากนั้นทุกๆ 2 สัปดาห์

ฉีด rVP28 หรือ rVP28F118 ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (0.1 มิลลิกรัมของ โปรตีนต่อตัว) ฉีดกระตุ้นซ้ำ 3 ครั้ง แล้วเก็บซีรัมจากหนูแต่ละตัวหลังจากฉีดเข็มที่ 4 เป็นเวลา 7 วัน นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อ rVP28 และ rVP28F118 โดย วิธี Western blot และต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี immunohistochemistry

7.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

วิธีการทำ cell fusion ในการศึกษาค้างนี้ได้พัฒนามาจากวิธีการของ Köhler และ Milstein (1976) ซึ่งดัดแปลงโดย Mosmann และคนอื่นๆ (1979) โดยฉีด rVP28 หรือ rVP28F118 ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุด ก่อนทำการ fusion 3 วัน และใช้ P3X myeloma cell เป็น fusion partner จากนั้นนำหนู ผ่าตัดม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวและนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ polyethyleneglycol (PEG) 40% หลังจากนั้นนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (selective medium - HAT medium) ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine 20% fetal calf serum ใน RPMI medium ซึ่งมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของ hybridoma ใน culture plate ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่างๆ ที่มี hybridoma ไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี dot-blot immunohistochemistry และ Western blot โคลนของ hybridoma ที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะนำมา reclone ด้วยวิธี limited dilution จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนและเก็บเซลล์แช่ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป และตรวจสอบ Class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)

7.3 การคัดเลือก hybridoma

7.3.1 Dot blotting

นำ rVP 28 protein ความเข้มข้น 10 µg/ml มาหยดลงบนกระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 µl/หยด อบที่ 60° C เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จาก hybridoma ในแต่ละหลุม (เจือจาง 1:20 ใน 5% blotto = 5% non fat dry milk 0.1% tritonX 100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 4 ชม. หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto นำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP ; Biorad) เจือจาง 1:1,500 เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นล้างใน 0.5% blotto และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine

(DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เลือก hybridoma clone ที่จำเพาะต่อ rVP 28 protein นำมาคัดเลือกต่อโดยวิธี immunohistochemistry และ Western blot

7.3.2 Immunohistochemistry

นำส่วนหัวของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติที่สลับในน้ำเย็น แช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 μm ติดบนสไลด์นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านลง butanol และ แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตั้งแต่ 100% 95% 90% 70% และน้ำ บ่มในโมโนโคลนอล แอนติบอดีแต่ละชนิด 6 ชม. ล้างและบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 เป็นเวลา 6 ชม. และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematoxyline และ eosin Y (H & E) ดึงน้ำด้วย แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตั้งแต่ 70% 90% 95% 100% และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass บริเวณที่ติดเชื้อ ไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล

7.3.3 SDS-PAGE และ Western blot

นำ rVP 28 protein ที่ทำให้บริสุทธิ์ และสารสกัดจากเหงือกของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติ มาแยกบน 15% SDS-PAGE ที่ 100 V เป็นเวลา 1 ชม. ตัด แยก gel เป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของ gel นำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ transblot apparatus (Biorad) จากนั้นนำ nitrocellulose membrane จุ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมเจือจาง 1:200 ใน 5% blotto เป็นเวลา 4 ชม. และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blot เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

8. การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่ง กล้วยาดำ

เตรียมกึ่งกล้วยาดำ ชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดสารสกัดจากเหงือกกึ่ง กล้วยาดำที่กรองด้วย 0.45 μm filter และนำมาเจือจาง 1:50 โดยฉีดปริมาตร 50 μl ให้กึ่ง กล้วยาดำขนาด 15-20 กรัม เก็บตัวอย่าง ชุดละ 8 ตัว ที่เวลา 12 18 24 และ 36 ชม. โดย

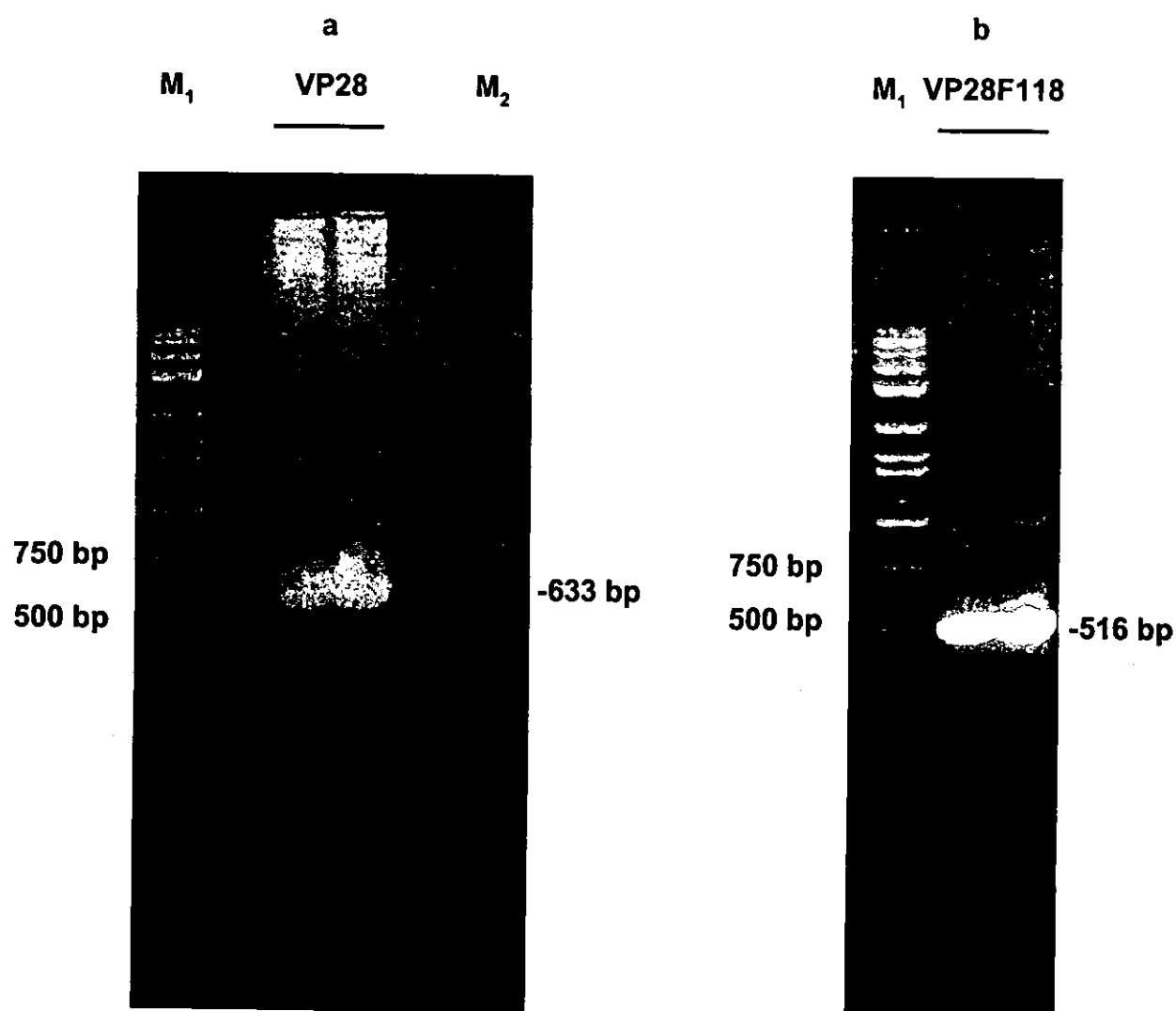
เก็บ haemolymph จากกิ้งแต่ละตัวแยกกัน ส่วนหัวนำไปแช่ใน Davidson's Fixative และผ่านกระบวนการเตรียม paraffin section สำหรับตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดย immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ กรณี haemolymph จากกิ้งแต่ละตัวนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดย dot blot หรือรวมกันในการทดลองแต่ละชุด ตรวจยืนยันการติดเชื้อโดย PCR โดยใช้ primer VP28F และ VP28R

บทที่ 4

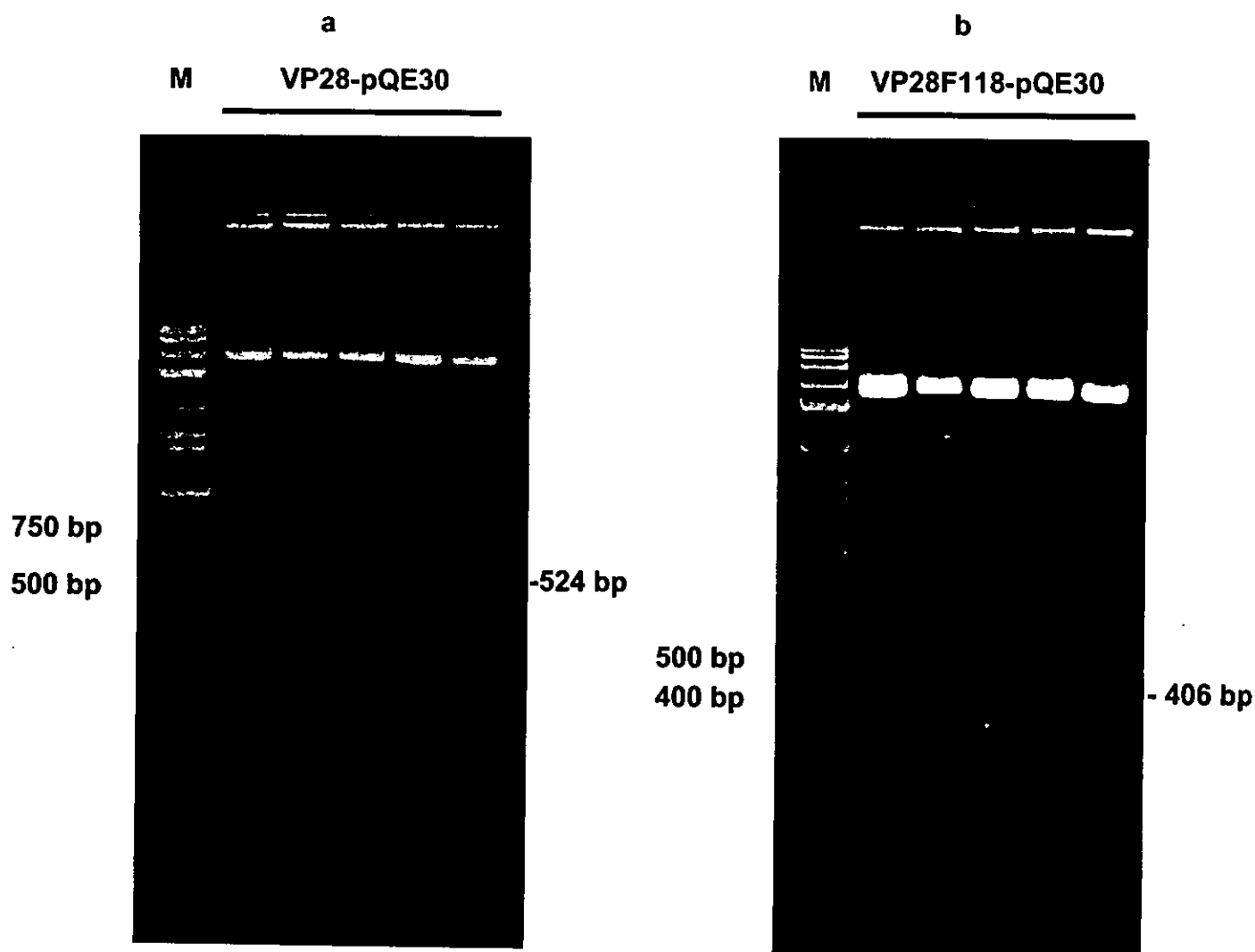
ผลการทดลอง

การโคลนยีนและการแสดงออกของโปรตีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากการสกัด DNA ของไวรัสจากเหือกกุ่มกุลาดำและเหือกปูทะเลด้วยชุดสกัด high pure viral nucleic acid kit สำหรับใช้เป็น DNA ต้นแบบในการเพิ่มชิ้นส่วนยีน VP28 และ VP28F118 โดยวิธี PCR ด้วยเอนไซม์ *Pfx* DNA polymerase พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 633 bp และ 516 bp ตามลำดับ (ภาพประกอบ 8) โดยปลายของผลผลิต PCR ของยีน VP28 และ VP28F118 เป็นแบบปลายทู่ (blunt end) จึงทำการโคลนเข้าสู่ พลาสมิด pCR Blunt ก่อนที่จะนำไปตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Pst*II และโคลนเข้าสู่ พลาสมิด pQE30 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ สำหรับการกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยมี T5 promoter และ lac O (lac operator) ควบคุมการแสดงออก ทำการคัดเลือกโคลนที่มีการเชื่อมต่อของยีน VP28 และ VP28F118 ใน pQE30 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I ซึ่งเอนไซม์ *Bam*HI จะตัดจำเพาะบนพลาสมิด ส่วนเอนไซม์ *Kpn*I ทำการตัดภายในชิ้นของยีน VP28 และ VP28F118 ซึ่งจะได้ชิ้น DNA ขนาด ประมาณ 3.4 kb ของพลาสมิด และ ชิ้น DNA ขนาด 524 ของยีน VP28 หรือ ขนาด 406 bp ของ ยีน VP28F118 (ภาพประกอบ 9) ภายหลังการตรวจสอบหาลำดับเบส พบว่าพลาสมิดที่ได้นั้นมี การเชื่อมของยีน VP28 และ VP28F118 ในตำแหน่งที่ถูกต้อง จากนั้นจึงนำพลาสมิด VP28-pQE30 และ VP28F118-pQE30 ไป transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) เพื่อกระตุ้นให้ แบคทีเรียสร้างโปรตีน rVP28 และ rVP28F118



ภาพประกอบ 8 PCR product ของ (a) VP28 (b) VP28F118 M_1 = Hi-Lo DNA marker และ M_2 = 100 bp DNA ladder โดยขนาด PCR product ของ VP28 = 633 bp และ ของ VP28F118 = 516 bp



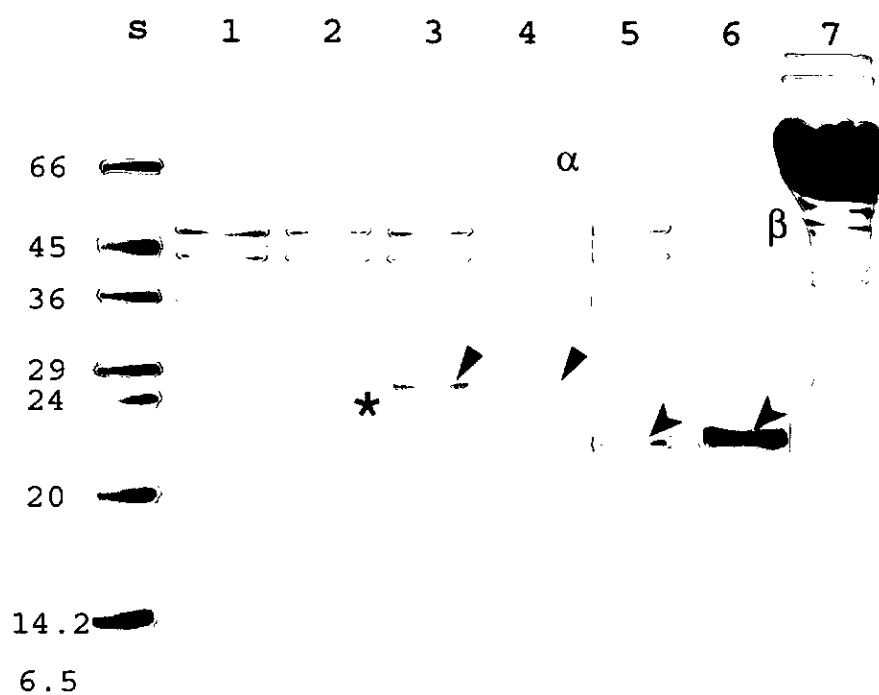
ภาพประกอบ 9 การวิเคราะห์การเชื่อมยีนโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I ของ (a) VP28-pQE30 (b) VP28F118-pQE30 M = Hi-Lo DNA marker โดยพลาสมิด pQE30 มีขนาดประมาณ 3.4 kb ส่วนขนาดของ VP28 = 524 bp และ ของ VP28F118 = 406 bp

การผลิตโปรตีนโครงสร้าง VP28 และ VP28F118

เมื่อคัดเลือกได้ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ซึ่งมีการเชื่อมต่อยีน VP28 และ VP28F118 เข้าสู่พลาสมิด pQE30 ได้แล้วจึงนำมาระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 โดยใช้ 1mM IPTG ก่อนเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตก (cell lysate) และวิเคราะห์โดยแยกบน SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีน rVP28 และ โปรตีน rVP28F118 ซึ่งมีขนาดประมาณ 28 kDa และ 23 kDa ตามลำดับ ซึ่ง recombinant protein ที่ได้จะมี histidine 6 หน่วย เชื่อมอยู่ทางปลาย N ชุดควบคุมในขั้นตอนการกระตุ้นการแสดงออกของยีน (expression) คือแบคทีเรียที่มีการใส่เฉพาะพลาสมิด pQE30 ซึ่งไม่มีการแสดงออกของยีน (negative control) และแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pQE40 ซึ่งมีการเชื่อมยีน dihydrofolate reductase (DHFR) อยู่ในพลาสมิด (positive control) ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน 6xHistag-DHFR ของหนู ขนาด 26 kDa (ภาพประกอบ 10 lane ที่ 2)

การทำโปรตีน VP28 และ VP28F118 ให้บริสุทธิ์

จากการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย มาทำการแยกโปรตีนบน SDS-PAGE และตัดแถบโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 มาทำการสกัดโปรตีนออกจากเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า สามารถแยกได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง ไม่พบแถบโปรตีนอื่น ๆ นอกจากโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าประมาณ 2 เท่าเล็กน้อย และคาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกันของโปรตีนในขณะที่ทำให้บริสุทธิ์ (α และ β ในภาพประกอบ 10 lane ที่ 4 และ 6)



ภาพประกอบ 10 15% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue ของ (1) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30 (2) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มี พลาสมิด pQE40 (3) lysate ของแบคทีเรียที่มี VP28-pQE 30 (4) purified rVP28 (5) lysate ของแบคทีเรียที่มี VP28F118-pQE 30 (6) purified rVP28F118 (7) สารสกัดจากเหวือกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว S = molecular weight โดย * = โปรตีน 6xHistag-DHFR ► = rVP28 ► = rVP28F118
 α = โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 เท่าของ rVP28 และ
 β = โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 เท่าของ rVP28F118

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากการนำโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 ที่ทำบริสุทธิ์ได้ มาฉีดให้หนูขาว 3 ตัว พบว่า หนูทั้ง 3 ตัวสามารถตอบสนองต่อโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 ได้ดี สามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ VP28 แต่มีการจับของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาดใหญ่ และเล็กกว่าแถบของโปรตีน VP28 จำนวนมาก คาดว่าอาจเกิดจากการรวมตัวและการสลายของโปรตีน VP28 ระหว่างการเตรียมโปรตีน และพบปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนต่างๆ จากการสกัดของเหงือกกุ้งกุลาดำ (ภาพประกอบ 11-2) ซึ่งการตอบสนองของ rVP28 และ rVP28F118 ไม่แตกต่างกันจึงใช้เฉพาะหนูที่ฉีดด้วย rVP28 สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทำ fusion สามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ VP28 จำนวน 9 clones (ตาราง 11) มีความจำเพาะต่อ VP28 ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเหงือกกุ้งกุลาดำ (ภาพประกอบ 11-3 และ 11-4) แต่ในกรณีของสารสกัดจากแบคทีเรียที่แสดงออก VP28 และแบคทีเรียปกตินั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับได้หลายแถบโปรตีน คาดว่าน่าจะเกิดการรวมตัวของ VP28 และการสลายตัวของ VP28 ในขณะที่ทำการแยกสกัด



ภาพประกอบ 11 SDS-PAGE และ Western blot ของ (a) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่พลาสมิด pQE30 (b) lysate ของแบคทีเรียที่มี VP28-pQE30 (c) purified rVP28 (d) สารสกัดจากเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว S = molecular weight standard (1) gel ย้อมด้วย Coomassie blue (2) Western blot โดยใช้ mouse anti rVP28 antiserum (3) Western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน W1-7D (4) Western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน W14-8A โดยลูกศรชี้โปรตีน VP28

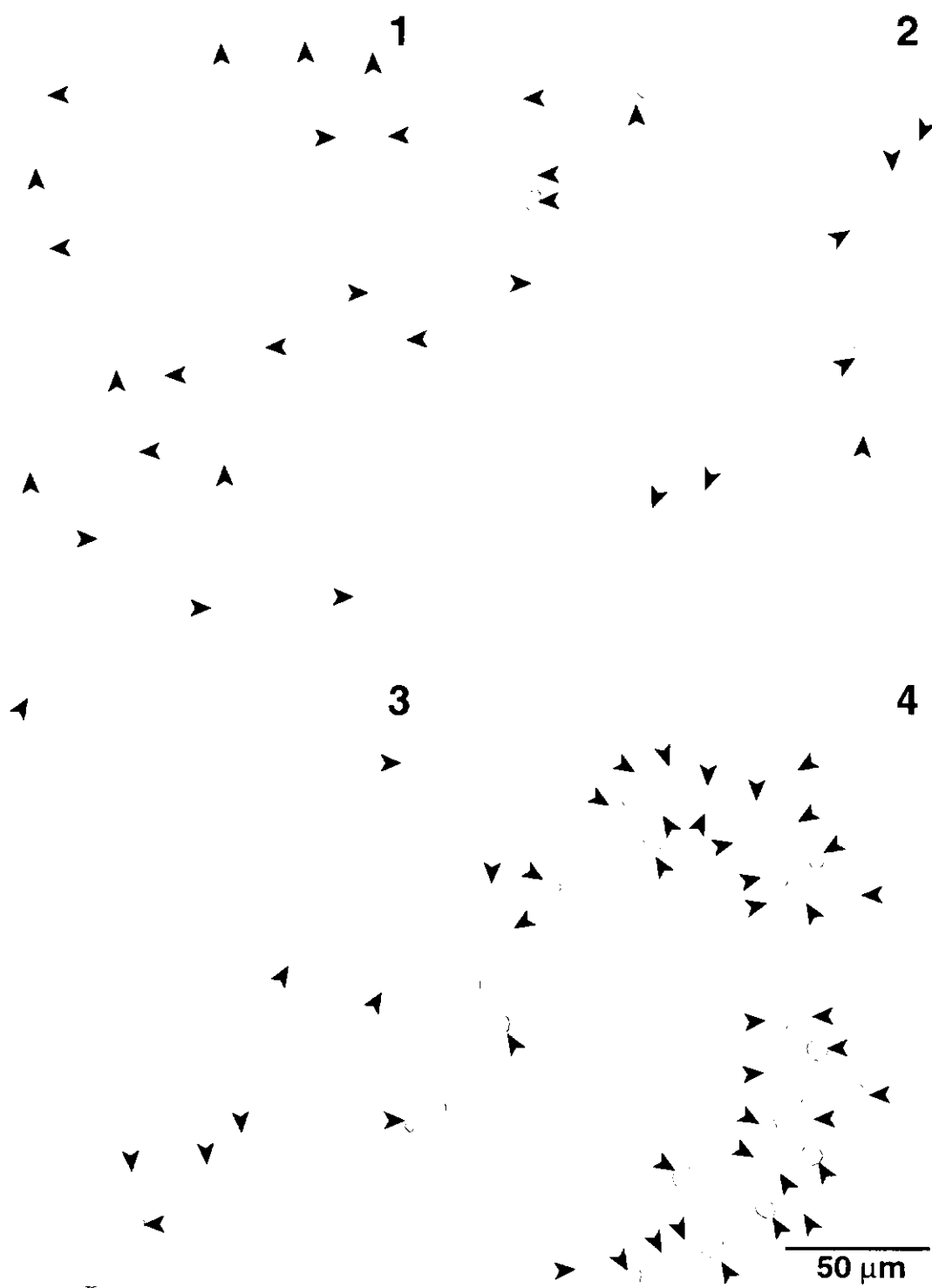
ตาราง 11 แสดงโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP28 (rVP28 และ rVP28F118) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดี	Subclass	Dot-blot (gill extract)	Western blot	Immunohistochemistry
W1-7D	IgG ₁	+	+	+
W2-4G	IgG _{2a}	+	+	+
W6-5H	IgG ₁	+	+	+
W13-8E	IgG _{2a}	+	+	+
W14-8A	IgG ₁	+	+	+
W14-9A	IgG _{2a}	+	+	+
W15-7E	IgG ₁	+	+	+
W28-8H	IgG ₁	+	+	+
W29-1A	IgG ₁	+	+	+

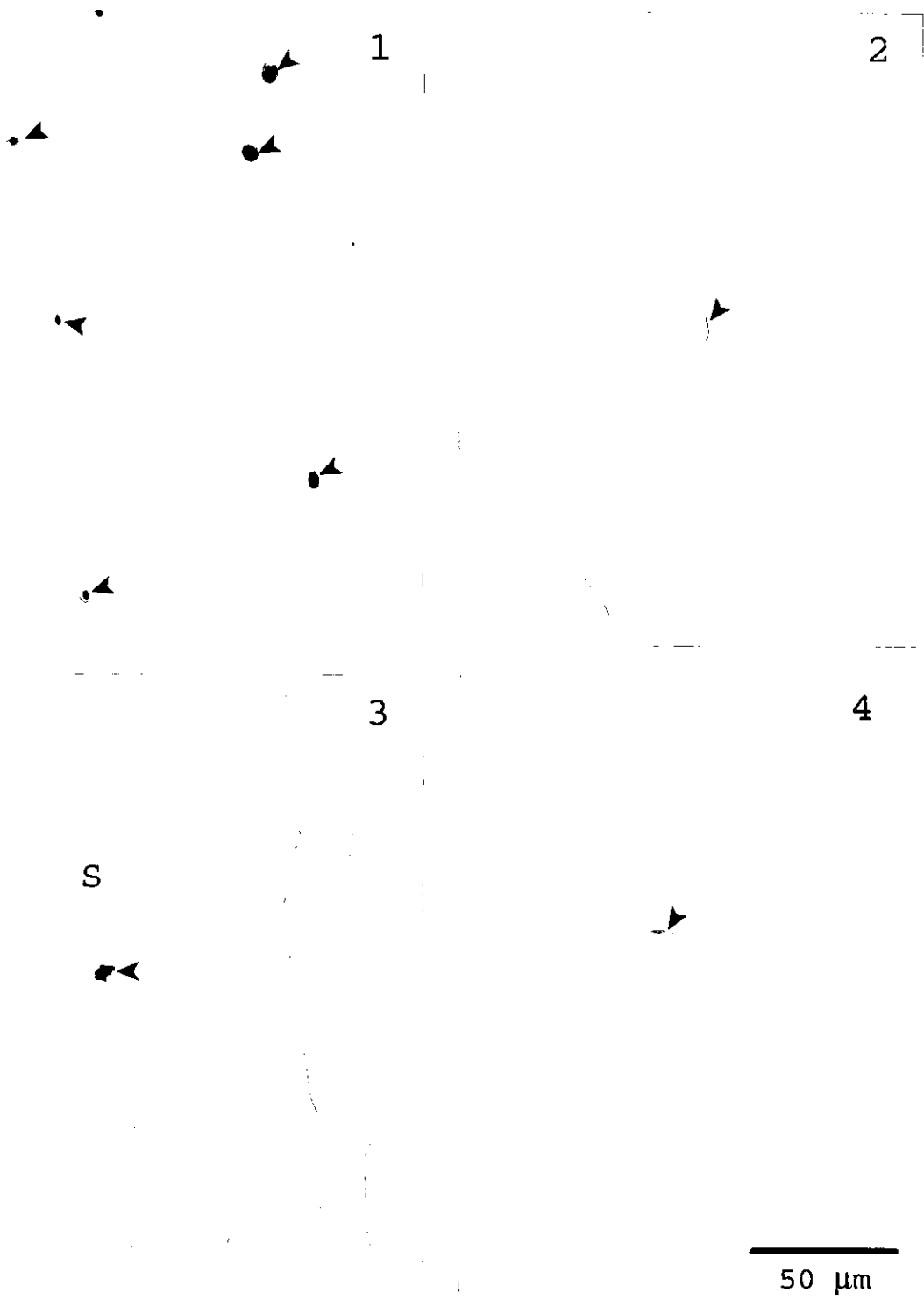
การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูดดำ

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจสอบกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบการติดเชื้อในเซลล์ ที่แสดงลักษณะ Cowdry type A nucleus และนิวเคลียสที่ยังไม่แสดงอาการผิดปกติ ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ เหนือก interstitial cell ของ hepatopancreas lymphoid organ subcuticular epithelium จากบริเวณต่างๆ ของกิ้งกูดดำ (ภาพประกอบ 12)

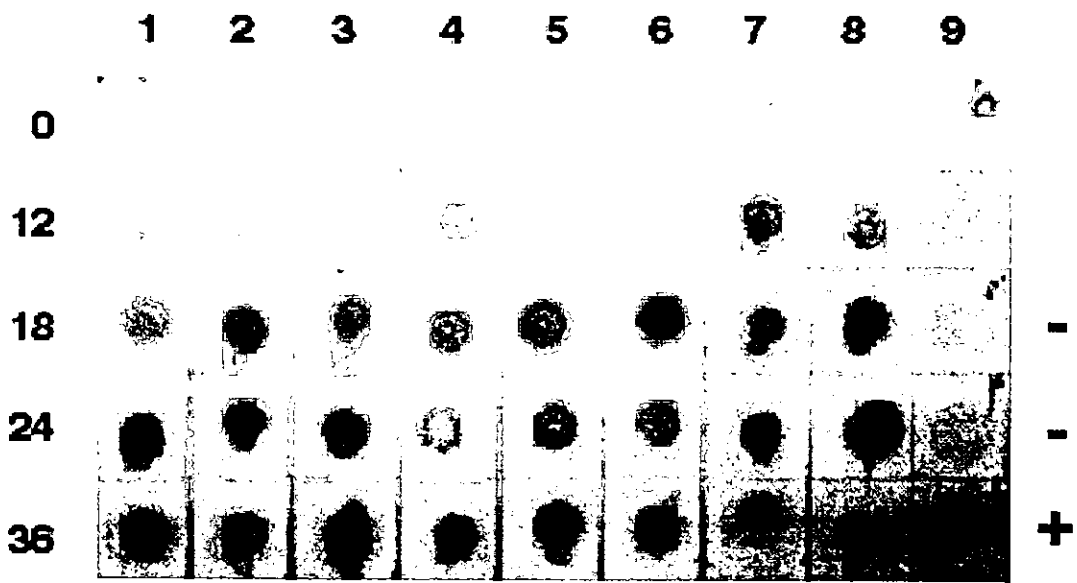
จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจการติดเชื้อของกิ้งกูดดำที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลาต่าง ๆ โดยวิธี immunohistochemistry สามารถพบการติดเชื้อปริมาณน้อย ในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ lymphoid organ และหัวใจของกิ้งกูดดำที่ 12 ชม. หลังจากได้รับเชื้อ ส่วนอวัยวะอื่นเช่น เหนือก และ subcuticular tissue พบการติดเชื้อน้อยมาก (ภาพประกอบ 13) ซึ่งการติดเชื้อจะเห็นชัดเจนในอวัยวะต่าง ๆ หลังจากได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มากกว่า 18 ชม. ขึ้นไป สำหรับการตรวจการติดเชื้อโดยใช้ dot blot ของ haemolymph (ภาพประกอบ 14) พบว่า สามารถพบการติดเชื้อชัดเจนในกิ้งที่ได้รับเชื้อที่ 12 18 และ 24 ชม. ขึ้นไปเพียงบางตัวเท่านั้น (ตาราง 12) ซึ่งต่างจากการใช้วิธี one step PCR ซึ่งสามารถให้ผลชัดเจนในกิ้งที่ได้รับเชื้อตั้งแต่ 12 ชม. เป็นต้นไป (ภาพประกอบ 15)



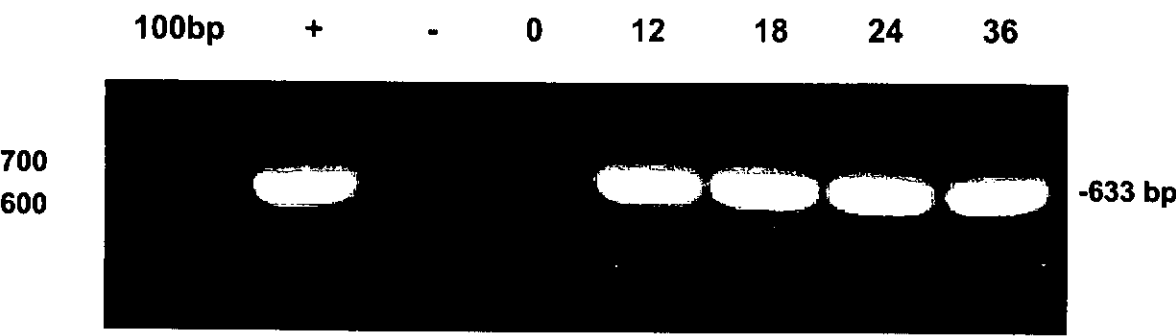
ภาพประกอบ 12 Immunohistochemistry ของไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน W14-8A ตรวจการติดเชื้อที่บริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ ย้อมสีทับด้วย haematoxylin และ eosin Y (1) กล้ามเนื้อหัวใจ (2) เหนือก (3) interstitial cell ของ hepatopancreas (4) subcuticular epithelium จะพบ immunoreactivity ในเซลล์ที่แสดงลักษณะ Cowdry type A nuclei และนิวเคลียสของเซลล์บางเซลล์ที่ยังไม่แสดงลักษณะผิดปกติ



ภาพประกอบ 13 Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน W14-8A ต่อ
เนื้อเยื่อต่าง ๆ จากกุ้งกุลาดำที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 12 ชม. สามารถตรวจ
พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ปริมาณน้อย (ลูกศร) ที่ (1) หัวใจ (2) lymphoid organ
(3) subcuticular tissue (S) และ (4) บริเวณรอบนอกของท่อ hepatopancreas



ภาพประกอบ 14 Dot blot ของ haemolymph จากกุ้งที่ได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว (แถวที่ 1 - 8) เป็นเวลา 12 18 24 และ 36 ชม. + = haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว - = haemolymph ของกุ้งปกติ (แถวที่ 9) 0 = haemolymph ของกุ้งก่อนได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว



ภาพประกอบ 15 One step PCR ของ Haemolymph จากกุ้งกุลาดำที่ได้รับการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 12 18 24 36 ชม. (+) gill extract จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (-) negative control โดยใช้น้ำกลั่น (0) กุ้งปกติตามลำดับ

ตาราง 12 การติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกิ้งกูดำที่ชักนำโดยการฉีดที่เวลาต่าง ๆ

เวลาหลังจากได้รับ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (ซ.ม.)	PCR*	Dot-Blot	Immunohistochemistry
0	-	-(8)	- (8)
12	+++	±(7/8)	+ (7/8)
18	+++	+ (8/8)	++ (8/8)
24	+++	++ (8/8)	+++ (8/8)
36	+++	++ (8/8)	+++ (8/8)

±

พบการติดเชื้อไม่ชัดเจน

+

พบการติดเชื้อเล็กน้อย

*

การตรวจโดยวิธี PCR ทุกตัวอย่างในแต่ละชั่วโมง

++

พบการติดเชื้อชัดเจน

+++

พบการติดเชื้อชัดเจนมาก

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการโคลนนิ่งและการแสดงออกของโปรตีนโครงสร้างของ WSSV สามารถผลิตโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 จาก *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ได้โปรตีนที่มีขนาด 28 kDa และ 23 kDa ตามลำดับ และสามารถแยกโปรตีน rVP28 และ rVP28F118 ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง ไม่พบแถบของโปรตีนอื่นนอกจากโปรตีนที่มีขนาดสูงกว่า ประมาณ 2 เท่า ซึ่งคาดว่าเกิดจากการเชื่อมต่อกันเองของโปรตีนระหว่างการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rVP28 protein ซึ่งจำเพาะต่อ WSSV ได้จำนวน 9 โคลน ทั้ง 9 โคลนล้วนเป็น IgG class โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี immunohistochemistry ได้อย่างดี เพราะจะสังเกตเห็นการติดเชือย่างชัดเจน แม้ในเซลล์ที่ยังไม่แสดงลักษณะของ Cowdry type A nuclei ดังนั้น MAb เหล่านี้จึงสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกได้ดี ซึ่งจะสามารถตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกึ่งทุกตัว หลังกึ่งได้รับการฉีด WSSV เพียง 12 ชม. ซึ่งใกล้เคียงกับวิธี PCR ในขณะที่วิธี *in situ* hybridization สามารถตรวจพบการติดเชื้อ WSSV หลังได้รับเชื้อ 16 ชม. ในเซลล์ของกระเพาะอาหาร เหงือก epidermis และตับ (Chang; et al. 1996 : 131-139) ซึ่งกรณีของ immunohistochemistry พบการติดเชื้อชัดเจนที่ lymphoid organ หัวใจ และ ตับ

สำหรับการตรวจการติดเชื้อโดย dot blot ยังมีความไวค่อนข้างต่ำ ที่ 12 ชม.ให้ผลไม่ชัดเจนนัก และชัดเจนขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อเวลานาน 18 ถึง 36 ชม. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนไวรัสส่วนใหญ่สะสมอยู่ในนิวเคลียสภายในเซลล์ จึงมีการปลดปล่อยสู่ haemolymph จำนวนน้อย ซึ่งต่างจากกรณีของการติดเชื้อ YHV ที่มีการปลดปล่อย YHV สู่ haemolymph จำนวนมาก ส่วนการตรวจโดยวิธี one step PCR จะใช้ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างทั้งหมดของแต่ละชม. มาบดรวมกัน (pool sample) สามารถให้ผลบวกชัดเจนตั้งแต่เวลา 12 ชม. ขึ้นไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้ MAb ต่อไป ได้แก่ sandwich ELISA ซึ่งคาดว่าจะให้ผลความไวในการตรวจใกล้เคียงกับ PCR (Lui; et al. 2002 : 11-18) และนอกจากนี้คาดว่าจะสามารถใช้ MAb เหล่านี้พัฒนาชุดตรวจแบบง่าย ๆ ได้แก่ strip test เช่นเดียวกับชุดตรวจการตั้งครรภ์ หรือ flow through sandwich ELISA ซึ่งจะให้ความไวสูงและใช้ง่ายต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ยัยนั๊บ แวและ. (2545). การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* *Penaeidae* และ *Atyidae* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี. ปรินซ์นิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สิริ ทุกขวินาศ; และ ชุตติมา ขมวิลัย. (2545, พฤษภาคม – มิถุนายน). แนวทางการวิจัยและพัฒนา อุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. วารสารการประมง. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=122. วันที่ 15 มิถุนายน 2546.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ; และคนอื่นๆ. (2537). อิมมูโนวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เค.พี. พรินต์ติ้ง จำกัด.
- Anderson, I.G.; & Prior, H.C. (1992). Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla serrata* and a freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* from Australia. *Invertebrate pathol.* 60 : 265 – 273.
- Anil, T.M.; Shankar, K.M.; & Mohan, C.V. (2002). Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Diseases of Aquatic Organisms.* 51 : 67 - 75.
- Black, J.K. (1976). *Microbiology*. New Jersey, USA : Prentice-Hall, Inc.
- Chang, P.S.; et.al. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms.* 27 : 131 – 139
- Chen, L.L.; et.al. (2000). Natural and experimental infection of white spot syndrome in Benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Diseases of Aquatic Organisms.* 40 : 157 - 161.
- Chou, H.Y.; et.al. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms.* 25 : 133 – 141.
- Chou, H.Y.; et.al. (1995). Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture.*
- Flegel, T.W. (1995). "Progress in characterization and control of yellow – head virus of *Penaeus monodon*." In Browndy, C.L. and J.S. Hopkins.(eds). *Swimming through troubled water, Proceedings of the special session on shrimp farming.*

- Aquaculture*'95, World Aquaculture Society. pp. 77 – 83. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Flegel, T.W. (1997). Special topic review : major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol Biotechnol.* 13 : 433 – 442.
- Flegel, T.W.; Fegan, D.F.; & Sriurairatana, S.; (1995). "Environmental control of infectious shrimp disease in Thailand." In Asian aquaculture II Asean fisheries Society, pp. 65 - 79. Manila, Philippines.
- Flegel, T.W.; Boonyaratpalin, S.; & Withyachumnarnkul, B. ; (1997). "Progress in research on yellow – head virus and white spot virus in Thailand." In Flegel, T.W. and I.H.MacRae.(eds.), *Diseases in Aquaculture III*, Asian Fisheries Society, pp. 285 - 295. Manila, Philippines.
- Kanchanaphum, P.; et al. (1998). Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms.* 34 : 1 – 7.
- Kasornchandra, J.; & Boonyaratpalin, S. (1994). White spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *Farming.* 12 : 9 – 11.
- Kasornchandra, J.; Boonyaratpalin, S.; & Supamattaya, K. (1994). Electron microscopic observation on the replication of yellow head baculovirus in lymphoid organ of *Penaeus monodon*. Department of Fisheries, Bangkok, Technical paper # 2, pp 1 – 11.
- Kasornchandra, J.; et al. (2000). Vertical transmission of white spot syndrome virus. In *The 2nd National Symposium on Marine Shrimp*, pp. 32 - 41. Phuket, Thailand.
- Lighter, D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge.
- Lighter, D.V.; & Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic method. *Aquaculture.* 164 : 201 – 220.
- Liu, W ; et al. (2002, August). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Diseases of Aquatic Organisms.* 49 : 11 - 18.
- Lo, C.F.; et al. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms.* 25 : 133 - 141.

- Lo, C.F.; et al. (1996). White spotsyndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 215 – 225.
- Lo, C.F.; et al. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon*.with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30 : 53 – 72.
- Lu, Y.; et al. (1995). Distribution of yellow-head virus in selected tissue and organ of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 : 67 - 70.
- Mohan, C.V.; et al. (1998). Histology of cultured shrimp showing gross sign of yellow – head syndrome and white – spot syndrome during 1994 Indiand Epizootics *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 9 - 12.
- Nadala, E.C.B.Jr; Tapay,L.M.; & Loh, P.C. (1997). Yellow - head virus : a rhabdovirus – like Pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 141 - 146.
- Nadala, E.C.B.Jr.; Tapay,L.M.; & Loh, P.C. (1998, July). Characterization of a non – occluded baculovirus – like agent pathogenic to penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 33 : 221 - 229.
- Nadala, E.C.B.Jr.; & Loh, P.C. (2000, Febuary). Dot blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white - spot virus and yellow – head virus of penaeid shrimp. *Journal of Virol methods*. 84 : 175-179.
- Park, J.H.; et al. (1998) An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 71 - 75.
- Poulos, B.T.; et al. (2001, October) Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 47 : 13 - 23.
- Sambrook, J.; & Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning*. 3rd Ed. New york: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. A1.7, A1.17, A1.28, A2.2.
- Supamattaya, K.; et al. (1998, March). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelegicus*, mud crab *Scylla serrata* and Krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32 : 79 - 85.
- Takahashi, Y.; et al. (1994). Electron microscope evidence of baciliform virus infection in Kuruma shrimp (*Portunus japonicus*). *Fish pathology*. 29 : 121 - 125

- Tapay, L.M.; et al. (1997). Infection of white spot baculovirus – like (WSBV) of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *Diseases in Aquaculture III*, Asian Fisheries Society, pp. 285 - 295. Manila, Philippines.
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2000a, July) Analysis of genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes repeat regions. *Journal of General Virology*. pp. 307 - 316.
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2000b, July) Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*. 266 : 227 - 236.
- Van Hulten, M.C.W.; Goldbach, R.W.; & Vlak, J.M.. (2000, October) Three functionally diverged major structural protein of white spot syndrome virus enveloped by gene duplication. *Journal of General Virology*. 81 : 2525 - 2529.
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2001a, July) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*. 286 : 7 - 22
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2001b, July) White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 285 : 228 – 233.
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2002, January) Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of General Virology*. 83 : 257 - 265.
- Wang, C.H.; et al. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 : 239 - 242.
- Wang, Q.; Poulos, B.T.; & Lightner, D.V. (2000) Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. *Archives of Virology*. 145 : 263-274.
- Wongteerasupaya, C.; et al. (1995). A non – occluded, stythetic baculovirus that occurs incells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21 : 69 - 77.
- Wongteerasupaya, C.; et al. (1995, May). Yellow – head virus of *Penaeus monodon* is RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22 : 45 - 50.
- Wongteerasupaya, C.; et al. (1997, December). Detection of yellow head virus of *Penaeus monodon* by RT – PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 181 - 186.
- Zhang, X.; et al. (2002). Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *Journal of General Biology*. 83 :1069-1074.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. Lysis buffer (Flegel pers. Comm., 1988)

(50mM Tris-HCl pH 9.0 100mM EDTA 50mM NaCl 2%SDS)

Tris-HCl (ปรับ pH 9.0)	6.055	g
EDTA	37.225	g
NaCl	2.922	g
SDS	20	g
เติมน้ำกลั่น (TdH ₂ O) ให้ได้ปริมาตร	1	L

2. GTE buffer (50mM Glucose 10mM EDTA 25mM Tris-HCl pH 8.0)

Glucose	0.9	g
EDTA	0.732	g
Tris-HCl (ปรับ pH 8.0)	0.3	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml

3. TE buffer (1mM EDTA 10mM Tris-HCl pH 8.0)

EDTA	0.0372	g
Tris-HCl (ปรับ pH 8.0)	0.1211	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml

4. 5M KAc buffer

KAc	14.72	g
Glacial acetic acid	5.75	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50	ml

5. 10X TBE buffer

Tris-HCl (ปรับ pH 8.3)	108	g
Boric acid	55	g
EDTA	9	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1	L

6. 100mM IPTG

IPTG	0.238	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10	ml

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

NaH_2PO_4	1.38	g
Tris-HCl (ปรับ pH 6.3)	0.12	g
Urea	48.05	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml

8. 100mM PMSF

PMSF	17.4	mg
Isopropanol (conc.)	1	ml

9. LB broth

Tryptone	5	g
Yeast-extract	2.5	g
NaCl	5	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500	ml

10. LB agar

Tryptone	5	g
Yeast-extract	2.5	g
NaCl	5	g
Agar	7	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500	ml

11. RPMI IV medium

RPMI 1640 (Gibco BRL)	10.4	g
D- glucose	3.6	g
L-glutamine	0.2923	g
Sodium pyruvate	1.1005	g
NaHCO_3	2.016	g

Hepes (N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N-2-ethanol sulphonic acid)		
	5.9525	g
เติมน้ำกลั่น (TdH ₂ O) ให้ได้ปริมาตร	1	L
12. Monomer solution		
Acrylamide	58.4	g
Bis-acrylamide	1.6	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200	ml
13. 4X Running gel buffer		
Tris-HCl (ปรับ pH 8.8)	36.3	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200	ml
14. 4X Stacking gel buffer		
Tris-HCl (ปรับ pH 6.8)	3	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200	ml
15. Staining solution G250		
95% methanol	50	ml
Glacial acetic acid	10	ml
10% Coomassie Brilliant blue	1	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml
16. Destain I		
95% methanol	50	ml
Glacial acetic acid	10	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml
17. Destain II		
95% methanol	5	ml
Glacial acetic acid	7	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml

18. treatment buffer (Sample buffer)

4X Stacking gel buffer	2.5	ml
10% SDS	4	ml
Glycerol	2	ml
2-mercaptoethanol	1	ml
น้ำกลั่น	0.5	ml

19. Gel overlay

4X Running gel buffer	25	ml
10% SDS	1	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml

20. วิธีการเตรียม 15% separating gel

Monomer solution	5	ml
4X running gel buffer	2.5	ml
10% SDS	0.1	ml
น้ำกลั่น	2.35	ml
Ammonium persulfate	50	μ l
TEMED	5	μ l

21. วิธีการเตรียม 4% separating gel

Monomer solution	1.33	ml
4X stacking gel buffer	2.5	ml
10% SDS	0.1	ml
น้ำกลั่น	6.1	ml
Ammonium persulfate	50	μ l
TEMED	5	μ l

22. 4X Tank buffer

Tris-HCl	12	g
Glycine	57.6	g
10% SDS	40	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1	L

23. Towbin buffer

Tris-HCl	3.03	g
Glycine	14.4	g
Methanol	200	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1	L

24. โปรตีนมาตรฐาน ประกอบด้วย

	MW (kDa)
Albumin, bovine serum	66.0
Ovabumin, chicken egg	44.0
Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36.0
Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29.0
Trypsinogen, bovine pancrease	24.0
α -lactalbumin, bovine milk	14.2
Apotinin, bovine lung	6.5

25. Davidson fixative

95% ethanol	30	ml
35% formalin	20	ml
Glacial acetic acid	10	ml
น้ำกลั่น	30	ml

26. 0.15M Phosphate buffer saline, pH 7.2

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
Na ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	2.15	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1	L

27. 10% Calf serum (P1⁺)

Calf serum	10	ml
PBS	90	ml

28. 5% blotto

skim milk	5	g
PBS	100	ml
1% merthiolate	1	ml
TritonX100	0.1	ml

29. Anticoagulant (Modified Alsever solution), pH 7.4

(27mM Sodium citrate 336mM NaCl 1mM EDTA)

Sodium citrate	7.94	g
NaCl	19.64	g
EDTA	3.35	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1	L

30. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Gelatin	1	g
Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	ml

31. สี Enrilich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8	g
95% Ethyl alcohol	400	ml
Aluminium Potassium Sulphate	8	g
Glycerine	400	ml
Glacial acetic acid	400	ml
น้ำกลั่น	400	ml

32. 0.2 % Eosin Y ใน 95% Ethyl alcohol

Eosin Y	0.2	g
95% Ethanol	100	ml

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวจรัสพร ตั้งขบวนบุตร
วันเดือนปีเกิด	29 มีนาคม 2520
สถานที่เกิด	ปทุมวัน กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	161/68 ถ.สรรพาวุธ แขวงบางนา เขตบางนา กรุงเทพฯ 10260
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนพระโขนงพิทยาลัย
พ.ศ. 2542	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2547	วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ