

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2546
ชุดโครงการวิจัยเรื่อง

การตรวจวินิจฉัยและการป้องกันโรคไวรัสในกุ่มกุลาดำ

วีระวรรณ สิทธิกรกุล

(ผู้ประสานงาน)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ไพศาล สิทธิกรกุล

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ปริณฑ์ ชัยวิสุทธิธำรง

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ชัยณรงค์ วงศ์ธีระทรัพย์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

วาสนา สุขุมศิริชาติ

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณงานส่งเสริมการวิจัยและตำรา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ผู้วิจัย

กรกฎาคม 2547



บทคัดย่อ

งานวิจัยในชุดโครงการวิจัยนี้เป็นการสร้างเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอนุชีววิทยา รวมทั้งความพยายามในการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาในการผลิตโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีน ซึ่งประกอบด้วย

การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus, YHV) ชนิดแถบสี ทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 kD มาเชื่อมต่อกับ colloidal gold แล้วใส่ในแผ่นดูดซับและนำมาประกอบด้านหนึ่งของแถบ nitrocellulose membrane ที่มี rabbit anti YHV antibody และ goat anti mouse IgG antibody ตรึงขวางอยู่เป็นขีดตามลำดับ อีกด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane มีแผ่นดูดซับเพื่อใช้ดูดซับสารละลายที่มาจากแผ่นดูดซับด้านแรกและนำมาประกอบในตลับพลาสติกเพื่อสะดวกในการเก็บรักษาและใช้ การใช้ทำได้โดยดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตามด้วยดูดเลือดกุ้งที่ต้องการตรวจ ผสมกันก่อนหยดใส่ในช่องบนแผ่นดูดซับชุดแรกและปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน nitrocellulose membrane ไปยังแผ่นดูดซับอีกด้านหนึ่ง ถ้าปรากฏสีม่วงแดง 2 แถบบนแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าตัวอย่างมีการติดเชื้อ YHV วิธีนี้สามารถใช้ตรวจตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกุ้งได้โดยการบดตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้และดูดเฉพาะส่วนน้ำใสมาทดสอบ ใช้ตรวจสอบตัวอย่างกุ้งแต่ละตัวได้ และใช้ในการคัดเลือกกุ้งที่ติดเชื้อเบื้องต้น และยืนยันผลการติดเชื้อ YHV ข้อดีของวิธีการนี้ได้แก่ ความง่าย สะดวก รวดเร็วในการตรวจโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ สามารถทำได้โดยเกษตรกรทั่วไปได้

ส่วนงานวิจัยเกี่ยวกับการแยก cDNA และการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสหัวเหลือง เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนต่อ YHV สำหรับสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้ง ทำโดยแยกยีน gp116 Δ TM โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่การแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector ใน *E. coli* พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ ในขณะที่การแยกยีน gp116(N73) (บริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 73 ตัวแรกทางปลาย N) และทำการแสดงออกโดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ามีการแสดงออกของ 6 histidine-tag gp116(N73) ในปริมาณที่สูง สามารถนำโปรตีนนี้ไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำได้ต่อไป สำหรับการแยกยีน gp64 Δ TM โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน 6 histidine-tag gp64 Δ TM (56 kD) ในระดับที่ต่ำมาก ความพยายามในการแสดงออกของโปรตีน gp64 Δ TM นี้โดยใช้ pMAL-C2, pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 vectors ใน *E. coli* ไม่พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนนี้แต่อย่างใด และจากการแยกยีน gp64 ตรงบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 160 ตัวแรกทางปลาย N ซึ่งมีส่วนที่ขอบหน้าเป็นส่วนใหญ่และให้ชื่อว่า gp64 (HPL) โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้

expression vectors ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ pQE30, pMAL-C2, pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 ไม่พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนนี้

การพัฒนาชุดตรวจสอบโรคไวรัสที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้พร้อม ๆ กัน โดยวิธี multiplex RT-PCR ELISA ทำโดยพัฒนาเทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิก ที่เป็น DNA และ RNA ได้พร้อมกันโดยวิธี CTAB ทำให้ประหยัดเวลา และได้ทำการออกแบบ primer 2 คู่ จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1 b ขนาด 300 เบส และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีน nVP500F-nVP500R ขนาด 500 เบส ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการทำ multiplex RT-PCR เพียงขั้นตอนเดียว และตรวจวิเคราะห์ผลโดยวิธี ELISA ซึ่งเป็นการเพิ่มความไว ประหยัดเวลา และสะดวกเพื่อตรวจตัวอย่างจำนวนมาก

การพัฒนาชุดตรวจสอบวินิจฉัยไวรัส HPV โดยใช้วิธี Sandwich ELISA ทำโดยแยกสกัด HPV (Hepatopancreatic parvovirus) จากตับกึ่งกุลาดำแคะโดยวิธี urografin gradient ultracentrifugation และตรวจหา DNA และโปรตีนของไวรัสโดยเทคนิค PCR และ SDS-PAGE ปรากฏว่าพบแถบโปรตีนหลัก 1 ชนิด ขนาด 54 kD จึงใช้ฉีดเข้าไปในหนูขาวเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คัดเลือกแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัส HPV โดยเทคนิค dot blot, Western blot และ immunohistochemistry สามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 4 โคลน ซึ่งแอนติบอดีทั้ง 4 สามารถจับกับโปรตีนหลักขนาด 54 kD และจับกับนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส HPV บริเวณ basophilic intranuclear inclusion bodies ในการวิเคราะห์ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของ hybridoma พบว่าเป็น IgG_{2b} จำนวน 2 โคลน และ IgG₁ จำนวน 2 โคลน โดยที่ subclass IgG_{2b} สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสได้ดีกว่า subclass IgG₁ ดังนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการของ immunoassay คือ Sandwich ELISA และยังได้ทำการโคลนยีนของโปรตีนโครงสร้างของ HPV เพื่อให้มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	1
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์และหรือเป้าหมายหลักของชุดโครงการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4
แผนการดำเนินงานพร้อมทั้งขั้นตอนการดำเนินงานตลอดชุดโครงการวิจัย	5
ชื่อชุดโครงการวิจัยย่อย/ชื่อโครงการวิจัย/หัวหน้าโครงการ	6
ขอบเขตของแผนงานชุดโครงการวิจัยในปี พ.ศ. 2546	7
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย	8
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 1	9
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 2	10
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 3	11
สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 4	12
เอกสารอ้างอิง	13
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 1-4	16



ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

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

ปัจจุบันการแก้ปัญหาการเกิดโรคไวรัสโดยการรักษายังไม่มีวิธีที่ชัดเจน การลดการสูญเสียจากโรคติดเชื้อไวรัส ทำโดยการป้องกันการติดเชื้อ โดยการตรวจวินิจฉัยคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และกุ้งวัยอ่อนที่ปลอดเชื้อก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม และตรวจสอบการติดเชื้อระหว่างการเลี้ยง ซึ่งวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อต่างๆ โดยการตรวจพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (histopathology) และตรวจดูอาการของโรค (symtomatic diagnosis) ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วสามารถตรวจพบเมื่อกุ้งแสดงอาการของโรคเต็มที่ และส่วนตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาในเวลาที่เหมาะสมและถูกต้อง อีกทั้งอาการของโรคมักมีอาการเกี่ยวกับการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อโปรโตซัวอื่นร่วมอยู่ด้วย ซึ่งเป็นปัญหาทำให้การวิเคราะห์วิธีเหล่านี้ไม่ให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ

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

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

ส่วนการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อใช้ตรวจ WSSV และ YHV นั้น ได้มีการผลิตแอนติซีรั่มต่อ WSSV และ YHV เพื่อการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค Western blot (Loh et al., 1998) แต่อย่างไรก็ตาม

การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำ และไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก ถึงแม้จะสามารถดัดแปลงใช้วิธี dot blot (Nadala et al., 2000) แต่ความไวในการตรวจสอบก็ยังต่ำอยู่มาก

ความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งจำเพาะต่อไกลโคโปรตีนที่คาดว่าเป็นองค์ประกอบส่วนที่เป็นเปลือกหุ้มของ YHV (Nadala et al., 1997) สามารถใช้ตรวจหา YHV ได้ใน haemolymph และเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยวิธี dot blot, Western blot และ immunocytochemistry ซึ่งวิธีเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังต้องทำในห้องปฏิบัติการ บางวิธีต้องใช้เวลาในการตรวจหลายวัน และความไวของวิธีตรวจยังไม่ถึงจุดสูงสุด จึงจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจเพื่อให้ใช้ได้ง่าย สะดวก และมีความไวสูงต่อไป

จากตัวอย่างความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถปรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสได้อย่างหลายวิธี และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก จึงน่าจะนำมาใช้ในการตรวจหา MBV และ HPV ด้วยเช่นกัน

กรณีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV และ YHV ไม่ได้นำเสนอในชุดโครงการนี้ เนื่องจากโครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติในช่วงปี 2543-2545 ซึ่งดำเนินการวิจัยสำเร็จแล้วในบางส่วนและจะดำเนินการวิจัยควบคู่กันไป

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

โดยสรุปชุดโครงการวิจัยนี้เป็นการสร้างเครื่องมือในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อที่จะได้เครื่องมือวินิจฉัยที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อไวรัสในระดับต่าง ๆ และสามารถปรับใช้ภาคสนามได้ อันเป็นแนวทางการป้องกันและติดตามการติดเชื้อไวรัสในการเลี้ยงกุ้งและศึกษาพฤติกรรมของไวรัส ส่วนแนวทางการป้องกันการติดเชื้ออีกแนวทางหนึ่งจะเป็นโครงการนำร่องการผลิตวัคซีน เพื่อสร้างภูมิคุ้มกันในประชากรของกุ้ง ซึ่งจะใช้ YHV ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงเป็นต้นแบบสำหรับใช้เป็นแนวทางในการผลิตวัคซีนของไวรัสชนิดอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์และหรือเป้าหมายหลักของชุดโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกิ้งกูดดำ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกิ้งกูดดำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอนุชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกิ้งกูดดำ
2. สามารถพัฒนาวิธีการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกิ้งกูดดำ
3. สามารถพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตการเลี้ยงกิ้งเนื่องจากโรคไวรัส
4. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกิ้งกูดดำสู่กลุ่มเป้าหมาย

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

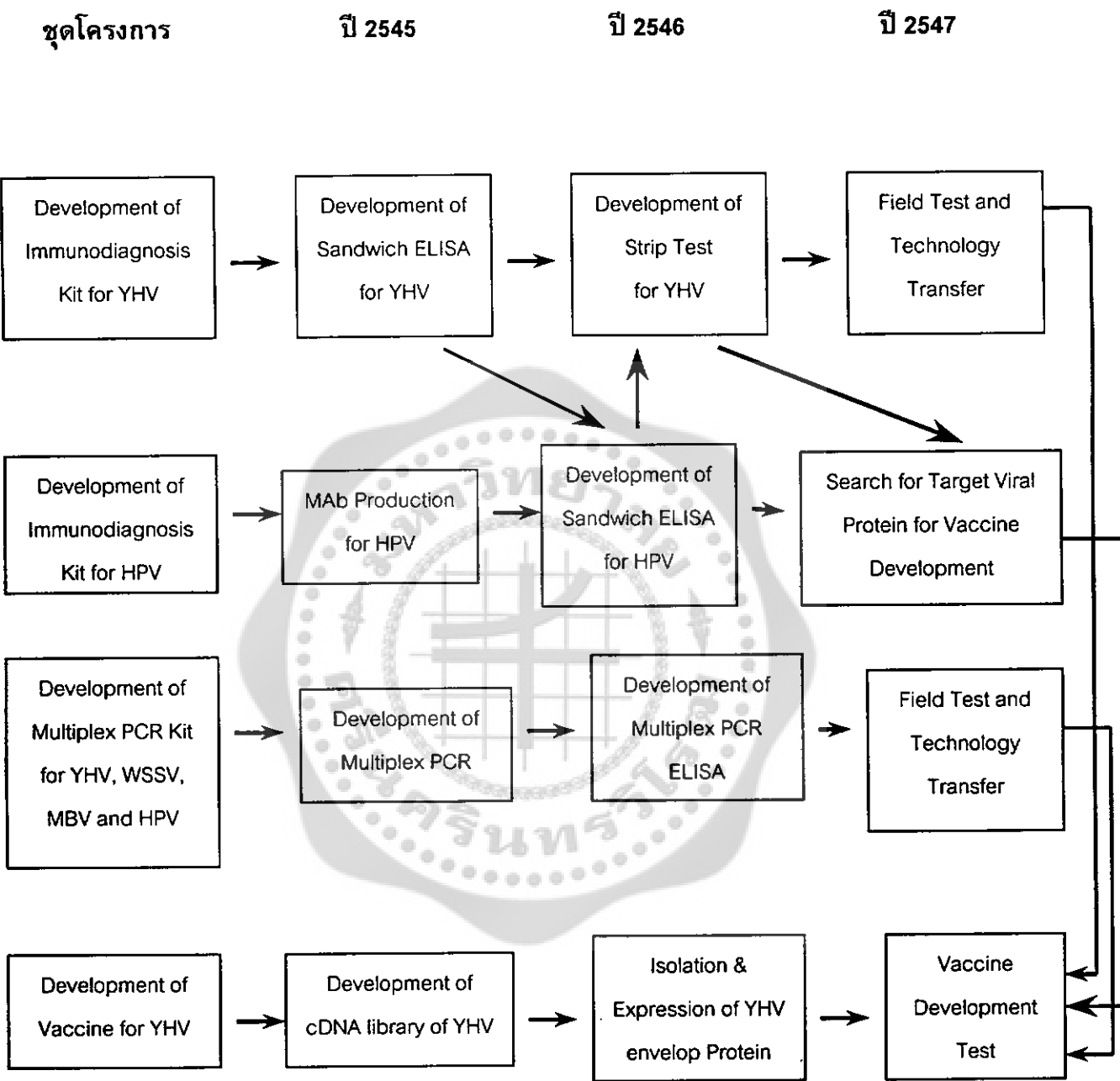
หน่วยงานภาครัฐ

1. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการดูแลด้านการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดดำ เช่น กรมประมง
2. สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ เช่น ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และศูนย์วิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงกิ้งกูดดำ เป็นต้น
3. สถาบันอุดมศึกษาที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดดำ เช่น มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นต้น

หน่วยงานภาคเอกชน

1. เกษตรกรผู้เลี้ยงกิ้งกูดดำ
2. บริษัทที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์การเพาะเลี้ยงกิ้งกูดดำ เช่น สถาบันวิจัยสัตว์น้ำเค็มเจริญ-โภคภัณฑ์

แผนการดำเนินงานพร้อมทั้งขั้นตอนการดำเนินงานตลอดชุดโครงการวิจัย



ชื่อชุดโครงการวิจัยย่อย/ชื่อโครงการวิจัย/หัวหน้าโครงการ

ชื่อชุดโครงการวิจัยย่อย	ชื่อโครงการวิจัยในปี 2546/หัวหน้าโครงการวิจัย
1. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัด- เหลืองในกึ่งกลาดำโดยใช้เทคนิค ภูมิคุ้มกันวิทยา	การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลาดำแบบ แถบสี (รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)
2. การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันการ ติดเชื้อไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลาดำ	การแยก cDNA และการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกของ ไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลาดำ (ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)
3. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่ง กลาดำโดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา	การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่งกลาดำโดยวิธี multiplex RT-PCR ELISA (ผศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีระทรัพย์)
4. การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีและ ชุดตรวจเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ ไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำ	การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำโดยใช้วิธี sandwich ELISA (ผศ.ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ)

ขอบเขตของแผนงานชุดโครงการวิจัยในปี พ.ศ. 2546

โครงการวิจัย	ขอบเขต
1. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกิ้งกูดดำแบบแถบสี	-การผลิต Ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y3 Y18 Y19 และ V3-2B -การติดฉลากแอนติบอดีด้วย colloidal gold -การพัฒนาชุดตรวจ strip test -การทดสอบความแม่นยำ ความไว ความจำเพาะของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น
2. การแยก cDNA และการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสโรคหัวเหลืองในกิ้งกูดดำ	-การเพิ่มจำนวนของไวรัส YHV โดยการฉีดเพิ่มจำนวนในกิ้งกูดดำและสกัดไวรัสให้บริสุทธิ์ -การหาลำดับ cDNA ทั้งหมดของ YHV enveloped protein และตรวจยืนยันผลผลิตจาก cDNA ด้วย MAb ที่จำเพาะต่อ YHV enveloped protein
3. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกิ้งกูดดำโดยวิธี multiplex RT-PCR ELISA	-การพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูป multiplex RT-PCR ELISA ที่มีความจำเพาะและไวสูงต่อเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ไวรัสหัวเหลือง HPV และ MPV
4. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV ในกิ้งกูดดำโดยใช้วิธี sandwich ELISA	-การผลิต Ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี -การผลิต rabbit anti-HPV antiserum -การพัฒนาชุดตรวจ sandwich ELISA โดยใช้ indirect immunoperoxidase method -การทดสอบความแม่นยำ ความไว ความจำเพาะของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น

สรุปการดำเนินงานของชุดโครงการวิจัย



1. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 1

1.1 เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกึ่งกุลาดำแบบแถบสี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองแบบแถบสีที่รวดเร็ว แม่นยำ ราคาย่อมเยา และสำหรับใช้โดยเกษตรกรทั่วไป

1.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

สามารถผลิตชุดตรวจไวรัสหัวเหลืองชนิดแถบสี (strip test) ที่มีความแม่นยำและมีความไวสูงโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ประกอบกับ goat anti-mouse IgG antibody และ rabbit anti-YHV antibody ชุดตรวจสอบนี้ ราคาย่อมเยา สะดวก ง่ายและเกษตรกรสามารถใช้ในภาคสนามได้

1.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินต่อ

เสร็จสมบูรณ์

1.5 % ความสำเร็จของโครงการ

100 %

1.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

ต้องใช้เวลาในการทดลองทำชุดตรวจสอบหลายครั้ง

1.7 งบประมาณที่ใช้

430,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 1

2. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 2

2.1 เรื่อง การแยก cDNA และการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสโรคหัวเหลืองในกิ้งกูดดำ

2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยก cDNA ที่เป็นรหัสสำหรับสร้าง envelop protein ของ YHV
2. เพื่อผลิต envelop protein ของ YHV โดยใช้ expression system

2.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

สามารถแยกยีนที่เป็นบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 73 ตัวแรกทางปลาย N และสามารถทำการแสดงออกใน expression system พบว่าได้โปรตีนในปริมาณที่สูงสามารถนำโปรตีนนี้ไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อ YHV ในกิ้งกูดดำต่อไป

2.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินการต่อ

นำโปรตีนของไวรัสที่ได้ไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อเชื้อ YHV ในกิ้งกูดดำต่อไป

2.5 % ความสำเร็จของโครงการ

90 %

2.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

สามารถแยกยีนได้หลายยีน แต่ไม่สามารถทำให้ยีนบางชนิดแสดงออกเพื่อสร้างเป็น

โปรตีนได้

2.7 งบประมาณที่ใช้

364,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 2

3. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 3

3.1 เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่งกลางดำโดยวิธี multiplex RT-PCR ELISA

3.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัส HPV และไวรัส MBV ที่มีความไวและจำเพาะ โดยวิธี multiplex RT-PCR ELISA

2. เพื่อนำชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจภาคสนาม เช่น ตรวจหาเชื้อในพ่อ-แม่ พันธุ์กึ่ง และตรวจลูกกึ่ง nauplii เพื่อเป็นการคัดเลือกลูกกึ่งหรือตรวจหาการติดเชื้อไวรัสในขณะที่ยังไม่แสดงอาการ และเพื่อการตรวจหาพาหะของเชื้อไวรัสทั้ง 4 ชนิด

3.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

ได้พัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสโดยวิธี multiplex RT-PCR ELISA และได้ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบเชื้อไวรัส 2 ชนิดพร้อมกันคือ ไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสหัวเหลือง

3.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินต่อ

3.5 % ความสำเร็จของโครงการ

100 %

3.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

3.7 งบประมาณที่ใช้

340,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 3

4. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการวิจัย 4

4.1 เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำโดยใช้วิธี sandwich ELISA

4.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สร้างขึ้นให้มีความไวและความจำเพาะสูง

2. เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV โดยวิธี sandwich ELISA ในกึ่งกลาดำที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และราคาถูก สำหรับใช้ในภาคสนามต่อไป

4.3 ผลการดำเนินการของโครงการวิจัย

ได้ทำการแยกสกัด HPV จากตับของกึ่ง ทำให้บริสุทธิ์ และนำมาฉีดให้หนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 4 โคลนทุกโคลนจับกับโปรตีนขนาด 54 kD ตามที่คาดหวัง แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสเด่นชัดและที่ยังไม่แสดง hypertrophied nuclei แสดงว่ามีความจำเพาะต่อ HPV จึงนำแอนติบอดีเหล่านี้ไปพัฒนาชุดตรวจสอบ sandwich ELISA

4.4 โครงการวิจัยที่ต้องดำเนินการต่อ

ผลิต MAb เพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 54 kD ในโครงการต่อไป

4.5 % ความสำเร็จของโครงการ

80 %

4.6 อุปสรรคหรือแนวทางแก้ปัญหา

อยู่ในขั้นตอนการพัฒนาชุดตรวจสอบ sandwich ELISA

4.7 งบประมาณที่ใช้

325,000 บาท

หมายเหตุ

ดูรายละเอียดในรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 4

เอกสารอ้างอิง



- Belcher, C.R. and Young, P.R. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* post larvae. J. Virol. Meth. 74 : 21-29.
- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang Y.C. and Kou, G.H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. Dis. Aquat. Org. 27 : 131-139.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C. and Lo, C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis. Aquat. Org. 23 : 165-173.
- Fegan, D.F., Flegel, T.W., Sriurairatana, S. and Waiakrutra, M. 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon vaculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand. Aquaculture 96 : 205-217.
- Flegel, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikornudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantanachookhlin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. in Fulks W. and Main, K.L. eds. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Oceanic Institute, Honolulu HI, USA.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand, in Flegel T.W. and MacRae, I.H., (eds) Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Kanchanaphum, P., Wongteerasupaya, C., Sittidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 34 : 1-7.
- Lighter, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164 : 201-220.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Org. 27 : 215-225.

- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu K.F., Chiu, Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.* 30 : 53-72.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., Lu, Y. and Nadala Jr., E.C.B. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. *Advances in Virus Research.* 48 : 263-312.
- Nadala Jr., E.C., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow-head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the western blot technique. *J. Virol. Meth.* 69 : 39-44.
- Nadala Jr., E.C. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *J. Virol. Meth.* 84 : 175-179.
- Sithigorngul, P., Chauyuchwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sukhumsirichart, W., Wongteerasupaya, C., Boonseng, V., Panyim, S., Sriuratana, S., Withyachumnarkul, B. and Flegel, T.W. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 38 : 1-10
- Supamattaya, K., Hoffmann, R.W., Boonyaratapalin, S. and Kanchanaphum, P. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis. Aquat. Org.* 32 : 79-85.
- Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย 1-4



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2546

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแบบแถบสี
Development diagnostic kit for detection of yellow head virus in
Penaeus monodon : Strip test



ไพศาล สติธิกรกุล ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร
ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธำรง และ วีระวรรณ สติธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกึ่งกลางดำชนิดแถบสี เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง การตรวจวินิจฉัยและการป้องกันโรคไวรัสในกึ่งกลางดำ และเป็นโครงการต่อเนื่องจากการพัฒนาชุดตรวจแบบ Sandwich ELISA เพื่อพัฒนาชุดตรวจที่สามารถใช้ได้ง่ายและลดขั้นตอนต่าง ๆ ลง สามารถใช้โดยบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความจำเป็นต้องมีความรู้ทางวิทยาศาสตร์และสามารถนำออกใช้ในภาคสนามได้ทุกแห่ง นอกจากนี้ผลการตรวจยังสามารถรู้ผลได้ทันทีโดยใช้เวลาเพียงประมาณ 1 นาที โดยโครงการนี้เป็นการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยมาพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจง่าย ๆ ที่เกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้ แต่อย่างไรก็ดีชุดตรวจนี้สามารถใช้ได้ง่ายก็จริงแต่ก็ต้องแลกกับข้อด้อยบางประการของเทคนิคได้แก่ ความไวของเทคนิคย่อมลดลงเนื่องจากการตรวจสอบด้วยตา และใช้สารที่ก่อให้เกิดสัติดฉลากโดยตรงกับแอนติบอดีทำให้ไม่มีการขยายสัญญาณให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นชุดตรวจนี้จึงสามารถใช้ตรวจเพื่อยืนยันผลการติดเชื้อและคัดเลือกกึ่งที่มีการติดเชื้อเบื้องต้นในกึ่งแต่ละตัวสำหรับกึ่งที่มีการติดเชื้อพอสมควรเท่านั้น ในกรณีที่ให้ผลลบควรมีการยืนยันสภาพปลอดเชื้อโดยวิธี RT-PCR อีกครั้ง

ในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ และคุณนิลวรรณ เพชรบุรณิน ประธานบริษัท Pacific Biotech Co. Ltd. และพนักงานที่ให้ความช่วยเหลือในการประกอบชุดตรวจซึ่งทำให้การผลิตชุดตรวจได้ผลอย่างดี

คณะผู้วิจัย
ธันวาคม 2546

สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

1	กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง	3
2	เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง	4
3	Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลือง	6
4	แผนภูมิแสดงสรุปการทดลอง	16
5	SDS-PAGE และ Western blot ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จากกึ่งกลาดำ	20
6	Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำ	21
7	RT-PCR ของhaemolymph จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV	22
8	ขั้นตอนการใช้ชุดตรวจสอบไวรัสโรคหัวเหลืองแบบแถบสี	26



สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
โรคหัวเหลือง	2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการทดลอง	11
สัตว์ทดลอง	12
การเตรียมไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV)	12
การเตรียม rabbit anti YHV antibody	12
การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry	13
การเตรียม ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	14
การเตรียม V3-2B antibody colloidal gold conjugate	14
การประกอบชุดทดสอบ	14
การตรวจสอบความไวของ strip test	15
การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR	15
ผลการทดลอง	17
สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	27

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus = YHV) ชนิดแถบสีทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B เชื่อมต่อกับ colloidal gold ใส่ในแผ่นดูดซับประกอบด้านหนึ่งของแถบ nitrocellulose membrane ที่มี rabbit anti YHV antibody และ goat anti mouse IgG antibody ตรึงขวางอยู่เป็นขีดตามลำดับ อีกด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane มีแผ่นดูดซับเพื่อใช้สำหรับดูดซับสารละลายที่มาจากแผ่นดูดซับด้านแรกและนำมาประกอบในดิสก์พลาสติก บรรจุในถุงพลาสติกป้องกันความชื้นเพื่อสะดวกในการเก็บรักษาและใช้ วิธีการใช้ชุดตรวจสามารถทำได้โดยง่ายโดยการดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 200 ไมโครลิตรเข้าในเข็มฉีดยาและดูดเลือดกึ่งที่ต้องการตรวจ ผสมกันก่อนหยดใส่ในช่องบนแผ่นดูดซับส่วนแรกและปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน nitrocellulose membrane ไปยังแผ่นดูดซับอีกด้านหนึ่ง ถ้าปรากฏสีม่วงแดง 2 แถบบนแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าตัวอย่างมีการติดเชื้อ YHV วิธีนี้สามารถใช้ตรวจตัวอย่างจากเนื้อเยื่อได้โดยการบดตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้และดูดเฉพาะส่วนน้ำใสมาทดสอบ สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างกึ่งแต่ละตัวได้ แต่วิธีนี้มีความไวต่ำกว่า one step RT-PCR ประมาณ 200 เท่า จึงสามารถใช้ในการคัดเลือกกึ่งที่ติดเชื้อเบื้องต้นและยืนยันผลการติดเชื้อ YHV แต่ข้อดีของวิธีการนี้ได้แก่ ความง่าย สะดวก รวดเร็วในการตรวจโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ สามารถทำได้โดยเกษตรกรและบุคคลทั่วไปได้

ABSTRACT

Simple yellow head virus (YHV) detection strip test kit was developed using monoclonal antibody V3-2B (against gp 116 structural protein) colloidal gold conjugated. The conjugated antibody was placed on the sample absorbing pad at the end of nitrocellulose membrane strip (3.5 X 60 mm) and rabbit anti YHV antibody as well as goat anti mouse Ig were streaked across consecutively. Another absorbing pad was assembly at the opposite end of nitrocellulose strip for collecting the test solution. The ready to use strip was held in a plastic case for convenient usage and storage and stored in desiccated plastic bag. About 100 μ l of haemolymph from shrimp was withdrawn into a syringe and mixed with 200 μ l of anti-coagulant, then about 200 μ l of the mixture was applied to the sample receptacle chamber and let the solution flow pass through the nitrocellulose membrane to the other end. The positive sample will show red purple bands at the test line (T) and control line (C). Sample of homogenate shrimp tissue can be used by applying the supernatant instead of haemolymph. The sensitivity of this method was about 200 times lowers than that of one step RT-PCR. Therefore, it can be used for primary screening of individual shrimp and confirmation of the YHV infection. The beneficial features of this kit are simple and fast and it can be used by any people without any additional tool or equipment.



การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามในระยะหลังนี้การติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow-head virus : YHV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) (Boonyaratpalin et al., 1993; Wongteerasupaya et al., 1995) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยพบว่าในปี 2538 การผลิตกุ้งจากประเทศไทยลดลงจากปี 2537 ถึงประมาณ 30,000 ตันโดยคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 9600 ล้านบาท (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV ในกุ้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAB) จำเพาะต่อโรคหัวเหลือง ซึ่งผลิตจากห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย (Sithigorngul et al., 2000) เพื่อนำไปสู่การใช้ในห้องปฏิบัติการและพัฒนารูปแบบอื่น ๆ เพื่อที่จะสามารถใช้โดยเกษตรกรได้ต่อไป ซึ่งการพัฒนาชุดตรวจ YHV ในโครงการแรก Sandwich ELISA เป็นการพัฒนาชุดตรวจที่มีราคาถูกกว่าและมีความไวใกล้เคียงกับ RT-PCR ได้สำเร็จ แต่เนื่องจากวิธีการนี้ยังค่อนข้างมีความยุ่งยากพอสมควรต้องทำในห้องปฏิบัติการและใช้เครื่องมือหลายชิ้นที่มีราคาค่อนข้างแพง ถึงแม้ว่าราคาในการตรวจต่อตัวอย่างจะมีราคาถูกกว่า RT-PCR มากก็ตาม ยังจำเป็นต้องพัฒนาวิธีให้ลดเวลาและ การใช้เครื่องมือให้น้อยลง แต่อย่างไรก็ดีจากการพัฒนาชุดตรวจนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานการพัฒนาชุดตรวจอีกรูปแบบหนึ่ง ได้แก่ direct colloidal gold conjugate sandwich strip test ซึ่งในที่นี้จะใช้เพียงข้อสั้น ๆ ว่า strip test ซึ่งสามารถใช้โดยเกษตรกรทั่ว ๆ ไปได้ในราคาที่ไม่แพงนัก

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นการค้าไม่เฉพาะประเทศไทยเท่านั้น ยังรวมไปถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก (Lu et al., 1994, 1995) โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำมีรายงานครั้งแรกบริเวณภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ เมื่อปี 2533 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคหัวเหลืองบริเวณภาคใต้ของประเทศพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคหัวเหลืองได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุณยรัตผลิน และคณะ. 2535) การตรวจลักษณะ

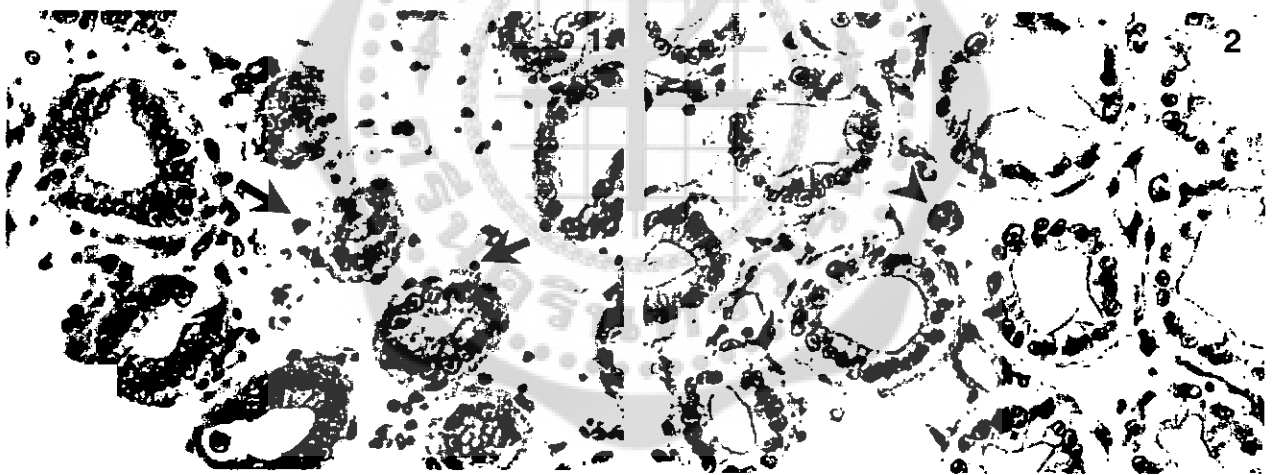
การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ่มกุลาดำ สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในบริเวณเหงือก ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง ในกุ่มที่ปรากฏอาการเป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งทำให้ส่วนหัว ตับ-ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน พยาธิสภาพของกุ่มที่เป็นโรคหัวเหลืองจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ถ้ากุ่มได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วยโดยจะส่งผลให้มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3-5 วันหลังจากได้รับเชื้อซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543 ; สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

สำหรับกุ่มกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีลักษณะอาการดังนี้คือ กุ่มมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารจะลดลงจนผิดปกติ กุ่มมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงดีด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนตับ ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลือง (รูปที่ 1) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ่มจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ่มจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้าหลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)



รูปที่ 1 กุ่มกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (ซ้าย) สังเกตบริเวณหัวซึ่งเป็นส่วนของตับ-ตับอ่อนและเหงือกมีสีเหลืองและซีดกว่ากุ่มกุลาดำปกติ (ขวา)

เมื่อตรวจวิเคราะห์กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหั่วเหลือง พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ เช่น บริเวณเหงือกในกึ่งที่เป็นโรคหั่วเหลือง เซลล์ภายในซี่เหงือก (pillar cell) จะบวม เกิดการตายและสลายตัวของเซลล์และออร์แกเนลล์ในส่วนนี้ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดระหว่าง pillar cell มากขึ้น มีการขยายตัวของท่อเลือด (lacuna) ใหญ่กว่าปกติ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกึ่งที่เป็นโรคจะเกิดการตายและเสื่อมสลายของเซลล์ รวมทั้งมีลักษณะของ granuloma เพิ่มมาก มีการคั่งของฮีโมลิมป์ (haemolymph) และการขยายตัวในส่วนของ hemal sinus นอกจากนี้พบว่าการบวมพองของนิวเคลียสในเซลล์ของอวัยวะน้ำเหลืองทั่วไป ตรวจพบ dense bodies ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง เมื่อนำมาย้อมด้วย Feulgen reaction พบว่า dense bodies จะติดสีชมพูเข้มอยู่ภายใน cytoplasm (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535 ; Chantanachookin et al. 1993) (รูปที่ 2)

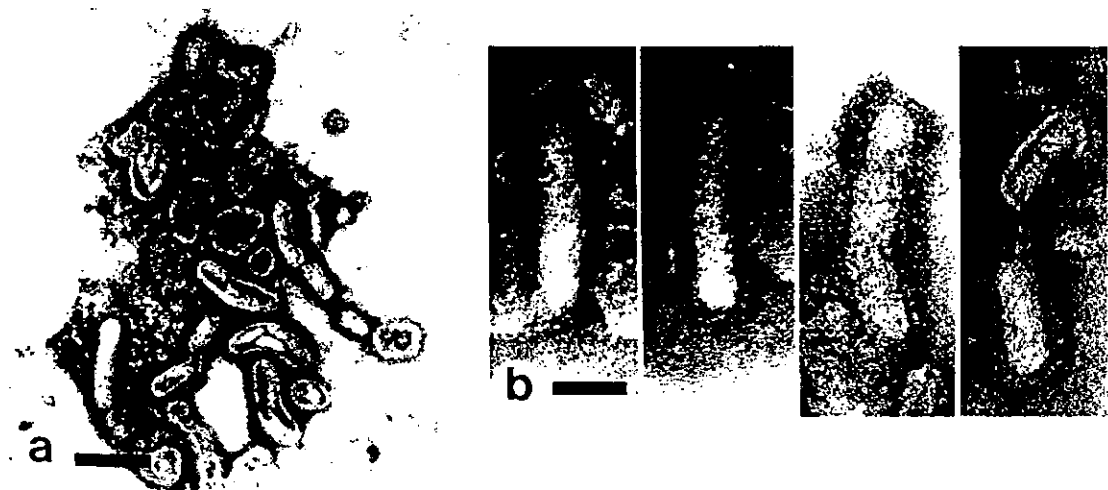


รูปที่ 2 เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหั่วเหลือง (1) การตรวจสอบด้วยวิธีทาง histology เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นลักษณะของนิวเคลียสรวมกัน (pycnotic nuclei) (ลูกศร) (2) การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry เซลล์ที่พบไวรัสจะติดสีน้ำตาลและแสดงความผิดปกติของนิวเคลียส (หัวลูกศร)

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

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

ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาโรคหัวเหลืองได้ ดังนั้นวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่นักวิชาการหลายกลุ่มทำการศึกษาเพื่อเสนอแนะวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่ผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดการที่ดีทั้งในเรื่องอาหาร น้ำ และพื้นบ่อจะลดโอกาสการเกิดโรคได้มาก หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง รักษาสภาพพื้นบ่อให้สะอาด รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ระหว่างบ่อเลี้ยงปนกัน การเพาะเลี้ยงระบบปิดและการตรวจคุณภาพน้ำ (ชลอ ลัมสุวรรณ, 2543; Flegel and Sriurairatana, 1993) นอกจากนี้การกำจัดสัตว์ต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรพอด (arthropod) อื่น ๆ ที่เชื่อว่าเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลืองก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยง ก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัว



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

เหลืองได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกึ่ง อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันเหล่านี้ก็ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุด เนื่องจาก ลูกกึ่งที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลือง ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกึ่งวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกึ่งที่เป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัยสามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย วิธีการนี้จะช่วยลดเวลาในการตรวจได้รวดเร็วมีความไวสูง (Wongteerasupaya et al., 1997) ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ และความชำนาญทางเทคนิค RT-PCR เป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูงในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากค่าตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทาง PCR มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 800 บาทต่อตัวอย่าง) ทั้งไม่สามารถรับรองความแม่นยำตลอดการนำผลมาเทียบเคียงกันระหว่างห้องปฏิบัติการได้

เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน และวิธีการสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยก็แตกต่างกันไปด้วย หากมีผลการตรวจที่ขัดแย้งกัน อาจทำให้เกิดความสับสนขึ้นกับผู้ให้บริการได้ และส่งผลให้ผู้ให้บริการเกิดความไม่มั่นใจในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการนี้ และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคนิค RT-PCR มีข้อจำกัดในด้านการใช้

สำหรับวิธีตรวจอื่น ๆ อย่างเช่น การตรวจทางชิ้นเนื้อและพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยการดูอาการของโรค (symptomatic diagnosis) ก็ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและอาการของโรคมักจะมีการเกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ก็จะไม่ให้ผลที่น่าเชื่อถือในทาง ระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส YHV

เมื่อ 3 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อใช้ในการวินิจฉัย การติดเชื้อไวรัส YHV และ WSSV (Loh et al., 1997) โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามการใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำและวิธี Western blot ก็ไม่เหมาะสมในการ วินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยสามารถประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ี้มีความจำเพาะต่อโปรตีน ส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 116 kD ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของไกลโค โปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) ของ YHV (Nadala et al., 1997) โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และในสภาวะที่ถูกทำให้เสีย สภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เป็น โครงสร้างของ YHV ขนาด gp116, gp64 และ gp20 kD เพิ่มเติมได้ (Sithigorngul et al., 2002) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล gp116, gp64 และ gp22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form และแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry ได้ การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยตรงสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ immunohistochemistry, dot blot และ Western blot แต่ในแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันคือ

-Immunohistochemistry เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก สามารถใช้วินิจฉัย เนื้อเยื่อและ haemocyte ของกุ้งที่ติดเชื้อเพียงเล็กน้อยโดยที่กุ้งยังไม่แสดงอาการของโรค (Sithigorngul et al., 2000) แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีนี้ต้องทำในห้องปฏิบัติการ เพราะต้องผ่านกระบวนการ

การเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้ paraffin section ซึ่งกินเวลามากถึง 3 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีมาก ไม่สะดวกในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก และการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องตรวจดูจาก section บาง ๆ สามารถตรวจดูได้เพียงบริเวณแคบ ๆ ถ้าการติดเชื่อมน้อยอาจตรวจไม่พบ

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

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

การศึกษาในโครงการที่ผ่านมาเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไว โดยการใช้อันติบอดีจำเพาะต่อไวรัส ตรึงและรวบรวมไวรัสในหลุมของ ELISA plate แล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method สำหรับตรวจสอบไวรัสทำให้สามารถใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบปริมาณมากได้และทำได้ทั้งการตรวจไวรัสในเลือดหรือเนื้อเยื่อก็ได้ ซึ่งความไวในการตรวจใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR (ไพศาลและคณะ 2546) แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือหลายชิ้น ได้แก่ 8 channel micropipette และ ELISA reader และการตรวจในแต่ละครั้งสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก (80-88 ตัวอย่าง) ต่อ plate ดังนั้นวิธีการตรวจนี้จึงเหมาะสำหรับทำในห้องปฏิบัติการ สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการพัฒนาต่อให้ใช้ได้ง่ายขึ้น สำหรับเกษตรกรและบุคคลทั่ว ๆ ไป คล้ายกับชุดตรวจการตั้งครรภ์ซึ่งสามารถทราบผลได้ทันทีและใช้กับการตรวจที่ละตัวอย่างเท่านั้น

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wongteerasupaya et al. (1997) ได้พัฒนา RT-PCR สำหรับตรวจการติดเชื่อ YHV ในกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon* โดยใช้ primer ขนาด 135 bp สามารถใช้ตรวจไวรัสปริมาณน้อยมาก ประมาณ 0.01 pg ของ YHV-RNA และตรวจพบไวรัสในเลือดกึ่งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดจากเหงือกกุ้งที่ติดเชื่อตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมง

Loh et al. (1997) และ Nadala et al. (1997) ได้ผลิตแอนติซีรัมต่อเชื่อ YHV และใช้ Western blot ในการตรวจการติดเชื่อ YHV ในกิ้ง *Penaeus vanamei* พบว่าแอนติซีรัมสามารถตรวจพบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 170, 135, 67 และ 22 kDa และสามารถใช้ในการตรวจการติดเชื่อไวรัสหลังจากกึ่งได้รับการฉีดไวรัสตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป

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

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

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

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

สำหรับรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคในกุ้งมีการใช้ในการตรวจโรค WSSV ได้แก่การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VP28 protein ของ WSSV โดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูด้วย WSSV บริสุทธิ์ ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลนที่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (Poulos et al., 2001) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV โดยใช้ recombinant VP28 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 โคลนซึ่งสามารถนำไปพัฒนาติดสลาด้วย biotin สำหรับตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี antigen capture ELISA พบว่ามีความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไวรัสบริสุทธิ์ได้ 4 โคลนซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี dot blot (Anil et al., 2002)

ในรายงานผลการทดลองพัฒนาชุดตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti YHV เป็น capture antibody โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 เป็น detector antibody และ rabbit anti mouse IgG เป็น reporting antibody พบว่าความไวในการตรวจ YHV

ใกล้เคียงกับ RT-PCR โดยมีความไวต่ำกว่าประมาณ 4-5 เท่าสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละอย่างน้อย 80 ตัวอย่าง/ถาด ในราคาที่ต่ำ แต่ยังคงใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงในการตรวจสอบผล และต้องทำในห้องปฏิบัติการ (ไพศาล และคณะ 2546) ดังนั้นในรายงานนี้จึงเป็นการพัฒนาต่อจากวิธีการดังกล่าวเพื่อให้ได้ชุดตรวจที่ง่ายสามารถทำการทดสอบในภาคสนาม รู้ผลรวดเร็ว ราคาไม่แพง และสามารถใช้ได้โดยบุคคลทั่ว ๆ ไป





1. สัตว์ทดลอง

กึ่งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซื้อจากฟาร์มใกล้เคียงกรุงเทพ ฯ ขนาด 20-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt กึ่งก้ามกรามซื้อจากจังหวัดอยุธยา ขนาด 15-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำจืดสำหรับเก็บเลือดเพื่อใช้เชื้อจากเลือดกึ่งกุลาดำและเป็น negative control สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

2. การเตรียมไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV)

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

3. การเตรียม rabbit anti YHV antibody ($r\alpha$ YHV Ab)

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

3.2 การทำให้บริสุทธิ์ rabbit anti-YHV antibody นำ serum มาตกตะกอนด้วย 40 % saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 4°C ปั่นที่ 3,000 g แยกตะกอนออกและนำไป dialyzed และละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Protein A column ผสมแอนติซีรัมกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผ่าน protein A column ล้างด้วย binding buffer และเก็บแอนติบอดีโดยใช้ elution buffer จากนั้นนำไป dialyzed ด้วยน้ำกลั่นและทำให้เข้มข้นด้วย vacuum concentrator (Savant)

เติม 5X PBS ในอัตราส่วน 5 : 1 ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford reagent แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บไว้ที่ -70°C

3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ rabbit anti YHV antibody ตรวจ สอบความบริสุทธิ์ของ rabbit anti YHV antibody ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย ammonium sulfate และ protein A column โดย SDS-PAGE ตรวจสอบความจำเพาะของ rabbit anti YHV antiserum โดย Western blot ของ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและ YHV ที่แยกจาก haemolymph เปรียบเทียบกับ monoclonal antibodies V3-2B, Y18 และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัส YHV และ immunohistochemistry

4. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry

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

สำหรับการประมาณตำแหน่งของแถบโปรตีนของไวรัสทำโดยเทียบกับ prestained standard protein และนำแผ่นในไตรเซลลูโลสนั้นไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ haemocyanin (PMVS-22) (Longyant et al., 2000) และใส่สารละลายสับสเตรทที่ไม่มี cobalt chloride

ส่วนการตรวจทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี immunohistochemistry ทำโดยนำเนื้อเยื่อที่เตรียมใน paraffin section มาละลายพาราฟินออก หยดด้วย P_1^+ (10 % calf

bovine serum เจือจางใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดด้วย P_1^+ , rabbit anti-YHV antiserum และย้อมด้วย GAR-HRP ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin แล้วทำเป็นสไลด์ถาวร

5. การเตรียม ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

เลี้ยง hybridoma clone V3-2B นำมา reclone เพื่อคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดี ขยายเซลล์จนมีจำนวนประมาณ 50 ล้านเซลล์ บั่นแยกเซลล์นำไปฉีดให้หนูขาวที่ฉีด pristane (0.5 มิลลิลิตร/ตัว) ล่วงหน้าอย่างน้อย 2 สัปดาห์ในปริมาณ 5 ล้านเซลล์/ตัวทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วัน ตรวจเช็คการเจริญของ hybridoma เลือกหนูที่มีการเจริญของ ascites tumor เต็มที่มาเจาะ ascites fluid จากช่องท้องออกรวบรวม บั่นแยกเซลล์ออกที่ 3,000 g ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์โดยนำมาตกตะกอนด้วย 40 % saturated $(NH_4)_2SO_4$ ที่ 4 °C และนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยผ่าน Protein A column จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดย Western blot และ immunohistochemistry

6. การเตรียม V3-2B antibody colloidal gold conjugate

เตรียม 1 % gold chloride ทำโดยนำ gold chloride มาต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที จนได้สารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติม 1 % sodium citrate ต้มต่อไปอีก 10 นาทีจนได้สารละลายมีสีม่วงแดง ทิ้งให้เย็น จากนั้นผสมแอนติบอดี V3-2B ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เติม 10 % BSA ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยการปั่นที่ 50,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนของแอนติบอดี V3-2B colloidal gold conjugate ที่ได้ไปใช้ต่อไป

7. การประกอบชุดทดสอบ

7.1 การเตรียม absorbing pad และ colloidal gold conjugate antibody

นำแอนติบอดี V3-2B colloidal gold conjugate ที่ได้จากข้อ 6 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นพ่นลงบนแผ่น sample pad ปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

7.2 การเตรียม nitrocellulose strip

นำ rabbit anti-YHV antibody ที่ได้จากข้อ 3 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาขีดบน nitrocellulose membrane บริเวณ test line (T) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ส่วนอีกด้านหนึ่งขีดด้วย goat anti mouse IgG antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร บริเวณ control line (C) ทิ้งไว้ให้แห้ง (รูปที่ 4)

7.3 การประกอบชุดทดสอบ

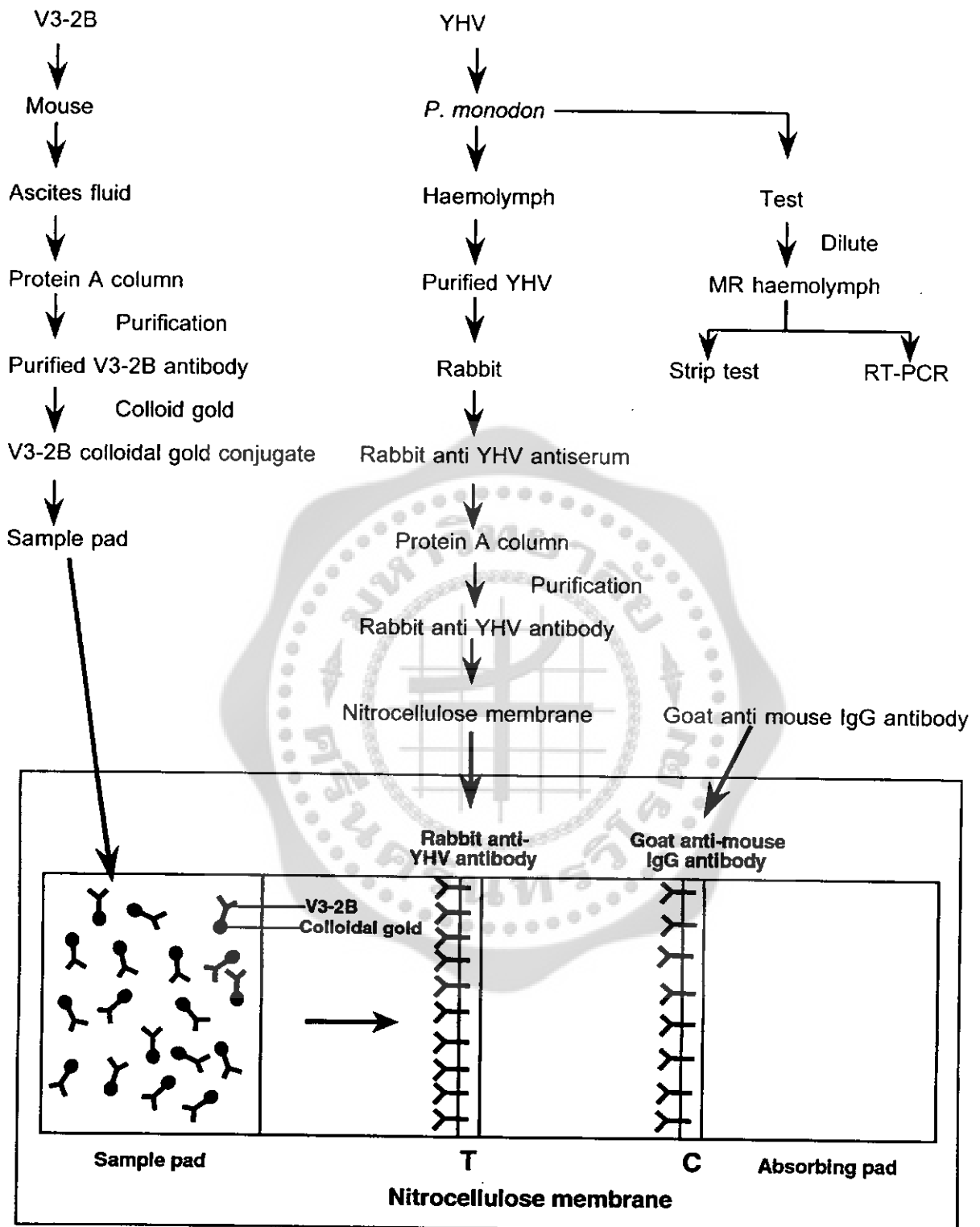
นำแผ่น sample pad ที่ได้จากข้อ 7.1 และแผ่น nitrocellulose membrane จากข้อ 7.2 มาประกอบกันโดยวางแผ่น sample pad ของ V3-2B colloidal gold conjugate ไว้บนด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane ถัดจากบริเวณที่ขีดด้วย rabbit anti-YHV antibody ส่วนด้านตรงข้ามวาง absorbing pad สำหรับดูดซับสารละลายที่ใช้ทดสอบโดยวางถัดจากบริเวณที่ขีดด้วย goat anti-mouse IgG antibody (รูปที่ 4) จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้น ๆ ขนาด 3.5 X 60 มิลลิเมตรแล้วนำมาประกอบใส่ตลับ (รูปที่ 8)

8. การตรวจสอบความไวของ strip test

นำ haemolymph ของกิ้งกูด้าที่ติดเชื้อ YHV มาเจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ haemolymph ของกิ้งก่ามกรามเป็นตัว diluent หยดตัวอย่างที่ได้ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงในช่องวงรีของชุดทดสอบ ทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงนำมาตรวจผลโดยดูจากแถบสีม่วงแดงที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผล ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีม่วงแดง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C และ T แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าพบว่าปรากฏสีม่วงแดงแถบเดียวตรงกับตัวอักษร C แสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือมีการติดเชื้อ YHV ต่ำกว่าชุดทดสอบจะสามารถตรวจสอบได้

9. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

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



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงสรุปการทดลอง

ผลการทดลอง



1. การเตรียมไวรัส YHV

กึ่งกลาดำประมาณ 120 ตัวนำมาเก็บ haemolymph ได้ 150 มิลลิลิตร นำมาแยกไวรัสได้ประมาณ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างมาแยกด้วย SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue พบแถบโปรตีนหลักของไวรัสที่ 116 64 และ 20 kD โดยมีแถบโปรตีนขนาด 170 kD ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีปะปนมาเล็กน้อย ความบริสุทธิ์ของไวรัสมากกว่า 90 % (รูปที่ 5C)

2. การเตรียม rabbit anti YHV antiserum

จากการฉีด YHV ให้กระต่ายจำนวน 4 ตัว พบว่ากระต่ายทุกตัวมีการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีต่อ YHV ครบทุกส่วนคือต่อโปรตีนขนาด 116 64 และ 20 kD ซึ่งเมื่อทดสอบด้วย haemolymph-SRBC conjugate แล้วไม่พบ cross reactivity กับโปรตีนอื่น ๆ ใน haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งที่ติดเชื้อ (รูปที่ 5B) และเมื่อทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry พบว่า rabbit anti YHV antiserum ที่ได้สามารถย้อมเนื้อเยื่อของกึ่งบริเวณที่ติดเชื้อ YHV ได้ (รูปที่ 6) สามารถเก็บ serum ของกระต่ายได้ประมาณ 100 มิลลิลิตรและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ประมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรได้จำนวน 5 มิลลิลิตร

3. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B จาก ascites fluid

Ascites fluid รวบรวมจากหนูจำนวน 8 ตัวได้ประมาณ 40 มิลลิลิตร หลังจากผ่าน protein A column แล้วได้แอนติบอดี V3-2B ความเข้มข้น 10.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 4 มิลลิลิตร เมื่อแบ่งมาทดสอบความจำเพาะโดย Western blot และ immunohistochemistry ที่ความเข้มข้น 1 : 50,000 พบว่ามีความจำเพาะคงเดิม (รูปที่ 5D)

4. การเตรียม V3-2B antibody เชื่อมต่อกับ colloidal gold

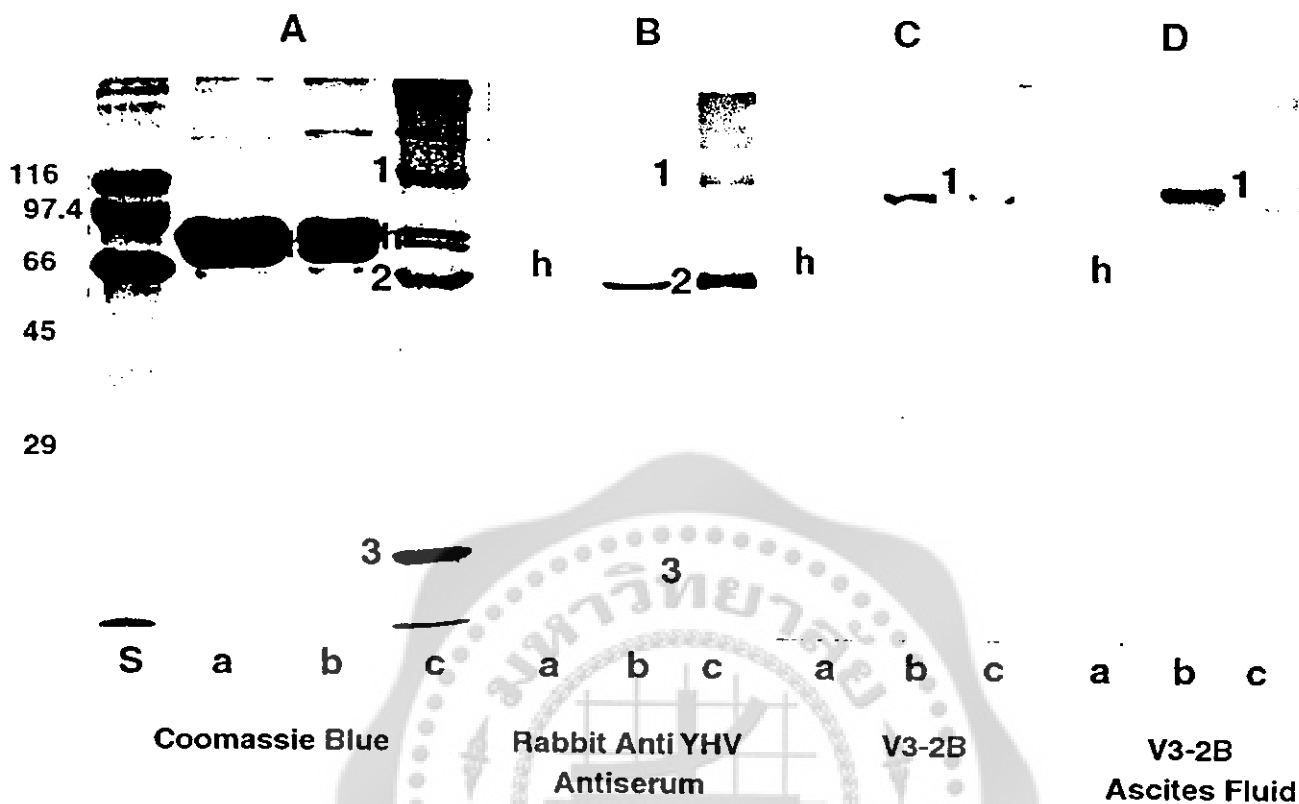
ใช้ V3-2B antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 3 มิลลิลิตร นำมาเชื่อมต่อกับ colloidal gold หลังจากทำให้เข้มข้นแล้ว สามารถนำมาผลิต strip test ได้จำนวน 1,400 ชุด

5. การทดสอบความไวของการตรวจหา YHV โดย strip test

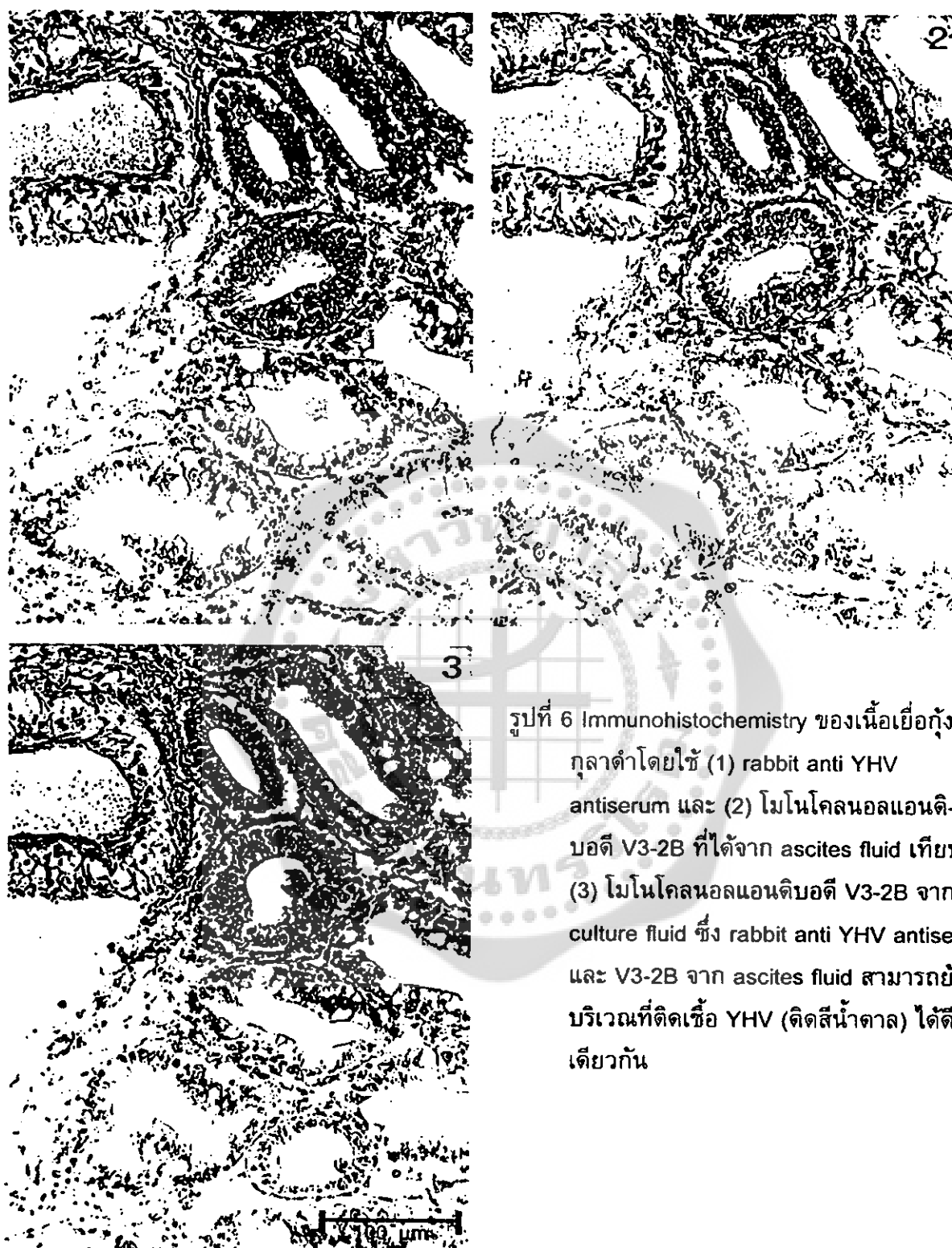
จากการเจือจาง haemolymph ของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV ด้วย haemolymph

ของกึ่งกัมมกราม เมื่อนำมาทดสอบกับ strip พบว่าสามารถตรวจสอบได้ดีชัดเจนที่ 1 : 1000 สำหรับที่ 1 : 5000 ให้ผลบวกค่อนข้างจางแต่ก็สามารถสังเกตความแตกต่างจาก negative control (*M. rosenbergii* haemolymph) ซึ่งเมื่อเทียบกับวิธี RT-PCT สามารถเห็นผลบวกจางที่ haemolymph เจือจางถึง 1 : 1,000,000 เท่า ดังนั้นวิธีใช้ strip test จึงมีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 200 เท่าและมีความไวต่ำกว่าวิธี indirect immunoperoxidase sandwich ELISA ในการทดลองที่แล้วประมาณ 40 เท่า

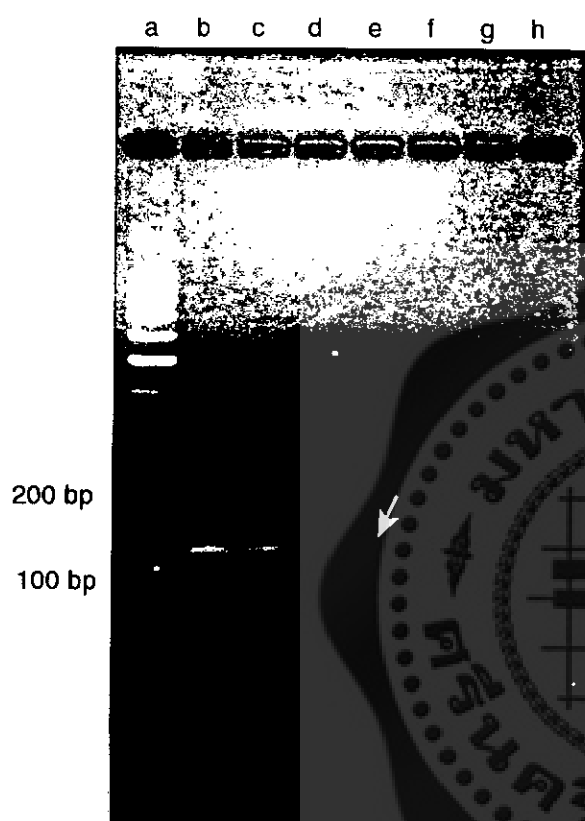




รูปที่ 5 SDS-PAGE (A) และ Western blot (B-E) ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก กุ้งกุลาดำ ตัวเลขด้านซ้ายมือเป็นน้ำหนักโมเลกุล (kD) ของโปรตีนมาตรฐาน (A) เจลที่ย้อม ด้วย Coomassie blue Western blot ที่ย้อมด้วย rabbit anti YHV antiserum (B) และโมโน โคลนอลแอนติบอดี V3-2B (C) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ที่ได้จาก ascites fluid (D) s = โปรตีนมาตรฐาน a = haemolymph ของกุ้งกุลาดำปกติ b = haemolymph ของ กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV c = YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน 1, 2, 3 = โปรตีนหน่วยย่อยของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 116, 64 และ 20 kD ตามลำดับ h = haemocyanin. Rabbit anti YHV antiserum มีความจำเพาะต่อ YHV สูงดังผลการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยแอนติซีรัมสามารถจับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 116 64 และ 20 kD ได้โดยมี background staining เล็กน้อย



รูปที่ 6 Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อ
 กระจกตาโดยใช้ (1) rabbit anti YHV
 antiserum และ (2) โมโนโคลนอลแอนติ-
 บอดี V3-2B ที่ได้จาก ascites fluid เทียบกับ
 (3) โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B จาก
 culture fluid ซึ่ง rabbit anti YHV antiserum
 และ V3-2B จาก ascites fluid สามารถย้อม
 บริเวณที่ติดเชื้อ YHV (ติดเชื้อน้ำตา) ได้ดีเช่น
 เดียวกัน



รูปที่ 7 RT-PCR (a) DNA marker (100 bp ladder) haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของ กุ้งก้ามกรามปกติคือ (b) $1 : 2.5 \times 10^4$ (c) $1 : 1 \times 10^5$ (d) $1 : 5 \times 10^5$ (e) $1 : 1 \times 10^6$ (f) $1 : 2.5 \times 10^6$ (g) $1 : 5 \times 10^6$ ตาม ลำดับ และ (h) haemolymph ของกุ้งก้าม กรามปกติ PCR product ที่ 135 bp ลดลง จนเห็นเพียงเล็กน้อยที่ระดับเจือจาง $1 : 1,000,000$ เท่า (ลูกศร)

สรุปผลการทดลอง



ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจไวรัส YHV แบบ strip test โดยใช้ rabbit anti YHV antibody เป็น capture antibody และ goat anti mouse IgG antibody เป็น positive control ชีตบน nitrocellulose membrane และใช้ V3-2B antibody colloidal gold conjugate เป็น detector antibody สะสมบน sample pad วางบนด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane และด้านตรงข้ามวาง absorbing pad สำหรับดูดซับสารละลายที่ใช้ทดสอบวิธีการใช้แสดงดังรูปที่ 8

ชุดตรวจสอบ YHV นี้สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่าง haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางได้ถึง 1 : 5,000 เท่าโดยให้แถบสีชัดเจน ในขณะที่การตรวจสอบแบบ indirect immunoperoxidase sandwich ELISA ให้ผลบวกชัดเจนที่ 1 : 200,000 เท่าและ one step RT-PCR ให้ผลตรวจได้ 1 : 1,000,000 เท่า (ไพศาลและคณะ 2546) ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความไวต่ำกว่าวิธีทั้งสอง 40 และ 200 เท่าตามลำดับ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีค่าไวต่ำกว่าทั้งสองวิธีแต่ก็มีข้อได้เปรียบหลายประการได้แก่ 1) สามารถทำการทดสอบได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ เพิ่มเติมจากอุปกรณ์เจาะเก็บ haemolymph หรือบดเตรียมเนื้อเยื่อเหมือนวิธีการทดสอบวิธีอื่น ๆ จึงสามารถใช้ในภาคสนามได้อย่างสะดวก 2) สามารถทำได้โดยเกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปที่ไม่จำเป็นต้องมีความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ 3) ผลการทดสอบสามารถทราบผลได้ทันทีภายในระยะเวลา 1 นาที (รูปที่ 8) 4) ราคาไม่แพงนักประมาณ 100-200 บาทต่อชุดทดสอบ 5) การเก็บรักษาง่ายเพราะบรรจุในถุงปราศจากความชื้นเพียงเก็บไว้ในตู้เย็นปกติสามารถใช้ได้เป็นเวลานานหลายปี แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อเสียในแง่ความไวของชุดทดสอบแล้วยังมีข้อควรระวังในการทดสอบ คือการเก็บเลือดควรเจือจางเลือดด้วย anti coagglulant ประมาณ 3 เท่าขึ้นไปและใช้ทดสอบและตรวจดูผลทันทีไม่ควรทิ้งไว้นานเพราะอาจเกิดการจับของสารสีในเลือดกับ capture antibody ได้ทำให้เกิด false positive และในกรณีที่มีการติดเชื้อระดับต่ำมาก ๆ อาจตรวจไม่พบ ดังนั้นกรณีที่ได้ผลลบจากชุดตรวจนี้ควรตรวจซ้ำด้วยวิธี RT-PCR เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งนั้นปลอดเชื้อ YHV แน่نون ชุดตรวจนี้จึงควรใช้ในการยืนยันผลการติดเชื้อเบื้องต้นขั้นแรกเท่านั้น

เนื่องจาก V3-2B เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในประเทศไทยเท่านั้น การใช้ตรวจเชื้อคล้าย YHV สายพันธุ์อื่นได้แก่ gill associated virus (GAV) หรือสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในประเทศไทยไม่สามารถใช้ได้ สำหรับชุดตรวจที่ใช้ตรวจเชื้อ 2 สายพันธุ์ดังกล่าวกำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนา

สำหรับชุดตรวจนี้คณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการปรับปรุงเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะให้ดีขึ้นกว่าเดิม ซึ่งคาดว่าจะสามารถได้ชุดตรวจซึ่งสามารถใช้ตรวจได้อย่างแม่นยำและมีความไวสูงขึ้น

การพัฒนาชุดตรวจรูปแบบอื่น ๆ ได้แก่ sandwich dip strip โดยใช้ immunoperoxidase เป็นตัวเพิ่มสัญญาณคล้าย indirect immunoperoxidase ELISA แต่ให้ใช้สะดวกมากขึ้นคาดว่าจะสามารถเพิ่มความไวของชุดตรวจได้ใกล้เคียงกับ RT-PCR ได้เช่นกัน



ชุดทดสอบไวรัสโรคหัวเหลืองแบบแถบสี (Strip test)

อุปกรณ์ประกอบด้วย

- เข็มฉีดยาสำหรับเจาะเลือด (syringe)
- สารเก็บตัวอย่าง
- คลับทดสอบ (strip test)

ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ

1) แบ่งสารเก็บตัวอย่างประมาณ 0.5 มล. ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 2) ใช้กรรไกรตัดส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ เช่น ส่วนปลายของขาคู่แรก, เหนือ, เนื้อเยื่อใต้เปลือกส่วนหัวและกล้ามเนื้อ ใช้ปากคีบ คีบเนื้อเยื่อลงในหลอดที่เตรียมไว้ 3) บดเนื้อเยื่อในหลอดให้ละเอียดพอสมควร 4) บดตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 rpm, 1-2 นาที 5) ดูดส่วนที่เป็น น้ำใสออกมา 0.1-0.2 มล. หยดลงในช่องวงรี (S) บนชุดแถบทดสอบ 6) ทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 15 นาที)

ตัวอย่างจากเลือด

1) ใช้เข็มฉีดยาดูดสารเก็บตัวอย่างในหลอดที่เตรียมไว้ประมาณ 0.2 มล. 2) ดูดเลือดจากแองเงิลคบริเวรใต้ท้องหรือหัวใจประมาณ 0.1 มล. 3) ผสมสารเก็บตัวอย่างและเลือดให้เข้ากัน โดยการดันก้านกระบอกฉีด ขึ้นลงหรือตีเบา ๆ 4) หยดเลือดที่ผสมสารเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ประมาณ 0.1-0.2 มล. ลงในช่องวงรี (S) บนชุดแถบทดสอบ 5) ทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 15 นาที)

การอ่านผล

โดยดูแถบสีชมพูที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผลของชุดแถบทดสอบ ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีชมพู/ม่วง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C (control) และ T (test) แสดงว่ากึ่งที่นำมาทำการทดสอบติดไวรัสโรคหัวเหลือง ถ้าพบว่าปรากฏสีชมพู/ม่วงแถบเดียวตรงกับตัวอักษร C (control) แสดงว่ากึ่งที่นำมาทดสอบไม่ติดไวรัสโรคหัวเหลืองหรือติดในระดับที่ต่ำกว่าความสามารถของแถบทดสอบที่จะตรวจจับได้

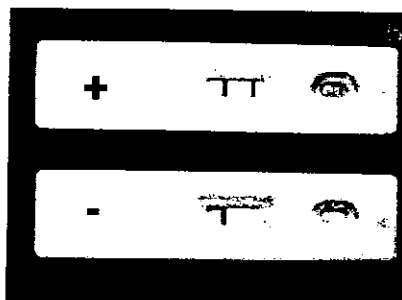
ข้อควรระวัง

- 1) อุปกรณ์ทุกชนิดที่นำมาใช้ควรเป็นอุปกรณ์ที่สะอาด ผ่านการฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาทีก่อนใช้ทุกครั้ง
- 2) ชุดตรวจภาคสนามนี้เหมาะสำหรับการวินิจฉัยโรคหัวเหลืองเบื้องต้นเท่านั้น หลังจากตรวจหากพบว่าได้ผลเป็นลบ ควรตรวจซ้ำด้วยวิธีการทาง RT-PCR หรือตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อ (histology) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

ประดิษฐ์โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล } ภาควิชาชีววิทยา
 ดร. ศิวาพร ลงยันต์ } มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 คุณสมบัติ รักประทานพร หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล BIOTEC
 คุณนิลวรรณ เพชรบูรณ์ Pacific Biotech Co., LTD.

**สนับสนุนทุนวิจัยโดยฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



เอกสารอ้างอิง



- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543 กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์.
- ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ. 2546. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545. 36 หน้า
- สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535. Baculovirus สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุม สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ : 200-205.
- Anil, T.M., Shankar, K.M. and Mohan. C.V. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. Dis. Aquat. Org. 51 : 67-68.
- Boonyaratpalin, S., Supamataya, K., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U. and Chantanachookin, C. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol. 28 (3) : 103-109.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat Org. 17 : 145-157.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. and Walker, P.J. 2000. Gill-Associated virus of *Penaeus monodon* prawns : An invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen Virol. 81 : 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasuoaya, C., Boonsaeng, V. Panyim, S. and Walker, P.J. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. Dis. Aquat. Org. 36 : 153-157.
- Flegel, T. and Sriurairatana, S. 1993. Black tiger prawn diseases in Thailand. Page 6 in D.M. Akiyama, editor. Technical Bulletin AQ39 1993/3, American Soybean Association, Singapore 0923.

- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), Diseases in Aquaculture III., Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p 285-302.
- Javois, L.C. 1999. Immunocytochemical methods and protocols. Methods in molecular biology. V115 2nd ed. 465p.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquacultures. 164 : 201-220.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., LU, Y. and Nadala, E.C.B. Jr. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. Advances in Virus Research .48 : 263-311.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Thampalerd., N., Sithigorngul., W., and Menasveta. P. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. Invert. Reprod. Dev. 37(3) : 211-221.
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, J.A. and Loh, P.C. 1994. Infection of the yellow head baculovirus (YHB) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish. Dis. 17: 649-656
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, Loh, P.C. and Brock, J.A. 1995. Distribution of yellow head virus in selected tissue. Dis. Aquat. Org. 23 : 67-70.
- Lui, W., Wang, Y.T., Tian, D.S. Yin, Z.C. and Kwang, J. 2002. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelop protein (28 kDa). Dis. Aquat. Org. 49 : 11-18.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. J. Virol. Meth. 69 : 39-44.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M. and Loh, P.C. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis.Aquat.Org. 31 : 141-146.

- Nadala Jr., E.C.B. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. *J. of Virol. Meth.* 175-179.
- Poulos, B.T., Kibler, R., Bradley-Dunlop, D., Mohny, L.L. and Lightner, D.V. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 37 : 99-106.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aquilar, J. and Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 47 : 13-23.
- Rodriguez J., Boulo, V., Mialhe, E. and Bachere E. 1995. Characterisation of shrimp haemocyte and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell. Science.* 108 : 1043-1050.
- Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49 : 71-76.
- Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Panyim, S., Cowley, J.A., Jittrapakdee, S., Boonsaeng, V. and Walker P.J. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow-head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis. Aquat. Org.* 50 : 87-93.
- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1998. A yellow-head virus probe : application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis. Aquat. Org.* 35 : 165-173.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Anutara, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Thongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2546

การแยก cDNA และการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกของ
ไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

Isolation and expression of cDNA encoding enveloped
protein of yellow head virus from *Penaeus monodon*

ปริญทร์ ชัยวิสุทธิธำรงกุล ไพศาล สิทธิกรกุล
ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2547



บทคัดย่อ

จากการแยกยีน gp116 Δ TM โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่การแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector ใน *E. coli* พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ ในขณะที่การแยกยีน gp116(N73) (บริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 73 ตัวแรกทางปลาย N) และทำการแสดงออกโดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ามีการแสดงออกของ 6 histidine-tag gp116(N73) ในปริมาณที่สูง สามารถนำไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อเชื้อ YHV ในกิ้งกูดดำได้ต่อไป

สำหรับการแยกยีน gp64 Δ TM โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน 6 histidine-tag gp64 Δ TM (56 kDa) ในระดับที่ต่ำมาก ความพยายามในการแสดงออกของโปรตีน gp64 Δ TM นี้โดยใช้ pMAL-C2, pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 vectors ใน *E. coli* ไม่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนนี้แต่อย่างใด

จากการแยกยีน gp64 ตรงบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 160 ตัวแรกทางปลาย N ซึ่งมีส่วนที่ขอบหน้าเป็นส่วนใหญ่ ตั้งชื่อว่า gp64(HPL) โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ expression vectors ชนิดต่างๆ ได้แก่ pQE30, pMAL-C2, pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 ไม่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนนี้เช่นกัน

Abstract

Isolation of gp116 Δ TM gene by PCR was performed but an expression of gp116 Δ TM protein using pQE30 expression vector in *E. coli* was not successful. However, the isolation of gp116(N73) gene encoding the first 73 amino acids at the N-terminal of gp116 protein was done and a high expression level of 6xHis-tag gp116(N73) protein using pQE30 was obtained. This protein will be used for vaccination testing against YHV of *Penaeus monodon* in the near future.

Isolation of gp64 Δ TM gene by PCR was utilized but an expression level of 6xHis-tag gp64 Δ TM protein at 56 kDa was relatively low. Attempts for expression of gp64 Δ TM in various expression vectors including pMAL-C2, pMAL-P2 and pGEX-6P-1 in *E. coli* were not successful.

Isolation of truncated gp64 gene, namely gp64(HPL) encoding the first 160 amino acids, mostly hydrophilic region, of gp64 proteins was performed. However, attempts for expression of gp64(HPL) in various expression vectors including pMAL-C2, pMAL-P2 and pGEX-6P-1 in *E. coli* were not successful.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการทดลอง	6
ผลการทดลอง	12
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	29



บทนำ

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

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

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

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

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

อย่างไรก็ตามได้มีรายงานถึงผลสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000, Sithigorngul et al., 2002) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kD 67 kD

และ 22 kD ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) capsid และ matrix ของ YHV (Nadala et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปรกติ (native form) และ ในสภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสโรคหัวเหลืองได้ใน haemolymph และในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้เทคนิค dot-blot, Western blot และ immunocytochemistry

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

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

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

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

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

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

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

ในระยะต่อมาได้มีการศึกษาโดย Cowley et al. (1999) ซึ่งพบว่าลำดับ DNA ของยีน ORF 1b หรือยีน replicase ซึ่งมีความยาวประมาณ 7.8 kb ของ gill-associated virus (GAV) มี

ความเหมือนกับลำดับ DNA ของ YHV ที่มีความยาว 135 bp ที่ได้จากกระบวนการ RT-PCR โดยใช้ primer ที่ถูกออกแบบสำหรับการวิเคราะห์โรคไวรัสหัวเหลือง (Wongteerasupaya et al., 1997) โดยมีความเหมือนในระดับ DNA ประมาณ 83% และในระดับกรดอะมิโนประมาณ 86.7% และพบว่ายีน ORF 1b ของ GAV มีความเหมือนกับลำดับ DNA ของ YHV ที่รายงานโดย Tang และ Lightner (1999) ซึ่งมีความยาว 1068 bp โดยพบว่ามีเหมือนในระดับ DNA ประมาณ 80.9% และในระดับกรดอะมิโนประมาณ 86.5%

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

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

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

สำหรับรายงานที่สนับสนุนสมมติฐานนี้ มาจากการที่พบว่าการติดเชื้อ YHV ในกึ่งฤดูดำในระยะแรกจะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก โดยรวมถึงกุ้งในระยะ larva ที่สัมผัส (exposed) กับ YHV นี้ด้วย แต่ต่อมาพบว่ากุ้งในระยะ early larva (ซึ่งน่าจะมีการแยกได้ระหว่าง self และ nonself) จะดื้อ (refractory) ต่อการติดเชื้อ YHV ในภายหลัง ซึ่งปรากฏการณ์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับของไวรัสที่ก่อให้เกิดการจดจำ และได้พัฒนาการติดเชื้อแต่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (innocuous infection) เมื่อได้รับ YHV ในภายหลัง (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการต้านทาน (tolerance) ต่อไวรัส น่าจะเกี่ยวข้องกับการปรับตัว (accommodation) เพื่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งแต่อย่างใด

(Flegel & Pasharawipas, 1998) ถ้าหากสมมติฐานนี้ถูกต้อง การพัฒนาสารที่เรียกว่า tolerines เพื่อใช้ในลักษณะเดียวกันกับการพัฒนาวัคซีน ก็จะมีความเป็นไปได้สูง (Flegel & Pasharawipas, 1998)

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

จากรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (2003) ที่ได้รายงานถึง ORF3 ของ YHV โดยส่วนของ ORF 3 (genbank accession number AF540644) นี้เป็นส่วนของยีน gp116 (เดิมเรียกยีน p135) และยีน gp64 (เดิมเรียกยีน p65) ซึ่งยีนทั้งสองนี้เป็นยีนของ envelope protein ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ข้อมูลนี้ในการออกแบบ primer เพื่อแยกยีนทั้งสองและนำไปแสดงออกใน *E. coli* ต่อไป โดยได้ออกแบบ primer เพื่อแยกยีน gp116 ที่ปราศจากส่วน N-terminal transmembrane (gp116 Δ TM) และยีน gp116 ตรงบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 73 ตัวแรกทางปลาย N (gp116(N73)) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ GAV เพียง 43.8% และได้ออกแบบ primer เพื่อแยกยีน gp64 ที่ปราศจากส่วน C-terminal transmembrane (gp64 Δ TM) และยีน gp64 ตรงบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 160 ตัวแรกทางปลาย N ซึ่งมีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic region) เป็นส่วนใหญ่ โดยให้ชื่อยีนตรงส่วนนี้ว่า gp64(HPL) จากนั้นจึงโคลนยีนทั้งหมดเข้าสู่ expression vector ต่างๆ ได้แก่ pQE30 pMAL-C2 pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การสร้าง cDNA ของ YHV

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

2. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp116ΔTM

2.1 การทำ PCR เพื่อแยกยีน gp116ΔTM

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน gp116ΔTM (gp116 ที่ปราศจากส่วน N-terminal transmembrane) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน gp116ΔTM ใช้ primer 135F685 (CGGGATCCACGATTCTAAGTGGAATTCCTG) และ primer 135R4 (CCCCATGGAAACAGCATAGCTACTGCCTGG) โดยใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase (Invitrogen) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 2 นาที denaturation: 94°C 15 วินาที annealing: 55°C 30 วินาที extension: 68°C 2 นาที 30 วินาที และ final extension: 68°C 20 นาที

2.2 การโคลนยีน gp116ΔTM เข้าสู่ pQE30

นำ PCR product ของยีน gp116ΔTM โคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector (Invitrogen) จากนั้นทำการ subclone ยีน gp116ΔTM ที่ insert อยู่ใน pCR-Blunt vector เข้าสู่ expression vector pQE30 (Qiagen) ตรงบริเวณ *Bam*HI และ *Kpn*I จากนั้น transform gp116ΔTM-pQE30 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15(pREP4) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer pQE prom (CCCGAAAAGTGCCACCTG)

2.3 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp116ΔTM

เลี้ยง *E. coli* ที่มี gp116ΔTM-pQE30 plasmid และ gp116ΔTM-pMAL-C2 plasmid จนกระทั่งเข้าสู่ log phase จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยใช้ 1mM isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้มีการสังเคราะห์

recombinant protein นำเชื้อ *E. coli* ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของแบคทีเรียมาแช่ในน้ำแข็ง และนำไปแขวนลอยในบัฟเฟอร์ (100mM NaH_2PO_4 10mM Tris-Cl 8M Urea pH 8 ที่มี 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)) จากนั้นนำไป sonicate จน lysate ของแบคทีเรียได้ ปั่นเก็บส่วนใสที่ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที.

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp116(N73)

3.1 การทำ PCR เพื่อแยกยีน gp116(N73)

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน gp116(N73) (gp116 ที่มีกรดอะมิโน 73 ตัวแรกทางปลาย N) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน gp116(N73) ใช้ primer 135F685 (CGGGATCCACGATTCTAAGTGGGAATTCCTG) และ primer 135R903 (CCCCATGGGGCAGAAGAAGTTGTAGTGG) โดยใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase (Invitrogen) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 2 นาที denaturation: 94°C 15 วินาที annealing: 57°C 30 วินาที extension: 68°C 30 วินาที และ final extension: 68°C 20 นาที

3.2 การโคลนยีน gp116(N73) เข้าสู่ pQE30

นำ PCR product ของยีน gp116(N73) โคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector (Invitrogen) จากนั้นทำการ subclone ยีน gp116(N73) ที่ insert อยู่ใน pCR-Blunt vector เข้าสู่ expression vector pQE30 (Qiagen) ตรงบริเวณ *Bam*HI และ *Kpn*I จากนั้น transform gp116(N73)-pQE30 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15(pREP4) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer pQE prom

3.3 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp116(N73)

เลี้ยง *E. coli* ที่มี gp116(N73)-pQE30 plasmid จนกระทั่งเข้าสู่ log phase จากนั้นทำตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4

3.4 การทำ Western blot เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน gp116(N73)

นำ lysate ของแบคทีเรีย มาแยกบน SDS-PAGE ตามวิธีของ Lamml (1970) ที่ 100 V เป็นเวลา 3-4 ชม. จากนั้นถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่กระดาษ nitrocellulose โดยใช้ transblot apparatus (Biorad) นำ nitrocellulose membrane จุ่มใน 5% blotto (5% non fat dry milk 0.1 % tritonX100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มใน primary antibody คือ MAb V3-2B (MAb ที่จำเพาะต่อ gp116 ของ YHV: Sithigorngul et al., 2000) ที่

เจือจางใน 5% blotto 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 1:1500 เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นล้างใน 0.5% blotto และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS

4. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp64 Δ TM

4.1 การทำ PCR เพื่อแยกยีน gp64 Δ TM

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน gp64 Δ TM (gp64 ที่ปราศจากส่วน C-terminal transmembrane) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน gp64 Δ TM ใช้ primer p65F78 (CGGGATCCCTCGCTCCACGACAGGCACG) และ primer p65R6 (CCCAAGCTTCTTGAGAATGTAATCCCATG) โดยใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase (Invitrogen) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 2 นาที denaturation: 94°C 15 วินาที annealing: 55°C 30 วินาที extension: 68°C 1 นาที 45 วินาที และ final extension: 68°C 20 นาที

4.2 การโคลนยีน gp64 Δ TM เข้าสู่ pQE30

นำ PCR product ของยีน gp64 Δ TM โคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector (Invitrogen) จากนั้นทำการ subclone ยีน gp64 Δ TM ที่ insert อยู่ใน pCR-Blunt vector เข้าสู่ expression vector pQE30 (Qiagen) ตรงบริเวณ *Bam*HI และ *Hind*III จากนั้น transform gp64 Δ TM-pQE30 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15(pREP4) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer pQE prom

4.3 การโคลนยีน gp64 Δ TM เข้าสู่ pMAL-C2 และ pMAL-P2

นำ gp64 Δ TM-pCR-Blunt plasmid มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III จากนั้นทำการโคลนยีน gp64 Δ TM ที่ได้เข้าสู่ expression vector pMAL-C2 และ pMAL-P2 (New England Biolabs) จากนั้น transform gp64 Δ TM-pMAL-C2 plasmid และ gp64 Δ TM-pMAL-P2 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Amersham Bioscience) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer malE (GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC)

4.4 การโคลนยีน gp64 Δ TM(*Eco*) เข้าสู่ pGEX-6P-1

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน gp64 Δ TM(*Eco*) (gp64 ที่ปราศจากส่วน transmembrane และมีบริเวณตัดจำเพาะทางปลาย 3' เป็น *Eco*RI เพื่อ

ใช้ในการโคลนเข้าสู่ pGEX-6P-1) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน gp64 Δ TM(Eco) ใช้ primer p65F78 (CGGGATCCCTCGCTCCACGACAGGCACG) และ primer p65R6Eco(GGAATTCCTTGAGAATGTAATCCCATG) โดยใช้เอนไซม์ Pfx polymerase (Invitrogen) ในการทำให้ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 2 นาที denaturation: 94°C 15 วินาที annealing: 55°C 30 วินาที extension: 68°C 1 นาที 30 วินาที และ final extension: 68°C 20 นาที

นำ PCR product ของยีน gp64 Δ TM(Eco) โคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector (Invitrogen) จากนั้นทำการ subclone ยีน gp64 Δ TM(Eco) ที่ insert อยู่ใน pCR-Blunt vector เข้าสู่ expression vector pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) ตรงบริเวณ BamHI และ EcoRI จากนั้น transform gp64 Δ TM(Eco)-pGEX-6P-1 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Amersham Biosciences) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer pGEX 5' (GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG)

4.5 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp64 Δ TM

เลี้ยง *E. coli* ที่มี gp64 Δ TM-pQE30 plasmid gp64 Δ TM-pMAL-C2 plasmid gp64 Δ TM-pMAL-P2 plasmid และ gp64 Δ TM(Eco)-pGEX-6P-1 plasmid จนกระทั่งเข้าสู่ log phase จากนั้นทำตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4

สำหรับการเตรียมส่วน periplasmic fraction (cold osmotic shock fluid) จากแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pMAL-P2 ทำได้โดยเลี้ยง *E. coli* จนกระทั่งเข้าสู่ log phase จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยใช้ 1mM isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้มีการสังเคราะห์ recombinant protein นำเชื้อ *E. coli* ไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 7,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนของแบคทีเรียมาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ (30 mM Tris-Ci/20% sucrose, pH 8.0) จากนั้นเติม EDTA, pH 8.0 จนมีความเข้มข้นเป็น 1 mM เขย่าเป็นเวลา 5-10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาแขวนลอยใน 5 mM MgSO₄ ที่เย็น เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส (cold osmotic shock fluid)

4.6 การทำ Western blot เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน gp64 Δ TM

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4 แต่ใช้ primary antibody เป็น MAb Y18-2D (MAb ที่จำเพาะต่อ gp64 ของ YHV: Sithigorngul et al., 2002)

5. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp64(HPL)

5.1 การทำ PCR เพื่อแยกยีน gp64(HPL)

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน gp64(HPL) (gp64 ที่มีกรดอะมิโน 160 ตัวแรกทางปลาย N ซึ่งมีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic region) เป็นส่วนใหญ่) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน gp64(HPL) ใช้ primer p65F78

(CGGGATCCCTCGCTCCACGACAGGCACG) และ primer p65R558

(GGGTTTCGAAAGCGTGACCATCGTTGATGG) โดยใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase

(Invitrogen) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 2

นาที denaturation: 94°C 15 วินาที annealing: 57°C 30 วินาที extension: 68°C 30

วินาที และ final extension: 68°C 20 นาที

5.2 การโคลนยีน gp64(HPL) เข้าสู่ pQE30

นำ PCR product ของยีน gp64(HPL) โคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector (Invitrogen) จากนั้นทำการ subclone ยีน gp64(HPL) ที่ insert อยู่ใน pCR-Blunt vector เข้าสู่ expression vector pQE30 (Qiagen) ตรงบริเวณ *Bam*HI และ *Hind*III จากนั้น transform gp64(HPL)-pQE30 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15(pREP4) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer pQE prom

5.3 การโคลนยีน gp64(HPL) เข้าสู่ pMAL-C2 และ pMAL-P2

นำ gp64(HPL)-pCR-Blunt plasmid มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III จากนั้นทำการโคลนยีน gp64(HPL) ที่ได้เข้าสู่ expression vector pMAL-C2 และ pMAL-P2 (New England Biolabs) จากนั้น transform gp64(HPL)-pMAL-C2 plasmid และ gp64(HPL)-pMAL-P2 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Amersham Bioscience) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer malE

5.4 การโคลนยีน gp64(HPL)(*Eco*) เข้าสู่ pGEX-6P-1

นำ cDNA ที่สร้างขึ้นมาใช้เป็น template ในการแยกยีน gp64(HPL)(*Eco*) (ยีน gp64(HPL) ที่มีบริเวณตัดจำเพาะทางปลาย 3' เป็น *Eco*RI เพื่อใช้ในการโคลนเข้าสู่ pGEX-6P-1) สำหรับการทำให้ PCR ของยีน gp64(HPL)(*Eco*) ใช้ primer p65F78

(CGGGATCCCTCGCTCCACGACAGGCACG) และ primer

p65R558(*Eco*)(GGAATTCAGCGTGACCATCGTTGATGG) โดยใช้เอนไซม์ *Pfx* polymerase

(Invitrogen) ในการทำ PCR 35 รอบ โดยมี condition ดังนี้ initial denaturation : 94°C 2

นาที denaturation: 94°C 15 วินาที annealing: 57°C 30 วินาที extension: 68°C 30 วินาที และ final extension: 68°C 20 นาที

นำ PCR product ของยีน gp64(HPL)(Eco) โคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector (Invitrogen) จากนั้นทำการ subclone ยีน gp64(HPL)(Eco) ที่ insert อยู่ใน pCR-Blunt vector เข้าสู่ expression vector pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) ตรงบริเวณ BamHI และ EcoRI จากนั้น transform gp64(HPL)(Eco)-pGEX-6P-1 plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Amersham Biosciences) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของ open reading frame กระทำโดยการหาลำดับ DNA โดยใช้ primer pGEX 5'

5.5 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp64(HPL)

เลี้ยง *E. coli* ที่มี gp64(HPL)-pQE30 plasmid gp64(HPL)-pMAL-C2 plasmid gp64(HPL)-pMAL-P2 plasmid และ gp64(HPL)(Eco)-pGEX-6P-1 plasmid จนกระทั่งเข้าสู่ log phase จากนั้นใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.5

5.6 การทำ Western blot เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน gp64(HPL)

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.6

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp116 Δ TM

1.1 การแยกยีน gp116 Δ TM

จากการแยกยีน gp116 Δ TM โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ซึ่งมีขนาด 2410 bp ซึ่งผลที่ได้ตรงกับขนาดของ DNA ที่ได้คาดไว้ (รูปที่ 1)

1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน gp116 Δ TM โดยใช้ pQE30

จากการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp116 Δ TM โดยใช้ pQE30 ไม่พบว่าการแสดงออกของโปรตีน gp116 Δ TM เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ *E. coli* ที่ไม่มียีนนี้ (*E. coli* ที่มีเฉพาะ pQE30) (รูปที่ 2)

2. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp116(N73)

1. การแยกยีน gp116(N73)

จากการแยกยีน gp116(N73) โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ซึ่งมีขนาด 235 bp ซึ่งผลที่ได้ตรงกับขนาดของ DNA ที่ได้คาดไว้ (รูปที่ 3)

2. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp116(N73) โดยใช้ pQE30

จากการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp116(N73) โดยใช้ pQE30 พบว่าการแสดงออกของโปรตีน gp116(N73) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ *E. coli* ที่ไม่มียีนนี้ (*E. coli* ที่มีเฉพาะ pQE30) (รูปที่ 4A) และเมื่อทำการตรวจสอบโปรตีนนี้โดยวิธี Western blot และใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ gp116 ของ YHV พบว่า antibody สามารถจับกับโปรตีน gp116(N73) ได้ (รูปที่ 4B)

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp64 Δ TM

3.1 การแยกยีน gp64 Δ TM

จากการแยกยีน gp64 Δ TM และ ยีน gp64 Δ TM(*Eco*) โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ซึ่งมีขนาด 1526 bp ซึ่งผลที่ได้ตรงกับขนาดของ DNA ที่ได้คาดไว้ (รูปที่ 5 และ 9 ตามลำดับ)

3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน gp64 Δ TM โดยใช้ pQE30 pMAL-C2 pMAL-P2 และ pGEX-6P-1

จากการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp64 Δ TM โดยใช้ pQE30 pMAL-C2 pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 ไม่พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน gp64 Δ TM เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ *E. coli* ที่ไม่มียีนนี้ (*E. coli* ที่มีเฉพาะ expression vector ต่างๆ) (รูปที่ 6 รูปที่ 7 รูปที่ 8 และรูปที่ 10) ในรูปที่ 7 จะเห็นการแสดงออกของ maltose binding protein (MBP) จาก pMAL-C2 ที่ไม่มี DNA insert โดย MBP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42.5 kDa และในรูปที่ 10 จะเห็นการแสดงออกของ glutathione S transferase (GST) จาก pGEX-6P-1 ที่ไม่มี DNA insert โดย GST มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 kDa

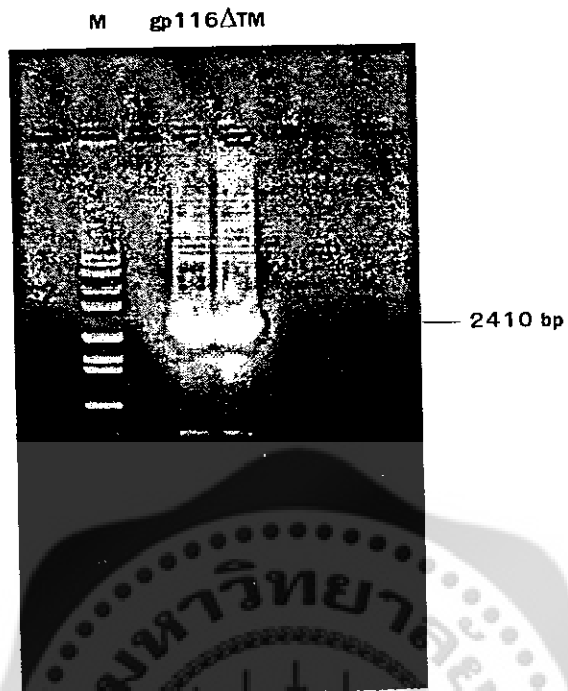
4. การศึกษาการแสดงออกของยีน gp64(HPL)

3.1 การแยกยีน gp64(HPL)

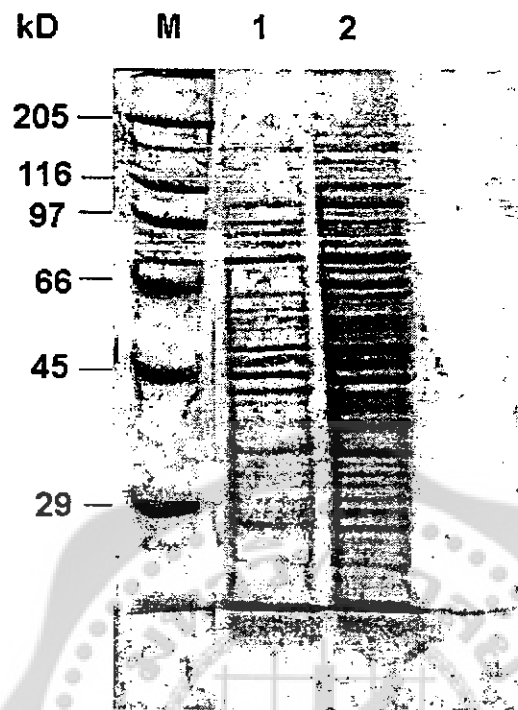
จากการแยกยีน gp64(HPL) และ ยีน gp64(HPL)(*Eco*) โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ซึ่งมีขนาด 498 bp ซึ่งผลที่ได้ตรงกับขนาดของ DNA ที่ได้คาดไว้ (รูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ)

3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน gp64(HPL) โดยใช้ pQE30 pMAL-C2 pMAL-P2 และ pGEX-6P-1

จากการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน gp64(HPL) โดยใช้ pQE30 pMAL-C2 pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 ไม่พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน gp64(HPL) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ *E. coli* ที่ไม่มียีนนี้ (*E. coli* ที่มีเฉพาะ expression vector ต่างๆ) (รูปที่ 7 รูปที่ 8 รูปที่ 10 และรูปที่ 13)



รูปที่ 1 PCR product ของยีน gp116 Δ TM
(M: Hi-LoTM DNA Marker)

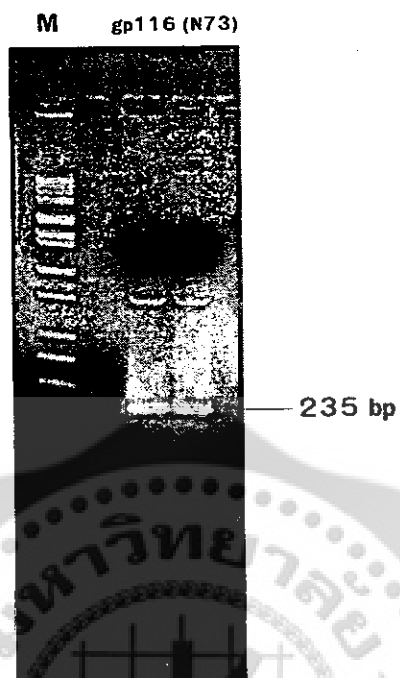


รูปที่ 2 ผลของSDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E.coli* ที่มีพลาสมิด gp116ΔTM-pQE30

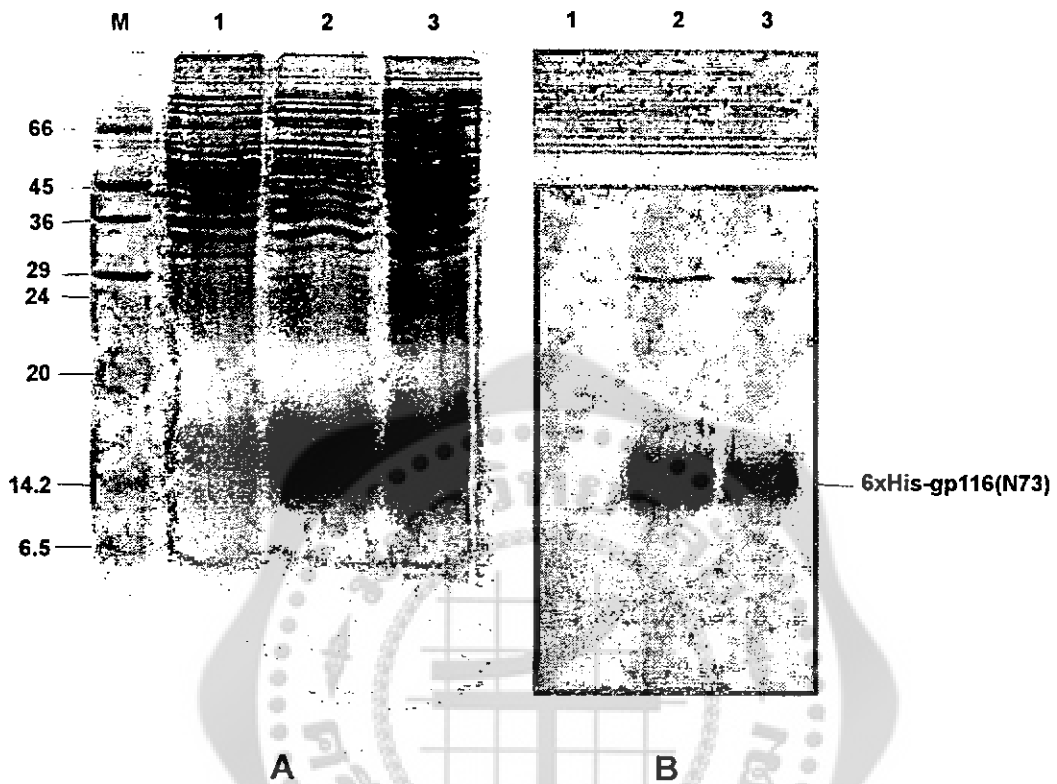
Lane M : Low Molecular Weight

Lane 1 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 2 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีพลาสมิด
gp116ΔTM -pQE30



รูปที่ 3 PCR product ของยีน gp116(N73)
(M: Hi-Lo™ DNA Marker)

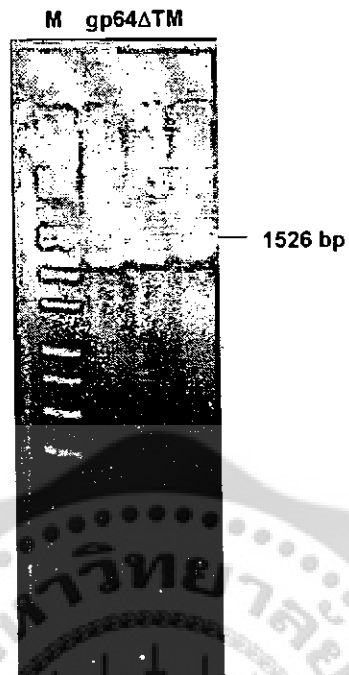


รูปที่ 4 ผลของ (A) SDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E.coli* ที่มีพลาสมิด gp116(N73)- pQE30 และ (B) Western blot โดยใช้ MAb V3-2B ที่จำเพาะต่อ gp116 ของ YHV

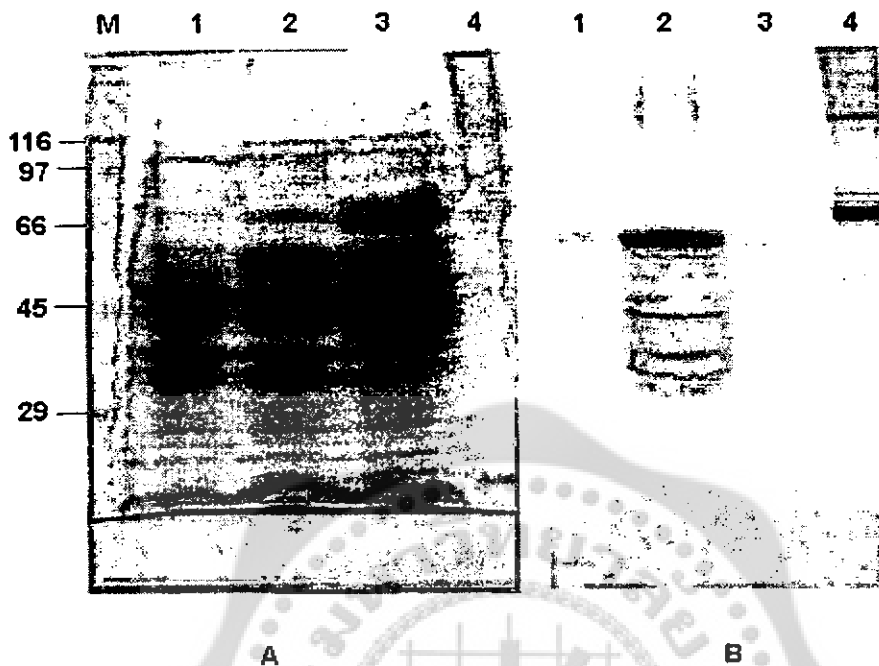
Lane M : Low Molecular Weight

Lane 1 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 2-3 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีพลาสมิด gp116(N73)-pQE30



รูปที่ 5 PCR product ของยีน gp64 Δ TM
(M: Hi-LoTM DNA Marker)



รูปที่ 6 ผลของ (A) SDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* ที่มีพลาสมิด gp64 Δ TM-pQE30 และ (B) Western blot โดยใช้ MAb Y18-2D ที่จำเพาะต่อ gp64 ของ YHV

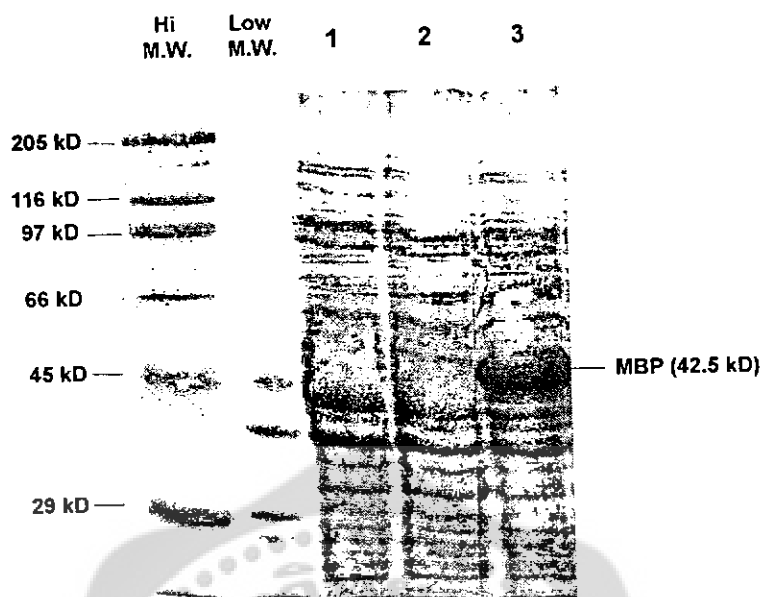
Lane M : Molecular Weight Marker

Lane 1 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 2 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีพลาสมิด gp64 Δ TM -pQE30

Lane 3 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีพลาสมิด gp116 Δ TM -pQE30

Lane 4 : purified YHV

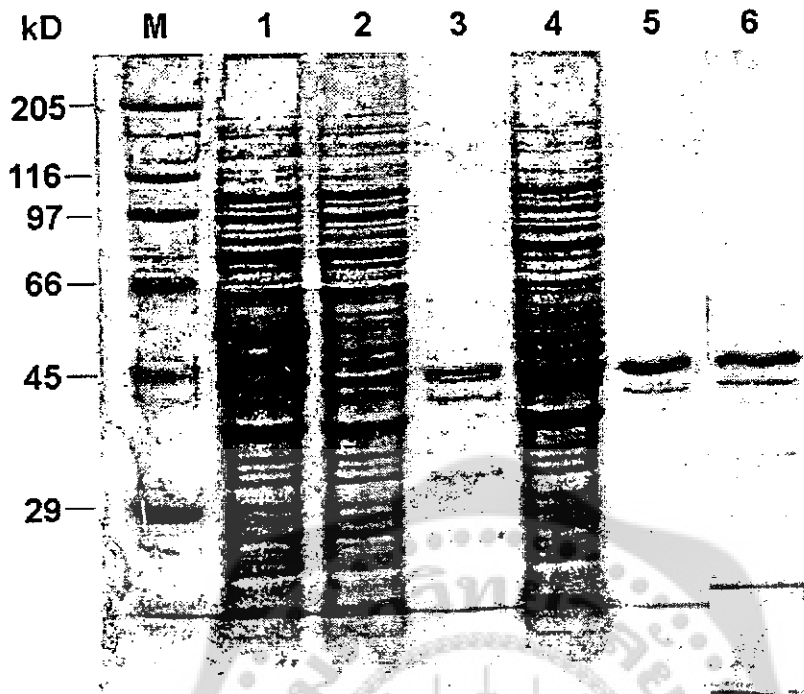


รูปที่ 7 ผลของ SDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E.coli* ที่มีพลาสมิด gp64 Δ TM-pMAL-C2 และ พลาสมิด gp64(HPL)-pMAL-C2

Lane 1 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64(HPL)-pMAL-C2

Lane 2 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64 Δ TM-pMAL-C2

Lane 3 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pMAL-C2 (control)

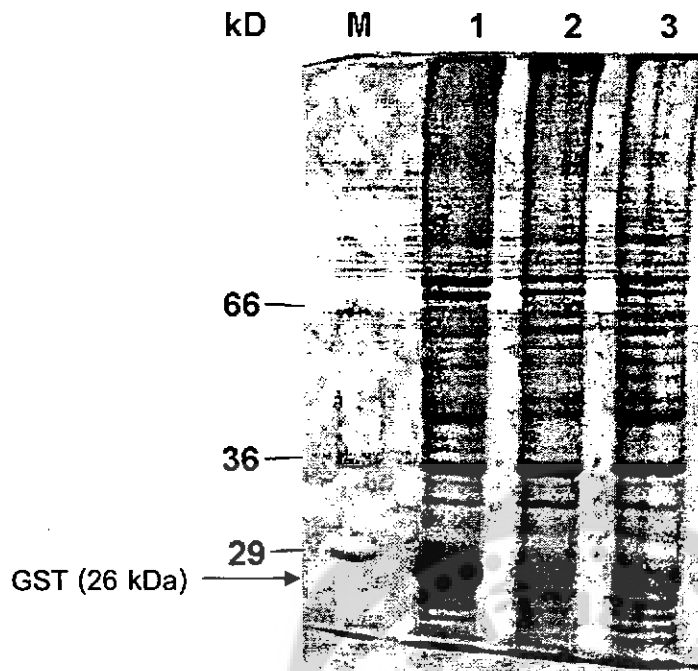


รูปที่ 8 ผลของ SDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E.coli* ที่มีพลาสมิด gp64 Δ TM-pMAL-P2 และ พลาสมิด gp64(HPL)-pMAL-P2

- Lane 1 : pellet ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pMAL-P2 (control)
- Lane 2 : pellet ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64(HPL)-pMAL-P2
- Lane 3 : periplasmic fraction จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64(HPL)-pMAL-P2
- Lane 4 : pellet ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64(Δ TM)-pMAL-P2
- Lane 5 : periplasmic fraction จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64(Δ TM)-pMAL-P2
- Lane 6 : periplasmic fraction จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pMAL-P2 (control)



รูปที่ 9 PCR product ของยีน gp64 Δ TM(Eco)
(M: Hi-LoTM DNA Marker)



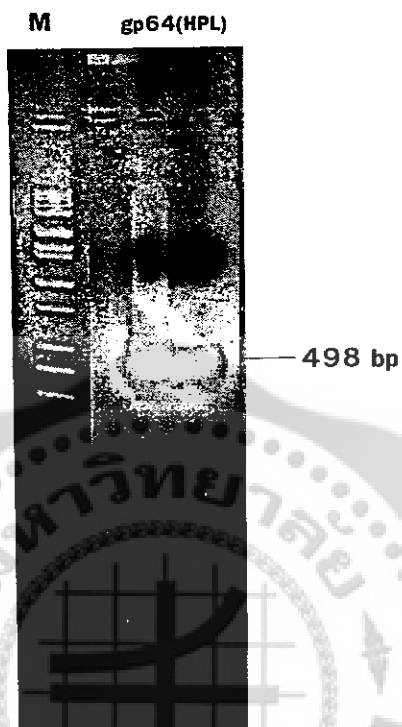
รูปที่ 10 ผลของ SDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* ที่มีพลาสมิด gp64 Δ TM-pGEX-6P-1 และ พลาสมิด gp64(HPL)-pGEX-6P-1

Lane M: Low molecular weight marker

Lane 1 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 (control)

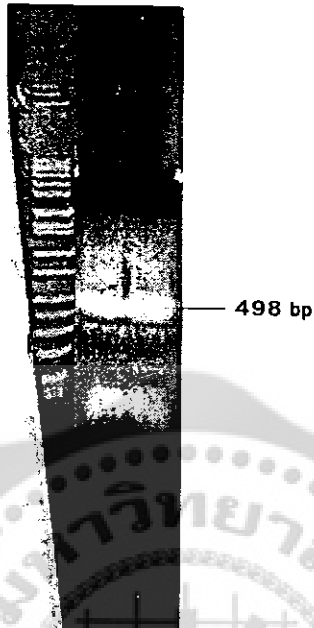
Lane 2 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด gp64(HPL)-pGEX-6P-1

Lane 3 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด gp64 Δ TM-pGEX-6P-1

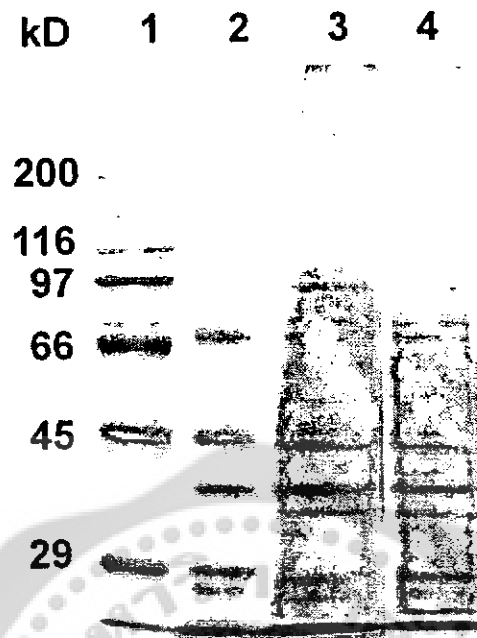


รูปที่ 11 PCR product ของยีน gp64(HPL)
(M : Hi-LoTM DNA Marker)

M gp64(HPL)(Eco)



รูปที่ 12 PCR product ของยีน gp64(HPL)(Eco)
(M : Hi-Lo™ DNA Marker)



รูปที่ 13 ผลของ SDS-PAGE จากโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* ที่มีพลาสมิด gp64(HPL)-pQE30

Lane 1: High molecular weight marker

Lane 2: Low molecular weight marker

Lane 3 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีพลาสมิด pQE30

Lane 4 : lysate จากแบคทีเรีย *E. coli* M15(pREP4) ที่มีพลาสมิด
gp64(HPL)-pQE30

12. สรุปผลการทดลอง

จากการแยกยีน gp116 Δ TM โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสภาวะแวดล้อมภายในเซลล์ของแบคทีเรียอาจไม่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนนี้ ซึ่งในอนาคตการศึกษาการแสดงออกในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงที่ใช้ baculo virus expression system อาจมีสภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกับเซลล์ของกิ้งและอาจทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนนี้ดีขึ้น หรืออาจจะใช้ expression vector ชนิดอื่นสำหรับการแสดงออกใน *E. coli* ต่อไป อย่างไรก็ตาม จากการแยกยีน gp116(N73) ซึ่งตรงกับบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 73 ตัวแรกทางปลาย N และเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ GAV เพียง 43.8% และทำการแสดงออกโดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ามีการแสดงออกของ 6 histidine-tag gp116(N73) ในปริมาณที่สูง (รูปที่ 4) ซึ่งผู้วิจัยจะนำโปรตีนนี้ไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อเชื้อ YHV ในกิ้งกุดล่าต่อไป และเนื่องจากโปรตีนในส่วนนี้มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ GAV เพียง 43.8% จึงน่าจะมีความจำเพาะต่อ YHV ก่อนข้างสูง

จากการแยกยีน gp64 Δ TM โดยวิธี PCR พบว่าได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ แต่ผลจากการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน 6 histidine-tag gp64 Δ TM (56 kDa) ในระดับที่ต่ำมากเนื่องจากไม่สามารถสังเกตเห็นได้จาก protein gel แต่จะพบว่าการแสดงออกของโปรตีนเมื่อใช้ Y18-2D monoclonal antibody (Sithigornngui et al., 2002) เป็น probe ในการทำ Western blot (รูปที่ 6) ผลจาก Western blot แสดงให้เห็นว่าโปรตีน 6 histidine-tag gp64 Δ TM มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 kDa ซึ่งเล็กกว่าโปรตีน gp64 ของ YHV เนื่องจากการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli* จะไม่มีการบวนการ glycosylation เกิดขึ้นจึงทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าโปรตีน gp64 ที่เตรียมได้จากไวรัสซึ่งโปรตีนนี้เป็น glycoprotein จากผลการแสดงออกที่ต่ำของโปรตีนนี้จึงได้มีความพยายามในการแสดงออกของโปรตีนนี้โดยมีการใช้ expression vector ชนิดอื่นซึ่งได้แก่ pMAL-C2, pMAL-P2 vectors ซึ่งจะให้ fusion protein กับ maltose binding protein (MBP) และ pGEX-6P-1 vector ซึ่งจะให้ fusion protein กับ glutathione-S-transferase (GST) ก็ไม่พบว่าทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนนี้แต่อย่างใด

ต่อมาจึงได้มีความพยายามในการแสดงออกของโปรตีน gp64 โดยมีการแยกยีน gp64 ตรงบริเวณที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 160 ตัวแรกทางปลาย N ซึ่งมีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic region) เป็นส่วนใหญ่ โดยให้ชื่อยีนตรงส่วนนี้ว่า gp64(HPL) จากนั้นจึงโคลนยีนนี้เข้าสู่ expression vector ต่างๆ ได้แก่ pQE30, pMAL-C2, pMAL-P2 และ pGEX-6P-1 เพื่อศึกษาการแสดงออกแต่ก็ไม่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนนี้แต่อย่างใด ในอนาคตการศึกษา

การแสดงออกของยีน gp64 ในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงที่ใช้ baculo virus expression system อาจทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนนี้ดีขึ้น

โดยสรุปผู้วิจัยสามารถทำการแสดงออกของโปรตีน gp116(N73) ได้สำเร็จและจะนำโปรตีนนี้ไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อเชื้อ YHV ในกุ่มกลาต่อไป อย่างไรก็ตามก็ยังคงพยายามทำการแสดงออกของโปรตีน gp116 และ gp64 ต่อไปเพื่อนำไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อเชื้อ YHV เช่นกัน



เอกสารอ้างอิง

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

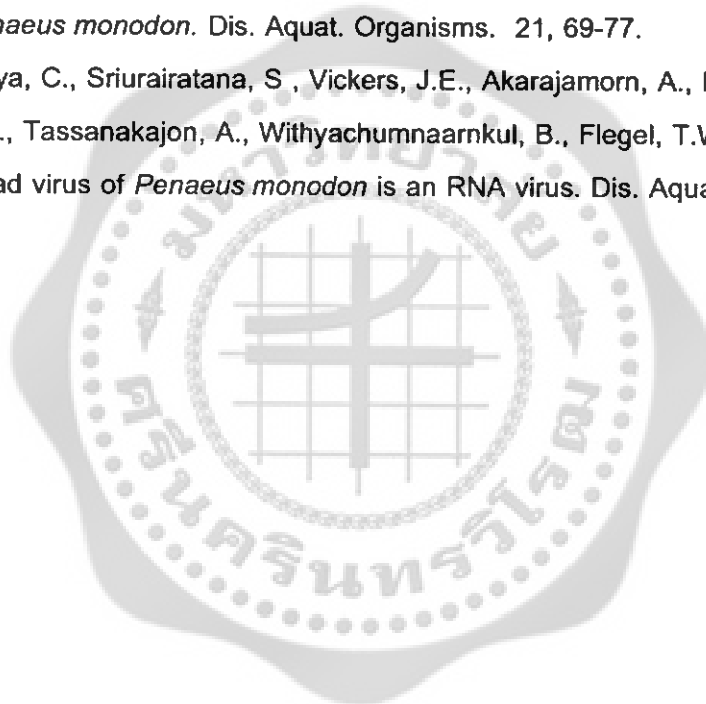
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P.J., Panyim, S., Boonsaeng, 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84; 863-873
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 ; 680-685.
- Lightner, D.V., Redman, R.W., 1998. Shrimp diseases and current diagnosis methods. Aquaculture. 164 ; 201-220.
- Loh, P.C., Cesar, E., Nadala, B., Tapay, L.M., Lu, Y., 1998. Recent development in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogen. Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.255-259.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Follin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193 ; 256-275.
- Nadala, Jr. E.C.B., Tapay, L.M., Loh, P.C., 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 31, 141-146
- Pasharawipas, T., Flegel, T.W. Sriurairatana, S., Morrison, D.J., 1997. Latent yellow-head infections in *Penaeus monodon* and implications regarding disease tolerance or resistance. In Flegel, T.W., Menasaveta, P., Paisamrat, S. (Eds) Shrimp biotechnology in Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 45-53.
- Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Menasveta, P., 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 42, 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Menasveta, P., 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 49, 71-76.
- Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. Dis. Aquat. Org. 35, 165-173.
- Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Tongchuea, W., Sittidilokratana, N., Kanchanapun, P., Klinputsorn, R., Panyim, S., 1998. Multiplex PCR for detection of yellow-head virus and white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*.

Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.256.

Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W, Boonsaeng, V., Panyim, S, Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis. Aqua. Org. 31, 181-186.

Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Organisms. 21, 69-77.

Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S , Vickers, J.E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Dis. Aquat. Org. 22, 45-50.



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยวิธี

Multiplex RT-PCR ELISA

Development of diagnostic kit for detection of Viruses in

***Penaeus monodon* using Multiplex RT – PCR ELISA**

งบประมาณรายได้ประจำปี 2546

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง	II
สารบัญตาราง	III
สารบัญรูปภาพ	IV
กิตติกรรมประกาศ	V
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	VI
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	VII
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ขอบเขตงานวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	2
การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
ระเบียบวิธีวิจัย	3
อุปกรณ์และสารเคมี	3
การทดลอง	5
ผลการทดลอง	11
ความไวของการตรวจสอบ WSSV โดยเทคนิค PCR-ELISA	11
ความไวของการตรวจสอบ YHV โดยเทคนิค PCR-ELISA	12
ความไวของการตรวจสอบ YHV ในขณะที่มี WSSV อยู่ด้วย	13
ความไวของการตรวจสอบ WSSV ในขณะที่มี YHV อยู่ด้วย	14
สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	15
ผลงานวิจัย	16
ประโยชน์ของผลงานวิจัย	16
ผลงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้อง	17
บรรณานุกรม	18

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	ความไวในการตรวจ WSSV โดยเทคนิค PCR-ELISA	12
รูปที่ 2	ความไวในการตรวจ YHV โดยเทคนิค PCR-ELISA	13
รูปที่ 3	ความไวในการตรวจ YHV เมื่อมี WSSV โดยเทคนิค RT-PCR ELISA	14
รูปที่ 4	ความไวในการตรวจ WSSV เมื่อมี YHV โดยเทคนิค RT-PCR ELISA	15



สารบัญตาราง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	3
ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	4
ตาราง 3 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	5
ตาราง 4 ส่วนผสมของ PCR reaction ของการตรวจ WSSV	6
ตาราง 5 ส่วนผสมของ RT-PCR reaction ของการตรวจ YHV	7
ตาราง 6 ส่วนผสมของ Multiplex RT-PCR reaction	9



กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอแสดงความขอบพระคุณคณาจารย์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้พิจารณาให้รับ
ทุนอุดหนุนวิจัย จากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2546 และคณาจารย์ประจำภาควิชา รวมถึงคุณไพศาล
ชาวสีก นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชา ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยสำเร็จ

รศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์



บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศ และยังมีส่วนในการจ้างแรงงาน จึงมีผลสำคัญต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าผลผลิตกุ้งกุลาดำมีแนวโน้มลดลง สาเหตุหลักเนื่องจากปัญหาการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงจุดขาว(WSSV) และไวรัสหัวเหลือง(YHV)ในกุ้งกุลาดำ ในระยะเวลาที่ผ่านมาได้มีผู้ทำการวิจัยและสร้างวิธีตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อทั้งสองชนิด โดยมีความไวในการตรวจสอบสูงและนำมาใช้ตรวจในภาคสนามได้แล้ว สิ่งสำคัญในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสทั้งสองคือ วิธีการตรวจที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัดเวลา สารเคมี และค่าใช้จ่าย ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคไวรัสที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้พร้อมๆกัน เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า multiplex RT - PCR ELISA ซึ่งได้พัฒนาเทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิก (Total nucleic) ที่เป็น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้พร้อมกันโดยวิธีCTAB ทำให้ประหยัดเวลา และได้ทำการออกแบบ primer 2 คู่ จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของ ORF 1b ขนาด 300 เบส และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของ ยีน α VP500F - α VP500R ขนาด 500 เบส ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการทำ multiplex RT - PCR เพียงขั้นตอนเดียว และตรวจวิเคราะห์ผลโดยวิธี ELISA ซึ่งเป็นการเพิ่มความไว ประหยัดเวลาและสะดวกเมื่อตรวจตัวอย่างจำนวนมาก

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) applied in diagnosis has the very useful advantages of sensitivity and specificity. We have developed a method for the simultaneous detection of both genomic RNA and DNA for two different species of shrimp viruses, yellow – head virus (YHV) white – spot syndrome virus (WSSV) which are currently the cause of very serious and widespread losses in the shrimp industry in Thailand and in Asia. We describe a method which allows rapid diagnosis by performing a single step of extraction for both RNA and DNA using CTAB. The co – extract was then used for successful nucleic acid amplification in a multiplex RT-PCR ELISA reaction employing the Super Script One multiplex RT-PCR process with primer in ORF1 gene for YHV and primer nVP500F -nVP500R for WSSV. This multiplex RT – PCR assay system is convenient and should be useful to shrimp aquaculturists for simultaneous detection of YHV and WSSV in post-larvae and broodstock of *P. monodon* and in other asymptomatic carriers

1. บทนำ

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

อย่างไรก็ดีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องประสบปัญหาความเสี่ยงในการเพาะเลี้ยงอันเนื่องจากการระบาดของเชื้อไวรัสที่รุนแรง 2 ชนิด คือ ไวรัสตัวแดงจุดขาว และไวรัสหัวเหลือง จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส 2 ชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงในกุ้งกุลาดำ และเป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้ผลผลิตลดลง การตรวจวินิจฉัยโรคทั้ง 2 ชนิด จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการตรวจที่ง่าย และรวดเร็ว ประหยัดเวลา สารเคมี และค่าใช้จ่ายคณะผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคไวรัสทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างเดียวกัน และสามารถตรวจสอบไปพร้อมๆ กันได้ โดยคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาการทำ Multiplex RT-PCR โครงการวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการตรวจผลผลิต Multiplex RT-PCR โดยวิธี ELISA เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบ ในกรณีการตรวจถูกกึ่ง พ่อ แม่พันธุ์ หรือพาหะซึ่งมีการติดเชื้อจำนวนน้อยๆ เป็นการช่วยสนับสนุนการจัดการเพาะเลี้ยง ควบคุมและป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัสได้

2. วัตถุประสงค์ของชุดโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ ให้ความไวสูง โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR

3. ขอบเขตงานวิจัย

การวิจัยจะมุ่งเน้นการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ไวรัสหัวเหลือง และไวรัส ซึ่งมีรายงานการระบาดในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งบริเวณภาคใต้ เช่น จังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ชุมพร และภาคตะวันออกของประเทศ เช่น จังหวัดจันทบุรี และฉะเชิงเทรา เป็นต้น

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีทางอนุชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกึ่งกลาคำ
2. สามารถพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตอันเนื่องจากการติดเชื้อไวรัส
3. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและป้องกันโรคไวรัสในกึ่งกลาคำ

5. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการดูแลด้านการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาคำ เช่น กรมประมง
2. กลุ่มเกษตรกรต่างๆ ที่มีการจัดตั้งศูนย์ตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิบัติถูกใช้โพลิเมอร์ส เช่น กลุ่มชมรมกุ้งสุราษฎร์ธานี
3. สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ เช่น BIOTECH และศูนย์วิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาคำ
4. สถาบันอุดมศึกษาที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาคำเช่น มหาวิทยาลัยมหิดล รวมถึงมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
5. หน่วยงาน หรือบริษัทเอกชนที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์การเพาะเลี้ยงกึ่งกลาคำ เช่น สถาบันวินิจฉัยสัตว์น้ำ เครือเจริญโภคภัณฑ์

6. การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

7. ระเบียบวิธีวิจัย

7.1 อุปกรณ์และสารเคมี

7.1.1 สัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

กึ่งกุลาคำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและกึ่งกุลาคำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

7.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR)	MJ Research Inc., U.S.A.
เครื่องบดเนื้อเยื่อ	Pyrex , U.S.A.
ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิต่ำ	Sharp, Japan
เครื่องชั่งวางน้ำหนักด้านบน	Sartorius, Germany
เครื่องดูดสารละลายปริมาณต่ำ	Gilson Medical Electronics S.A., France
เครื่องหมุนเหวี่ยง	Hettich, Germany
ตู้เย็น -70°C	Revco, U.S.A.
เตาไมโครเวฟ	National, Japan
เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ไฟรีซิส	
laboratory sealing film	Whatman
ชุดถ่ายภาพเจล	Fotodyne
เครื่อง Autoclaved	Hirayama, Japan
Gravity convention oven	Precision

7.1.3 เคมีภัณฑ์ (สารเคมี)

สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดในการวิจัยเป็นเกรดที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Analytical grade)

ตารางที่ 2 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัท
<i>Thermus aquaticus</i> (<i>Taq</i>) DNA polymerase	Gibco BRL, U.S.A.
Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)	Gibco BRL, U.S.A.
QIAGEN onestep RT-PCR	QIAGEN
PCR buffer	Gibco BRL, U.S.A.
Superscript one step RT-PCR with platinum <i>Taq</i>	Invitrogen
MgCl ₂	Gibco BRL, U.S.A.
Agarose gel	Sigma, U.S.A.
Ethidium bromide	Sigma, U.S.A.
Phenol	Gibco BRL, U.S.A.
Chloroform	Merck, Germany
100 bp DNA Ladder	Gibco BRL, U.S.A.
CTAB buffer	
DEPC water	Sigma, U.S.A.
dye	
70% Ethanol	
Isopropyl alcohol	Sigma, U.S.A.
10x PCR buffer	Gibco BRL, U.S.A.
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	

7.1.4 วัสดุภัณฑ์

ตารางที่ 3 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุภัณฑ์	บริษัท
Microtube ขนาด 0.2, 0.5, และ 1.5 ml	Treff lab. Switzerland
Tip	Treff lab. Switzerland
Flask ขนาด 100, 250, และ 500 ml	
ถุงมือ	

7.2 การทดลอง

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ จากเนื้อเยื่อขาวย่น้ำกุ้ง, หรือลูกกุ้งทั้งตัว เพื่อใช้เป็น DNA template ใน

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR

1. นำเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อมาบดใน homogenizer ที่มี CTAB buffer อยู่ 150 ไมโครลิตร โดยการใช้อัตราส่วน เนื้อเยื่อต่อ CTAB (1: 10 w/v) จนละเอียด
2. เติม CTAB buffer ลงไปอีก 800 ไมโครลิตร
3. Incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. นำไป centrifuge ที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มล.
6. เติมสาร phenol-chloroform- isoamyl จำนวน 750 ไมโครลิตร
7. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
8. นำไป centrifuge ที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
9. แยกเอาส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มล.
10. เติม 650 ไมโครลิตร ของ Chloroform-isoamyl
11. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
12. นำไป centrifuge ที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
13. แยกเอาส่วนที่เป็น supernatant (aqueous phase) ใส่ในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มล.
14. เติม Isopropanol 630 ไมโครลิตร (0.9 volume)
15. นำไป Incubate ที่ -20°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
16. นำไป centrifuge ที่ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
17. เก็บส่วนที่เป็น pellet และทิ้งให้ pellet แห้ง
18. ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol จำนวน 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
19. ละลาย pellet ด้วย DEPC-water จำนวน 50 ไมโครลิตร

20. ตรวจสอบปริมาณ DNA โดยนำไป run บน agarose gel electrophoresis

21. เก็บสารละลายที่ได้ใน -70°C จนกว่าจะออกนำมาใช้

7.2.2 การออกแบบไพรเมอร์ และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การออกแบบ primer จากยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง เพื่อใช้ในการศึกษา conserve sequence ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว โดยได้ทำการออกแบบ primer จากลำดับเบสของยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง nVP28 และได้ทำการออกแบบ primer จากลำดับเบสของยีน ORF1b ของไวรัสหัวเหลือง โดยโปรแกรม Oligo4.0

7.1 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของ WSSV

ด้วยวิธีการของเทคนิค PCR โดยมีส่วนผสมของ PCR reaction ดังนี้

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของ PCR reaction ของการตรวจสอบ เชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	15.25
10x PCR buffer	2.50
50 mM MgCl_2	1.50
10 mM dNTPs	1.00
Primer nVP28F (20 μM)	1.25
nVP28R (20 μM)	1.25
DNA template	2.00
Taq DNA polymerase (5U/ μl)	0.25
รวม	25.00

1. ผสมสารละลายทั้งหมดใน micro tube แล้วนำไปปั่นในเครื่อง centrifuge ประมาณ 30 วินาที

2. นำส่วนผสมที่ได้ไปไว้ในเครื่อง PCR โดยมีการกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation step 94°C 30 วินาที

Annealing step 59°C 30 วินาที

Extension step 72°C 30 วินาที

ทำซ้ำ 35 รอบ จากนั้น

Final extension 72°C 10 นาที

เก็บ PCR product ไว้ที่ 4°C

3. นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยการเทียบ
กับขนาดของ DNA มาตรฐาน

4. บันทึกผลโดยการใช้ชุดถ่ายภาพเจล

7.2.4 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของ YHV

ด้วยวิธีการของเทคนิค RT-PCR ซึ่งในการทำ RT-PCR จะมีส่วนประกอบสำคัญอยู่ 4 ส่วน ดังนี้

RNA template เป็น RNA สายเดี่ยวที่ได้จากการสกัด RNA ของไวรัสจากก้างที่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

QIAGEN one step RT-PCR Enzyme mix

dNTPs mix ความเข้มข้น 10 mM

Oligonucleotide primers

ซึ่ง primer เหล่านี้ออกแบบจากบริเวณ ORF 1b gene ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งเป็นบริเวณ conserve sequence ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ตารางที่ 5 ส่วนผสมของ RT-PCR reaction ของการตรวจสอบ YHV

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	14.0
5x QIAGEN RT-PCR buffer	5.0
10 mM dNTPs	1.0
Primer YHV300F (20 μ M)	1.25
YHV300R (20 μ M)	1.25
RNA template	2.00
QIAGEN onestep RT-PCR enzyme mix (5U/ μ l)	0.5
รวม	25.00

1. ผสมสารละลายทั้งหมดลงใน micro tube แล้วนำไปปั่นในเครื่อง centrifuge ประมาณ 30 วินาที
2. นำส่วนผสมที่ได้ไปไว้ในเครื่อง PCR โดยมีการกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

DNA synthesis and pre-denaturation

45°C 30 นาที

94°C 2 นาที

จำนวน 1 รอบ

PCR amplification 40 รอบ ของ

Denaturation step 94°C 30 วินาที

Annealing step 59°C 30 วินาที

Extension step 72°C 30 วินาที

ทำซ้ำ 35 รอบ จากนั้น

Final extension 72°C 10 นาที

เก็บ PCR product ไว้ที่ 4°C

3. นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยการเทียบ
กับขนาดของ DNA มาตรฐาน
4. บันทึกผลโดยการใช้ชุดถ่ายภาพเจล

7.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ WSSV และ YHV

โดยการใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งมีส่วนประกอบอยู่ 4 ส่วนที่สำคัญคือ

1. DNA template ของไวรัสตัวแดงจุดขาวและ cDNA ของไวรัสหัวเหลือง
2. Taq DNA polymerase
3. dNTPs mix (10 mM)
4. Oligonucleotide primer โดยใช้ primer 2 ชุดคือ

ชุดที่ตรวจสอบ ไวรัสตัวแดงจุดขาว คือ nVP28F, nVP28R

ชุดที่ตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง คือ YHV300F, YHV300R

ซึ่งมีส่วนผสมในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมของการทำ multiplex RT-PCR reaction

ส่วนผสมของการทำ multiplex PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	12.25
10x PCR buffer	2.50
50 mM MgCl ₂	1.50
10 mM dNTPs	1.00
Primer nVP28F (20 μM)	1.25
nVP28R (20 μM)	1.25
YHV300F (20 μM)	1.25
YHV300R (20 μM)	1.25
DNA template	2.00
Taq DNA polymerase (5U/ μl)	0.25
รวม	25.00

- ผสมสารละลายทั้งหมดลงใน micro tube แล้วนำไปปั่นในเครื่อง centrifuge ประมาณ 30 วินาที
- นำส่วนผสมที่ได้ไปไว้ในเครื่อง PCR โดยมีการกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation step	94°C 30 วินาที
Annealing step	59°C 30 วินาที
Extension step	72°C 30 วินาที
ทำซ้ำ 35 รอบ จากนั้น	
Final extension	72°C 10 นาที
เก็บ PCR product ไว้ที่ 4°C	
- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยการเทียบ
กับขนาดของ DNA มาตรฐาน
- บันทึกผลโดยการใช้ชุดถ่ายภาพเจล

7.2.6 การตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำโดยวิธี

Multiplex PCR-ELISA

การตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี Multiplex PCR-ELISA นับว่าเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีความไวสูงมาก และเป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาไวรัสจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำจำนวนมาก เทคนิคนี้ใช้การดักกลืนแสงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ หรือวัดการดักกลืนแสงโดยใช้เครื่อง ELISA reader แทนที่การวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ในขั้นตอนแรกการทำ PCR-ELISA ต้องทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตัวแดงจุดขาวและ RNA ของไวรัสหัวเหลือง โดยเครื่อง PCR ก่อน ซึ่งในขณะที่มีการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ จะถูกติดตามด้วยสาร Deoxigenin ไปด้วย จากนั้นก็ทำการตรวจหานิวคลีโอไทด์ที่มีสาร Deoxigenin โดยวิธีทาง ELISA จึงทำให้เกิดสีเขียวที่สามารถวัดการดักกลืนแสงได้ที่ 405 นาโนเมตร เทคนิคนี้มีความไวกว่าการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ประมาณ 100-1000 เท่า

7.2.7 การทำ Multiplex PCR-ELISA

1. การเตรียมสารละลายเพื่อทำ PCR และติดตามผลสาร Deoxigenin (DIG labeling)

สารละลายปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในการทำ PCR มีส่วนประกอบดังนี้

1x PCR buffer	2.5
50 mM MgCl ₂	1.0
10 mM dNTPs	0.5
PCR DIG labeling mix	2.5
20 μM primer nVF28F	1.25
20 μM primer nVP28R	1.25
20 μM primer YHV300F	1.25
20 μM primer YHV300R	1.25
5 Unit Taq DNA Polymerase	0.5
DNA ของ WSSV และ cDNA ของ YHV	2.0
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	11.0
รวม	25

2. การทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมของการทำ PCR ดังนี้

- | | |
|---|--------------|
| 1. 94°C 5 นาที | จำนวน 1 รอบ |
| 2. 94°C 30 วินาที 59°C 30 วินาที 72°C 30 วินาที | จำนวน 35 รอบ |
| 3. 72°C 5 นาที | จำนวน 1 รอบ |

3. นำ PCR product ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ใน micro tube ขนาด 1.5 มล.
4. ใส่ Denaturation solution ปริมาตร 40 ไมโครลิตร
5. ผสมให้เข้ากัน และปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
6. เติม Hybridization solution ให้ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
7. ผสมให้เข้ากันและเปิดสารจากข้อ 6. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ microtiter plate
8. นำไปอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. ดูดสารละลายในหลุมทิ้งไปและล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
10. เติม Anti-DIG-POD working solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร
11. นำไปอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
12. ดูดสารละลายในหลุมทิ้งไปและล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
13. เติม ABTS substrate solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร
14. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
15. สังเกตสีเขียวที่เกิดขึ้น หรืออ่านค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยเครื่อง PCR reader ที่ 405 นาโนเมตร (Reference filter 492 นาโนเมตร)

8. ผลการทดลอง

8.1 ความไวของการตรวจสอบ WSSV โดยเทคนิค PCR-ELISA

ความไวของการทำ PCR-ELISA สำหรับการตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาว เมื่อนำวิธีการตรวจสอบมาเปรียบเทียบกับระหว่างเทคนิค agarose gel electrophoresis และการตรวจสอบโดย ELISA โดยที่เราได้ทำการเจือจาง DNA ที่นำมาใช้เป็น DNA template ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า โดยเริ่มจาก 100 ng จนถึง 0.1 fg ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว รูปที่ 1A เป็นการตรวจสอบความไวโดย gel electrophoresis และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide ที่แสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจสอบโดยวิธีนี้เป็น 1 pg แต่ในขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงหรือ ELISA ดังรูป 1B สามารถเห็นสีของการตรวจสอบได้ถึง 10 fg ซึ่งวิธีวัดโดย ELISA เป็นวิธีที่ไวกว่าการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ถึง 100 เท่า

จำนวนของ DNA ของไวรัสตัวแดงจุดขาว ในตัวอย่างเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ

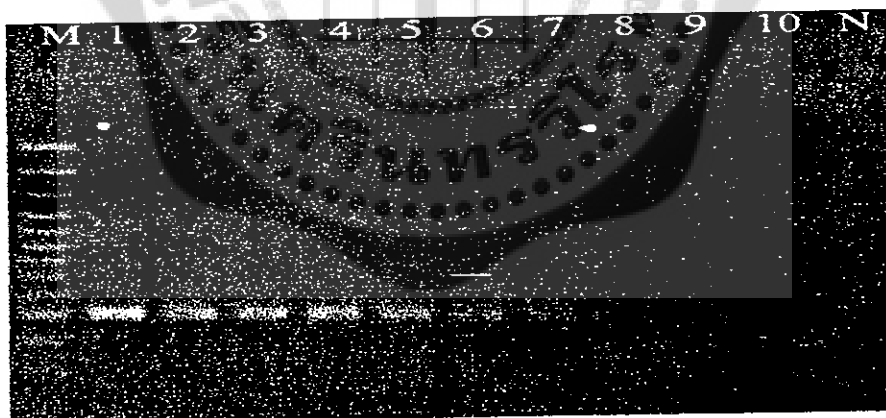
เครื่อง ELISA ที่มีความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (OD_{405}) ซึ่งความไวที่ได้ก็สามารถปรากฏเป็นสีเขียวให้เห็นด้วยตาเปล่าเมื่อเปรียบเทียบกับ blank ผลที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสงในการตรวจสอบที่ 10 fg ของ DNA ของไวรัสตัวแดงจุดขาวได้ ซึ่งค่าที่ได้สามารถคำนวณย้อนกลับถึงการตรวจสอบไวรัสได้ 3.65×10^4 อนุภาค

8.2 ความไวของ YHV โดยเทคนิค RT-PCR ELISA

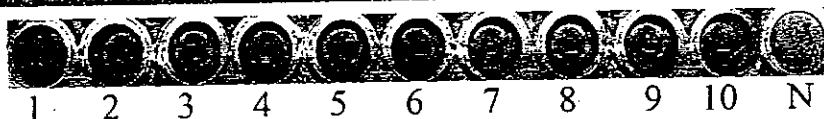
ความไวของการตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองโดยการใช้เทคนิค PCR-ELISA เช่นเดียวกับการตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาว กล่าวคือนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบความไวระหว่าง เทคนิค agarose gel electrophoresis กับวิธีการ ELISA โดยขั้นตอนแรกก็ทำการเจือจางไวรัสหัวเหลืองให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า โดยเริ่มจากความเข้มข้น 1 ng จนถึง 0.01 fg ซึ่งผลที่ได้อยู่ในรูปที่ 2 ซึ่งในรูปที่ 2A นั้น แสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจสอบโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis สามารถวัดได้ 0.1 pg ของความเข้มข้นไวรัสหัวเหลือง แต่ในขณะที่การตรวจสอบด้วยเทคนิคทาง ELISA สามารถเห็นการเกิดสีเขียวจากการตรวจสอบของเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ถึง 1 fg ดังรูปที่ 2B ซึ่งมีความไวว่าการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ถึง 100 เท่า

จากค่าของการตรวจสอบได้โดยใช้วิธีทาง ELISA ปรากฏเป็นสีให้เห็นได้ด้วยตาเปล่าได้เมื่อเปรียบเทียบกับ blank ที่สามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองได้ถึง 1 fg ซึ่งสามารถคำนวณย้อนกลับของการตรวจสอบไวรัสได้ถึง 6,000 อนุภาค

รูปที่ 1A



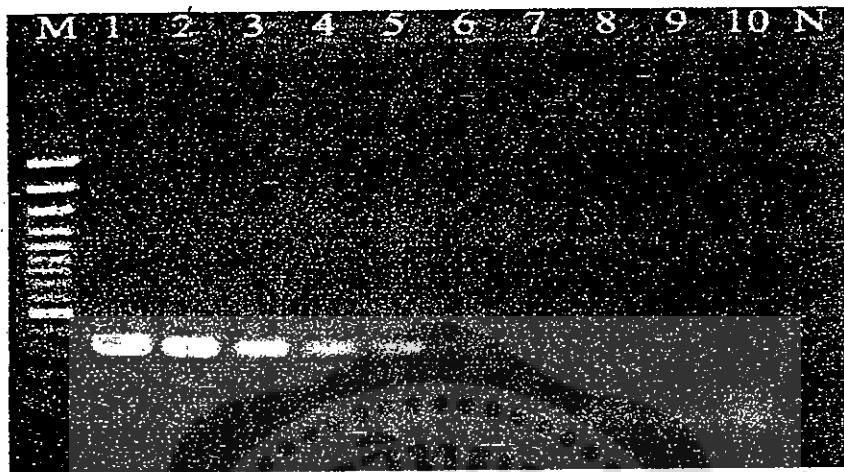
รูปที่ 1B



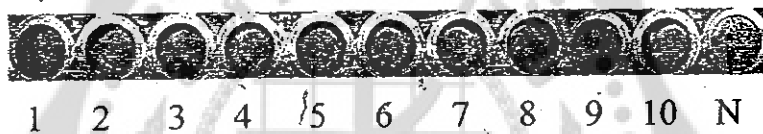
รูปที่ 1 ความไวในการตรวจ WSSV โดยใช้วิธีทาง PCR-ELISA

ช่องที่ 1-10(1A) คือ ผลผลิต PCR จากการย้อมสี Ethidium bromide ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว 100 ng ถึง 0.1 fg N คือ Negative control (1B) คือ การตรวจสอบผลผลิต PCR ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี ELISA 100 ng ถึง 0.1 fg (ช่องที่ 1-10) ตามลำดับ

รูปที่ 2A



รูปที่ 2B



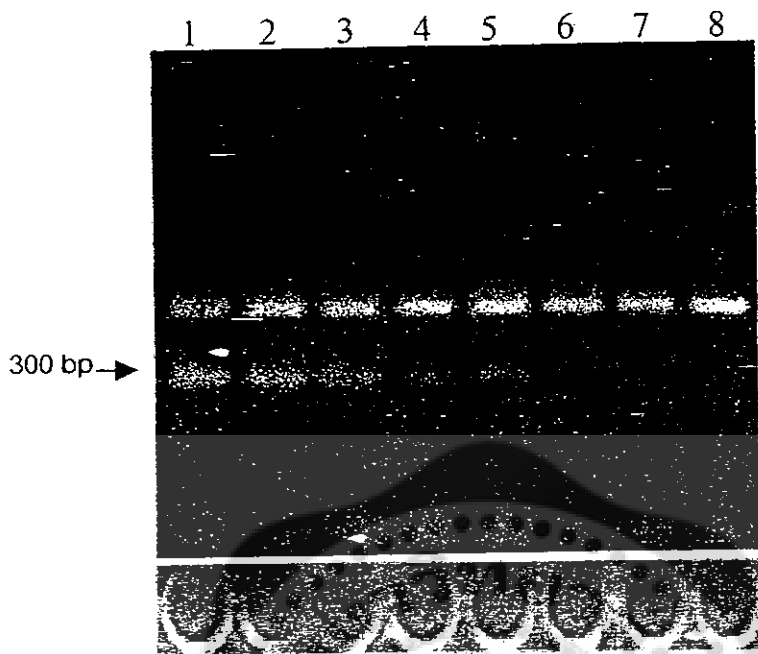
รูปที่ 2 ความไวในการตรวจ YHV โดยใช้วิธีทาง PCR-ELISA

ช่องที่ 1-10 (2A) เป็นผลผลิต RT - PCR จากการย้อมสี Ethidium Bromide ของเชื้อไวรัสไวห้ว
เหลือ 1 ng ถึง 0.01 fg N คือ Negative control (2B) คือ การตรวจสอบโดยวิธี ELISA
1 ng ถึง 0.001 fg

8.3 การตรวจสอบความไวของ YHV ในขณะที่มี WSSV อยู่ด้วย

การตรวจสอบโดยเทคนิค PCR-ELISA โดยเริ่มจากการนำเอา cDNA template ของเชื้อ
ไวรัสหัวเหลืองมาทำการเจือจางเพื่อจะดูความไวที่สามารถตรวจสอบได้ จากความเข้มข้นของ cDNA ของไว
รัสหัวเหลือง 50 ng ถึง 0.05 fg (เลน 1-10) รูปที่ 4 โดยที่มี DNA ของไวรัสตัวแดงจุดขาวอยู่ด้วยที่มีความเข้ม
ขึ้น 400 ng ทุกหลอดทดลอง เมื่อนำไปเพิ่มขยายปริมาณ DNA ผลปรากฏว่า เมื่อมีการผสมกันระหว่างสอง
เชื้อในหลอด PCR เดียวกันจะมีการแข่งขันจับ primer จะเห็นว่า cDNA ของไวรัสหัวเหลืองสามารถตรวจ
สอบความไวได้ดีที่ 5 fg ถ้าความเข้มข้นของไวรัสหัวเหลืองน้อยกว่านี้ก็ไม่สามารถตรวจสอบได้ ดังรูปที่ 5 เช่น
เดียวกันกับ DNA ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวได้คงความเข้มข้นไว้ที่ 400 ng ไว้ ในช่วงความเข้มข้นมากๆ ก็
สามารถตรวจสอบได้มาก แต่ถ้าความเข้มข้นของไวรัสหัวเหลืองมากขึ้นความสามารถที่จะตรวจสอบของไว
รัสตัวแดงจุดขาวจึงลดลงไป ซึ่งในเลนที่ 1 ไม่สามารถตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาว

รูปที่ 3A



รูปที่ 3B



รูปที่ 3 ความไวในการตรวจสอบของYHVเมื่อมี WSSV โดยใช้ RT-PCR ELISA

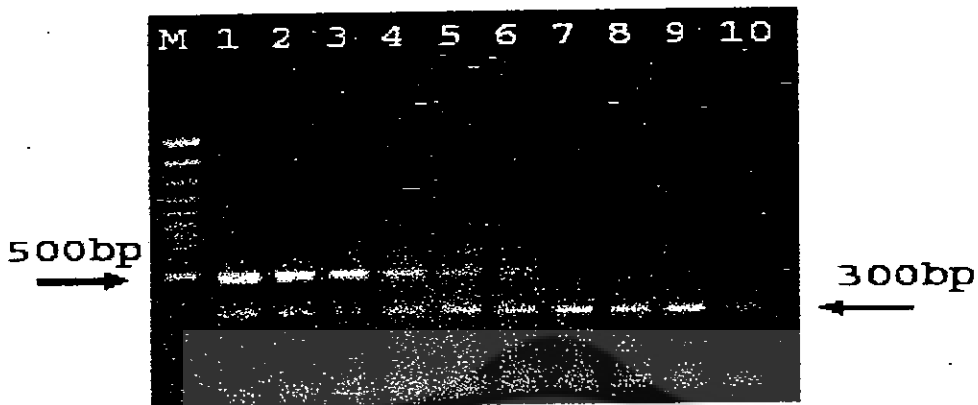
(ช่องที่ 1-8, 3A) เป็นไวรัสหัวเหลือง 1 ng ถึง 0.1 fg โดยมีไวรัสตัวแดงจุดขาวอยู่ด้วยปริมาณ 10 ng

โดยที่รูปที่ 3B เป็นการตรวจสอบด้วย Probe ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ช่องที่ 1-8 เป็นไวรัสหัวเหลือง 1 ng ถึง 0.1 fg

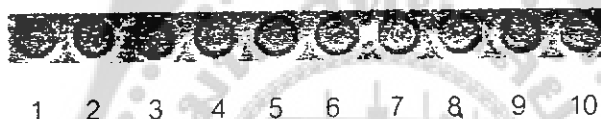
8.4 ตรวจสอบความไวของWSSVในขณะที่มีYHVร่วมด้วย

การตรวจสอบความไวของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว ซึ่งมีเชื้อไวรัสหัวเหลืองอยู่ด้วยในการตรวจสอบด้วย PCR-ELISA กล่าวคือเมื่อนำเอา DNA ของเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวมาทำการเจือจางลง 10 เท่า จากความเข้มข้น 100 ng จนถึง 0.1 fg แล้วนำเอาเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาผสมลงไป โดยมีความเข้มข้นของ cDNA ของไวรัสหัวเหลืองอยู่ที่ 100 ng ทุกหลอดทดลอง แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในหลอดทดลอง ผลปรากฏว่า DNA ของไวรัสตัวแดงจุดขาวที่น้อยที่สุดในการตรวจสอบได้ที่ 1 pg เท่าเดิม ทั้งที่มีความเข้มข้นของไวรัสหัวเหลืองอยู่ด้วยดังแสดงในรูปที่ 4

รูปที่ 4A



รูปที่ 4B



รูปที่ 4 ความไวในการตรวจสอบของ WSSV เมื่อมี YHV โดยใช้ RT-PCR ELISA แสดงความไวในการตรวจสอบของไวรัสตัวแดงจุดขาว 100 ng ถึง 0.1 fg (ช่องที่ 1-10) รูปที่ 4A โดยมีไวรัสหัวเหลืองอยู่ด้วยปริมาณ 10 ng โดยใช้ วิธีทาง PCR-ELISA โดยที่รูปที่ 4B เป็นการตรวจสอบด้วย probe ที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงจุดขาว ช่องที่ 1-10 คือ ไวรัสตัวแดงจุดขาว 100 ng ถึง 0.1 fg

9. สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง ซึ่งเป็นการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า multiplex PCR-ELISA ในการทดลองนี้ ได้ออกแบบ primer ออกเป็น 2 ชุด จากบริเวณที่เป็น conserve sequence ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยได้ออกแบบ primer สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนของยีน ORF 1b ขนาด 300 คู่เบส และเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวจากส่วนของยีนสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้ม nVP28 ขนาด 500 คู่เบส บริเวณ conserve sequence

ผลการทดลองพบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลืองโดยมีความไวในการตรวจสอบอยู่ในระดับ 10pg และ 1pg ซึ่งนับว่าเป็นระดับความไวที่ต่ำกว่าการทำ PCR ของเชื้อไวรัสชนิดเดียวประมาณ 10 เท่า การตรวจสอบโดยวิธี Multiplex RT-PCR ต้องมีการพัฒนาให้มีความไวในการตรวจสอบสูงขึ้น จึงนำเอาเทคนิค PCR-ELISA มาใช้ในการพัฒนาเพื่อให้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อได้สูงขึ้น ได้เปรียบเทียบการตรวจสอบความไวในการตรวจสอบระหว่างเทคนิคของ agarose gel electrophoresis กับวิธีการทาง ELISA ผลการทดลองเห็นว่า เชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว และหัวเหลืองมีความ

ไวในการตรวจสอบโดย ELISA สูงกว่าเทคนิค agarose gel electrophoresis อยู่ประมาณ 100 เท่า หรือประมาณ 6,000 อนุภาคในไวรัสหัวเหลือง และ 3.65×10^4 อนุภาคในไวรัสตัวแดงจุดขาว นอกจากนี้ วิธีการ multiplex PCR-ELISA ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาครั้งนี้เป็นทางเลือกใหม่ในการวินิจฉัยโรคของกุ้งไม่ว่าจะเป็นโรคไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง รวมไปถึงพาหะนำเชื้อไวรัสได้ การทำ PCR ธรรมดาเน้นการดูผลมีความจำเป็เป็นอย่างยิ่ง ที่ต้องใช้วิธีการ agarose gel electrophoresis ซึ่งต้องย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ในส่วนความไวในการตรวจสอบแล้วนั้น มีความไวในการตรวจสอบไวรัสตัวแดงจุดขาวและไวรัสหัวเหลือง ต่ำกว่า ELISA

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาเป็นการทำ multiplex PCR ELISA เพียง 1 ขั้นตอน ระหว่างไวรัสตัวแดงจุดขาวเป็น DNA ส่วนไวรัสหัวเหลืองเป็น RNA ไวรัส อีกทั้งสามารถทำการสกัดไวรัสที่เป็นทั้ง RNA และ DNA ร่วมกันภายใต้ขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยประหยัดเวลาในการตรวจสอบ สะดวกในการนำไปใช้ทั้งในห้องทดลองหรือภาคสนาม รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ รวมไปถึงลดการสูญเสียรายได้ต่อการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศ การตรวจเชื้อไวรัส Multiplex PCR ELISA เป็นเทคนิคที่ให้ความไวสูงมาก อย่างไรก็ตามหากตรวจตัวอย่างจำนวนน้อยจะทำให้ต้นทุนการตรวจสอบสูง และจะทำให้ใช้เวลาการตรวจสอบต่อตัวอย่างมาก จึงเสนอแนะให้ใช้การตรวจ Multiplex PCR ELISA กับ จำนวนตัวอย่างจำนวนมาก ๆ และที่ต้องการความไวในการตรวจสอบสูง เช่น early detection หรือในลูกกุ้ง เป็นต้น

10. ผลงานวิจัย(out put)

10.1 ประโยชน์ของผลงานวิจัย

10.1.1 เชิงพาณิชย์

ได้เริ่มมีการผลิตชุดตรวจไวรัสหัวเหลือง โดยมีบริษัทเอกชนบางแห่งได้ติดต่อและสั่งซื้อ เช่น บริษัท ชัชฉี เป็นต้น แต่เป็นเพียงระยะแรกเท่านั้น จำเป็นต้องมีการพัฒนาชุดตรวจต่อไปเพื่อจะสามารถแข่งขันได้ และยังได้มีการเจรจาอย่างไม่เป็นทางการกับ ศ.ดร. Tim Flegel ศูนย์ Centex Shrimp (Chalerm Prakit Building, faculty of Science, Mahidol University) ในการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปทำชุด Kits เพื่อจำหน่าย ซึ่งจะได้ดำเนินการยื่นคำขออนุญาตต่อไป

อยู่ในระหว่างการดำเนินการจดสิทธิบัตรชุดไพรเมอร์และบางขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อไวรัส

10.1.2 เชิงสาธารณะ

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้เปิดให้มีการบริการวิชาการซึ่งเป็นการตรวจสอบสารพันธุกรรมต่าง ๆ รวมถึงการเปิดบริการการตรวจโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ โดยเทคนิค PCR โดยให้บริการแก่บุคคลทั่วไป และ ศูนย์หรือสถาบันต่าง ๆ

10.1.3 เชิงวิชาการ

ได้รับรางวัล “นักเทคโนโลยีดีเด่น” ปี2546 กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรมผลิตกุ้งกุลาดำ จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์ (ผลงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง2)

เป็นคณะกรรมการเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง กลุ่มสุขภาพกุ้ง ศูนย์พันธุ์วิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2545 - 2546

สอนนิสิตปริญญาโท ปริญญาเอกและเป็นอาจารย์ควบคุมและสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ในสาขาอนุชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

10.2 ผลงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้อง

Wongteerasupaya C., Pungchai P., Withyachumnankul B., Panyim S.,and Vichai Boonsaeng.

High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Disease of Aquatic Organisms* .Volume 54 : April 2003, Pages 253 – 257

ศ.ดร. วิชัย บุญแสง, ศ.ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม, ศ.ดร. บุญเสริม, วิทยชำนานกุล,ศ.ดร. ทิมโมที เฟลมเกล, รศ.ดร. อัญชลี ทศนาขจร, รศ.ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และ ดร.ศิวารุท กลิ่นบุหงา

ในหนังสือรางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่น ประจำปี 2546 กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรมผลิตกุ้งกุลาดำเรื่องการใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอในการวินิจฉัยโรคและการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ หน้า 1-26

บรรณานุกรม

- Wongteerasupaya C., Pungchai P., Withyachumnarkul B., Panyim S., and Vichai Boonsaeng.**
High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates from Thailand. *Dis Aquat* 2003, 54(3) : 253-257
- Sukumsirichart W., Kiatpathomchai W., Wongteerasupaya C., Withyachumnarkul B., Flegel TW., Boongsaeng V., and Panyim S.** Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol Cell Probes*. 2002 16(6): 409-413
- Kiatpathomchai W., Boonsaeng V., Tassanakajon A., Wongteerasupaya C., Jitrapakdee S., Panyim, S.** A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Dis Aquat* 2001, 47(3):235-239
- Boongsaeng V., Tongchuea W., Kanchanaphum P., Klingputsorn R., Wongteerasupaya C., Sittidilokratana N., Jittiwatana K., Tassanakajon A., and Panyim S.** PCR-based detection of shrimp viral disease in Thailand in Molecular Diagnostics for shrimp viruses in the Asian Region (work shop II) March 2000, L8/1-5
- Hodgson R., and Wongteerasupaya C.** One tube RT-PCR for the detection of yellow-head virus (YHV) in total nucleic acid extracts in Molecular Diagnostics for shrimp viruses in the Asian Region (workshop I) February 1999, P9/1-5
- Sukumsirichart W., Wongteerasupaya C., Boongsaeng V., Panyim S., Sriurairatan S., Withyachumnarkul B., and Flegel TW.** Characterization and PCR detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aqua* 1999, 38:1-10
- Cowly, A.J., Dimmock, C.M., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S. and Walker P.J.** 1999. Yellow head virus from Thailand and gill – associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of Aquatic Organisms*. 36:153-157
- Kanchanaphum, P., Boonsaeng, V., Panyim, S., Wongteerasupaya, C., Tassanakajon, A., Withyachumnarkul, B., and Flegel, T.W.** 1998. Experimental transmission of White – spot baculovirus (WSBV) from crabs to shrimp (*penaeus monodon*) *Diseases of Aquatic Organisms*. 34:1-7

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

NOTE

High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand

Chainarong Wongteerasupaya¹, Paranee Pungchai², Boonsirm Withyachumnarnkul³,
Vichai Boonsaeng³, Sakol Panyim³, T. W. Flegel^{3,*}, Peter J. Walker⁴

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and ²Department of Biology, Faculty of Science Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Road, Bangkok 10110, Thailand

³Centex Shrimp, Chalerm Prakiat Building, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

⁴CSIRO Livestock Industries, Long Pocket Laboratory, Indooroopilly, Brisbane, Queensland 4068, Australia

ABSTRACT: White spot syndrome virus (WSSV) presently causes the most serious losses to shrimp farmers worldwide. Earlier reports of high DNA sequence homology among isolates from widely separated geographical regions suggested that a single virus was the cause. However, we have found surprisingly high variation in the number of 54 bp DNA repeats in ORF94 (GenBank AF369029) from 55 shrimp ponds (65 shrimp samples) experiencing WSSV outbreaks in Thailand in 2000 and 2002. These were detected by PCR amplification using primers ORF94-F and ORF94-R flanking the repeat region. Altogether, 12 different repeat groups were found (from 6 to 20 repeats) with 8 repeats being most frequent (about 32%). Extracts prepared from individual shrimp in the same outbreak pond belonged to the same repeat group while those collected at the same time from separate WSSV outbreak ponds, or from the same ponds at different times, usually belonged to different repeat groups. This suggested that different outbreaks were caused by different WSSV isolates. In contrast to the highly variable numbers of repeats, sequence variation within the repeat region was confined to either T or G at Position 36. These variations may be useful for epidemiological studies on the local and global movement of WSSV, since there is high variation in the number of repeats (good for local studies) but little sequence change (good for global studies).

KEY WORDS: WSSV · DNA sequence variation · Tandem DNA repeat

Resale or republication not permitted
without written consent of the publisher

High losses from white spot syndrome virus (WSSV) were first reported from cultivated shrimp ponds in China, 1993, but these subsequently spread to most major shrimp cultivation areas globally in succeeding years (Flegel 1997, Lightner 1996). It is currently the most serious viral pathogen of shrimp worldwide, with estimated losses in production amounting to several

hundred million US dollars per year in Asia alone (Flegel & Alday-Sanz 1998). Characterization of WSSV has shown that it is a tailed, rod-shaped, double-stranded DNA virus (Wongteerasupaya et al. 1995, Lightner 1996) with a very large genome in the order of 300 kb (van Hulten et al. 2001). Since the genome has no significant homology to any known virus, it has been assigned to a new viral family (*Nimaviridae*) and a new viral genus (*Whispovirus*) (van Hulten et al. 2001; www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm).

Sequence comparison of relatively small regions of the total genome have shown very little variation in widely separated geographical isolates of WSSV (Lo et al. 1999, Wang et al. 2000). This high uniformity in DNA sequences suggests that a single virus species is responsible for the worldwide outbreaks caused by WSSV and has also made it difficult to trace movements of the virus with any degree of certainty. Recent publications (Tsai et al. 2000, van Hulten et al. 2000) and deposition of full WSSV genome sequences at GenBank (AF369029 from Thailand hereinafter called WSSV-Th, AF440570 from Taiwan hereinafter called WSSV-Tw, and AF332093 from China hereinafter called WSSV-Ch) have revealed the presence of several tandemly repeated DNA sequences. For example, ORF94 in WSSV-Th (van Hulten et al. 2001) contains 6 tandem repeats of a 54 bp sequence (hereinafter called ORF94-54) as does WSSV-Tw (ORF WSSV234). By contrast WSSV-Ch (ORF WSV178) has 12 repeats. The only sequence variation within the repeat region is alternation of G or T at Position 36 of the repeat. We considered that this repeat region might be useful for comparison of WSSV from shrimp culture ponds experiencing white spot disease outbreaks. Our strategy

*Corresponding author. Email: sctwf@mahidol.ac.th

Table 1. Source, date and number of samples collected for the study

Province	Location	Date	No. of ponds
Chantaburi	SE coast, Gulf of Thailand	25 to 29 Jan 2002	6
Chacheongsao	Central Thailand near Bangkok	29 Sep to 10 Oct 2000	8
		1 to 30 Jan 2002	17
Chumporn	Mid-SW coast, Gulf of Thailand	11 to 29 Nov 2000	4
		28 Nov 2002	1
Surat Thani	Lower SW coast, Gulf of Thailand	9 and 24 Oct 2000	11
		26 Nov to 13 Dec 2002	6
Nakornsrithumarat	Lower SW coast, Gulf of Thailand	5 Sep to 13 Oct 2000	2
Total			55

was to construct PCR primers bracketing the multiple repeat region of the ribonuclease reductase gene of WSSV, to use these with template DNA extracted from a variety of WSSV-infected Thai shrimp, and to sequence any PCR products for possible variation. We found wide variation in the number of tandem repeats but little change in sequence amongst the isolates tested.

Materials and methods. Shrimp specimens: A total of 65 specimens of shrimp were collected from 55 Thai shrimp ponds experiencing outbreaks of white spot disease (WSD) over the interval October 2000 to January 2002. Pleopods from live, moribund shrimp showing gross signs of WSD were clipped with scissors cleaned in alcohol and placed directly in 95% ethanol for transport to the laboratory (volume of ethanol 10 times more than tissue placed in it). Farming areas included in the study were Chantaburi Province on the east coast of the Gulf of Thailand, Chacheongsao Province in central Thailand and Surat Thani and Chumporn provinces in the mid-south on the west coast of the Gulf of Thailand (Table 1).

Nucleic acid purification: Infected tissues were homogenized in TN buffer (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4). After centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min, DNA was isolated by treatment with Proteinase K (0.2 mg ml^{-1}) and sarkosyl (1%) at 45°C for 2 to 4 h followed by phenol-chloroform extraction (Sambrook & Russel 2001).

PCR reactions: The primers used were derived from ORF94 of WSSV as part of the total genome of WSSV (van Hulten et al. 2001) and designed to act as upstream and downstream brackets to 6 tandem repeats of a 54 bp sequence (ORF94-54). The primers were ORF94-F (5'-TCT ACT CGA GGA GGT GAC AC-3') and ORF94-R (5'-AGC AGG TGT GTA CAC TT TCA TG-3'). For the PCR, 10 ng DNA template and 30 pmol each primer were added to 50 μl reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl , 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM each dATP, dTTP, dCTP

Table 2. Number and frequency of ORF94 repeats found in PCR products from DNA extracts of 65 Thai shrimp samples taken from 55 white spot syndrome virus (WSSV) outbreak ponds

No. of repeats	Amplicon size (bp)	No. of shrimp	No. of ponds	Frequency for ponds
6	506	9	8	0.14
7	560	8	6	0.10
8	614	19	18	0.32
9	668	10	8	0.14
10	722	5	3	0.05
11	776	1	1	0.02
12	830	4	4	0.07
13		—	—	—
14	938	2	2	0.04
15	992	1	1	0.02
16		—	—	—
17	1100	2	2	0.04
18		—	—	—
19	1208	3	1	0.02
20	1262	1	1	0.02
Total		65	55	—

and dGTP, 2.5 U TaqDNA polymerase Gibco-BRL (Life Technologies). The mixture was incubated in a thermal cycler using 35 cycles of 94°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final elongation step at 72°C for 10 min. The PCR products were resolved by 1.2% agarose gel electrophoresis (Nusieve 3:1) at 5 V cm^{-1} .

Sequence analysis: PCR amplicons were purified from agarose gels using a QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) and were sequenced using Thermo Sequence™ (Amersham) and an Automated ABI model 377 Sequencing system (Applied Biosystem). Sequence alignment and estimation of sequence identity were conducted using Clustal W software.

Results and discussion. A preliminary test of 3 shrimp each from 4 outbreak ponds (not shown) indicated that multiple shrimp specimens from the same pond would give the same result for ORF94 repeat group, although larger samples would be needed to

Table 3. Pattern of ORF94 repeat groups for WSSV outbreak ponds sampled in 2000 and 2002

No of repeats	2000				2002				Total
	Surat Thani	Chum-porn	Chat-cheongsao	Nakorn-srithamarat	Surat Thani	Chum-porn	Chat-cheongsao	Chanta-buri	
6	4	1					3		8
7		1			1		4		6
8	2	1	8		2		5		18
9	5	1				1	1		8
10				2			1		3
11								1	1
12					1		2	1	4
14								2	2
15							1		1
17					1			1	2
19			5*		1				1
20					1				1
Total	11	4	8	2	6	1	17	6	55

*In agarose gels, the band for 19 repeats was faint (except for 1 sample) and additional to the stronger band for 8 repeats. Two amplicons possibly indicated simultaneous infection by 2 different WSSV types

test this assumption rigorously. Based on this test, we assumed that each pond outbreak was caused by a single WSSV type, and only 1 to 3 individual shrimp were tested from each pond. The DNA extracts from 65 samples of WSSV-infected shrimp from 55 ponds gave a variety of amplicons using the primers ORF94-F and ORF94-R (Table 2), suggesting differences in the number of repeats from pond to pond. An example gel for fragments representing 6 to 11 repeats is shown in Fig. 1. The most frequently encountered number of ORF94-54 repeats was 8, but the range was 6 to 20. The GenBank records for WSSV-Th and WSSV-Tw (6 repeats) and WSSV-Ch (12 repeats) fell within this range. For the sake of explanation, we numbered these repeats regions ORF94-1 to ORF94-20, realizing that there were no ORF94-13, -16 and -18 repeats.

When comparing the number of ORF94 repeats found in samples from various shrimp farming areas (Table 3), there was no particular pattern, except in 2000 for Chacheongsao, where ORF94-8 dominated and Surat Thani, where ORF94-9 dominated. Also, the Chacheongsao samples gave 2 PCR amplicons, a strong one for ORF94-8 and a lighter one for ORF94-1, possibly indicating infections with 2 strains of WSSV. Alternatively, it could have been a non-specific amplification product, although that would appear to be unlikely considering that 2 amplicons occurred in only 5 of the 8 shrimp tested (i.e. not all) and that double amplicons occurred only in this sample. However, PCR product sequencing would be necessary to resolve this issue. In addition to differences in repeat pattern between ponds and areas, the pattern of repeats for Chacheongsao in 2000 and 2002 also varied (Table 3).

Sequencing several of the fragments confirmed the presence of the 54 bp tandem repeat identical to that in WSSV-Th, WSSV-Tw and WSSV-Ch at GenBank, including variation in an alternate T or G at Position 36 (Table 4). In the initial repeat (ORF94-1), T at Position 36 was invariant in all the sequenced fragments and in WSSV-Th, WSSV-Tw and WSSV-Ch. T was also invariant for ORF94-2, except for G found in WSSV-Th (Table 4). Discounting ORF94-1 and ORF94-2, where T was overwhelmingly dominant, the number of T (24) and G (22) was almost equal for the remaining repeats, although distribution amongst the repeats varied (Table 4).

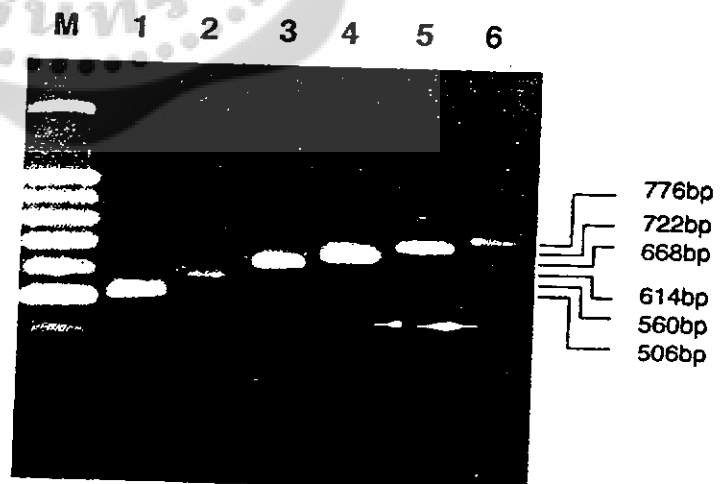


Fig. 1. Example agarose gel showing PCR amplification products for 6 (Lane 1) to 11 (Lane 6) ORF94 repeats

Table 4. Summary of substitutions found at Position 36 in sequenced ORF94 tandem repeat regions of selected amplicons from Thai shrimp samples from Surat Thani (Surat) and Chumphon (Chum), compared to GenBank references for white spot syndrome virus (WSSV) in Taiwan, China and Thailand (WSSV-Tw, -Ch and -Th) with 6 and 12 ORF94 repeats

Isolate	ORF94 repeat number											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Surat #1	T	T	T	T	G	T	T	G	T			
WSSV-Tw	T	T	T	G	T	T						
Chum #2	T	T	T	G	T	G	T					
Chum #4	T	T	T	G	G	G						
Surat #2	T	T	G	T	T	G	G	T				
Chum #3	T	T	G	T	T	G	G	T				
WSSV-Ch	T	T	G	G	G	G	G	G	T	T	T	T
WSSV-Th	T	G	G	G	T	T						

Only 2 of the sequenced PCR products had identical numbers of repeats and identical sequences. These were Surat #2 and Chum #3, both with 8 repeats and derived from outbreak ponds in the interval October to November of 2000 (Table 4). The result suggested that these outbreaks were caused by the same type of WSSV, even though they were separated by several hundred kilometers. This being the case, it is unlikely that the ponds became infected by cross contamination. On the other hand, these 2 provinces are adjacent to each other and it is possible that the owners obtained post-larvae (PL) for stocking the ponds from the same source. Indeed, it is considered that WSSV infected PL are the main cause of WSD outbreaks in Thailand (Withyachumnarnkul 1999). A similar argument might apply to the Chacheongsao 2000 samples that also gave identical results with PCR products for ORF94 repeats of 8 and 19. By contrast, repeat groups from Chacheongsao in 2002 mostly differed from pond to pond, and also differed from those in 2000. Similarly, samples from Chum #2, 3 and 4 collected at the same time in 2000 were all dissimilar in number of repeats and base pattern for Position 36. Perhaps these ponds used PL from different sources.

Other than Surat #2 and Chum #3, the variants in Table 4 show no obvious relationships. It is particularly interesting that WSSV-Th that originated from Thailand in 1996 (van Hulten et al. 2002) is markedly different from Chum #4 (also 6 repeats) and all the Thai isolates we sequenced from 2000 and 2002. Perhaps this was because we sequenced only 1 isolate with ORF94 repeats. Alternatively, it may indicate that changes have occurred in WSSV over time.

Obviously, the number of samples employed in this study was too small and taken at too intermittent intervals to make firm conclusions. However, they do show that the ORF94 repeat region has potential for use in epidemiological work with WSSV and may help in tracing its origin and spread. For example, it would be possible to use the method described herein to exam-

ine captured broodstock to determine the prevalence of various WSSV types and to compare this with the prevalence of the types found in outbreak ponds. It would also be useful, if possible, to trace the sources of PL for the various ORF94 groups associated with outbreaks. This is generally not possible in Thailand due to fragmentation in the shrimp industry (i.e. unrelated broodstock suppliers, nauplius producers, PL producers and farmers), but it may be possible elsewhere or with a large integrated shrimp operation.

ORF94 lies together with other ORF of unknown function between genes for the large subunit (ORF92) and small subunit (ORF98) of WSSV ribonucleotide reductase (RR). In WSSV-Th, -Tw and -Ch, the open reading frames for ORF94 are maintained in the multiple repeats with the stop codon falling exactly at the end of the last repeat. There is no sequence variation amongst the 3 except for Position 36 of the repeat that leads to an alternate aspartic acid (D) or glutamic acid (E) in the putative protein sequences. The large variation in tandem repeats leads one to question whether ORF94 could produce a functional protein. Perhaps its function (if any) is related to DNA transcription or conformation. Given that all of the samples studied came from WSD outbreak ponds and showed variable ORF94 repeat length, it is not immediately obvious whether repeat length might be useful in identifying virulent strains of WSSV. However, the possibility should be explored.

Acknowledgements. The authors would like to thank the Thailand Research Fund, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology and the Australian Centre for International Agricultural Research for support to carry out this work.

LITERATURE CITED

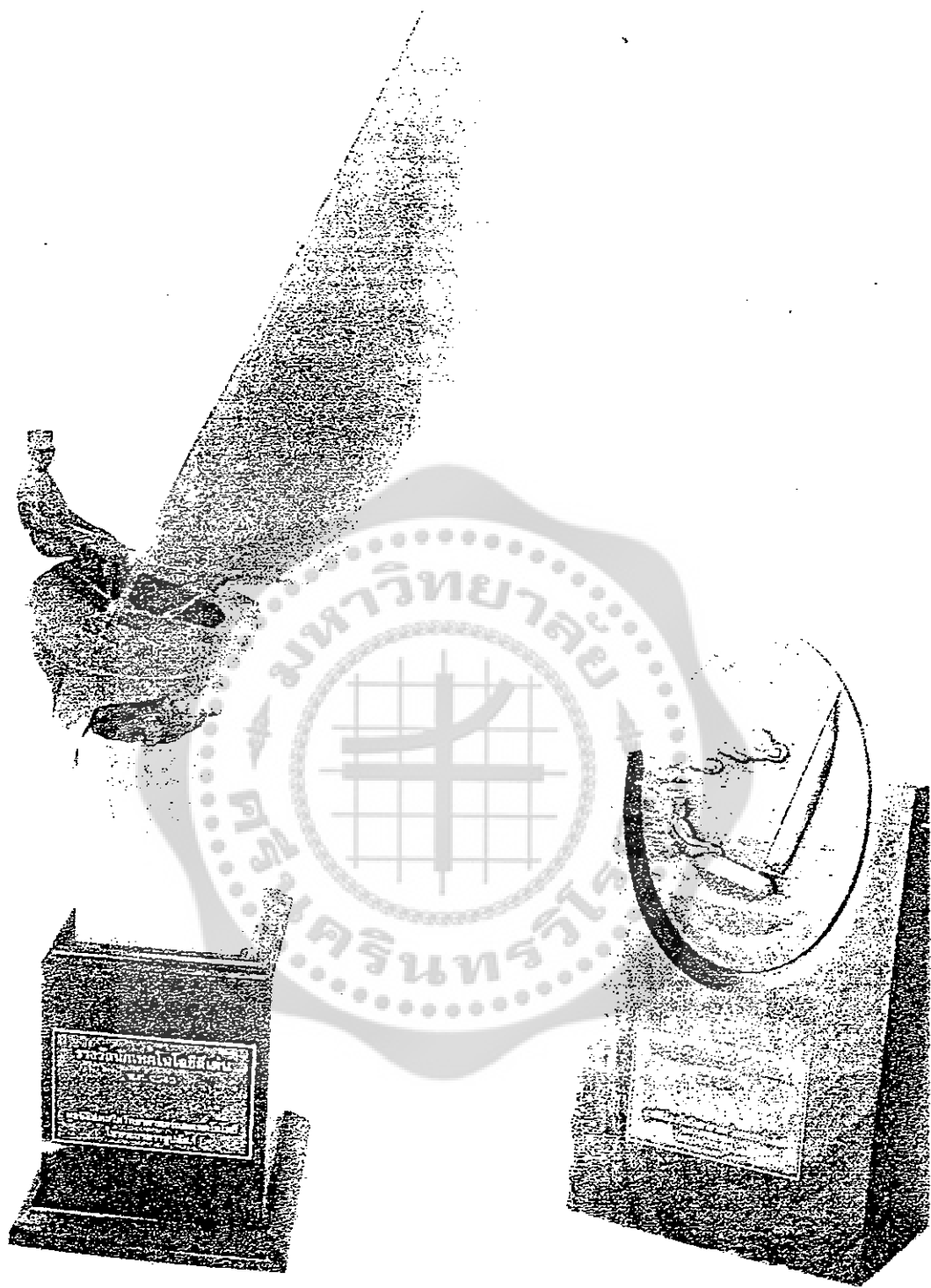
- Flegel TW (1997) Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol 13:433-442
Flegel T, Alday-Sanz V (1998) The crisis in Asian shrimp

- aquaculture: current status and future needs. *J Appl Ichthyol* 14:269-273
- Lightner DV (1996) A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, Lightner DV (1999) Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 35:175-185
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, Tzeng HF and 6 others (2000) Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277:92-9
- van Hulten MC, Tsai MF, Schipper CA, Lo CF, Kou GH, Vlak JM (2000) Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol* 81: 307-16
- van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N and 5 others (2001) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7-22
- van Hulten MC, Reijns M, Vermeesch AM, Zandbergen F, Vlak JM (2002) Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J Gen Virol* 83: 257-65
- Wang Q, Nunan LM, Lightner DV (2000) Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Dis Aquat Org* 43:175-81
- Withyachumnarnkul B (1999) Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Org* 39:21-27
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL and 6 others (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in the cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69-77

Editorial responsibility: Carey Cunningham,
Aberdeen, Scotland, UK

Submitted: August 21, 2002; Accepted: December 19, 2002
Proofs received from author(s): March 20, 2003





มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์
 Foundation for the Promotion of Science and Technology under the Patronage of His Majesty the King
 รางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่นและรางวัลนักเทคโนโลยีรุ่นใหม่ สนับสนุนโดย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
 มูลนิธิ เป็นองค์กรหรือสถานสาธารณกุศล ลำดับที่ 481 ของประกาศกระทรวงการคลังฯ

รางวัลเกียรติยศที่กลุ่มผู้วิจัยได้รับ

ศาสตราจารย์ ดร. วิชัย บุญแสง

1. รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง การสร้างและประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคน จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. รางวัลผลงานการประดิษฐ์คิดค้นประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง ชุดตรวจสอบหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลกึ่งกุลาทองเกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2541 จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดสุราษฎร์ธานี
4. รางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2543 จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. รางวัลวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มุลนิธิโทเร ประเทศไทย ประเภททีมวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2543
6. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโคโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

ศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่นแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2528 จากสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
2. รางวัลผลงานการประดิษฐ์คิดค้นประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง ชุดตรวจสอบหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลผลงานวิจัยเกียรติยศ สกว. ประจำปี พ.ศ. 2542
4. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโคโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

ศาสตราจารย์ ดร. บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล

1. รางวัลกึ่งกุลาทองเกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2540 จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดสุราษฎร์ธานี
2. รางวัลผลงานการประดิษฐ์คิดค้นประจำปี พ.ศ. 2540 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มูลนิธิโทเร ประเทศไทย ประเภททีมวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2543

ศาสตราจารย์ ดร. ทิมโมที เฟลเกล

1. รางวัลอาโยโนะโมโตะ ประจำปี พ.ศ. 2540
2. รางวัลกึ่งกุลาทองเกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2542 จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดสุราษฎร์ธานี

3. รางวัลวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มุลนิธิโทร ประเทศไทย ประเภททีมวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2543

รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทศนาขจร

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ ประจำปี 2537 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่ง ประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
2. รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น (ผู้ร่วมวิจัย) สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง การสร้างและประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคน จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. รางวัลทะกุกิ ประเภทนักวิจัยดีเด่น ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปี พ.ศ. 2543 จากมูลนิธิทะกุกิ และสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย
4. รางวัลชมเชยผลงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2544 เรื่อง การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายและการศึกษาพันธุกรรมในกิ้งกูดดำ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโคโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

1. รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น (ผู้ร่วมวิจัย) สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประจำปี พ.ศ. 2539 เรื่อง การสร้างและประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคน จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. รางวัลการเสนอผลงานวิจัยดีเด่นหลังปริญญาเอก จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี พ.ศ. 2544
3. รางวัล TTF AWARD ด้านวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และมูลนิธิโคโยต้า ประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2544-2545

ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ ประจำปี 2543 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่ง ประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
2. รางวัลชมเชยผลงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2544 เรื่อง การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายและการศึกษาพันธุกรรมในกิ้งกูดดำ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

การใช้เทคโนโลยีเอ็นเอในการวินิจฉัยโรค และการพัฒนาสายพันธุ์กึ่งกลาดำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาดำนับว่ามีศักยภาพมากกว่าอุตสาหกรรมทางการเกษตรอื่นๆ ทั้งหมด โดยจะเห็นได้จากช่วงสามทศวรรษที่ผ่านมา อัตราการเจริญเติบโตของการเลี้ยงกึ่งกลาดำในประเทศไทยได้มีการขยายตัวมาโดยตลอด การส่งออกกึ่งกลาดำของประเทศไทยนับเป็นอันดับหนึ่งของโลก คิดเป็นมูลค่ากว่า 110,000 ล้านบาท ในปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2544) และยังก่อให้เกิดการจ้างแรงงานมากกว่า 150,000 คน อย่างไรก็ตามใช้ว่าอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกลาดำในปีต่างๆที่ผ่านมาจะเป็นไปด้วยความราบรื่น ในช่วงปี พ.ศ. 2536 เป็นต้นมาได้เกิดโรคระบาดของเชื้อไวรัส ซึ่งทำให้กึ่งตายเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเกษตรกรไม่สามารถตั้งตัวรับมือ หรือหาทางป้องกันและแก้ไขได้ทันทั่วทั้ง จากการศึกษาพบว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสสามารถเกิดได้ในกึ่งทุกระดับอายุ ถ้าเป็นการติดเชื้อในระดับกึ่งอนุบาลหรือที่เรียกกันติดปากในหมู่นักเลี้ยงกึ่งว่า กึ่งพี จะก่อความเสียหายไม่มากนักเนื่องจากใช้วัตถุดิบเช่นอาหาร ในปริมาณที่น้อย แต่หากเป็นการติดเชื้อที่เกิดกับกึ่งที่ใกล้ได้เวลาเก็บแล้วนับว่าเป็นการเสียหายอย่างมาก เพราะเท่ากับว่าเกษตรกรต้องเสียเวลาและวัตถุดิบต่างๆ ในการเลี้ยงกึ่ง ยิ่งในภาวะปัจจุบันพบว่าต่างชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่มีการเลี้ยงกึ่งได้เองอย่างออสเตรเลียหรือประเทศในแถบยุโรป จะจำกัดการนำเข้ากึ่งที่มีการติดเชื้อไวรัส เนื่องจากกลัวว่ากึ่งเหล่านั้นจะเป็นตัวนำเชื้อไวรัสเข้าประเทศ ดังนั้นการศึกษาในระดับยีนของเชื้อจุลชีพเหล่านี้สามารถนำไปสู่ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอย่างหนึ่งที่เรียกว่าเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งจะขอกล่าวรายละเอียดในลำดับต่อไป

เทคนิคพีซีอาร์เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัส

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบวงจรในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการให้เป็นล้านๆ เท่าภายในระยะเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวในการตรวจสูง โดยเทคนิคพีซีอาร์นี้สามารถใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียในกรณีที่มีไวรัสหรือแบคทีเรียปริมาณน้อยๆ ในขณะที่กึ่งยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งเท่ากับเป็นการเพิ่มทางเลือกให้กับ

เกษตรกรอีกทางหนึ่งในการป้องกันโรคนอกเหนือไปจากการจัดการบ่อที่ดีและถูกต้อง เทคนิคพีซีอาร์ช่วยให้เกษตรกรสามารถคัดเลือกลูกกุ้งหรือพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรคไปเพาะเลี้ยงหรือขยายพันธุ์ เพื่อหยุดยั้งปัญหาหรือช่วยในการป้องกันโรคระบาดเหล่านี้ให้เร็วที่สุดได้ก่อนนำลูกกุ้งลงบ่อ หรือก่อนนำพ่อแม่พันธุ์แม่พันธุ์ไปขยายพันธุ์ ทำให้ลดความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งได้มากกว่าการไม่รู้อะไรเลย ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งมีอยู่ด้วยกันหลายตัว เช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัส HPV เป็นต้น

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการแพร่ระบาดไปทั่วภูมิภาคเอเชีย ไม่ว่าจะเป็นอินเดีย อินโดนีเซีย จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น รวมทั้งประเทศในแถบอเมริกาใต้ สำหรับประเทศไทยนั้นโรคนี้ได้แพร่ระบาดอย่างมากในทั่วพื้นที่ชายฝั่งทะเลรอบอ่าวไทย ชายฝั่งทะเลอันดามัน และบางพื้นที่ทางด้านตะวันออกของประเทศ โดยไวรัสชนิดนี้จะทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว ลำตัวของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีสีค่อนข้างแดงและมีดวงขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม. ติดอยู่บริเวณเปลือกหุ้มส่วนหัวของกุ้ง (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นที่มาของชื่อไวรัสตัวแดงดวงขาวนั่นเอง

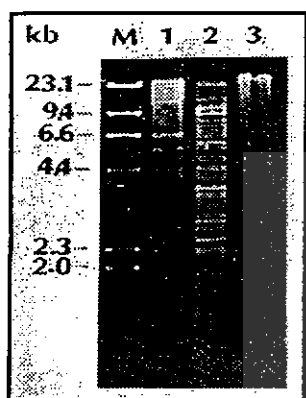


รูปที่ 1 กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาวก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ไวรัสชนิดนี้ทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว โดยมีสารพันธุกรรมเป็น DNA เส้นคู่ (รูปที่ 2)

ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (รูปที่ 3) เพราะเป็นเทคโนโลยีที่บุคลากรในห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถนำไปปฏิบัติได้ง่ายและรวดเร็ว การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว เริ่มจากการศึกษาลำดับเบสของเชื้อไวรัส เพื่อทำ

การออกแบบไพรเมอร์ (ตัวเริ่มต้น) ที่จำเพาะต่อไวรัส เมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 232 คู่เบส (bp) โดยผลการตรวจเชื้อไวรัสสามารถดูได้จากการนำผลผลิตดังกล่าวไปแยกบนแผ่นวุ้นอะกาโรส และย้อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต



รูปที่ 2 ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวแยกโดย

agarose gel electrophoresis

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ช่องที่ 1 = ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกตัดด้วย

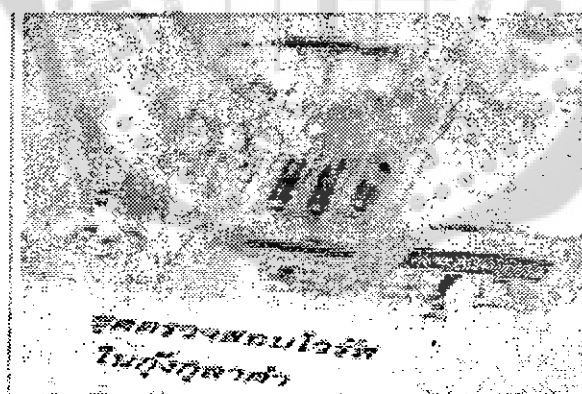
เอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI

ช่องที่ 2 = ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI

ช่องที่ 3 = ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ไม่ถูกตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ



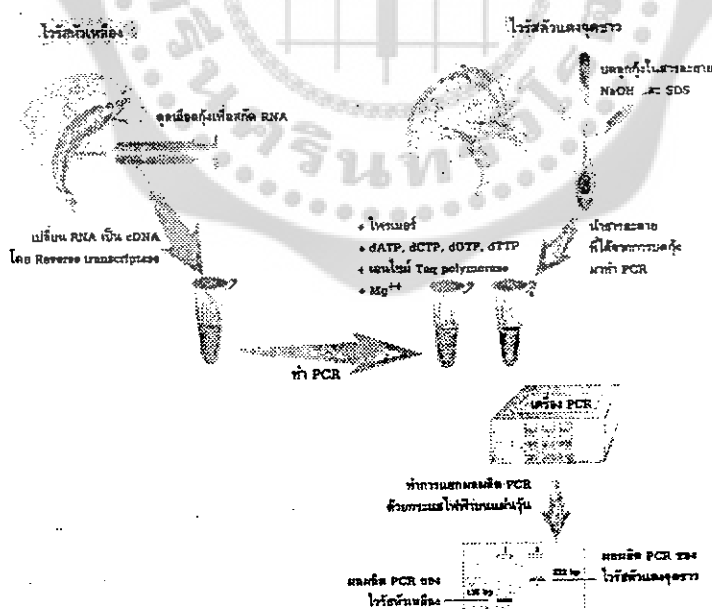
รูปที่ 3 ชุดตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ่งกุหลาบโดยวิธีพีซีอาร์

จากการศึกษาสารพันธุกรรมของไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ ขั้นตอนการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีพีซีอาร์ (รูปที่ 4) เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกิ่ง ถ้าเป็นลูกกิ่งจะใช้ลูกกิ่งทั้งกิ่งจำนวน 10-20 ตัว แต่ถ้าเป็นกิ่งขนาดใหญ่สามารถใช้น้ำย่น้ำเพียง 1 ขา นำมาบดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) แล้วนำไปต้มในน้ำ

เคือคนาน 5 นาที นำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งสักครู่ แล้วนำสารละลายเฉพาะส่วนใสมาทำพีซีอาร์ โดยเติมน้ำยาที่มีส่วนผสมของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส และสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยา เช่น คีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นต้น หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยอาศัยการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ ซึ่งการทำงานในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมโดยอุณหภูมิต่างๆ กันคือ

1. ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ถูกแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ที่อุณหภูมิ $90^{\circ}C$
2. ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจับกับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อุณหภูมิ $60^{\circ}C$
3. เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลายด้านหนึ่งของไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ $72^{\circ}C$

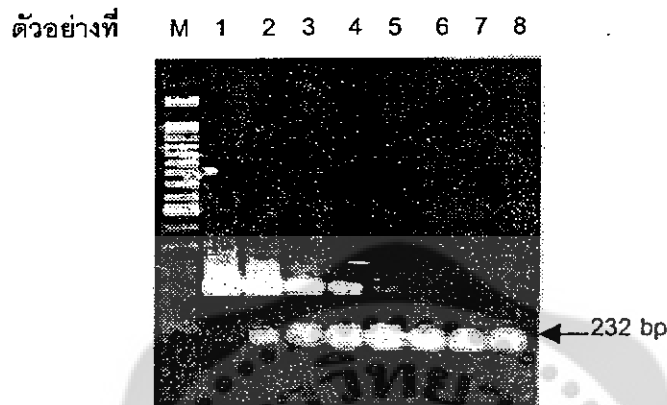
การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนข้างต้นจำนวน 35 รอบ จึงทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ หรือชิ้นส่วน ดีเอ็นเอขนาด 232 คู่เบส เพิ่มขึ้นเป็น 2^{35} โมเลกุล หรือ ประมาณ 3 หมื่นล้านเท่าของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งอธิบายว่าทำไมเทคนิคดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อไวรัสได้ ถึงแม้ว่าจะเป็นเพียงการติดเชื้อในวันแรกๆ ซึ่งมีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่น้อยมากก็ตาม



รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการตรวจโรคไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์

หลังจากปฏิกิริยาถูกใช้โพลิเมอเรสเสร็จสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกบน

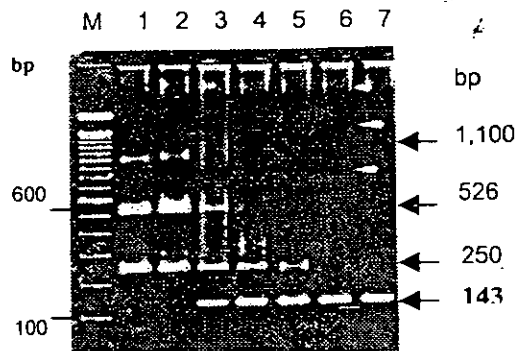
วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 - 2 % ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 10 โวลต์/ซม. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที จึงนำแผ่นวุ้นมาข้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปบันทึกผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ โดยถาดตัวอย่างใดให้แถบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 232 คู่เบส แสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 232 คู่เบส ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอของไวรัสตัวแดงดวงขาว จากภาพแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 แต่ไม่มีการติดเชื้อในตัวอย่างที่ 6, 7, 8 และ M = เครื่องหมายแสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน

นอกจากนี้การตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำด้วยวิธีพีซีอาร์ยังได้ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพื่อให้สามารถบอกความรุนแรงของการติดเชื้อได้ โดยดูจากจำนวนแถบของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นบนแผ่นวุ้น อะกาโรส ถ้าพบ 3 แถบ (1,100 คู่เบส, 526 คู่เบส และ 250 คู่เบส) แสดงว่ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรง ถ้ามี 2 แถบ (526 คู่เบส และ 250 คู่เบส) แสดงว่ามีการติดเชื้อปานกลาง และถ้ามีการติดเชื้อน้อยมากจะพบแถบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 แถบ (250 คู่เบส) เท่านั้น (รูปที่)

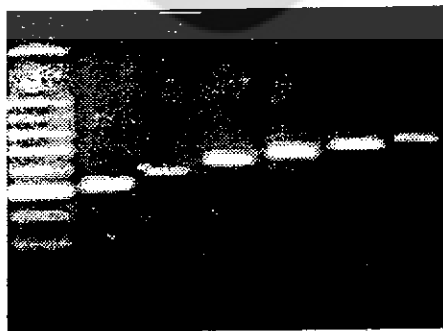
การศึกษายีนโนมของไวรัสและการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์นั้น นอกจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบคุณภาพลูกกุ้ง และพ่อ-แม่พันธุ์แล้ว เทคนิคพีซีอาร์ยังสามารถนำไปใช้ตรวจหาพาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้อีกด้วย พบว่าปูหลายชนิด เช่น ปูแสม ปูทะเล และปูเปี้ยว ที่พบบริเวณฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ล้วนแล้วแต่เป็นพาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้งสิ้น ความรู้ที่ได้นี้จึงเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งที่ต้องทำการกำจัดปูเหล่านี้ออกจากบ่อเลี้ยงก่อนนำลูกกุ้งลงบ่อ



รูปที่ 6 การตรวจความรุนแรงในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยสังเกตจากจำนวนแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้น จากภาพแสดงว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 มีการติดเชื้อไวรัสมากกว่าตัวอย่างที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แต่ตัวอย่างที่ 6 และ 7 ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเลย (แถบดีเอ็นเอขนาด 143 คู่เบสที่เห็นในช่องที่ 3-7 เป็นแถบดีเอ็นเอที่จะพบเมื่อดีเอ็นเอของไวรัสมีปริมาณน้อยหรือไม่มีเลย)

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังประสบความสำเร็จในการศึกษาความแปรผันของยีนในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวในส่วน ORF94 (GenBank AF369029) พบเบสซ้ำ (Variable number of tandem repeats) โดยพบเบสที่เป็นแกน (core) 54 เบส (รูปที่ 7) ซึ่งคาดว่าจะยังประโยชน์ในเชิงระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสนี้

M 1 2 3 4 5 6



รูปที่ 7 การตรวจสอบความแปรผันของยีนในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาว

ช่อง 1-6 = ความแตกต่างของดีเอ็นเอ ORF94 ในส่วนของในเชื้อไวรัสตัวแดงจุดขาวที่เตรียมจากที่ต่างๆ โดยมีจำนวนเบสซ้ำ 6-11 ครั้งตามลำดับ

ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus ; YHV)

โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำเป็น โรคร้ายแรงและเกิดการระบาดอย่างมากเช่นเดียวกับโรคตัวแดงจุดขาว โรคนี้เกิดขึ้นในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อกลางปี พ.ศ. 2534 ที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในแถบจังหวัดสมุทรสาครและสมุทรสงคราม ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก และได้มีระบาดอย่างรุนแรงอีกครั้งเมื่อปลายปี พ.ศ. 2540 จนกระทั่งบางพื้นที่ เช่น สมุทรสาครและสมุทรสงคราม ไม่สามารถทำการเลี้ยงกุ้งได้อีกต่อไป ต่อมาโรคนี้ยังได้ระบาดสร้างความเสียหายต่อไปยังจังหวัดในภาคตะวันออกอีกด้วย เช่น ฉะเชิงเทรา จันทบุรี และจังหวัดทางภาคใต้ เช่น นครศรีธรรมราช

กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองนั้นจะสังเกตเห็นได้ว่าหัวของกุ้งจะมีสีเหลืองอ่อนแตกต่างจากกุ้งปกติอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งบางครั้งเหงือกจะกลายเป็นสีเหลืองด้วย(รูปที่ 8) กุ้งจะกินอาหารน้อยลงจนกระทั่งตายภายในเวลาเพียง 2-3 วัน ฟาร์มที่ประสบกับโรคนี้จะเห็นได้ในวันแรกว่า กุ้งจะว่ายอยู่ที่ผิวน้ำและมีการตายให้เห็นบางเป็นประปราย แต่ต่อมาจำนวนกุ้งที่ตายจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด จนกระทั่งตายหมดบ่อในวันต่อมา



รูปที่ 8 ลักษณะกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะพบหัวหรือในบางครั้งอาจบริเวณเหงือกของกุ้งมีสีเหลืองอ่อนแตกต่างจากกุ้งปกติอย่างเห็นได้ชัด

ไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างเป็นแท่งขนาด 160–186x38–50 nm. ในระยะแรกมีรายงานว่า

ไวรัสหัวเหลืองมีสารพันธุกรรมเป็น DNA แต่หลังจากการวิจัยอย่างละเอียดจากคณะผู้วิจัยในกลุ่มได้พบว่าสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็น RNA

จากการศึกษาในระดับยีนของไวรัสหัวเหลือง พบว่ามีสารพันธุกรรมเป็น RNA ดังนั้นวิธีการตรวจไวรัสหัวเหลืองจะแตกต่างจากการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวเล็กน้อย กล่าวคือ จะต้องเพิ่มขั้นตอนการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เสียก่อนแล้วจึงจะทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามปกติ วิธีนี้เรียกว่าวิธี RT-PCR (Reverse transcription-PCR) การพัฒนาเทคนิค RT-PCR ในการตรวจไวรัส เริ่มจากการศึกษาลำดับเบสของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ (ตัวเริ่มต้น) ที่จำเพาะต่อไวรัส โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับไวรัสหัวเหลืองจะให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 135 คู่เบส (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลผลิต RT-PCR ขนาด 135 คู่เบส จาก RNA ของไวรัสหัวเหลือง จากภาพแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 แต่ไม่มีการติดเชื้อในตัวอย่างที่ 6, 7 และ 8

กระบวนการตรวจไวรัสหัวเหลืองโดยเทคนิค RT-PCR เริ่มจากการสกัด RNA

จากตัวอย่างเลือด (haemolymph) หรือเหงือกกุ้งด้วยสารละลาย Trizol นำ RNA ที่สกัดได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงทำการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 135 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 40 รอบ โดยอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนจะเหมือนกับการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่มีความแตกต่างของอุณหภูมิของการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเส้นเดียวในขั้นตอนที่ 2 โดยของไวรัสหัวเหลืองจะเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 52 °C แทน

นอกจากไวรัสหัวเหลืองแล้วยังมีรายงานการพบไวรัสอีกชนิดหนึ่งในประเทศออสเตรเลียที่มีลักษณะคล้ายไวรัสหัวเหลืองมากชื่อ GAV (gill-associated virus) ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำในประเทศออสเตรเลีย แต่กุ้งที่ติดเชื้อ GAV จะมีความรุนแรงของโรคน้อยกว่า และเมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาก คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการตรวจแยกเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดโดยวิธี Multiplex RT-PCR (รูปที่ 10)



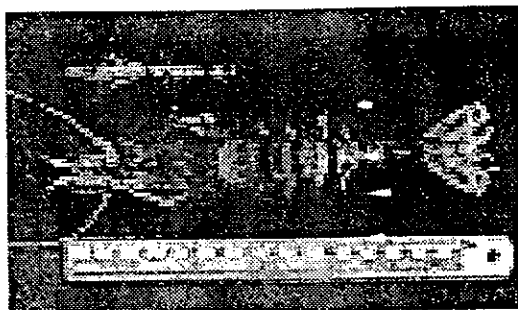
รูปที่ 10 Multiplex RT-PCR ระหว่างเชื้อไวรัสหัวเหลือง(YHV)และไวรัสGAV

ผลผลิตPCRขนาด 277bp จำเพาะกับYHV และผลผลิตPCRขนาด 406 bpจำเพาะต่อGAV

นอกจากไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลืองแล้ว ยังมีเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ อีก ที่แม้ว่าจะไม่ก่อให้เกิดการตายอย่างรุนแรง แต่ก็ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งได้เช่นกัน การศึกษาใหม่ของไวรัสเหล่านี้จึงมีความจำเป็นเช่นเดียวกับการศึกษาใหม่ของไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง

ไวรัส HPV (Hepatopancreatic Parvo Virus)

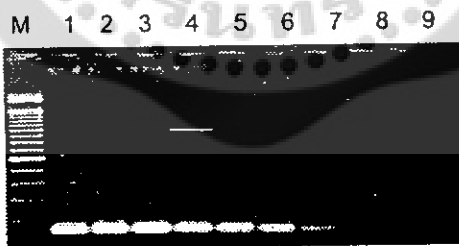
เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA จากการศึกษพบว่าไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดโรคในกุ้งหลายชนิด และมีการติดต่อผ่านจากแม่กุ้งเข้าสู่ลูกกุ้งโดยเชื้อไวรัสสามารถผ่านเข้าไปในไข่กุ้ง ซึ่งถือว่าการติดต่อโรคในแนวตั้ง (vertical transmission) เชื้อไวรัส HPV จะทำให้กุ้งอ่อนแอ เนื่องจากยับยั้งทำหน้าที่สร้างน้ำย่อย และดูดซึมอาหาร ทำงานไม่เต็มที่ ส่งผลให้กุ้งจะมีสีค่อนข้างซีดและขนาดเล็กลง การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อย่างรุนแรงอาจมีผลทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือแคระแกร็น (รูปที่ 11)



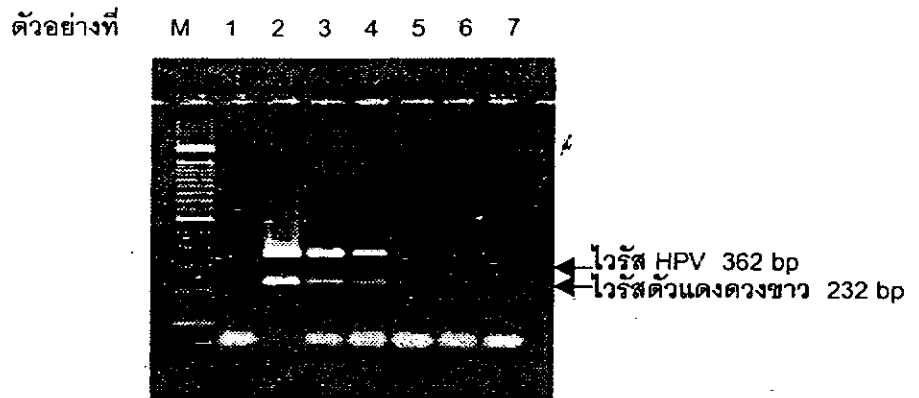
รูปที่ 11 ลักษณะกึ่งติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อย่างรุนแรงจะมีผลทำให้กึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือแคะแกร็น

ไวรัส HPV มีรูปร่าง icosahedral เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กมาก (ประมาณ 24 nm.) มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ขนาด 6 kb HPV ติดเชื้อเฉพาะบริเวณคervix ของผู้หญิง การวินิจฉัยจากลักษณะพยาธิสภาพทำได้ยากเพราะไม่พบลักษณะเฉพาะตัวของการติดเชื้อ

คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไพรมเมอร์ที่ออกแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส (รูปที่ 12) นอกจากนี้ยังได้พัฒนาให้มีการตรวจเชื้อไวรัส HPV และไวรัสตัวแหว่งดวงขาวได้พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยเรียกวิธีนี้ว่า เทคนิค multiplex PCR (รูปที่ 13) ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายด้วย



รูปที่ 12 ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากการขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 156 คู่เบสจากภาพแสดงการติดเชื้อ HPV ในตัวอย่างที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7



รูปที่ 13 Multiplex PCR สำหรับการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัส HPV พร้อมกัน ถ้าพบผลผลิตพีซีอาร์บนแผ่นวุ้นทั้งสองแถบ (ตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4) แสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัส HPV ถ้าพบเพียง 1 แถบ ขนาด 362 คู่เบส (ตัวอย่างที่ 5) แสดงว่าติดเชื้อไวรัส HPV

ไวรัส MBV (Monodon Baculovirus)

ไวรัส MBV ถูกพบครั้งแรกในประเทศไต้หวันเมื่อ พ.ศ. 2533 และปัจจุบันพบไวรัสชนิดนี้ได้ทั่วไปในฟาร์มกุ้งของประเทศไทย ไวรัส MBV ไม่ทำให้กุ้งตายอย่างเฉียบพลันเหมือนกับไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง แต่มีรายงานว่ากุ้งมีอัตราการกินอาหาร และการเจริญเติบโตลดลงเช่นเดียวกับไวรัส HPV กุ้งที่ติดเชื้อจะพบไวรัส MBV จำนวนมากที่บริเวณตับ ไวรัสนี้มีการติดต่อในลักษณะของการติดต่อโรคโดยการปนเปื้อน โดยเชื้อไวรัสจะปนเปื้อนมากับขี้ของแม่กุ้ง และติดต่อไปยังลูกกุ้งอีกต่อหนึ่ง

จากการศึกษาอีโนมของไวรัส MBV พบว่ามีสารพันธุกรรมเป็น DNA ในตระกูล baculovirus ปัจจุบันกลุ่มนักวิจัยชาวออสเตรเลีย ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ MBV ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อตรวจลูกกุ้งก่อนนำไปเลี้ยงในบ่อ

ไวรัส IHNV (Infectious Hypodermal and Hepatopoietic Necrosis Virus)

โรคเจริญเติบโตช้าในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* และ *Penaeus stylirostris* ที่เลี้ยงกันในแถบอเมริกากลาง เช่น ประเทศเอกวาดอร์ ถูกพบว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดหนึ่ง ชื่อว่า Infectious Hypodermal and Hepatopoietic Necrosis Virus หรือ IHNV ไวรัสจะทำให้เกิดการทำลายของ

เซลล์ผิวหนัง เซลล์เม็ดเลือด และทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ที่เรียกว่า runt-deformity syndrome จากการศึกษาในระดับยีนของกลุ่มนักวิจัยชาวอเมริกันพบว่า เชื้อไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ซึ่งผลของการวิจัยทำให้มีการพัฒนาได้เป็นชุดตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคพีซีอาร์เช่นเดียวกับไวรัสชนิดอื่นๆ

Taura syndrome virus (TSV)

ไวรัสนี้ถูกพบครั้งแรกในแถบอเมริกาในปี พ.ศ. 2535 จากการศึกษาเอนอิมของไวรัสชนิดนี้พบว่ามีการพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว ในตระกูล Picornaviridae ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* โดยหางของกุ้งที่ติดเชื้อในระยะเฉียบพลันจะมีสีแดง ที่เกิดจากการตายของ epithelial tissue แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อในแบบเรื้อรังจะพบรอยโรคสีน้ำตาลบริเวณเปลือกกุ้ง ปัจจุบันได้มีผู้ที่ได้พัฒนาการตรวจไวรัสชนิดนี้ด้วยวิธี RT-PCR โดยผลผลิต RT-PCR ที่ได้จะมีขนาด 231 เบส

ในปัจจุบันวิธีพีซีอาร์ ได้รับความนิยมนจากเกษตรกรและผู้ประกอบกิจการโรงเพาะฟักกุ้งอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกรู-แม่พันธุ์ และลูกกุ้งกุลาดำที่ปลอดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และพาราสิตมาเพาะเลี้ยง จากตัวอย่างการศึกษาในภาคสนามจำนวน 43 บ่อ พบว่าถ้านำลูกกุ้งที่มีผลพีซีอาร์เป็นบวกไปเลี้ยง กุ้งจะป่วยเป็นโรคตัวแดงดวงขาวตายจำนวน 41 บ่อ จาก 43 บ่อ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ซึ่งมีอายุโดยเฉลี่ย 39 วัน และมีเพียง 2 บ่อเท่านั้นที่เลี้ยงได้เกิน 100 วัน แต่ก็ยังเป็นโรคตัวแดงดวงขาวตายในที่สุด ในทางกลับกันพบว่าหากผลการตรวจ พีซีอาร์เป็นลบ ซึ่งอาจหมายความว่าตรวจไม่พบเชื้อไวรัส เมื่อนำไปเลี้ยงในบ่ออื่น พบว่าส่วนใหญ่สามารถเลี้ยงต่อไปจนถึงเวลาจับขายได้ซึ่งประมาณ 3-4 เดือน จากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นข้อพิสูจน์อย่างดีว่า การใช้ประโยชน์จากการศึกษาเอนอิมของสิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ สามารถนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคที่มีคุณภาพประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งได้อย่างมหาศาล

การพัฒนาวัคซีน

นับจนถึงขณะนี้ไวรัส 2 ชนิดที่มีบทบาทในการสร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยได้แก่ ไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสหัวเหลือง สำหรับไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้น มีผู้ทำการศึกษาหลายกลุ่มด้วยกัน ซึ่งรวมทั้งนักวิจัยจากประเทศไทยด้วย โดยการศึกษาได้มุ่งเน้นไปสู่หน่วยย่อยที่สุดของไวรัสซึ่งนั่นคือ นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่มีการเรียงตัวต่อกันได้เป็นยีน ยีนจะทำหน้าที่กำหนดลักษณะพันธุกรรมของไวรัส และสามารถทำให้ไวรัสนั้น

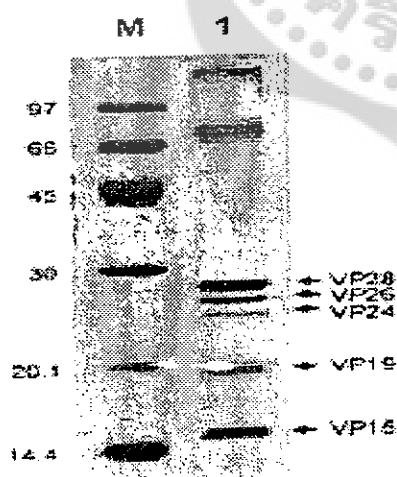
เป็นสายพันธุ์ก่อโรคที่มีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน การศึกษานี้จะนำไปสู่ความรู้และเข้าใจว่ายีนใดทำหน้าที่ผลิตโปรตีนอะไร และโปรตีนเหล่านั้นมีกระบวนการ หรือความสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้กุ้งเป็นโรคได้อย่างไร จากนั้นเมื่อทราบถึงกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพในกุ้งแล้ว เราจึงสามารถหาวิธีการป้องกันการเกิดโรคในกุ้งได้

จากการรวบรวมผลงานวิจัยในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวมีขนาดของจีโนมที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 292 – 300 กิโลเบส ส่วนไวรัสหัวเหลืองประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 26 กิโลเบส ทำให้ไวรัสหัวเหลืองมีขนาดเล็กกว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวถึงประมาณ 12 เท่าตัว ความรุนแรงของการก่อโรคในกุ้งไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม หากแต่ขึ้นอยู่กับการศึกษาที่ไวรัสเข้าไปมีบทบาทอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง นอกจากไวรัสหัวเหลืองแล้วยังมีรายงานการพบไวรัสอีกชนิดหนึ่งในประเทศออสเตรเลียที่มีลักษณะคล้ายไวรัสหัวเหลืองมากชื่อ GAV (gill-associated virus) ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำในประเทศออสเตรเลีย แต่กุ้งที่ติดเชื้อ GAV จะมีความรุนแรงของโรคน้อยกว่า และเมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาก จึงเป็นที่น่าสนใจมากกว่า เหตุใดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส GAV จึงมีอัตราการรอดที่มากกว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพราะฉะนั้นการศึกษาในรายละเอียดถึงระดับยีน และโปรตีนจากไวรัส อาจทำให้เราเกิดแนวความคิดในการยับยั้งการก่อโรคจากไวรัสหัวเหลืองได้

ไวรัสตัวแดงดวงขาว ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลักจำนวน 5 ชนิด และโปรตีนที่ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ได้อีกจำนวนหนึ่ง โดยโปรตีนโครงสร้างหลัก 5 ชนิดมีชื่อเรียกตามขนาดของโปรตีนเมื่อนำมาแยกบนแผ่นวุ้น (รูปที่ 14) ว่า VP28, VP26, VP24, VP19 และ VP15 เช่น VP28 หมายถึงโปรตีนจากไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 28 กิโลดาลตัน เป็นต้น จากการศึกษาอย่างต่อเนื่อง พบว่าโปรตีน VP28 และ VP19 เป็นโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเปลือกหุ้มไวรัส (envelope) ส่วนโปรตีน VP26, VP24 และ VP15 เป็นโปรตีนในส่วน nucleocapsid การศึกษาในลำดับต่อมาประกอบกับข้อมูลที่มีอยู่แล้วทำให้เชื่อว่าโปรตีน VP28 และ VP19 อาจจะมีหน้าที่ในการช่วยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ในตัวกุ้งและสามารถเข้าสู่ตัวกุ้งจนทำให้กุ้งป่วยและตายในที่สุด รวมทั้งอาจจะมีบทบาทที่เกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำได้อีกด้วย

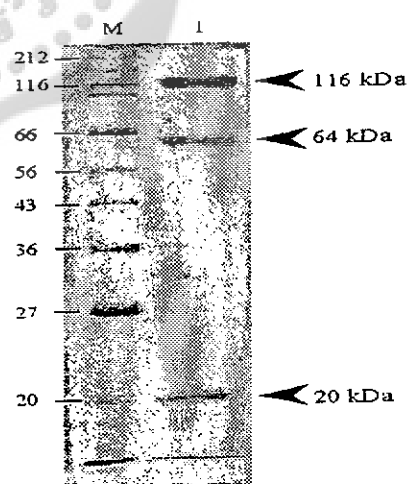
ผลการวิจัยโปรตีนต่างๆ ของไวรัสหัวเหลืองพบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง และโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเกิด replication และ transcription โปรตีนโครงสร้างมีจำนวน 3 ชนิด เรียกชื่อตามขนาดของโปรตีนบนแผ่นวุ้น (รูปที่ 15) เช่นเดียวกับไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ gp116, gp 64 และ p22 โดยที่โปรตีน gp116 และ gp64 เป็นโปรตีนที่มีการเติมหมู่น้ำตาล (glycoprotein) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่ในส่วนของเปลือกหุ้มไวรัส (envelope) ซึ่งเชื่อกันว่าโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้จะมียับยั้งที่สำคัญในการช่วยให้ไวรัสเข้าสู่ตัวกุ้ง และในขณะเดียวกันโปรตีนนี้อาจมี

ส่วนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งก่า สำหรับโปรตีน p22 ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดแต่คาดว่าอาจจะไม่มีส่วนในการเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกิ้งก่า การศึกษาวิจัยไวรัสหัวเหลืองโดยกลุ่มนักวิจัยไทยในขณะนี้ได้ทำการคัดต่อยีนที่ผลิตโปรตีนโครงสร้าง gp116 และ gp 64 โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อให้แบคทีเรียทำการผลิตโปรตีนขนาด 116 และ 64 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ข้อเสียที่เกิดจากการผลิตโปรตีนโดยใช้เซลล์แบคทีเรียคือจะได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากการผลิตโปรตีนตามธรรมชาติในเซลล์กิ้งก่า อย่างไรก็ตามก็ได้มีรายงานเกี่ยวกับการนำโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรียไปใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา Trout ผลการทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ฉีดเข้าไป และสามารถป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสได้ กลุ่มนักวิจัยไทยจึงเกิดแนวความคิดที่จะผลิตโปรตีน gp116 และ gp64 ให้ได้ปริมาณมากและนำไปผสมกับอาหารกิ้งก่า หรืออาจให้ในรูปสารแขวนลอยในน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ้งก่า เมื่อกิ้งก่าได้รับการกระตุ้นแล้วโปรตีนดังกล่าวอาจช่วยเหนี่ยวนำให้กิ้งก่ามีการสร้างสารบางอย่างขึ้นมาต่อต้านเมื่อเกิดการรุกรานของไวรัสหัวเหลืองได้ หรือสามารถอธิบายเปรียบเทียบกับการกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในคนขึ้นมาโดยการฉีดแอนติเจนซึ่งเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งของไวรัสนั้นเช่นเดียวกันนอกเหนือจากการศึกษาถึงคุณสมบัติและลักษณะของเชื้อไวรัสที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว การศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของกิ้งก่าก็มีส่วนช่วยในการพัฒนาเพื่อหาทั้งกลาดำสายพันธุ์ที่มีความสามารถต้านทานโรค รวมถึงมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิ้งก่าดำและไวรัสชนิดต่างๆ เพื่อหาแนวทางป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกิ้งก่า



รูปที่ 14 โปรตีนโครงสร้างของ WSSV

5 ชนิด ขนาด 28, 26, 24, 19 และ 15 Kd



รูปที่ 15 โปรตีนโครงสร้างของเชื้อ YHV

3 ชนิด ขนาด 116, 64 และ 20 Kd

การผลิตและการพัฒนาสายพันธุ์กิ้งกูดำในประเทศไทย

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและพัฒนาการตรวจสายพันธุ์กิ้งกูดำเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่โตไว ปลอดภัยและต้านทานโรค และให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปขยายจำนวนพ่อแม่พันธุ์กิ้งกูดำ เพื่อกำหนดให้แก่โรงเพาะฟักทั่วประเทศไทย ในราคาที่เป็นธรรม ซึ่งขณะนี้แม่พันธุ์กิ้งกูดำมีราคาถึงตัวละ 5,000-10,000 บาท สำหรับพ่อพันธุ์ราคาตัวละประมาณ 300-500 บาท

โครงการนี้ได้ริเริ่มและพัฒนาขึ้นโดยหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกึ่งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเริ่มจากการสร้างสายพันธุ์จากสายพันธุ์กิ้งกูดำที่มีอยู่แล้ว และทำการเพิ่มฐานของจำนวนสายพันธุ์ขึ้นมาให้ได้ 50 สายพันธุ์ ในแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีความแตกต่างกันในลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งสามารถทดสอบได้ด้วยการตรวจดีเอ็นเอ มีการทดลองผสมข้ามสายพันธุ์และเลี้ยงลูกกึ่งที่ออกมาว่าจะมีลักษณะตามที่ต้องการหรือไม่ กล่าวคือเป็นการทำ Selective Breeding Program โดยอาศัยครอบครัวเป็นหลัก ลูกกึ่งที่ได้นี้จะกำหนดให้เกษตรกรเพื่อนำไปเลี้ยง โดยหวังผลว่าจะได้ข้อมูลในด้านการเจริญเติบโตและการต้านทานโรคกลับคืนมา ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นไปตามความเป็นจริงในการเพาะเลี้ยงในระดับเกษตรกร นอกจากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมแล้ว ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อสนับสนุนให้การเพาะพันธุ์เป็นไปอย่างรวดเร็ว ได้แก่การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กิ้งกูดำโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย การศึกษาด้านการติดเชื้อและการป้องกันโรคที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่พันธุ์ไปสู่ลูกกึ่ง การศึกษาเรื่องสภาพแวดล้อมในบ่อพ่อแม่พันธุ์ที่จะทำให้ผลผลิตมากขึ้น การศึกษาด้านฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ และสุดท้ายคือการศึกษาด้านอาหารพ่อแม่พันธุ์กิ้งกูดำ การศึกษาทั้งหมดนี้จะดำเนินการไปพร้อมๆ กัน เพื่อให้ได้พ่อแม่พันธุ์กิ้งกูดำที่ดีที่สุดและมีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการ

การใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอในการพัฒนาสายพันธุ์กิ้งกูดำ

ปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะผลิตพ่อแม่พันธุ์จากกึ่งในบ่อเลี้ยงแทนการจับจากธรรมชาติ เพื่อลดปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์และได้สายพันธุ์ที่มีการปรับตัวในสภาพบ่อเลี้ยงได้ดี ซึ่งโครงการผลิตพ่อแม่พันธุ์กิ้งกูดำนอกจากจะต้องการเพิ่มปริมาณพ่อแม่พันธุ์ให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงแล้วยังต้องคำนึงถึงคุณภาพของพ่อแม่พันธุ์ซึ่งจะส่งผลต่อความสำเร็จของการเลี้ยงกึ่ง โดยโครงการเริ่มจากการสร้างสายพันธุ์ใหม่จากสายพันธุ์เดิมที่มีอยู่แล้ว และมีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อให้ได้กึ่งคุณภาพดีที่มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง เช่น มีความต้านทานต่อโรคและมีอัตราการ

เจริญเติบโตสูง ซึ่งในโครงการจะทำการเพิ่มฐานของสายพันธุ์ขึ้นมาให้ได้ 50 สายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีความแตกต่างในลักษณะทางพันธุกรรม ที่สามารถทดสอบได้ด้วยการตรวจดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีการคัดพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง และไม่ขึ้นกับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การตรวจดีเอ็นเอยังช่วยประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่มีอยู่ และช่วยกำหนดการผสมพันธุ์ให้เหมาะสมเพื่อให้ได้พ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพ

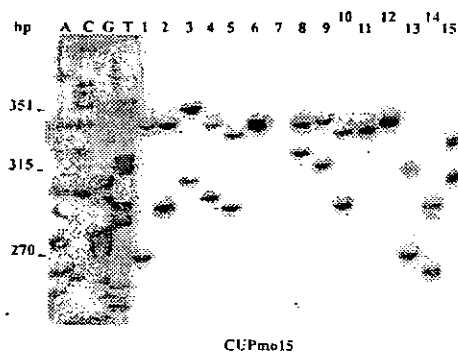
ในงานวิจัยได้พัฒนาการตรวจดีเอ็นเอของกุ้ง จากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลต์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี แม้ในสปีชีส์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับต่ำก็สามารถแยกได้ ไมโครแซเทลไลต์เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นช่วงสั้นๆ โดยหน่วยซ้ำส่วนใหญ่เล็กกว่า 6 คู่เบส เช่น (GT) n , (CAT) n , (GATA) n เมื่อ n คือจำนวนซ้ำ ไมโครแซเทลไลต์มีความหลากหลายสูง เนื่องจากจำนวน n ที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งเรียกว่ามีหลายรูปแบบหรือหลายอัลลีล (allele) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้พบกระจายอยู่ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต จึงสามารถเลือกใช้ตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมได้หลายตำแหน่ง ทำให้การตรวจมีความละเอียดและถูกต้องมากขึ้น และเป็นเครื่องหมายที่ถ่ายทอดจากพ่อ-แม่ไปสู่ลูกได้

การตรวจความแตกต่างของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ตำแหน่งต่างๆ ทำได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณไมโครแซเทลไลต์ ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสขาบข้าง (flanking regions) ของไมโครแซเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาแยกความแตกต่างของขนาดด้วยอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส วิธีการตรวจจึงทำได้ง่ายและรวดเร็ว และใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยจากส่วนปลายของขาว่ายน้ำหรือจากเลือด (hemolymph) ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งที่นำมาตรวจ และไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอคุณภาพดีเนื่องจากดีเอ็นเอบริเวณที่ตรวจความแตกต่างมักเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ ไม่เกิน 200-300 นิวคลีโอไทด์ ผลการวิจัยสามารถแยกเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ได้ถึง 234 ตำแหน่งในกุ้งกุลาดำ และได้พัฒนาไปใช้ในการตรวจพันธุกรรมแล้ว 28 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายที่มีความผันแปรสูงที่สุดคือ เครื่องหมายที่ตำแหน่ง CUPmo9 ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหรือมีรูปแบบของความแตกต่างซึ่งเรียกว่า อัลลีล มากถึง 33 อัลลีล และมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี 0.90 (ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีอยู่ระหว่าง 0-1.0 โดยค่าที่เข้าใกล้ 1.0 แสดงว่ามีความแตกต่างมาก) เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์มีความผันแปรแตกต่างกันสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการศึกษาที่แตกต่างกัน เครื่องหมายที่มีจำนวนอัลลีล >10 อัลลีล เหมาะสำหรับการใช้จำแนกครอบครัวในการคัดพันธุ์ ส่วนเครื่องหมายบางตำแหน่งที่มีความผันแปรต่ำ (<5 อัลลีล) นำไปใช้ได้ดีในการจำแนกกลุ่มประชากรหรือแยก สปีชีส์

ตัวอย่างลักษณะเบสซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกิ้งกูดำ ขนาดและจำนวนอัลลีลและค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการตรวจสอบตัวอย่างกิ้งจากจังหวัดชุมพร(ตารางที่1)

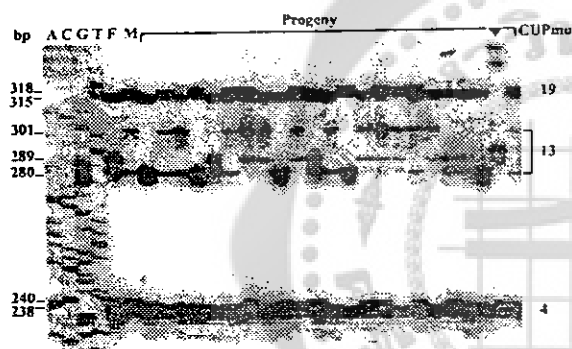
ตารางที่1 ลักษณะเบสซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกิ้งกูดำ

เครื่องหมาย	ลักษณะเบสซ้ำ	ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)	จำนวนอัลลีล (จำนวนตัวอย่าง)	ค่า เฮเทอโรไซโกซิตี
CUPmo 1	(GAA) ₄₃	224-326	29(51)	0.73
CUPmo 2	(ATCT) ₁₂ (TA) ₁₀	137-217	28(51)	0.78
CUPmo 3	(TAGA) ₃	135-223	27(49)	0.63
CUPmo 4	(ATCT) ₁₂ (AT) ₉ (GT) ₉	206-256	21(45)	0.89
CUPmo 5	(CT) ₁₀ TG(CT) ₁₇ (ATCT) ₁₀	120	1(10)	0
CUPmo 6	(GAA) ₁₀	166-242	27(49)	0.69
CUPmo 7	(GATA) ₄ ...(GATA) ₄	172-234	21(43)	0.16
CUPmo 9	(GATA) ₆ (GA) ₁₆	274-380	33(40)	0.90
CUPmo 11	(CT) ₁₅ (ATCT) ₉ (TA) ₄₉ (TAA) ₉ TGA(TAA) ₃	132-162	10(47)	0.81



รูปที่16 แบบความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในกิ้งกูดำแต่ละตัว (แถวที่ 1-15) จากการตรวจด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

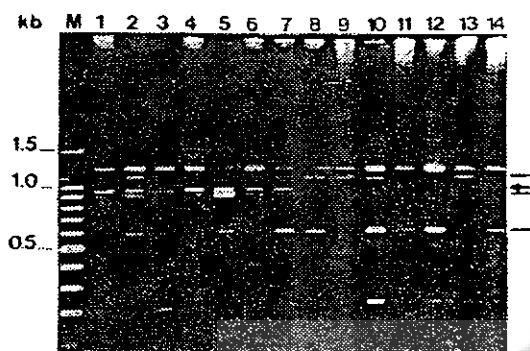
นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบแบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของกุ้งได้พร้อมกันที่หลายตำแหน่ง และได้นำไปใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในโครงการผลิตพ่อแม่พันธุ์จากบ่อเลี้ยง(รูปที่ 17) ขณะนี้อยู่ในรุ่นที่ 6 (F6) ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอมาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง โดยมีการติดตามและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งในรุ่นต่างๆ เพื่อกำหนดการผสมพันธุ์กุ้งในรุ่นต่อไปให้คงความหลากหลายทางพันธุกรรมและคัดเลือกรอบครวที่มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง หลีกเลี่ยงการผสมพันธุ์ภายในครอบครัว (inbreeding) และยังได้นำไปตรวจหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับอัตราการเติบโตและความสามารถในการทนโรค เพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถใช้คัดพันธุ์กุ้งที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและทนโรคเพื่อกักเพาะเลี้ยง



รูปที่ 17 การจำแนกครอบครัวกุ้งกุลาดำโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ 3 ตำแหน่ง F = พ่อ M = แม่ ▼ แสดงลูกกุ้งที่ไม่ได้มาจากครอบครัว

คณะผู้วิจัยยังได้มีความร่วมมือกับ CSIRO Molecular Animal Genetic Centre และ Australian Institute of Marine Science (AIMS) ที่ประเทศออสเตรเลีย นำเครื่องหมายดีเอ็นเอจากงานวิจัยนี้ไปใช้ทำแผนที่ยีน (Genetic Linkage Map) เพื่อศึกษาและค้นหายีนที่มีความสำคัญในกุ้งในโครงการ International Shrimp Map ซึ่งสามารถติดตามข้อมูลได้จาก website <http://www/shrimpmmap.tag.csiro.au>

นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่นๆ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโครคอนกรีต เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดี (RAPD ย่อมาจาก Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers) (รูปที่ 18) เพื่อใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ ได้แก่ การใช้แยกกุ้งกุลาดำจากอินตามันและอ่าวไทย(รูปที่ 19) โดยที่ปัจจุบันแหล่งพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมาจากฝั่งทะเลอินตามันและอ่าวไทย แต่เกษตรกรนิยมพ่อแม่พันธุ์ที่มาจากฝั่งอินตามัน เพราะเชื่อว่าให้ลูกที่แข็งแรงและมีอัตราการรอดสูงกว่า ทำให้ราคาพ่อแม่พันธุ์จากอินตามันสูงกว่าอ่าวไทยประมาณ 4-5 เท่า จึงอาจมีการปลอมปนของพ่อแม่พันธุ์ได้



รูปที่ 18 การจำแนกกุ้งกุลาดำอันดามันและอ่าวไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

แถวที่ 1-7 = กุ้งกุลาดำจากอันดามัน แถวที่ 8-14 = กุ้งกุลาดำจากตราด ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสที่พบเฉพาะในกุ้งกุลาดำจากอันดามัน



รูปที่ 19 กุ้งกุลาดำจากฝั่งอันดามันและอ่าวไทย ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างกัน

ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้

จากก้าวแรกจนถึงวันนี้ นับเป็นเวลาเกือบสิบปีแล้วที่โครงการวิจัยนี้ได้เกิดขึ้นมาและนับเป็นปีที่ห้าที่ได้มีการนำไปใช้ปฏิบัติจริง ซึ่งถือเป็นความภาคภูมิใจของผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการนี้ เมื่อความรู้จากงานวิจัยโดยเฉพาะการตรวจโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำด้วยวิธีพีซีอาร์สามารถสร้างประโยชน์ที่แท้จริงให้แก่เหล่าเกษตรกรได้และได้รับความนิยมนิยมจากเกษตรกรและผู้ประกอบกิจการ โรงเพาะฟักกุ้งอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์และลูกกุ้งกุลาดำที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมาเพาะเลี้ยง ทั้งนี้บริษัทเอกชนและองค์กรหลายแห่งก็ได้ส่งบุคลากรมาฝึกการทำเทคนิคพีซีอาร์กับคณะผู้วิจัยและนำไปใช้ตรวจหาไวรัสให้แก่เกษตรกรทั่วประเทศ เช่น บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด ชนมรมผู้เลี้ยงกุ้งสุราษฎร์ธานี บริษัท ภูเก็ต PCR จำกัด บริษัท PCR มหาสารคาม จำกัด บริษัท สยามเจนเนอรัลริชชีส์ จำกัด บริษัท อินเตอร์แปซิฟิคมารีน จำกัด บริษัท ยูเนี่ยนโฟรเซนโปรดักส์ จำกัด บริษัท แพ็คฟู้ด จำกัด บริษัท โกรเบสท์คอร์ปอเรชั่น จำกัด บริษัท เอเชียสตาร์แลป จำกัด บริษัท ไบโอเทคแลป ห.จ.ก. ตะวันออกสง

เสริมอาหารสัตว์ เป็นต้น และบริษัทจากต่างประเทศ เช่น บริษัท National Prawn ประเทศซาอุดีอาระเบีย บริษัท Black Tiger Aquaculture ประเทศมาเลเซีย บริษัท Padmanabha Labs ประเทศอินเดีย และบริษัท Tan Union Trading ประเทศมาเลเซีย นอกจากนี้ยังได้เปิดกว้างให้บุคลากรที่สนใจจากประเทศต่างๆ เข้ามาศึกษาเทคนิคการทำฟิชีอาร์กับคณะผู้วิจัยของไทย ในโครงการอบรมเทคโนโลยีในการตรวจไวรัสในกุ้งกุลาดำให้แก่กักขังจากแถบเอเชียอาคเนย์ อาทิ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และศรีลังกา โดยได้รับการสนับสนุนด้านการเงินจากหน่วยงานต่างประเทศ

โดยการวิจัยนี้ได้สร้างชื่อเสียงไม่เฉพาะแต่ในประเทศไทย แต่ยังได้รับการยอมรับจากนานาชาติในฐานะที่เป็นผู้บุกเบิกในการพัฒนาหาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งและพัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งนอกจากตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการในประเทศและบทความเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติไม่น้อยกว่า 200 เรื่อง ทั้งยังได้รับเชิญให้เป็นวิทยากรบรรยายในที่ประชุมเกี่ยวกับเรื่องกุ้งทั้งในประเทศและต่างประเทศไม่น้อยกว่า 250 ครั้ง

การพัฒนาเทคโนโลยี เพื่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอนาคต

ปัญหาที่พบในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในปัจจุบันไม่เพียงแต่เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น ที่เป็นปัญหาของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง แต่ยังมีเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่ทำให้กุ้งโตช้า ในความหมายของ “กุ้งโตช้า” นี้ ไม่ใช่เป็นความหมายของการโตช้าเพียงเล็กน้อยเหมือนกับเชื้อไวรัส HPV MBV และ IHNV ที่รู้จักมานานแล้ว แต่เป็นการโตช้าอย่างมากและพบอย่างกว้างขวางในทุกภาคการเลี้ยงกุ้งทั่วประเทศไทย ที่ว่าโตช้า นั่นคืออัตราการเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยเป็น 50% ของที่ควรจะเป็น สมมุติว่าในกุ้งที่เลี้ยงแล้วโตเป็นปกติ เมื่อครบเวลาสี่เดือนแล้ว น้ำหนักตัวกุ้งควรจะอยู่ที่ 30 ตัวต่อกิโลกรัม คือตัวละประมาณ 35-40 กรัม แต่กุ้งที่โตช้านี้จะมีน้ำหนักเฉลี่ยที่ตัวละ 15-17 กรัมเท่านั้น และยังมีอีกจะมีกุ้งในบ่อเลี้ยง 20-30% ที่น้ำหนักตัวเพียง 5-10 กรัม ทำให้ค่าเบี่ยงเบนของน้ำหนักจากค่าเฉลี่ย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\times 100$ / ค่าน้ำหนักเฉลี่ย) นั้นสูงมาก เช่น 60-70% แทนที่จะเป็น 10-15% อย่างที่ควรเป็น การโตช้าเร็วต่างกันอย่างมากของกุ้งในบ่อเดียวกันนี้ เกษตรกรเรียกว่าการแตกไซส์

คณะผู้วิจัยในกลุ่มได้ประยุกต์ใช้ความรู้พื้นฐานจากการศึกษาวิจัยและเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาเพื่อการจัดการกับปัญหาการโตช้าและการแตกไซส์นี้ โดยได้มีการศึกษามาเป็นเวลานานกว่าหกเดือนโดยกลุ่มนักวิจัยในทีม จากการศึกษาประวัติการเกิดโรค คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง คุณภาพพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้ง การจัดการภายในโรงเพาะฟัก การจัดการในบ่อเลี้ยง ได้ผลสรุปว่าสาเหตุน่าจะเกิดจากลูกพันธุ์กุ้งมากกว่าอย่างอื่น และน่าจะเกิดจากการติดเชื้อมากกว่าสาเหตุอื่น นั่นคือการติดเชื้อของลูกกุ้งตั้งแต่อยู่ในโรงเพาะฟัก ได้ทดลองตรวจเชื้อไวรัสทุกชนิดที่สามารถตรวจได้ในปัจจุบัน ด้วยเทคนิค

PCR คือ WSSV, YHV, MBV, HPV, gill-associate virus (GAV), spawning-mortality virus (SMV), infectious hypodermal and haematopoietic virus (IHHNV), Taura syndrome virus (TSV) และ Banyan virus (BV) ในกุ้งที่โตช้า พบว่ามีที่ติดเชื้ออยู่คือ MBV, HPV และ IHHNV แต่ทั้งสามไวรัสนี้ไม่ควรเป็นสาเหตุของการโตช้า เพราะว่ามีกุ้งโตช้าประมาณ 25% ที่ไม่มีเชื้อมีเชื้อดังกล่าวอยู่เลย และกุ้งที่ตัวโตปกติก็ยังมีพบว่ามีเชื้อไวรัสทั้งสามไม่น้อยไปกว่ากุ้งที่โตช้าเลย ได้ศึกษาต่อไปด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่านอกจากจะมีเชื้อไวรัสที่พบโดยวิธีการพีซีอาร์แล้ว ก็ยังพบการติดเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวอีกหลายชนิด แต่ก็พบเช่นเดียวกันว่ากุ้งที่โตช้าประมาณ 17% ไม่ติดเชื้อเหล่านั้น และกุ้งที่โตปกติก็มีเชื้อเหล่านั้นได้เช่นกัน โดยสรุป จะเห็นว่าเชื้อโรคทั้งหลายที่รู้จักกันในวงการติดเชื้อของกุ้งนั้น ไม่น่าเป็นสาเหตุของการโตช้าในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกุ้งที่โตช้าหลายตัวมีไวรัสขนาดเล็กๆอยู่ อย่างน้อยสี่ชนิด ได้สกัดเชื้อไวรัสเหล่านี้แยกอย่างหยาบๆ โดยเพียงแค่แยกเชื้อแบคทีเรียออกไป และนำสิ่งที่สกัดได้นี้ไปฉีดในกุ้งกุลาดำที่มีขนาดประมาณ 1 กรัม หลังจากเลี้ยงต่ออีกสามเดือน พบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีดสารสกัดนี้มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมและมีค่าเบี่ยงเบนของน้ำหนักจากค่าเฉลี่ยสูงมาก ทำให้แน่ใจว่าสิ่งที่ทำให้กุ้งโตช้าอยู่ใน lymphoid organ หลังจากนั้น จึงได้สกัดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดออกมาเพื่อศึกษาหาลำดับเบสของ RNA และได้พัฒนา primers เพื่อตรวจจับเชื้อไวรัสชนิดใหม่นี้ ซึ่งตั้งชื่อว่า monodon stunt growth virus (MSGV) และได้เริ่มพบแล้วว่ากุ้งที่โตช้าในบ่อเพาะเลี้ยงหลายบ่อมีการติดเชื้อ MSGV แต่ปัญหายังอยู่ที่ primers ที่หามาได้นี้ ยังอาจไม่เป็น primers ที่เหมาะสมที่สุด จึงต้องทำการสกัดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดออกให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ด้วยวิธีการของ sucrose gradient ultracentrifugation และนำไปฉีดกุ้งอีกครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อไวรัสชนิดใหม่นี้เป็นตัวใดที่เห็นในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกันแน่ คาดว่าจะได้ primers ที่ดีขึ้นอีกในเร็วนี้

นอกจากการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ได้แล้ว การพัฒนาการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่สามารถนำไปสู่การแก้ปัญหาโรคโตช้าได้อนาถของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยจึงน่าจะอยู่ที่การเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ปลอดเชื้อและโตเร็ว ควบคู่ไปกับการหาวิธีวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยที่ได้ดำเนินมาจนถึงปัจจุบันจะไม่สามารถประสบความสำเร็จได้หากปราศจากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหน่วยงานที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ได้แก่ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและ

เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) มหาวิทยาลัยมหิดล
บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด มหาชน และ ACIAR ของประเทศออสเตรเลีย

ขอขอบคุณคณะกรรมการรางวัลนักเทคโนโลยีดีเด่นประจำปี พ.ศ. 2546 มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์

ขอขอบคุณนักวิจัยอีกจำนวนมากที่ร่วมกันทำงานเป็นทีมอย่างยาวนานและได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในงานวิจัยอย่างเต็มที่ตลอดมา

ตัวอย่างผลงานของกลุ่มวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Wongteerasapaya, C., Vickers, J. E., Sriurawatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occur in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Dis. aquat. Org.*, 21: 69-77.
2. Wongteerasapaya, C., Sriurawatana, S., Vickers, J. E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. aquat. Org.* 22 : 45-60.
3. Wongteerasapaya, C. , S. Wongwisansri , V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G.L. Nash, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive *in situ* hybridization with viral infections in 6 penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143: 23-32.
4. Wongteerasapaya, C., Tongcheua, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. aquat. Org.* 31 : 181-186.
5. Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7 : 55-61.

6. Kanchanaphum, P., Boonsaeng, V., Wongteerasapaya, C., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. (1998) Experimental transmission of white-spot baculo-like virus (WSBV) from crabs to shrimp *Dis. aquat. Org.* **34**: 1-7.
7. Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, S. Sriurairatana, V. Boonsaeng, S. Panyim, B. Withyachumnarnkul, V. Thamavit and T.W. Flegel. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* **38**: 1-10.
8. Pongsoomboon, S., Whan, V., Moore, S., and Tassanakajon, A. (2000) Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellite in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Sci. Asia* **26**: 1-8.
9. Supangul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., and Tassanakajon, A. (2000) Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* **2**: 339-347.
10. Kiatpathomchai, W., Boonsaeng, V., Tassanakajon, A., Wongteerasupaya, C., Jitrapakdee, S. and Panyim, S. (2001) A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* **47**: 235-239.
11. Flegel TW, Fegan DF (2002) Strategies for preventing the spread of fish and shellfish diseases. *Fisheries Sci.* **68** Supplement 1: 776-788.
12. Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, Withyachumnarnkul B, Flegel TW, Boonsaeng V, Panyim S (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol. Cell. Probes* **16**: 409-413.
13. Phromjai J, Boonsaeng V, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (2002) Detection of HPV in Thai *Penaeus monodon* by in situ hybridization, dot-blot hybridization and PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* **51**: 227-232.

14. Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Chomsoong R, Flegel TW, Muangsin S, Nash GL (2003) Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 53: 167-171.
15. Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Panyim S, Flegel TW, Walker PJ (2003) High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 54: 253-257

ผลงานตีพิมพ์ในเอกสารในประเทศ

1. วรณสิกา ทองเชื้อ ชัยณรงค์ วงสิทธิ์ทรัพย์ และวิชัย บุญแสง การตรวจหาระดับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี PCR วารสารรมบี ฉบับที่ 24 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2542 หน้า 38-40.
2. เทคนิคใหม่ในการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ วารสารสัตว์น้ำ ฉบับที่ 127 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2543.
3. อัญชลี ทศนาขจร "การใช้ PCR ในการคัดสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ" ในหนังสือ การสัมมนาวิชาการเชิงปฏิบัติการเรื่อง "เทคนิค PCR กับการเพาะเลี้ยง กุ้ง" จัดโดย บริษัทวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้ง ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล 21 มกราคม 2541 หน้า 4/1 ถึง 4/6.
4. อัญชลี ทศนาขจร เปรมฤทัย สุพรรณกุล เมติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และวิชัย บุญแสง "The application of Microsatellite Markers in Shrimp Breeding Program" ในหนังสือการสัมมนาวิชาการ "เทคโนโลยี ชีวภาพกุ้ง" จัดโดยศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ 13 ธันวาคม 2540. หน้า 28 ถึง 34.
5. อัญชลี ทศนาขจร, ศิราวุธ กลิ่นบุหงา เมติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ สิริพร พงษ์สมบุญ และ เปรมฤทัย สุพรรณกุล การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายและการศึกษาพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำ วารสารจุฬาลงกรณ์ ปีที่ 20 ฉบับที่ 5 กันยายน-ตุลาคม 2544 หน้า 14 ถึง 20.

หนังสือ

1. บทความในหนังสือ จินนิมิกส์ภาษาแห่งชีวิต เรื่องจีโนมกุ้ง บทที่ 6 โดยมูลนิธิบัณฑิตยสภาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พิมพ์เมื่อเดือน ธันวาคม 2545 หน้า 125-144.
2. แผ่นพับเรื่อง การตรวจโรคไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงจุดขาว ด้วยวิธี PCR

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก
เงินงบประมาณแผ่นดิน ปี 2546

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV
ในกึ่งกลาดำโดยใช้วิธี
Sandwich ELISA

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก
เงินงบประมาณแผ่นดิน ปี 2546

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV
ในกึ่งกลาดำโดยใช้วิธี
Sandwich ELISA

หัวหน้าโครงการ :

ผศ. ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล
ผศ.ดร. ศิวาพร ลงยันต์
รศ.ดร. วีรวรรณ สิทธิกรกุล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญตาราง	ii
สารบัญรูป	iii
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
ระเบียบวิธีวิจัย	5
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	35
Output	37



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปี 2546 ขอขอบคุณเกษตรกรเจ้าของบ่อกุ้งที่ให้ตัวอย่างกุ้งแคะ ขอขอบคุณหน่วยงาน สวทช. (อุทยานวิทยาศาสตร์) ปทุมธานี ที่ให้บริการเครื่อง Ultracentrifuge ขอขอบคุณ นายสมบัติ รักประทานพร ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยด้านการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร นายเนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์ และนางสาววรรณุช เกตุสุวรรณ ที่ช่วยเหลืองานวิจัยด้านโคลนนิ่งโปรตีนโครงสร้าง

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความสนับสนุนในเรื่องสถานที่และอุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV	27



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 Map ของ pCR – Blunt Vector	11
รูปที่ 2 Map ของ pQE30 Expression Vector	19
รูปที่ 3 การวิเคราะห์โปรตีนของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE	21
รูปที่ 4 ตัวอย่างการทำ dot blot เพื่อคัดเลือกโมโนโคลนอลโคลนที่จำเพาะต่อโปรตีนของไวรัส HPV	22
รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลที่ผลิตได้โดย Western blot	22
รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีคัดเลือกมา 4 โคลนโดย เทคนิค immunohistocmistry	23
รูปที่ 7 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C โดย immunohistocmistry	24
รูปที่ 8 SDS-PAGE ของโปรตีนอนุภาคไวรัส HPV จากกึ่งกลาดำแคะที่ ย้อมด้วย Coomassie blue และ Western blot	25
รูปที่ 9 Immunohistochemistry ของ hepatopancresa จากกึ่งกลาดำแคะ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV 16-9C	26
รูปที่ 10 การวิเคราะห์ PCR product จากการเพิ่มปริมาณยืน VP ของไวรัส HPV โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	28
รูปที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบ insert ใน pCR-Blunt vector โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Kpn</i> I โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	29
รูปที่ 12 การตัด pQE30 expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III กับ <i>Kpn</i> I	30
รูปที่ 13 แสดงผลการตัด insert ใน pCR-Blunt ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Kpn</i> I	31
รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจสอบ VP gene ใน pQE30 expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III กับ <i>Kpn</i> I	32

บทคัดย่อ

ได้ทำการแยกสกัดไวรัส HPV หรือ Hepatopancreatic parvovirus จากตับกุ้งกุลาดำ แคระโดยวิธี urografen gradient ultracentrifugation ทำการตรวจหาดีเอ็นเอและโปรตีนของไวรัสโดยเทคนิคพีซีอาร์และ SDS-PAGE ปรากฏว่าพบแถบโปรตีนหลัก 1 ชนิด ขนาด 54 กิโลดาร์ตัน (kD) จาก fraction ที่มีอนุภาคไวรัส HPV จึงนำสารละลายของไวรัสฉีดเข้าไปในหนูขาว เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจากทำ cell fusion ได้ทำการคัดเลือกแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัส HPV โดยเทคนิค dot blot เป็นขั้นตอนแรก ในขั้นตอนที่สองได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนของไวรัสโดยเทคนิค Western blot และ immunohistochemistry ผลปรากฏว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 4 โคลน ซึ่งแอนติบอดีทั้ง 4 สามารถจับกับโปรตีนหลักขนาด 54 kD และจับกับนิวเคลียสของเซลล์ติดเชื้อไวรัส HPV บริเวณ basophilic intranuclear inclusion bodies จากการวิเคราะห์โดยวิธี immunohistochemistry โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อกุ้งปกติ และไวรัสอื่นๆ ที่มีการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำเช่น yellow-head virus (YHV), white spot syndrome virus (WSSV) และ monodon baculovirus (MBV) ในการวิเคราะห์ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่างๆ ของ hybridoma พบว่าเป็น IgG_{2b} จำนวน 2 โคลน และ IgG₁ จำนวน 2 โคลน โดยที่ subclass IgG_{2b} สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสได้ดีกว่า subclass IgG₁ ดังนั้นจึงอาจนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการของ immuno assay เช่น Sandwich ELISA หรือชุดตรวจสอบชนิดอื่นๆ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ที่สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้

ในการวิจัยครั้งนั้นยังมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจชนิด Sandwich ELISA ด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการโคลนนิ่งยีนของโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV เพื่อให้มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็สามารถโคลนนิ่งได้สำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนนี้ยังมีปัญหา ดังนั้นจำเป็นต้องมีการแก้ไข เช่น เปลี่ยนระบบในการแสดงออกของยีนใหม่ ทั้งนี้เพื่อให้ได้โปรตีนเพียงพอในการพัฒนาชุดตรวจชนิด Sandwich ELISA ต่อไป

Abstract

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) was isolated from hepatopancreas of slow growth *Penaeus monodon* by urografin gradient centrifugation. The presence of HPV in the fraction was monitored by PCR and SDS-PAGE. Only one major band of 54 kD protein was observed in the strongly PCR positive fractions that used for immunization in mice for monoclonal antibodies production. After cell fusion, the first step of selection for the specific antibodies was performed by dot-blot over purified HPV viral particle. The second step of screening was done by Western blot of the purified HPV and immunohistochemistry of HPV-infected hepatopancreas. Four monoclonal antibodies were isolated; they bound to the 54 kD protein on Western blot analysis, and to intranuclear inclusion body in the hepatopancreatic epithelial cell of infected prawn by immunohistochemistry. None of the antibodies did showed cross-reactivity to either uninfected shrimp tissue or other shrimp viruses tested. All MAbs are IgG class; two of them are IgG₁ and the other two are IgG_{2b}. The two MAbs of IgG_{2b} subclass seem to bind to the HPV-protein stronger than that of the other two antibodies of IgG₁. It is promising to use these monoclonal antibodies for developing a highly sensitive immuno assay such as sandwich ELISA or a convenient kit for detection of HPV infection that are more rapid, simple and suitable for field application.

In order to obtain large amount of viral protein for production of monoclonal antibodies that will be used for developing of Sandwich ELISA, cloning and expression of VP gene were performed. The cloning of the gene was success but the expression was not. Therefore, the expression system may be improved.

บทนำ

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำนับว่าเป็นอุตสาหกรรมที่ทำเงินรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้าน อย่างไรก็ตามในช่วงหลายปีที่ผ่านมาโรคไวรัสที่เกิดขึ้นในกุ้งกุลาดำทำให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งเป็นอันมาก ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่สำคัญได้แก่ ไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head virus, YHV), ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White-spot virus, WSV), Monodon baculovirus (MBV) และ Hepatopancreatic parvovirus (HPV)

สำหรับ HPV เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง *Penaeids* หลายสปีชีส์ โดยเฉพาะกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ได้แก่ กุ้งกุลาดำ และกุ้งแชบ๊วย การระบาดของไวรัสเหล่านี้พบในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ออสเตรเลีย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จีน ไต้หวัน เกาหลี อิสราเอล คูเวต และประเทศแถบอเมริกาใต้ (Lightner 1996) สำหรับประเทศไทย ไวรัส HPV ในกุ้งกุลาดำ พบครั้งแรกทางภาคใต้ เมื่อปี 2535

กุ้งที่ติดเชื้อ HPV จะไม่พบอาการภายนอกที่จำเพาะและเด่นชัด (ชะลอ ลิมสุวรรณ 2543) จึงต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histopathology) ซึ่งวิธีการนี้จำเป็นต้องอาศัยผู้ชำนาญและมีประสบการณ์สูง ดังนั้นการตรวจการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นยังไม่สามารถวินิจฉัยได้แน่นอน ส่วนการตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิค PCR มีการใช้อย่างแพร่หลาย (Sukhumsirichart *et al.* 1999 ; Pantoja & Lightner 2000; Phromjai *et al.* 2001; 2002) เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูงมาก สามารถตรวจหา DNA ของไวรัสอย่างน้อยที่สุด 1 fg ซึ่งเทียบเท่ากับไวรัส HPV 300 อนุภาค (Sukhumsirichart *et al.* 1999 ; Pantoja & Lightner 2000) แต่มีข้อจำกัดหลายอย่างคือ ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง ต้องมีห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน ค่าใช้จ่ายในการตรวจมีราคาสูง และต้องสัมผัสกับสาร ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR-ELISA ในการตรวจหาเชื้อไวรัส HPV ซึ่งมีความไวสูงกว่า PCR ปกติและหลีกเลี่ยงการใช้ ethidium bromide (Sukhumsirichart *et al.* 2000) แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอื่น ๆ เหมือนวิธี PCR ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับการพัฒนากันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว และแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังมีรูปแบบที่ใช้ในกระบวนการตรวจวินิจฉัยหลายรูปแบบ และสามารถปรับปรุงเป็นชุดตรวจชนิด strip test ที่ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีราคาต่ำ สำหรับในกุ้งกุลาดำมีรายงานในไวรัสหัวเหลือง โดยได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนของไวรัสโรคหัวเหลืองที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD (Sithigornngul *et al.* 2000; 2002) ที่สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคหัวเหลืองได้ตั้งแต่การติดเชื้อระยะเริ่มแรก และการติดเชื้อในพาหะ

เนื่องจาก HPV เป็นไวรัสที่ก่อโรคในกึ่งกลาดำที่สำคัญและพบการติดเชื้อมาก ซึ่งมีผลต่อผลผลิตกึ่งโดยรวมของประเทศและรายได้ของเกษตรกร ดังนั้นการเพาะเลี้ยงกึ่งในปัจจุบัน จึงต้องอาศัยวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ง่าย รวดเร็วและแม่นยำ เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อในขณะที่กึ่งไม่แสดงอาการ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่ากึ่งที่นำมาเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อไวรัส ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เพื่อนำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส HPV และคาดว่าจะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่รวดเร็วต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของชุดโครงการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส HPV
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี
3. เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัส HPV โดยวิธี sandwich ELISA ที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียม HPV แอนติเจน

แยกเอาตับ (hepatopancreas) ของกึ่งกุลาดำแคะจากบ่อในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา มาแช่แข็งทันทีในไนโตรเจนเหลวหรือน้ำแข็งแห้ง ตับกึ่งส่วนหนึ่งนำมาบดโดยใช้เครื่องบด (hand homogenizer) ใน NTE buffer; 0.2 M NaCl, 0.02 Tris-HCl, pH 7.4, 0.02 M EDTA) และปั่นให้ตกตะกอน 2 ครั้งโดยใช้ความเร็ว 7,000 และ 13,000 รอบต่อนาที ครั้งละ 15 นาที เก็บส่วนใสแล้วนำไปปั่นด้วย ultracentrifugation ที่ความเร็ว 140,000xg เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้ไปละลายในบัฟเฟอร์และปั่นแยกในสารละลายของ urografin ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 20%-40% ที่ความเร็ว 140,000xg เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที ดูด fraction ที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30% และ 35% ไปละลายในบัฟเฟอร์แล้วนำไปปั่นที่ 140,000xg เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างสารละลาย urografin เก็บตะกอนไวรัสและละลายในบัฟเฟอร์ NTE นำไปตรวจหาโปรตีนโดย SDS-PAGE ก่อนนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันให้หนู Swiss mouse และใช้เป็นโปรตีนสำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Dot blot และ Western blot

สำหรับตับกึ่งที่ติดเชื้อ HPV อีกส่วนหนึ่งนำมา fixed ใน Davidson's fixative เพื่อใช้ในการทดสอบการติดเชื้อ HPV โดยวิธี immunohistochemistry

การปลูกภูมิคุ้มกัน

นำสารละลายไวรัส HPV ที่เตรียมได้ข้างต้น ประมาณ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มาทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วย SDS และ β -mercaptoethanol หลังจากนั้นนำไป dialyzed ในน้ำกลั่นเพื่อกำจัด SDS และ β -mercaptoethanol ออก จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้นำไปฉีดเข้าใน หนู Swiss mouse ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว โดยครั้งแรกผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 หลังจากนั้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยสารละลายผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บซีรัม นำมาทดสอบความจำเพาะโปรตีนของไวรัส HPV ที่เตรียมได้โดยวิธี dot blot และทดสอบกับเนื้อเยื่อส่วน hepatopancreas จากกึ่งปกติ และกึ่งติดเชื้อไวรัส HPV โดยวิธี immunohistochemistry หนูตัวที่ตอบสนองดีจะถูกปลูกภูมิคุ้มกันซ้ำก่อนที่จะเริ่มทำ fusion 3 วัน

การผลิต hybridoma

นำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนจากไวรัส HPV ที่ตอบสนองดีที่สุดมาแยก spleen cell และนำมาหลอมรวมกับ myeloma cell โดยใช้ polyethylene glycol กระจ่าย

เซลล์ออกเลี้ยงใน 96 well microculture plate จำนวน 30 plate จำนวน 30 plate/fusion เลือก hybridoma clone ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เซลล์ที่ถูกคัดเลือกนำมา reclone อีกสองครั้ง โดยวิธี limitation dilution method (Sithigorngul *et al.* 2000)

การคัดเลือก hybridoma

ในการคัดเลือก hybridoma clone ที่สร้าง MAb จำเพาะต่อไวรัส HPV ใช้ 3 วิธี ดังนี้ ขั้นตอนแรกทำการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting จากนั้นนำมาคัดเลือกว่าต่อโดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry ตามลำดับ ซึ่งรายละเอียดของวิธีต่างๆ มีดังนี้

Dot blotting

ใช้สารละลายของไวรัส HPV ที่เตรียมได้ข้างต้นนำมาทำให้เสียสภาพด้วย SDS และ β -mercaptoethanol แล้ว dialyze ในน้ำกลั่น เพื่อกำจัด SDS และ β -mercaptoethanol ออกไป นำมาหยดบนกระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 ไมโครลิตร อบที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จาก hybridoma ในแต่ละหลุม (เจือจาง 1:20 ใน 5% blotto = 5% non-fat dry milk 0.1% triton X 100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง 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 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างใน 0.5% blotto และบ่มให้สารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เลือก hybridoma clone ที่แสดงปฏิกิริยากับโปรตีนของไวรัส HPV ที่เตรียมได้ นำมาคัดเลือกว่าต่อโดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry ก่อนนำไป reclone และ Cryo-preservation สำหรับการศึกษาคต่อไป

SDS-PAGE และ Western blot

นำสารละลายไวรัส HPV ที่เตรียมได้ มาทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE (10% เจล) ตามวิธีของ Laemmli (1970) ที่ 100 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แบ่งส่วนหนึ่งของเจล นำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่กระดาษ Nitrocellulose โดยใช้ Western blot apparatus (Biorad) จากนั้นนำ nitrocellulose membrane ไปจุ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มใน MAb แต่ละชนิดที่เจือจาง 1:200 ด้วย 5% blotto เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot-blot เพื่อหาตำแหน่งของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

Immunohistochemistry

นำ hepatopancreas ของกิ้งกักและกิ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV นำไปแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin embedded ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์ นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase ซึ่งมีวิธีทำโดยย้อมด้วย rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นนำไปผ่าน butanol (100%) 95% - 70% ethanol และน้ำ บ่มใน MAb ชนิดต่าง ๆ เจือจางประมาณ 1 : 5 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่ 37°C ล้าง section ด้วย PBS บ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1 : 1,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂ ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมด้วย haematoxylin และ eosin Y (H & E) ตี้น้ำด้วย ethanol เปอร์เซนต์ต่าง ๆ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็น slide ถาวรโดยใช้ permount บริเวณที่ติดเชื้อไวรัส HPV จะปรากฏเป็นสีน้ำตาล

การตรวจสอบ class และ subclass ของ Mab

Class และ subclass ของ mouse immunoglobulin สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของ hybridoma ตรวจสอบโดย sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)

การโคลนนิ่งโปรตีนห่อหุ้มของไวรัส HPV

ขั้นตอนการโคลนนิ่งแสดงในแผนผัง ข้างล่าง

ขั้นตอนการโคลนนิ่งและการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้ม (VP gene)

เพิ่มปริมาณยีน VP จาก HPV DNA โดย PCR และใช้ primer HPV-F-KPN กับ HPV-R-HND



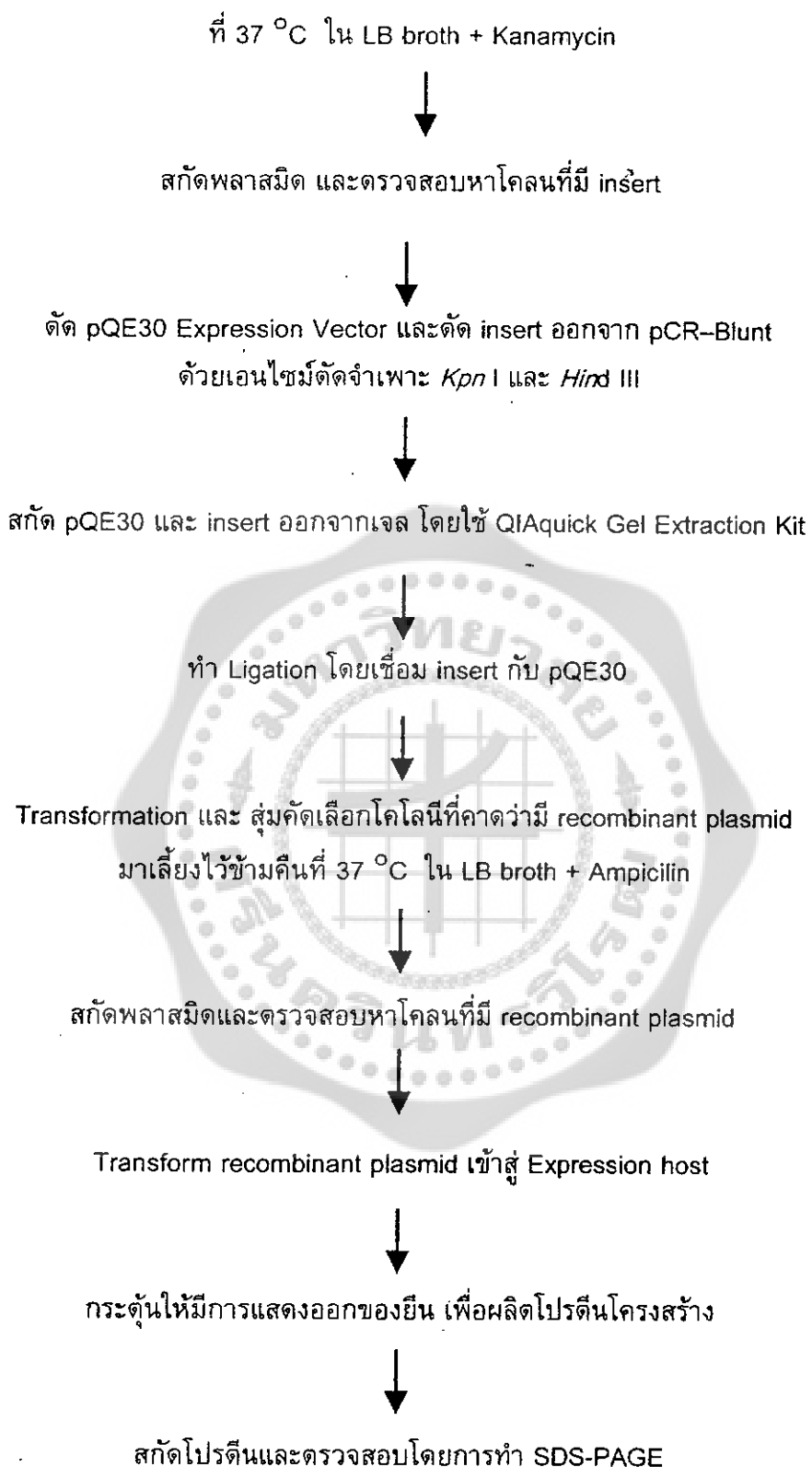
ตรวจสอบ PCR product โดย agarose gel electrophoresis



ทำ Ligation โดยเชื่อม PCR product กับ pCR-Blunt Vector



Transformation และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมี insert มาเลี้ยงไว้ข้ามคืน



การเพิ่มปริมาณยืน VP ของ HPV โดยการทำให้ PCR

ทำการเพิ่มปริมาณยืนของ VP ของไวรัส HPV โดยเทคนิค PCR และใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

1. DNA ของไวรัส HPV	3	ไมโครลิตร
2. <i>pfx</i> polymerase	0.4	ไมโครลิตร
3. 10X <i>pfx</i> buffer	5	ไมโครลิตร
4. 10X enhancer	5	ไมโครลิตร
5. 2.5 mM dNTPs	6	ไมโครลิตร
6. 50 mM MgSO ₄	1	ไมโครลิตร
7. HPVF – KPN primer	1	ไมโครลิตร
8. HPVR – HND primer	1	ไมโครลิตร
9. Deionized water	27.6	ไมโครลิตร
ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร	50.0	ไมโครลิตร

จากนั้น เริ่มทำ PCR โดยใช้ Condition ดังนี้

Pre-denaturation :	94°C เป็นเวลา	2 นาที	} จำนวน 35 รอบ
Denaturation :	94°C เป็นเวลา	15 วินาที	
Annealing :	54°C เป็นเวลา	30 วินาที	
Extension :	68°C เป็นเวลา	1 นาที 45 วินาที	
Final extension :	68°C เป็นเวลา	20 นาที	
Store :	4°C		

ลำดับเบสของไพรเมอร์

ไพรเมอร์ HPVF – KPN

5' GGG GTA CCA TGA ACA CCG AAG CAC CCG TC.....3'

หมายเหตุ ลำดับเบสบริเวณที่ขีดเส้นใต้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn* I

ไพรเมอร์ HPVR – HND

5' CCC AAG CTT TTA TAC ATT AAC TCT ATA TTT C.....3'

หมายเหตุ ลำดับเบสบริเวณที่ขีดเส้นใต้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis

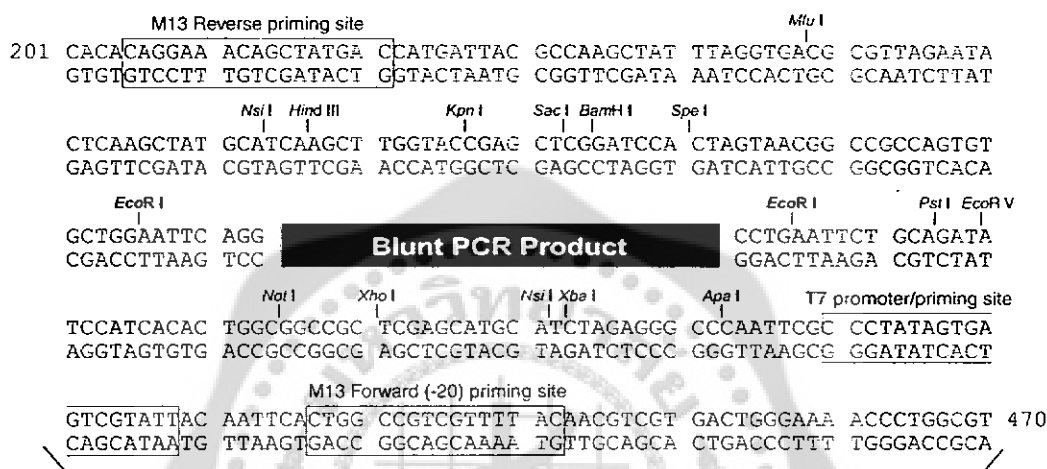
นำ 1 % agarose gel ที่เตรียมไว้แล้ว ใส่ลงใน chamber ที่มี TBE buffer จากนั้นนำ PCR product ที่ผสมกับ Loading dye โหลกลงไปในเจล ช่องละ 25 ไมโครลิตร และใช้ Hi-Lo™ DNA marker สำหรับเทียบขนาดของ DNA แยก DNA ตามขนาด โดยให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมใน Ethidium bromide นานประมาณ 10 วินาที และ Destain ในน้ำกลั่น นาน 10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบโดยใช้อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ DNA gel และถ่ายรูปเก็บไว้

การทำ Ligation เพื่อเชื่อมต่อ PCR product เข้ากับ pCR – Blunt Vector

ในการเชื่อมชิ้น DNA กับ Vector นั้น ใช้สัดส่วนของ Vector : DNA = 1 : 10 (อัตราส่วนโดยโมล) การเชื่อม PCR product กับ pCR–Blunt Vector ใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

1. pCR–Blunt Vector	1 ไมโครลิตร (25 ng หรือ 10 fmol)
2. Blunt PCR product	1 ไมโครลิตร (40 ng หรือ 100 fmol)
3. 10X Ligation buffer (with ATP)	1 ไมโครลิตร
4. T4 DNA Ligase (4U/μl)	1 ไมโครลิตร
5. Sterile water	6 ไมโครลิตร
ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร	10 ไมโครลิตร

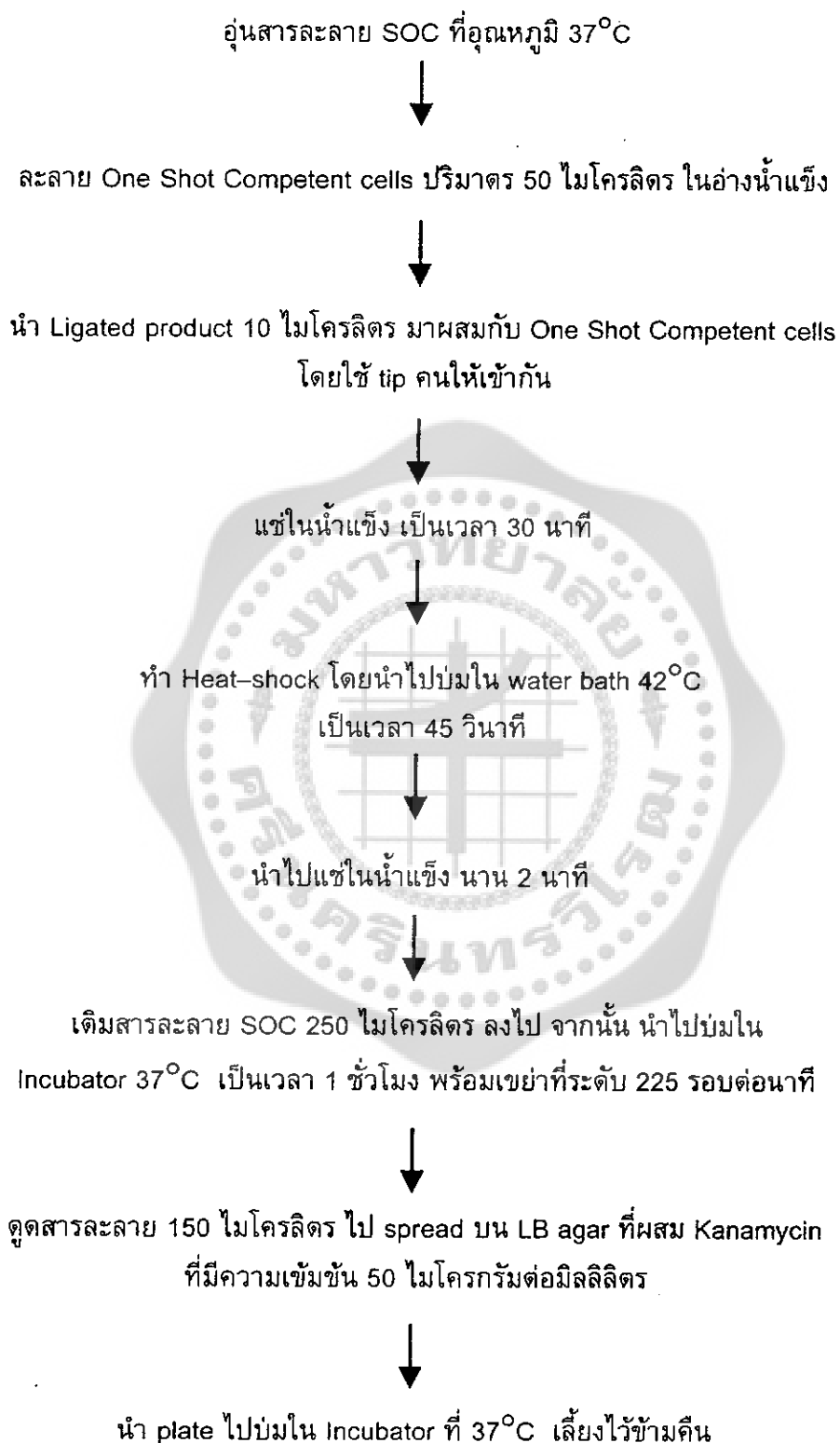
Incubate สารละลายที่ 16°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ Freezer ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปทำ Transformation



Comments for pCR®-Blunt
3512 nucleotides

รูปที่ 1 แสดงรายละเอียดต่าง ๆ ของ pCR – Blunt Vector

การทำ Transformation โดยใช้ One Shot Competent cells



การสกัดพลาสมิด ด้วยวิธี Rapid alkaline extraction

นำโคโลนีที่ขึ้นอยู่บน plate จากการทำ Transformation มาเลี้ยงใน LB broth ที่เติม Kanamycin ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงไว้ข้ามคืนใน Incubator shaker ที่ 37°C จากนั้นนำ culture ที่เลี้ยงไว้มาทำการสกัด พลาสมิดด้วยวิธี Rapid alkaline extraction ตามขั้นตอน ดังนี้

ดูด Overnight culture ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

↓

ดูดเอาส่วนใสที่เป็นน้ำใสทิ้ง เก็บเอาตะกอนของเซลล์แบคทีเรีย

↓

เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในตะกอนของแบคทีเรีย ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง vortex จนตะกอนละลาย ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

↓

เติมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา 5 ครั้ง ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที

↓

เติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เบา ๆ และแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

↓

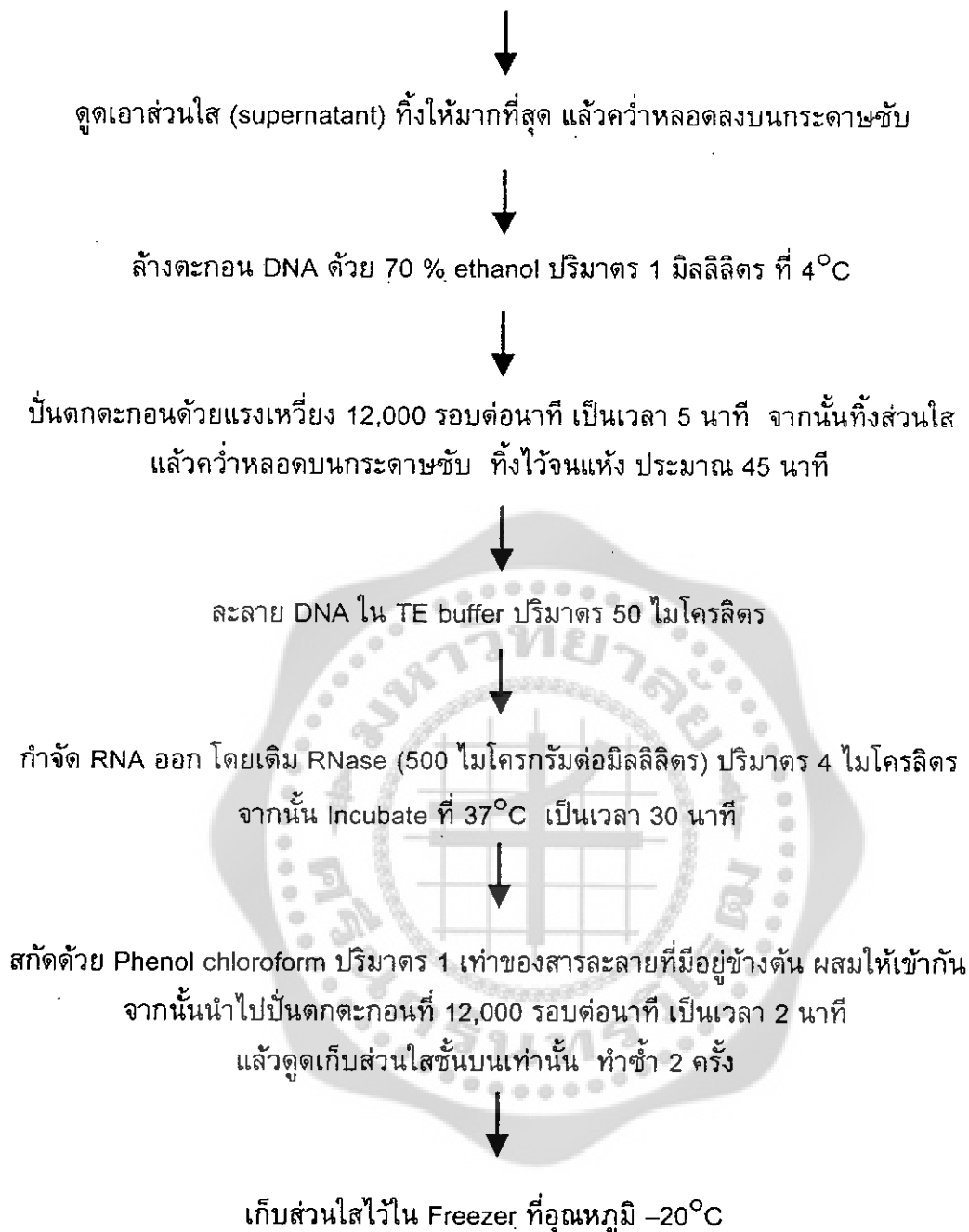
นำไปปั่นตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่องปั่นเหวี่ยง ดูดส่วนใสด้วยปิเปตอัตโนมัติ ใส่ใน microcentrifuge tube

↓

ทำการตกตะกอน DNA ด้วยการเติม Absolute ethanol เป็น 2 เท่า ของปริมาตรน้ำใส ผสมให้เข้ากันโดยการ vortexing แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

↓

ปั่นตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที



การตรวจสอบหาโคลนที่มี insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

- | | |
|---|---------------|
| 1. Recombinant plasmid (VP gene ใน pCR-Blunt) | 10 ไมโครลิตร |
| 2. 10X Reaction buffer 2 | 1.5 ไมโครลิตร |
| 3. 10X BSA | 1.5 ไมโครลิตร |
| 4. <i>Hind</i> III | 1 ไมโครลิตร |
| 5. <i>Kpn</i> I | 1 ไมโครลิตร |

ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร 15 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปบ่มไว้ใน Incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis นำโคลนที่มี insert ไปเลี้ยงไว้ใน LB broth + Kanamycin ก่อนที่จะนำมาสกัดพลาสมิด ให้มีปริมาณตามต้องการ

การเตรียม Competent cells

ในการเตรียม Competent cells นี้ จะใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* XI-1-Blue โดยมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

นำเชื้อ *E. coli* XI-1-Blue มาเลี้ยงใน LB broth 5 มิลลิลิตร



เขย่า ที่ 37°C ข้ามคืน ที่ระดับ 250 รอบต่อนาที



นำเชื้อที่เลี้ยงใน LB broth มา 1.5 มิลลิลิตรผสมกับ LB broth 100 มิลลิลิตร มาใส่เข้าด้วยกัน



เลี้ยงไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง

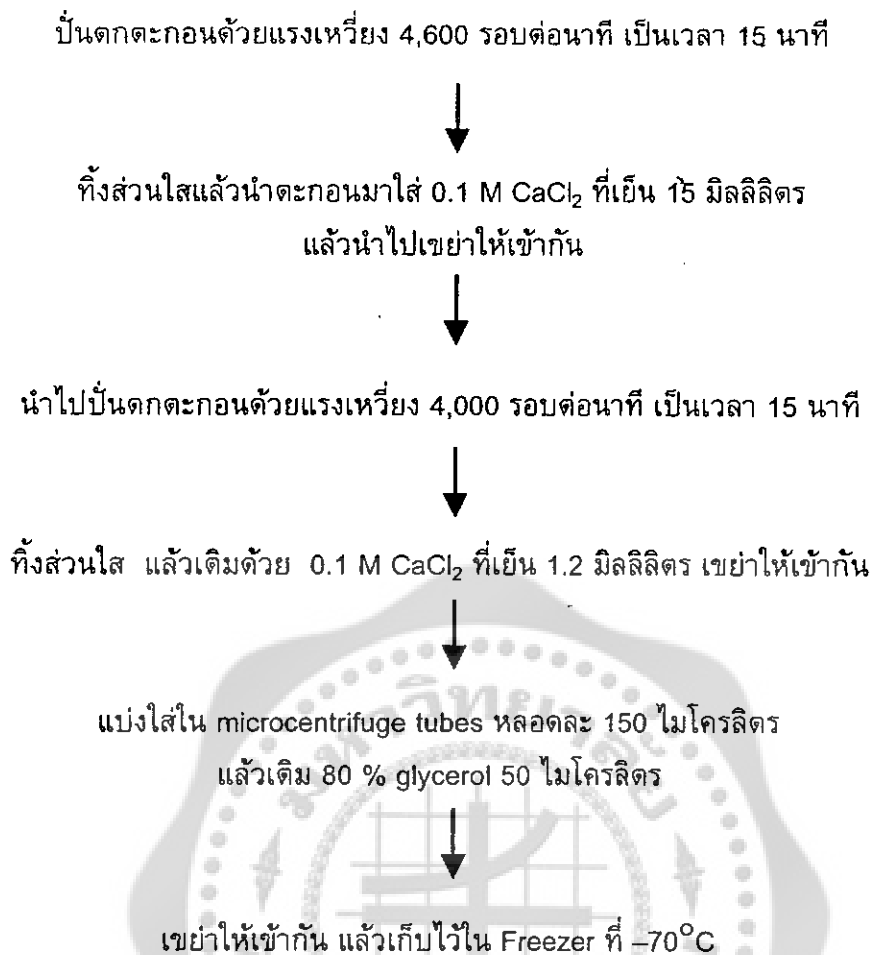


วัด OD₆₅₀ ให้ได้ประมาณ 0.5-0.6 (ใช้ LB broth เป็น blank)



แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที





การตัด pQE30 Expression Vector และตัด insert ออกจาก pCR-Blunt

นำโคลนที่เก็บไว้เป็น stock มาเลี้ยงใน LB broth + Kanamycin และนำเชื้อ pQE30 มาเลี้ยงใน LB broth + Ampicillin เลี้ยงไว้ข้ามคืนใน Incubator shaker ที่ 37°C แล้วนำไปสกัดพลาสมิด ตามขั้นตอนที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น จากนั้นทำการตัด pQE30 Expression Vector และตัด insert (VP gene) ออกจาก pCR-Blunt ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn* I และ *Hind* III เหมือนกัน โดยใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

การตัด pQE30 Expression Vector

1. pQE30 Expression Vector	50 ไมโครลิตร
2. 10X Reaction buffer 2	6.5 ไมโครลิตร
3. 10X BSA	6.5 ไมโครลิตร
4. <i>Hind</i> III	1 ไมโครลิตร
5. <i>Kpn</i> I	1 ไมโครลิตร
ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร	65 ไมโครลิตร

การตัด insert ออกจาก pCR-Blunt

1. recombinant plasmid	50	ไมโครลิตร
2. 10X Reaction buffer 2	6.5	ไมโครลิตร
3. 10X BSA	6.5	ไมโครลิตร
4. <i>Hind</i> III	1	ไมโครลิตร
5. <i>Kpn</i> I	1	ไมโครลิตร
ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร	65	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis ตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การสกัด pQE30 Expression Vector และ insert ออกจากเจล

ตัด band ของ DNA ตามขนาดที่คาดหวัง มาทำการสกัด DNA ออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตามคู่มือของ QIAquick Spin Handbook หน้า 23-24 ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

ขังน้ำหนักรวมของแต่ละ band ที่ตัดมา แล้วเติม Buffer QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักรวม โดย 100 มิลลิกรัม จะประมาณ 100 ไมโครลิตร

Incubate ที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมด

เติม Isopropanol ลงไป 1 เท่าของน้ำหนักรวม แล้วผสมให้เข้ากัน

นำ QIAquick spin column ใส่ลงใน collection tube

นำสารละลายทั้งหมดที่อยู่ใน microcentrifuge tube มาใส่ใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยงสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที

ทิ้งสารละลายด้านล่างที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่กลับเหมือนเดิม

เติม Buffer QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column

แล้วนำไปปั่นตกตะกอน เป็นเวลา 1 นาที



ล้างด้วยการเติม Buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน เป็นเวลา 1 นาที



ทิ้งสารละลายใน collection tube แล้วปั่นตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที



นำ QIAquick spin column ใส่ลงใน microcentrifuge tube



ใส่ Buffer EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลาง ไกล ๆ membrane ของ QIAquick spin column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอน เป็นเวลา 1 นาที



เก็บไว้ใน Freezer ที่ -20 องศาเซลเซียส

การทำ Ligation โดยเชื่อม insert (VP gene) กับ pQE30

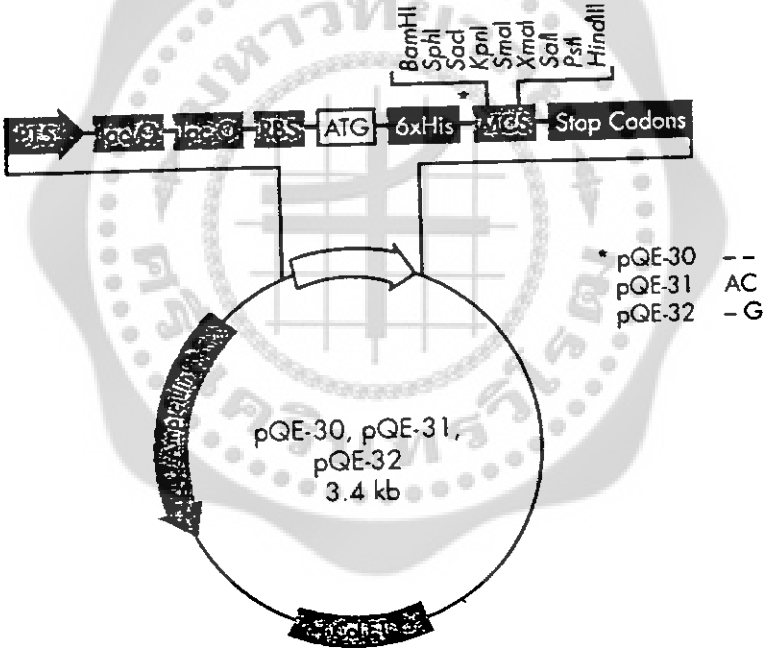
ในการเชื่อมชิ้น DNA กับ Vector นั้น จะใช้ Vector : DNA = 1 : 5 (อัตราส่วนโดยโมล)

การเชื่อม insert (VP gene) กับ pQE30 Expression Vector ใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

1. Insert (VP gene)	0.5 ไมโครลิตร (100 ng หรือ 100 fmol)
2. pQE30 Expression Vector	2 ไมโครลิตร (50 ng หรือ 20 fmol)
3. 5X Ligation buffer	2 ไมโครลิตร
4. T4 DNA Ligase	1 ไมโครลิตร
5. Sterile water	4.5 ไมโครลิตร
ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร	10 ไมโครลิตร

ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง 16°C จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปทำ

Transformation



รูปที่ 2 Map ของ pQE30 Expression Vector

การสกัดพลาสมิดที่อยู่ใน pQE30 โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit

นำโคลนที่ขึ้นอยู่บน plate จากการทำ Transformation มาเลี้ยงใน LB broth ที่เติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงไว้ข้ามคืนใน Incubator shaker ที่ 37°C จากนั้นนำ culture ที่เลี้ยงไว้มาทำการสกัดพลาสมิด โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ตามคู่มือของ QIAprep Miniprep Handbook หน้า 22-23

การตรวจสอบหาโคลนใน pQE30 ที่มี insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

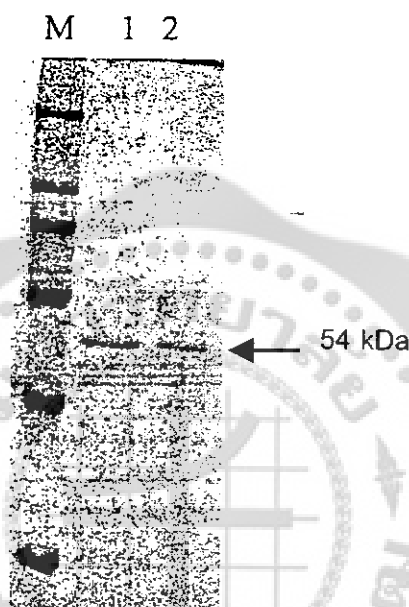
นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

1. recombinant plasmid	50 ไมโครลิตร
2. 10X Reaction buffer 2	6.5 ไมโครลิตร
3. 10X BSA	6.5 ไมโครลิตร
4. <i>Hind</i> III	1 ไมโครลิตร
5. <i>Kpn</i> I	1 ไมโครลิตร
ทั้งหมดอยู่ในปริมาตร	65 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปบ่มไว้ใน Incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสกัดไวรัส HPV จากตับกึ่งกุลาดำแคะด้วยวิธี urografin gradient ultracentrifugation แล้วนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ปรากฏว่าพบโปรตีนหลัก 1 ชนิด ขนาด 54 kD (รูปที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยรายงานโดย Bonami *et al* (1995) ที่พบโปรตีนของไวรัส HPV ที่สกัดได้จากกึ่ง *P. chinensis* เป็น polypeptide มีขนาด 54 kD



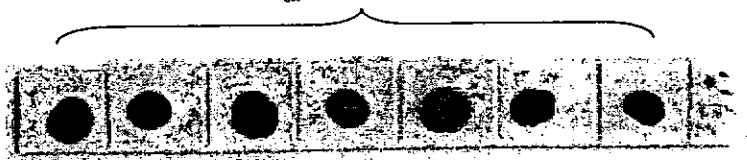
รูปที่ 3 การวิเคราะห์โปรตีนของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 และ 2 โปรตีนของไวรัส HPV

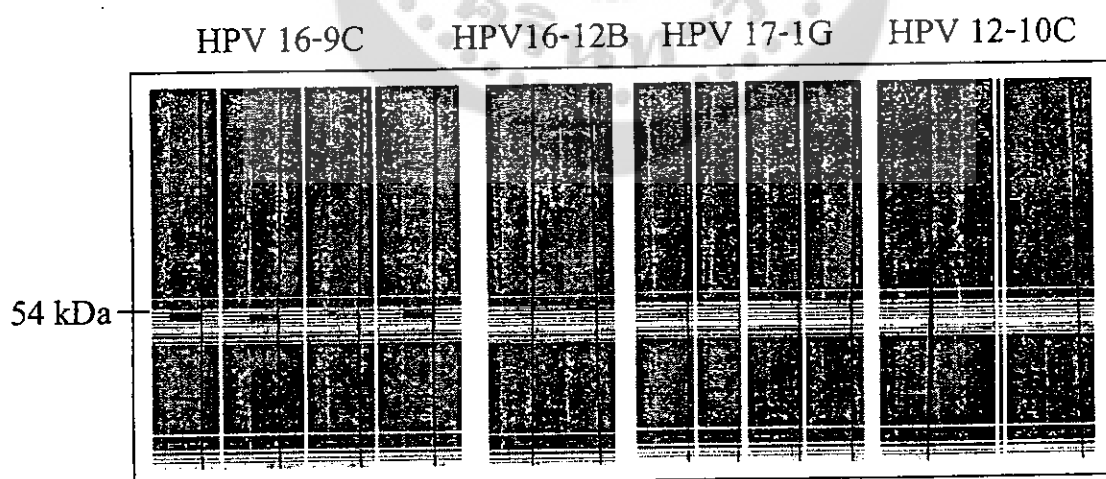
จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนของไวรัส HPV ฉีดเข้าไปในหนู จำนวน 4 ครั้ง แล้วเก็บซี่รีมและตรวจสอบ immunohistochemistry และ Western blot จากการหลอมรวมเซลล์จากม้ามหนู 1 ตัวได้ hybridoma clones ประมาณ 1,000 โคลน (30% จาก 30 plates) พบว่าเซลล์เหล่านี้สร้างแอนติบอดีที่ให้ผลบวกต่อไวรัสโดยวิธี dot blot 30 โคลน ตัวอย่างการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดย dot blot (แสดงในรูปที่ 4)

HPV antigen ทำปฏิกิริยากับ MAb 7-6 H

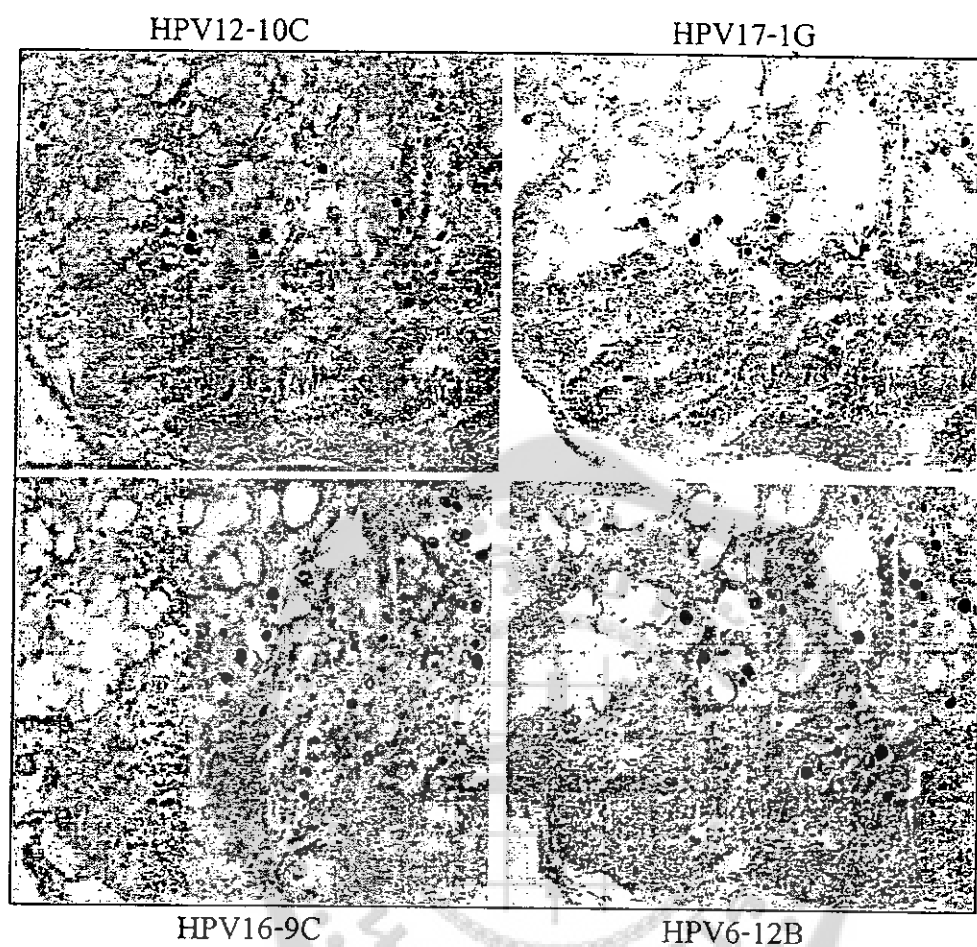


รูปที่ 4 ตัวอย่างการทำ dot blot เพื่อคัดเลือกโมโนโคลนอลโคลนที่จำเพาะต่อโปรตีนของไวรัส HPV

จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี Western blot และ immunohistochemistry พบ 4 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 54 kD (รูปที่ 5) และทั้ง 4 โคลนก็สามารถจับกับ basophilic intranuclear inclusion body ในเซลล์ของ hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ HPV (รูปที่ 6) โดยไม่พบปฏิกิริยาใด ๆ กับเนื้อเยื่อ hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำปกติ นอกจากนั้นยังไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสอื่น ๆ ได้แก่ YHV, non-virulent YHV, MBV และ WSSV (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัส HPV

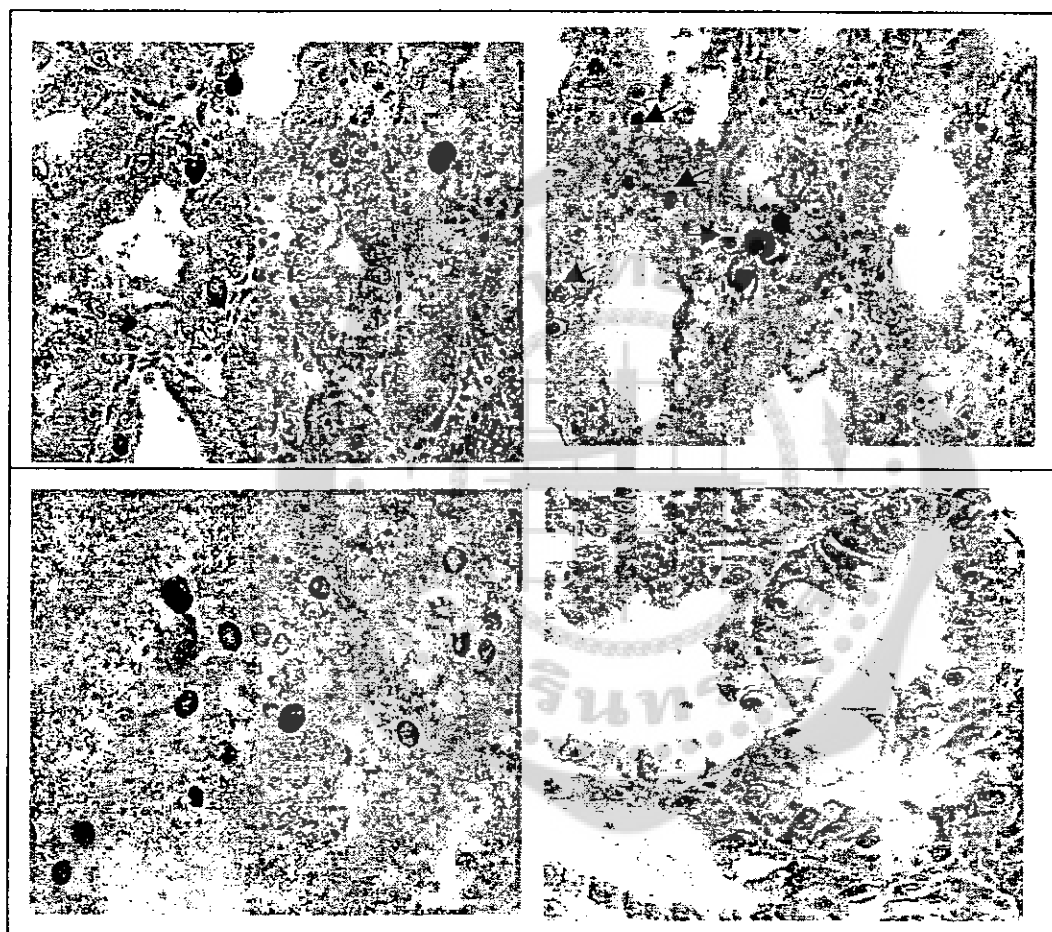


รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลที่ผลิตได้โดย Western blot analysis



รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีคัดเลือกว่า 4 โคลนโดยเทคนิค immunohistocmistry

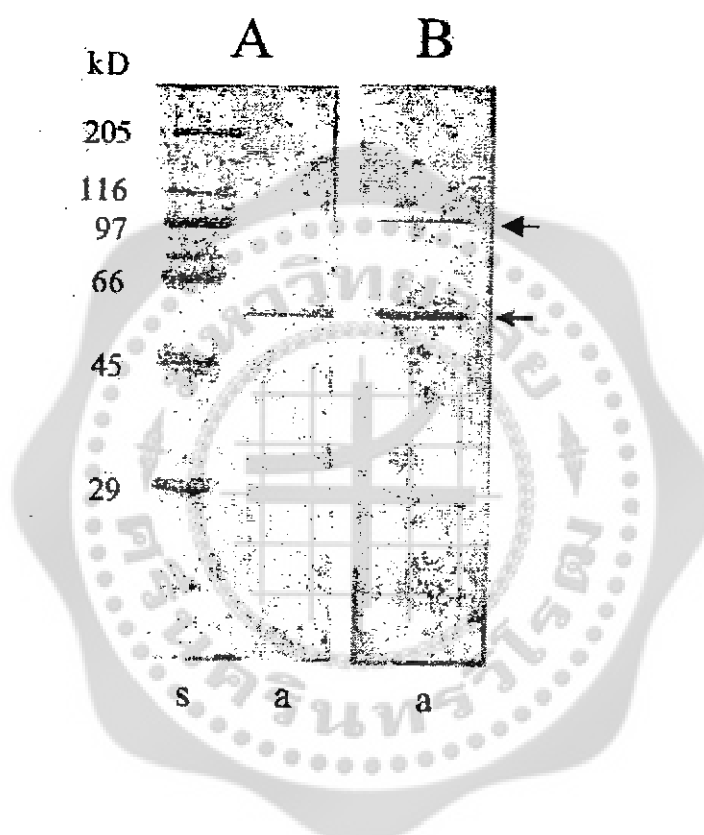
เมื่อเปรียบเทียบโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 4 โคลน พบว่า โคลน HPV16-9C ให้ผลการตรวจสอบที่ดีที่สุด ในรูปที่ 7 เป็นการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C อีกครั้งโดย immunohistochemistry จากรูปจะเห็นได้ว่า เซลล์ส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อจะให้สัญญาณที่เข้ม แต่มีบางเซลล์ที่ติดเชื้อแต่ไม่มีสัญญาณ ซึ่งคาดว่ามีความเสียหายจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ไม่สามารถเข้าถึงโปรตีนของไวรัสได้ อาจเนื่องมาจากมีความหนาแน่นของไวรัสในบริเวณนี้ มากเกินไป



Normal

รูปที่ 7 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C โดย immunohistochemistry ลูกศร แสดงให้เห็นเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแต่ไม่มีสัญญาณ

จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ต่อโปรตีนของไวรัส โดย Western blot อีกครั้ง พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C นอกจากจะสามารถจับกับโปรตีนหลักขนาด 54 kD ได้แล้วยังสามารถจับกับโปรตีนขนาด 97 kD ได้อีกด้วย (รูปที่ 8) และจากผลของ immunohistochemistry (รูปที่ 9) จะเห็นได้ว่า เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสส่วนมากจะให้สัญญาณการตรวจจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ได้ดี แต่จะมีบางเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแต่ไม่แสดงสัญญาณ (ลบครี)

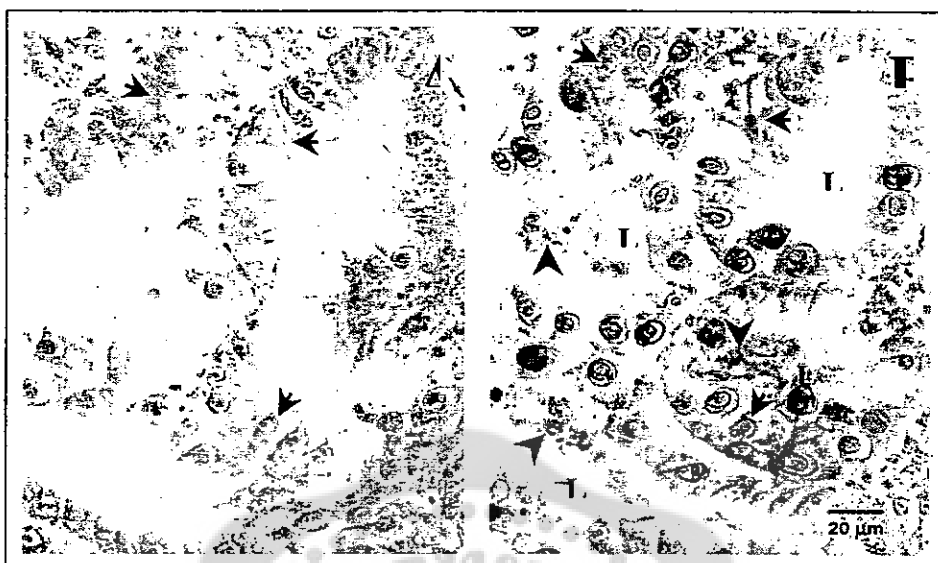


รูปที่ 8 SDS-PAGE (A) ของโปรตีนอนุภาคไวรัส HPV จากกึ่งกลาดำแคะที่ย้อมด้วย Coomassie blue

แถบ s = โปรตีนมาตรฐาน

a = โปรตีนจากอนุภาคไวรัส HPV

และ Western blot (B) ที่บ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV 16-9C ซึ่งจับกับโปรตีนขนาด 54 และ 97kD เมื่อเทียบกับโปรตีนใน SDS-PAGE (ลบครี)



รูปที่ 9 Immunohistochemistry ของ patopancreas จากกึ่งกุลาดำแคะ โดย (A) ไม่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (B) ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV 16-9C : immunoreactivity เข้ม พบใน basophilic intranuclear inclusion body

Subclass

subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของ hybridoma พบว่าเป็น IgG_{2b} 2 โคลน และ IgG₁ 2 โคลน (ตารางที่ 1) โมโนโคลนอลแอนติบอดี subclass IgG_{2b} ให้ผลในการตรวจสอบดีกว่า subclass IgG₁ 2 (รูปที่ 6 และ ตารางที่ 1)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HPV ที่ได้ อาจนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจ strip test เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวกโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือ สำหรับตัวอย่างที่ใช้ตรวจไม่จำเป็นต้องทำให้กึ่งตายเพื่อนำ hepatopancreas มาตรวจ เพราะเคยมีรายงานการใช้ feces ตรวจวินิจฉัย HPV โดยวิธี PCR ในกึ่งสกุล penaeid (Pantoja & Lightner 2000) และโดยวิธี *in situ* hybridization, dot blot hybridization และ PCR ในกึ่งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย (Phromjai *et al.* 2002) จึงเป็นการง่ายที่จะเก็บ feces ในภาคสนาม เพื่อนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

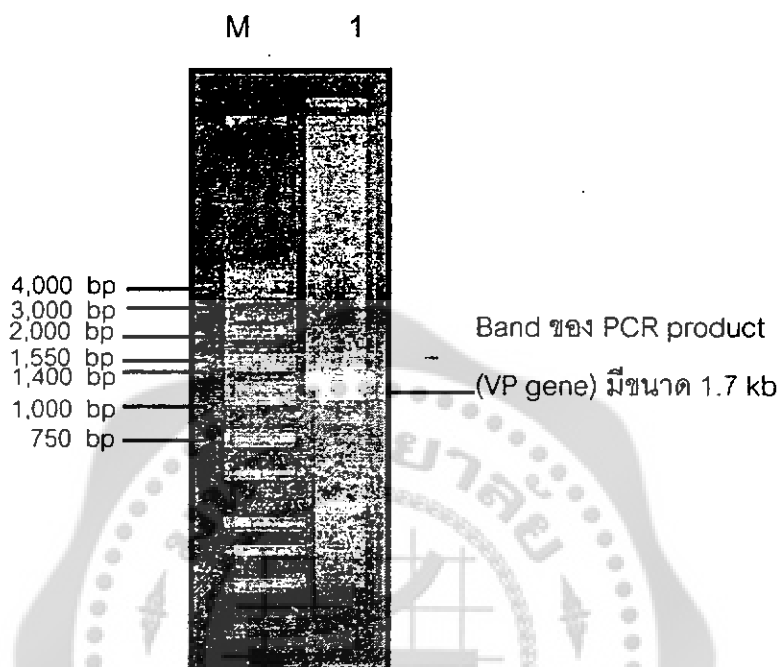
ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV

โมโนโคลนอล แอนติบอดี (subclass)	Dot blot	Immunohisto- chemistry	Western blot	ปฏิกิริยาข้ามกับไวรัส			
				YHV	Non-virulent YHV	MBV	WSSV
HPV 6-12B (IgG _{2b})	+	++	++	-	-	-	-
HPV 12-10C (IgG ₁)	+	+	+	-	-	-	-
HPV 16-9C* (IgG _{2b})	+	++	++	-	-	-	-
HPV 17-1G (IgG ₁)	+	+	+	-	-	-	-

- * ตัวแทนของโคลนที่ใช้ในการศึกษา
- ไม่แสดง immunoreactivity
- + แสดงผล immunoreactivity อ่อน
- ++ แสดงผล immunoreactivity เข้ม

การแยกยีนโปรตีนห่อหุ้ม (VP gene) ของไวรัส HPV โดย PCR

จากการแยกยีน VP โดยการทำให้ PCR ซึ่งใช้ primer HPV-F-KPN กับ HPV-R-HND พบว่าได้แถบ DNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 kb ดังรูปที่ 10



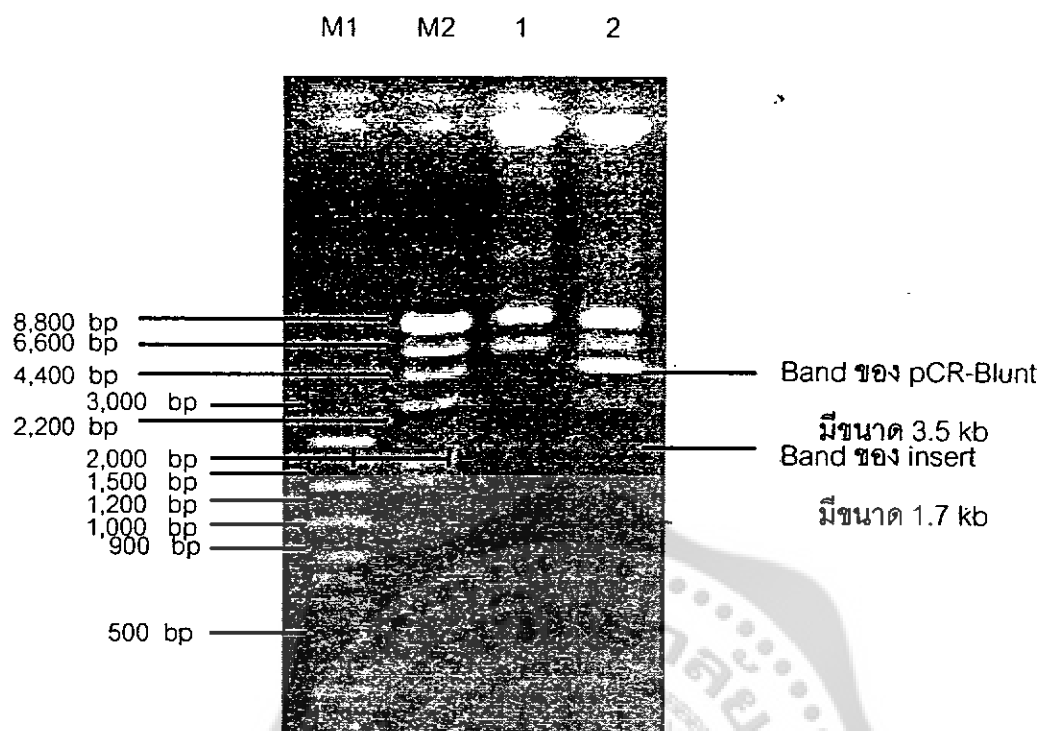
รูปที่ 10 การวิเคราะห์ PCR product จากการเพิ่มปริมาณยีน VP ของไวรัส HPV โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

แถวที่ M : Hi-Lo™ DNA Marker

แถวที่ 1 : PCR product ของ VP gene ซึ่งมีขนาด 1,7 kb

การตรวจสอบ DNA inserts ใน pCR-Blunt Vector โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการตรวจสอบ insert ใน pCR-Blunt โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Kpn* I ผลในรูปที่ 11 จะเห็นได้ว่า แถวที่ 1 ไม่มี insert แต่ในแถวที่ 2 สามารถตัดดีเอ็นเอได้ 2 ขนาด คือ 1.7 kb และ 3.5 kb ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีน VP และของ vector pCR-Blunt ตามลำดับ



รูปที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบ insert ใน pCR-Blunt vector โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Kpn* I โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

แถวที่ M1 : 100 bp Marker

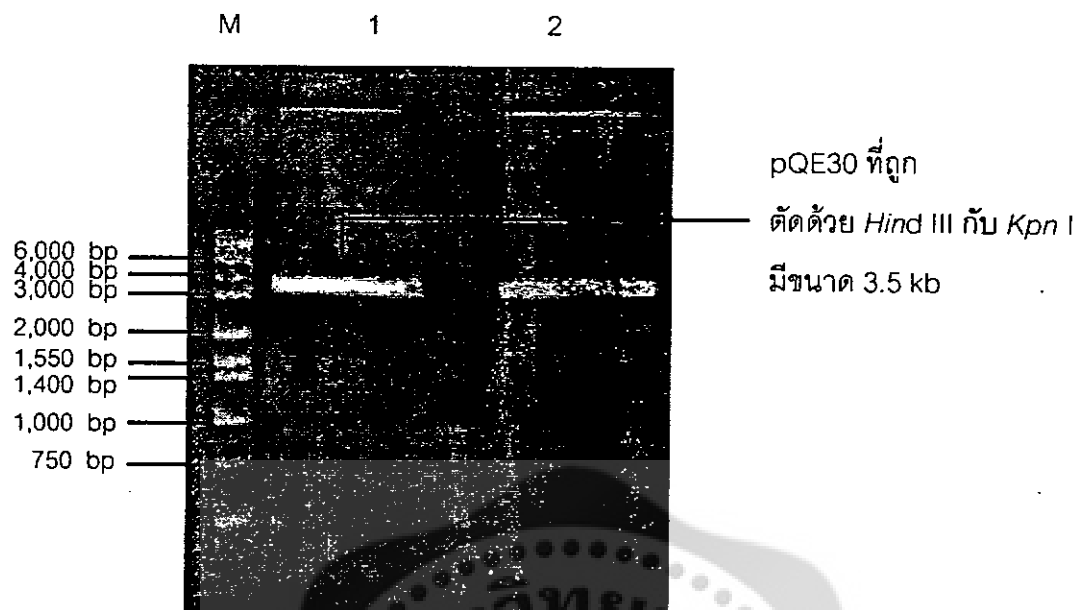
แถวที่ M2 : λ *Hind*III Marker

แถวที่ 1 : plasmid ไม่มี insert

แถวที่ 2 : recombinant ที่มี insert ใน pCR-Blunt

ผลการตัด pQE30 Expression Vector และตัด insert ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

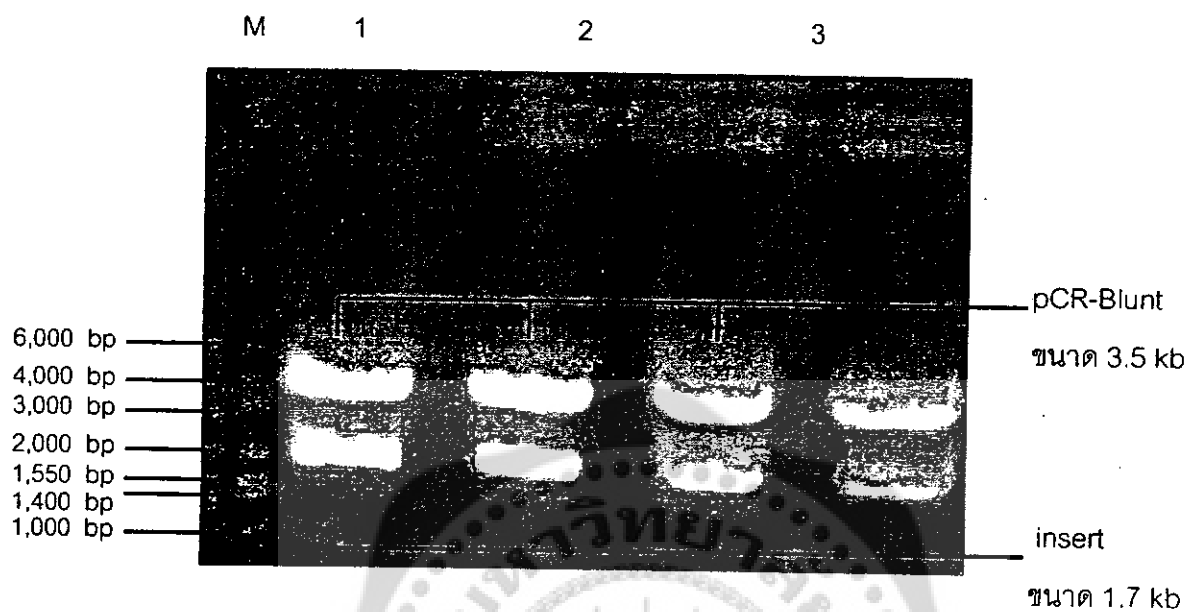
จากการตัด pQE30 Expression Vector และตัด insert ใน pCR-Blunt Vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III กับ *Kpn*I ผลปรากฏว่า ได้ขนาดตามที่ต้องการ คือ pQE30 Expression Vector มีขนาด 3.5 kb ดังรูปที่ 12 ส่วน insert ที่อยู่ใน pCR-Blunt มีขนาด 1.7 kb ดังรูปที่ 13 จากนั้นจะทำการโคลนยีน VP หรือ insert เข้าสู่ pQE30 Expression Vector



รูปที่ 12 การตัด pQE30 expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III กับ *Kpn* I

แถวที่ M : Hi-Lo™ DNA Marker

แถวที่ 1-2 : pQE30 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Kpn* I



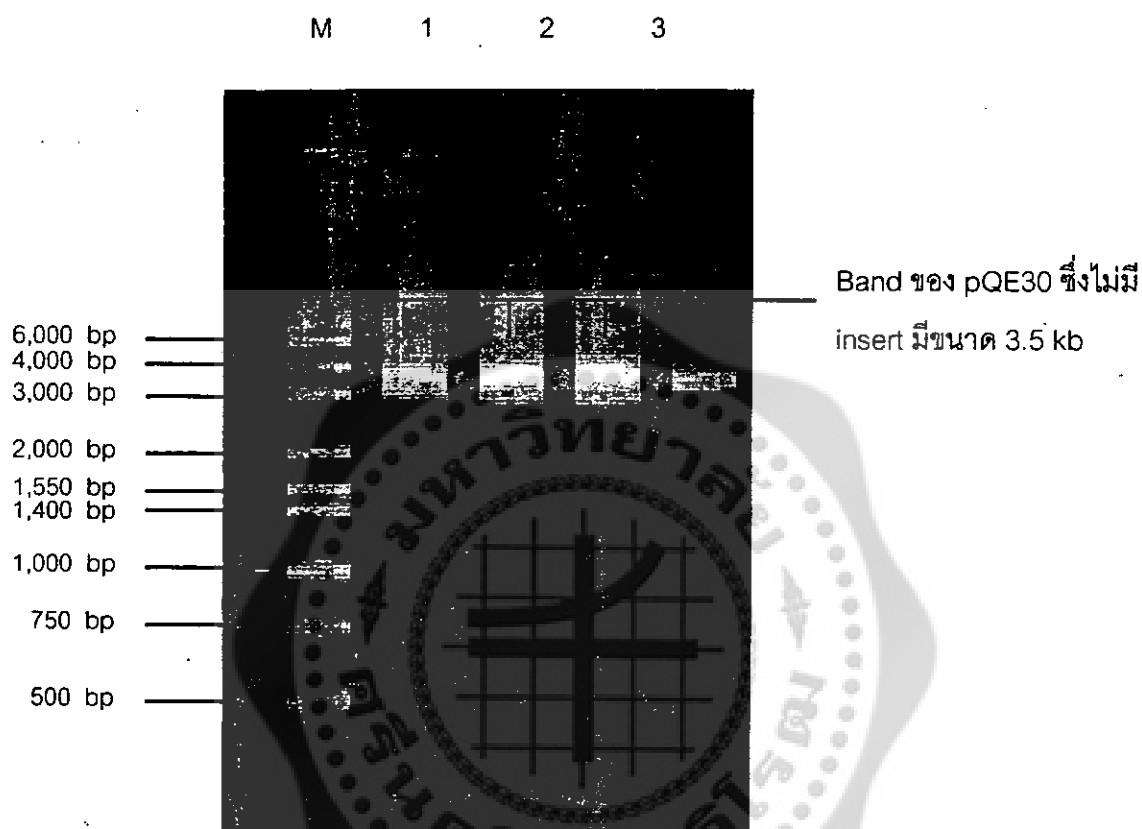
รูปที่ 13 แสดงผลการตัด insert ใน pCR-Blunt ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Kpn* I

แถวที่ M : Hi-LoTM DNA Marker

แถวที่ 1-4 : insert ใน pCR-Blunt ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Kpn* I

การตรวจสอบ VP gene ใน pQE30 expression vector โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการตรวจสอบ VP gene ใน pQE30 Expression Vector โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III กับ *Kpn* I ผลที่ได้ปรากฏว่า พลาสมิดที่สกัดได้ ไม่มี insert หรือ VP gene นั่นก็คือไม่ได้ recombinant plasmid ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจสอบ VP gene ใน pQE30 expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III กับ *Kpn* I

แถวที่ M : Hi-Lo™ DNA Marker

แถวที่ 1-4 : DNA ที่สกัดได้จากโคลนีนหมายเลข 1-4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทำวิจัยได้สกัดโปรตีนของไวรัสออกมาวิเคราะห์ พบโปรตีนหลัก 1 ชนิด ขนาด 54 kD ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานในไวรัส HPV ที่สกัดได้จากกิ้ง *P. chinensi* ซึ่งพบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสเป็น polypeptide 1 สาย ขนาด 54 kD (Bonami *et al.*, 1995) เนื่องจากโปรตีนของไวรัส HPV ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นจึงใช้ฉีดเข้าไปในหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการคัดเลือก hybridoma จำนวน 1,000 โคลน พบ 4 โคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับเซลล์ของตัวกิ้งติดเชื้อไวรัส HPV บริเวณ basophilic intranuclear inclusion bodies แต่ไม่จับกับเซลล์ปกติ และจากการทำ Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับได้ดีกับโปรตีนหลักของไวรัสขนาด 54 kD นอกจากนี้ยังสามารถจับโปรตีนขนาด 97 kD ได้อีกด้วย โปรตีนชนิดนี้คาดว่าเป็นโปรตีนต้นตอ (precursor) ของโปรตีนหลัก ที่ได้ผ่านกระบวนการ proteolytic cleavage แล้วทำให้มีขนาดเล็กลง และเคยมีรายงานเกี่ยวกับการมีกระบวนการนี้ในพาร์โวไวรัสในสัตว์ฟันแทะ (Rodent parvovirus) ในยีน VP2 จะถูกตัดหลังกรดอะมิโนอาร์จินีนที่อยู่หน้าบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนมาก ๆ (Glycine-rich region) สำหรับยีน VP ของไวรัส HPV ที่สร้างโปรตีนขนาด 97 kD มีกรดอะมิโนอาร์จินีนอยู่ 2 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถถูกตัดให้ได้โปรตีนขนาด ประมาณ 54 kD ได้ (personal communication) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงสามารถจับกับโปรตีนได้ 2 ขนาด ได้เนื่องจากมี epitope เหมือนกัน นอกจากนี้แล้วโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 ยังไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสอื่นที่อาจพบการติดเชื้อร่วมในกิ้งกุลาค่า ได้แก่ YHV, nonvirulent YHV, WSSV และ MBV ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ (ตารางที่ 1) .

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด อยู่ใน subclass IgG (IgG₁ และ IgG_{2b}) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความเสถียรมากกว่า subclass IgM ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่เคยผลิตได้เมื่อรายงานครั้งที่แล้ว โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี subclass IgG_{2b} มีจำนวน 2 โคลน สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสได้ดีกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี subclass IgG₁ โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี รหัส HPV16-9C ที่ให้สัญญาณในการตรวจสอบโดย immunohistochemistry เข้มที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีเซลล์ที่ติดเชื้อบางเซลล์ที่ไม่ให้สัญญาณกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเข้าไปไม่ถึงของแอนติบอดี เนื่องจากมี inclusion bodies หนาแน่น ปัญหาเช่นเดียวกันนี้เคยมีรายงานมาก่อนเมื่อใช้ DNA probe ในการทำ *in situ* hybridization (Sukhumsirichart *et al.*, 1999)

ในการผลิตชุดตรวจสอบชนิด Sandwich ELISA หรือชุดตรวจสอบอื่นๆ จำเป็นต้องมีแอนติเจนหรือโปรตีนของไวรัสจำนวนมาก ดังนั้นการโคลนนิ่งและการแสดงออกยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มของไวรัส HPV จะทำให้ได้โปรตีนของไวรัสมากพอที่จะนำไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมาก สำหรับผลิตชุดตรวจสอบชนิด Sandwich ELISA หรือชุดตรวจสอบอื่นๆ

จากการแยกยีน VP ซึ่งเป็นยีนส่วนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มของไวรัส HPV โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มขยายยีนของ VP โดยการทำให้ PCR ปรากฏว่าได้ PCR product ตามขนาดที่คาดไว้ คือ 1.7 kb และได้โคลนเข้าสู่ pCR-blunt vector ทำการคัดเลือก recombinant plasmid ที่มียีน VP อยู่ จากนั้นตัดยีนนี้ออกจาก pCR-blunt vector และโคลนเข้าสู่ pQE30 expression vector ผลที่ได้ปรากฏว่า ไม่มี recombinant plasmid เกิดขึ้น จึงได้เปลี่ยน Expression vector ใหม่แต่อยู่ในช่วงรอผล

แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากงานวิจัยนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส HPV ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสในกึ่งกลางดำโดยเทคนิค dot blot, immunohistochemistry ได้ สำหรับการพัฒนาชุดตรวจชนิด Sandwich ELISA หรือชุดตรวจอื่นๆ ที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและราคาถูก จำเป็นต้องรอการแสดงออกของโปรตีน เพื่อนำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมาก ต่อไป



เอกสารอ้างอิง

- ชะลอ ลิ้มสุวรรณ (2543) กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์
- Bonami JR, Mari, Poulos BT, Lightner DV (1995) Characterization of hepatopancreatic parvo-like Virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. J Gen Virol 76: 813-817
- Flegel TW, Fegan DF, Sriurairatana S (1993) Shrimp health management: an environmental Approach. In: Subasinghe RP, Shariff M (eds) Diseases in aquaculture : the current issues. Malaysian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, p1-41
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Pantoja CR, Lightner DV (2002) A non destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid Shrimp. Dis Aquat Org 39: 177-182
- Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, Lightner CV, Flegel Tw (2001) Different Reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean Hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Org 46: 153-158
- Phromjai J, Boonsaeng V, Withyachummarnkul B, Flegel TW (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai Shrimp *Tenaeus monodon* by in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. Dis Aquat Org 51: 227-232
- Sithigorngul P, Chauyuchwong P, Sithigorngul W, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Menasveta P (2000) Development of a monoclonal antibody specific to yellow head Virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 42: 27-34
- Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul W, Menasveta P (2002) Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 49: 71-76
- Spann KM, Aklard RD, Hudson DA, Pyecroft SB, Jones TC, Voigt MOC (1997) Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. Dis Aquat Org 31: 239-241

- Sukhumsirichart W, Wongteerasupaya C, Boonsaeng V, Panyim S, Sriurairatana S, Withayachummarnkul B, Flegel TW (1999) Characterization and PCR detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aquat Org* 38: 1-10
- Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, Withayachummarnkul B, Flegel TW, Boonsaeng V, Panyim S (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Molecular and Cellular Probes* 16: 409-413
- Sukhumsirichart W., C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, S.B. Withayachumnarkul, T.W. Flegel 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aquat Org*. 38: 1-10
- Sukhumsirichart W., C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, S.B. Withayachumnarkul, T.W. Flegel 1998. Genome organization and detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Advances in shrimp biotechnology*. p 261
- Flegel T.W., V. Thamavit, T. Pasharawipas, V. Alday-Sanz 1999. Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) *Aquaculture*. 174:197-206

Output

Publication :

1. การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ hepatopancreatic parvovirus ของกุ้งกุลาดำ
: วารสารศรินครินทรวิโรฒ (รอตีพิมพ์, 2547)
2. Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from
Penaeus monodon
: Disease of Aquaculture Organism (Submitted, 2004)



Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*.

Sombat Rukpratanporn¹, Wasana Sukhumsirichart², Parin Chaivisuthangkura³, Siwaporn Longyant³, Weerawan Sithigorngul³, Piamsak Menasveta¹ and Paisarn Sithigorngul³

¹Marine Biotechnology Research Unit at Chulalongkorn University, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology(BIOTEC), Bangkok 10330, Thailand.

²Department of Biochemistry, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand.

³Department of Biology, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand.

Corresponding author:

Dr. Paisarn Sithigorngul

Department of Biology

Faculty of Science

Srinakharinwirot University

Sukhumvit 23, Bangkok 10110,

Thailand.

Tel. No. (662) 664-1000-ext.8515

Fax. No. (662) 260-0127

E-mail paisarn@swu.ac.th

Text 9 Pages

2 Figures

1 Tables

Abbreviated: Monoclonal antibodies against hepatopancreatic parvovirus.

Key words: dot-blot, hepatopancreatic parvovirus (HPV), immunohistochemistry, monoclonal antibody, *Penaeus monodon*.

Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*.

Abstract

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) was isolated from hepatopancreas of slow growth *Penaeus monodon* by urografin gradient centrifugation. The presence of HPV in the fraction was monitored by PCR and SDS-PAGE. Only one major band of 54 kD protein was observed in the strongly PCR positive fractions that used for immunization in mice for monoclonal antibodies production. After cell fusion, the first step selection for the specific antibodies was performed by dot-blot over purified HPV viral particle. The second step of screening was done by Western blot of the purified HPV and immunohistochemistry of HPV-infected hepatopancreas. Four monoclonal antibodies were isolated; they bound to the 54 kD protein on Western blot analysis, and to intranuclear inclusion body in the hepatopancreatic epithelial cell of infected prawn by immunohistochemistry. None of the antibodies did showed cross-reactivity to either uninfected shrimp tissue or other shrimp viruses tested. It is promising to use these monoclonal antibodies for developing a highly sensitive immuno assay such as sandwich ELISA or a convenient kit for detection of HPV infection.

Introduction

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) has been known to infect several penaeid shrimp in Asian Australian and African region since 1985 (Lightner et al., 1993) and the first report was found in Thailand in *Penaeus monodon* in 1993 (Flegel et al., 1993). Shrimp infected with HPV usually showed non-specific gross sign of disease; however, the infection of HPV are statistically related to retarded growth in *P. monodon* (Flegel et al., 1999). HPV particle is an icosahedral shape approximately 22 nm in diameter containing ssDNA of 6 kb in size which encodes a single polypeptide of 54 kD. The virus was classified into the Parvoviridae family based on these characteristics (Bonami et al., 1995; Spann et al., 1997; Sukhumsirichart et al.,

1999). HPV detection was traditionally dependent upon the histological demonstration of basophilic intranuclear inclusion by H&E or Giemsa staining (Lightner, 1996). DNA probe and PCR primer have been developed and proven to be a powerful tool for diagnosis of shrimp HPV infection (Sukhumsirichart et al., 1999; 2002; Pantoja & Lightner 2000, Phromjai et al., 2001; 2002). Under the optimized conditions, approximately equivalent to 300 viral particles could be detected (Pantoja & Lightner, 2000). However, there are practical limitations of using PCR for their widespread applications including the need for special equipments, highly trained personnel and expensive cost for small sample numbers. Moreover, HPVs isolated from different shrimp species and geographic regions; *P. chinensis* from Korea (Bonami et al., 1995), *P. monodon* from Thailand (Sukhumsirichart et al., 1999) and *Macrobrachium rosenbergii* from Malaysia (Lightner et al., 1994), seem to be different isolate, therefore, the primers designed for HPV from *P. chinensis* were not particularly efficient for PCR amplification of HPV DNA from *P. monodon* (Phromjai et al., 2001).

Immunological based diagnosis, especially monoclonal antibody, has been proven to be an alternative effective method for diagnosis of various viral infected diseases (Sithigorngul et al., 2002) and can be modified to various techniques used including a convenient diagnostic kit. This study is an preliminary trial to produce monoclonal antibody specific to HPV in order to develop a high sensitive and convenient test kit for HPV detection in the future.

Methods

Antigen preparation

Retard growth shrimps *P. monodon* (1-5g) were collected from ponds in Chonburi province, Thailand. Hepatopancreas was dissected out and frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -70°C until use. The hepatopancreas was homogenated in NaCl-Tris-EDTA buffer (NTE; 0.2 M NaCl, 0.02M Tris-HCl, 0.02M EDTA pH 7.4). The cell debris was separated out by centrifugation at 7,000 and 13,000xg for 15 min each. The supernatant was centrifuged at 140,000xg for 1 hr and the pellet was resuspended and further separated by gradient ultracentrifugation in (20-40%) urografin for 3 hr. The fractions were collected, diluted with NTE and centrifuged at 140,000xg for 3 hr. The pellet was resuspended in Tris-EDTA buffer (TE; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.4) at 4°C and checked for the presence of HPV by PCR and SDS-PAGE. The positive fractions were divided into small

aliquots and stored at -70°C . The viral suspension was used for immunization, screening of MAbs by dot blot and Western blot.

Part of purified virus was denatured by mixing with treatment buffer (SDS and β -mercaptoethanol) dialyzed against phosphate buffered saline (PBS; 0.15 M phosphate buffered saline, pH 7.2), then divided into small aliquots and used for immunization.

Part of HPV-infected hepatopancreas was fixed in Davidson's fixative and processed for paraffin sectioning and used for immunohistochemical screening of antibody against HPV.

PCR detection of HPV

The HPV specific primer sets 121F (5'GCA CTT ATC ACT GTC TCT AC 3") and 276R (5'GTG AAC TTT GTA AAT ACC TTG 3") were used in PCR amplification. A stored viral fraction was thawed and treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of proteinase K for 30 min at 37°C followed by 0.5% sarkosyl treatment for 1 hr at 65°C . The nucleic acid was then extracted using phenol and chloroform-isoamyl alcohol (24:1:1 v/v) and precipitated with 70% ethanol. The DNA pellet was washed with 70% ethanol, air dried and resuspended in TE buffer. The purified DNA was amplified by PCR in a 50 μl reaction mixture as described by Sukhumsirichart et al., (1999), and PCR product of 156 bp was a specific DNA fragment for HPV detection.

Immunization

Three Swiss albino mice were first immunized intraperitoneally with 100 μl of denatured HPV (0.2 mg/ml) mixed with complete Freund's adjuvant (1:1). Mice were boosted with the same preparation mixed with incomplete Freund's adjuvant 3 times at 2 weeks intervals. After the forth injection, sera were collected and tested for HPV immunoreactivity by immunohistochemistry and Western blot.

Monoclonal antibody production

The best performing mouse was boosted 3 days before hybridoma production. A cell fusion procedure was adapted from the method developed by Köhler & Milstein (1976), with modifications described by Mosmann et al. (1979). A P3X myeloma cell line was used as the fusion partner. Fusion products from 1 mouse were plated on 30 microculture plates (96

wells/plate). After identification of positive cultures by screening methods described below, cell were recloned by the limiting dilution method.

Screening methods

Dot-blotting: Purified virus (0.1 mg/ml) was spotted on nitrocellulose membrane (1 µl/spot), subsequently baked at 60 °C for 10 min and then incubated with hybridoma conditioned media from each culture well (1:20 dilution in 5% Blotto: 5% nonfat dry milk, 0.1% Triton-X-100 in PBS) for 4 hr. After extensive washing in 0.5% Blotto, the membrane was incubated in horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP; BioRad) at 1:1000 dilution for 3 hr. The membrane was then washed extensively as before and incubated in a substrate mixture containing 0.006% hydrogen peroxide, 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.05% cobalt chloride in PBS. Hybridoma clones producing antibodies that displayed immunoreactivity were confirmed for viral specificity by Western blot and immunohistochemistry before cloning and cryo-preservation for further investigation.

Western blot: partially purified HPV were separated by 10% SDS-PAGE according to the method described by Laemmli (1970). Samples were electrophoresed for 1 hr at 100 V and part of the gel was stained using Coomassie brilliant blue R-250. For Western blot analysis, the samples resolved by SDS-PAGE were electroblotted onto nitrocellulose membranes using a Transblot apparatus (BioRad). The nitrocellulose membrane was incubated in 5% blotto for 10 min, treated with 1:200 of each monoclonal antibody for 4 h and then processed as described above in the dot blotting section.

Immunohistochemistry: Cephalothoraces from HPV infected prawns were fixed in Davidson's fixative solution for 24 hr before processing for paraffin sectioning. Serial sections (8 µm thickness) were prepared and processed for indirect immunoperoxidase staining using various monoclonal antibodies and GAM-HRP diluted 1:1000 with 10% calf serum in PBS. Peroxidase activity was revealed by incubation with 0.03% DAB and 0.06% hydrogen peroxide in PBS. Preparations were counterstained with haematoxylin and eosin Y (H&E), dehydrated in graded ethanol series, cleared in xylene and mount in permount (Sithigorngul et al., 1999). Positive reactions were visualized as brown coloration against pink cytoplasm and purple nuclei.

Tissues from *P. monodon* infected with YHV, nonvirulent YHV, MBV and WSSV, were also used to determine the cross-reactivity of the MAbs by immunohistochemistry.

Characterization of monoclonal antibodies

Class and subclass determination: Class and subclass of mouse immunoglobulins produced by the hybridomas were determined by sandwich ELISA using Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP).

Results and Discussion

From SDS-PAGE analysis of partially purified HPV, revealed a major band of 54 kD protein (Fig. 1A), which similar to that reported in *P. chinensis* (Bonami et al., 1995). Therefore the purity of the preparation was highly enough to use for immunization. After the fourth immunization with HPV preparations, antisera from all three mice bound specifically to basophilic intra-nuclear inclusion bodies of HPV-infected cells of hepatopancreas by means of immunohistochemistry and showed two strongly specific bands at 54 and 97 kD by means of Western blot. Then one mouse was used as spleen donor. The yield of hybridoma clones was approximately 1,000 clones (30% of wells from the 30 plates) and only 10 clones demonstrated the specific binding to viral protein by dot blot assay. After Western blot and immunohistochemistry analyses, only four clones showed specific binding to 54 kD protein (Fig. 1B), and to basophilic intra-nuclear inclusion bodies HPV-infected cells of hepatopancreas without any immunoreactivity to uninfected tissues (Fig. 2). The antibody also recognized the 97 kD protein. This protein may be the precursor of the 54 kD protein since it appeared as a minor protein but shares the same epitope of the major protein (54 kD). The specificity of the selected MAbs was tested by applying of all MAbs to the tissues infected with YHV, nonvirulent YHV, WSSV, and MBV for immunohistochemical analysis, no immunoreactivity was observed in all preparations (Table 1.).

From immunohistochemical studies using HPV16-9C antibody, some inclusion bodies were not recognized (Fig. 2) This similar result was also observed in *in situ* hybridization using *P. monodon* HPV probe (Sukhumsirichart et al., 1999). The unstained inclusion bodies may be

due to the high density of the inclusion bodies that may prevent the accession of the antibody, or the prawns may be infected with a mixture of different populations of HPV-like viruses.

All MAbs are IgG class; two of them are IgG₁ and the other two are IgG_{2b} (Table 1). The two MAbs of IgG_{2b} subclass seem to bind to the HPV-protein stronger than that of the other two antibodies of IgG₁. These MAbs may be useful for further development of a highly sensitive immuno-assay such as sandwich ELISA for HPV detection in feces similar to the PCR method (Pantoja & Lightner, 2000). A convenient strip test is be another choice for rapid assay in field test. However, more MAb generation is needed for production of antibodies against various epitopes in order to increase the sensitivity of the assay. Therefore, molecular cloning and expression of HPV protein will be useful approach for production of high quantity antigen for production of polyclonal antibody in rabbit.

Acknowledgement

This work was supported by Research Support Division, Srinakharinwirot University.

References

- Bonami JR, Mari J, Poulos BT, Lightner DV (1995) Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. J Gen Virol 76:813-17.
- Flegel TW, Sriurairatana S (1993) Black tiger prawn diseases in Thailand. In : Akiyama DM (ed) Tech Bull American Soybean Assoc, Singapore AQ39/1993 (3), SectB p 1-30.
- Flegel TW, Thamavit V, Pasharawipas T, Alday-Sanz V (1999) Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 174:197-206.
- Köhler G, Milstein C (1976) Derivative of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. Eur J Immunol 6:511-519.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lightner DV (1996) A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA

Lightner DV, Redman RM, Moore DW, Park MA (1993) Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture* 116:15-23.

Lightner DV, Redman RM, Poulos BT, Mari JL, Bonami JR, Shariff M (1994) Distinction of HPV- type virus in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. *Asian Fish Sci* 7:267-272.

Mosmann TR, Bauman R, Williamson AR (1979) Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. *Eur J Immunol* 9:511-516.

Pantoja CR, Lightner DV (2000) A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 39:177-82.

Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, Lightner DV, Flegel TW, (2001) Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 46:153-158.

Phromjai J, Boonsaeng V, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. *Dis Aquat Org* 51:227-232.

Sithigorngul P, Panchan N, Vilaivan T, Sithigorngul W, Petsom A (1999) Immunochemical analysis and immunohistochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone

from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. Comp Biochem Physiol 124B:73-80.

Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul W, Menasveta P (2002) Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 49:71-76.

Spann KM, Adlard RD, Hudson DA, Pyecroft SB, Jones TC, Voigt MOC (1997) Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. Dis Aquat Org 31:239-241.

Sukhumsirichart W, Wongteerasupaya C, Boonsaeng V, Panyim S, Sriurairatana S, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1999) Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. Dis Aquat Org 38:1-10.

Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, Withyachumnarnkul B, Flegel TW, Boonsaeng V, Panyim S (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. Mol Cell Probes 16:409-13.

Table 1. Characterization of monoclonal antibodies specific to HPV

MAb (subclass)	Immuno detection method			Cross-reactivity to other viruses			
	Dot blot	Western blot	IHC	YHV	YHV (nonvirulent)	WSSV	MBV
HPV6-12B (IgG _{2b})	+	++	++	-	-	-	-
HPV12-10C(IgG ₁)	+	+	+	-	-	-	-
HPV16-9C* (IgG _{2b})	+	++	++	-	-	-	-
HPV 17-1G(IgG ₁)	+	+	+	-	-	-	-

*represent antibody used for characterization.

- = no immunoreactivity

+ = light immunoreactivity

++ = strong immunoreactivity

IHC = Immunohistochemistry

Figure Legends

Figure 1. SDS-PAGE and Western blot analysis (A) SDS-PAGE of HPV preparation stained with Coomassie blue. (B) Western blot of HPV preparation treated with HPV16-9C monoclonal antibody, which bind to the main protein band at 54 kD (arrow) and minor band at 97 kD.

(s) = standard proteins, (a) = HPV preparation.

Figure 2. Immunohistochemistry of hepatopancreas from retard growth *P. monodon*. (A) tissue section stained with H&E without antibody treatment. (B) the nearby section treated with HPV16-9C monoclonal antibody and counter stained with H&E. Arrows indicated immunoreactivity in early HPV infection nuclei. The HPV immunoreactivity is observed in the lumen (L) of pancreatic tubule as well (arrow head).

Figure 1

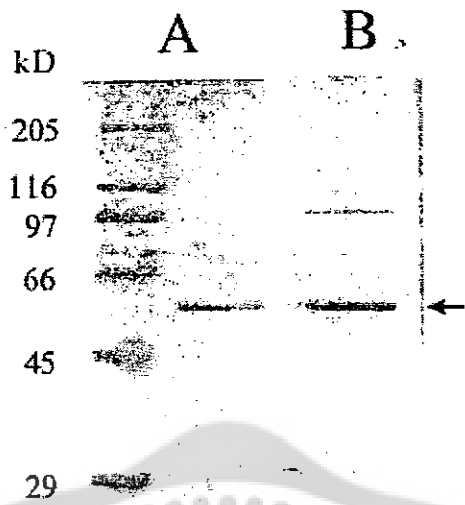
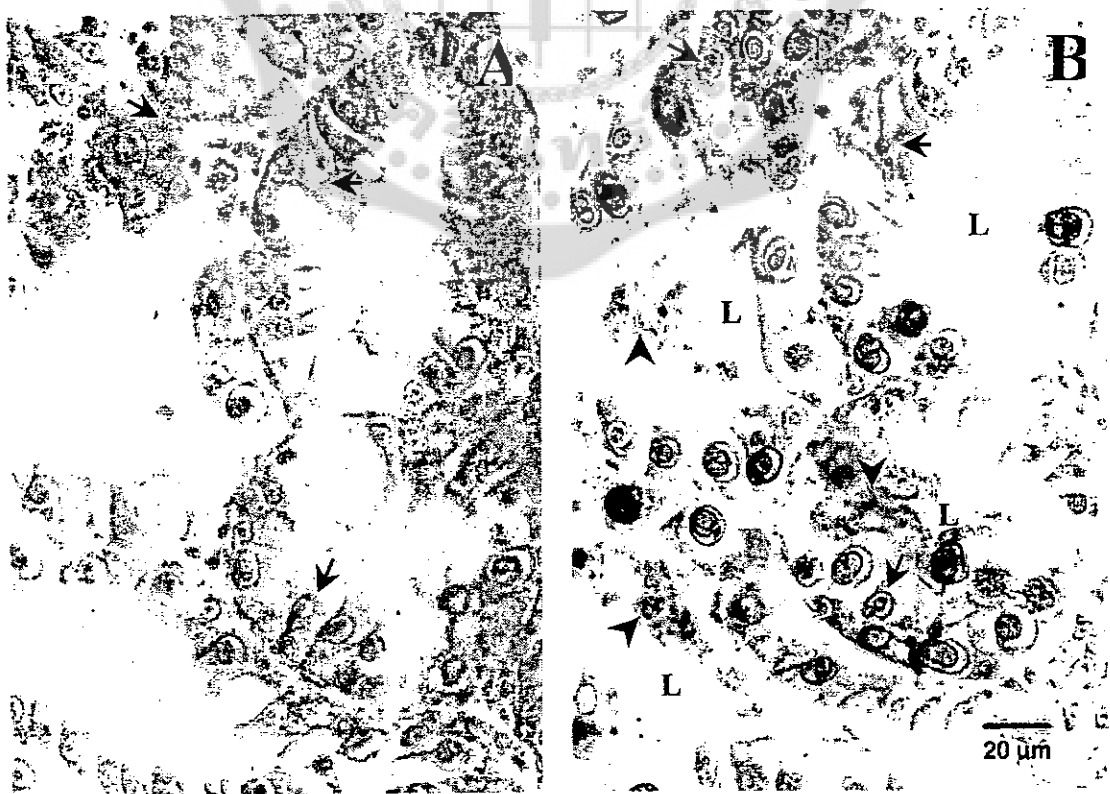


Figure 2



การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ hepatopancreatic parvovirus ของกุ้งกุลาดำ
 DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST
 HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS (HPV) IN PENAEUS MONODON

สมบัติ 1, วาสนา สุขุมศิริชาติ², ศิวาพร ลงยันต์³, ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิขางกูร³, วีรวรรณ สิทธิกรกุล³, ไพศาล สิทธิกรกุล³ และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต¹

Sombat Rukpratanporn¹, Wasna Sukhumsirichart², Siwaporn Longyant³, Parin Chaivisuthangkura³, Weerawan Sithigorngul³, Paisam Sithigorngul³ and Piamsak Menasveta¹

¹Marine Biotechnology Research Unit at Chulalongkorn University, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Bangkok 10330, Thailand.

²Department of Biochemistry, faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand.

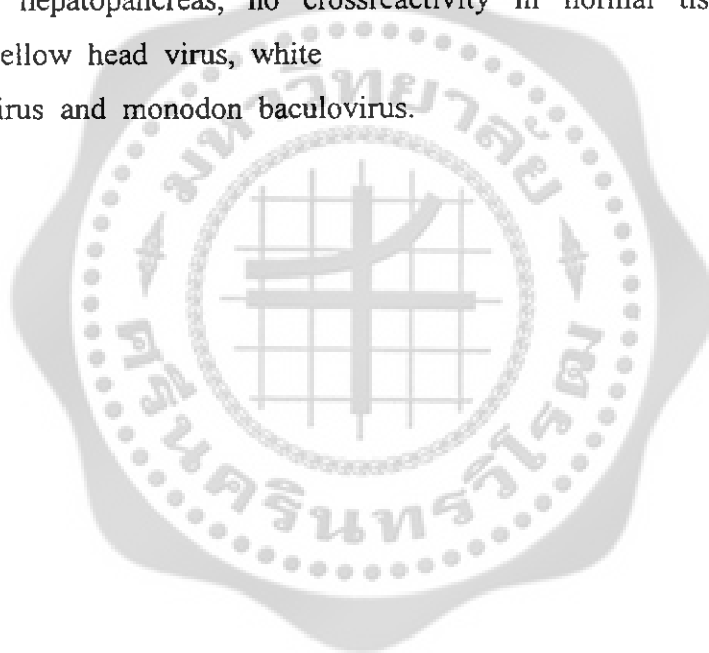
³Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand.

e-mail address : HYPERLINK mailto:sombat@biotec.or.th

sombat@biotec.or.th

บทคัดย่อ : ได้ทำการแยก Hepatopancreatic parvovirus (HPV) จากตับของกุ้งกุลาดำที่มีลักษณะแกระแกร็น โดยวิธี urografin gradient ultracentrifugation นำ fractions ที่มีอนุภาคไวรัส มาวิเคราะห์หาโปรตีน โดย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนหลักมีขนาด 54 kD เมื่อนำไวรัสที่เตรียมได้ไปทำให้เสียสภาพโดย SDS แล้วนำไปฉีดหนูขาวเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ปรากฏว่าสามารถคัดเลือก hybridoma ได้ 4 โคลน ที่ให้ผลบวกกับ dot blot และ immunohistochemistry ซึ่งแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนสามารถจับได้ทั้งโปรตีนในสภาพธรรมชาติและถูกทำให้เสียสภาพ จากการวิเคราะห์โดย Western blot พบว่าแอนติบอดีจับกับโปรตีนขนาด 54 kD และจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการติดเชื้อ HPV โดยวิธี immunohistochemistry พบว่าแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับนิวเคลียสของเซลล์ที่แสดงลักษณะ basophilic intranuclear inclusion bodies เท่านั้น โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกุ้งปกติ และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสอื่น ๆ เช่น yellow head virus (YHV) white spot syndrome virus (WSSV) และ monodon baculovirus (MBV)

Abstract : Hepatopancreatic parvovirus was isolated from hepatopancreas of stunt *Penaeus monodon* by urografin gradient ultracentrifugation. Fractions containing highest amount of viral particles were analysed by SDS-PAGE. The major protein band was found at 54 kD. The viral preparation was injected into Swiss mouse for production of monoclonal antibody. Four hybridoma clones were identified by dot blot and immunohistochemistry screening. Four monoclonal antibodies can bind to both native and denatured protein. Western blot analysis revealed that all of these antibodies bind to a protein with molecular mass of 54 kD protein. The detection of HPV infection by immunohistochemistry method revealed the immunoreactivity only in the basophilic intranuclear inclusion bodies of the infected cells of hepatopancreas, no crossreactivity in normal tissue and other viruses such as yellow head virus, white spot syndrome virus and monodon baculovirus.



บทนำ

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) เป็นไวรัสที่พบการติดเชื้อในกุ้งสกุล *penaeid* ในประเทศไทย พบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2535 (Flegel et al. 1993) แต่ความสูญเสียของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส HPV ยังไม่มีการสรุปอย่างชัดเจน เนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีความรุนแรงต่ำ เมื่อเทียบกับไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus : YHV) และไวรัสโรคตัวแดงจุดขาว (white spot syndrome virus : WSSV) ปัจจุบันเชื่อว่าเป็นสาเหตุหนึ่งในการทำให้กุ้งกุลาดำในบ่อมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าปกติ ยังผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งมีผลผลิตลดลงต่ำกว่าปกติมาก (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ 2543; Sukhumsirichart et al. 1999) จากการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า HPV เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อไวรัสประมาณ 22-24 nm รูปร่างเป็นแบบ icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (unenveloped viral particles) มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายเดี่ยว (single-stranded DNA : ssDNA) จัดอยู่ในวงศ์ Parvoviridae (Bonami et al. 1995; Spann et al. 1997; Sukhumsirichart et al. 1999) และจากการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของ HPV พบโปรตีนเพียงชนิดเดียวเป็น polypeptide มีน้ำหนักโมเลกุล 54 kD (Bonami et al. 1995)

กุ้งที่ติดเชื้อ HPV จะไม่พบอาการภายนอกที่จำเพาะและเด่นชัด (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ 2543) จึงต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histopathology) ซึ่งวิธีการนี้จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ มีประสบการณ์สูง และการตรวจการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นยังไม่สามารถวินิจฉัยได้แน่นอน ส่วนการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี PCR มีการใช้อย่างแพร่หลาย (Sukhumsirichart et al. 1999 ; Pantoja & Lightner 2000; Phromjai et al. 2001 ;2002) เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูงมาก สามารถตรวจหา DNA ของไวรัสอย่างน้อยสุด 1 fg ซึ่งเท่ากับอนุภาค HPV 300 อนุภาค (Sukhumsirichart et al. 1999 ; Pantoja & Lightner 2000) แต่มีข้อจำกัดหลายอย่างคือต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง ห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน ค่าใช้จ่ายในการตรวจมีราคาสูง และต้องสัมผัสกับสาร ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้วิธี PCR ยังมีการดัดแปลงผสมผสานวิธี PCR กับ ELISA เข้าด้วยกัน โดยใช้หลักการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR และวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของเชื้อ HPV ด้วยวิธี ELISA (Sukhumsirichart et al. 2000) มีข้อดีโดยไม่ต้องใช้ ethidium bromide เป็นตัวย้อมผลผลิต PCR แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอื่น ๆ เหมือนวิธี PCR ปกติ การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ และมีรูปแบบกระบวนการวินิจฉัยต่าง ๆ หลายรูปแบบ สามารถปรับปรุงพัฒนาเป็นชุดตรวจ strip test ที่ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีราคาต่ำ สำหรับในกุ้งกุลาดำโดยเฉพาะไวรัสโรคหัวเหลือง ได้มีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนของไวรัสโรคหัดเหลืองที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD (Sithigorngul et al. 2000; 2002) โดยสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคหัดเหลืองได้ตั้งแต่การติดเชื้อระยะเริ่มแรก และการติดเชื้อในสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ การศึกษาครั้งนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HPV เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HPV และคาดว่าจะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่รวดเร็วได้ในอนาคต

วิธีทดลอง

การเตรียม HPV ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

เก็บ hepatopancreas ของกิ้งกูดดำแคระ จากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี มาแช่แข็งทันทีในไนโตรเจนเหลว นำไปบดให้ละเอียดด้วย homogenizer ใน NaCl-Tris-EDTA buffer (NTE; 0.2 M NaCl, 0.02M Tris-HCl, 0.02M EDTA pH 7.4) และปั่นให้ตกตะกอน 2 ครั้งที่ 3,000 และ 15,000 รอบต่อนาที ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วย ultracentrifuge ที่ความเร็ว 140,000 xg เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตะกอนที่ได้นำมาละลายแล้วปั่นผ่าน urografin 15% ถึง 40% ที่ความเร็ว 140,000 xg เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที ดู fractions ที่ได้ไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 140,000 xg เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บตะกอนอนุภาคไวรัส และละลายใน Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.4) นำไปตรวจหาโปรตีนของไวรัสด้วย SDS-PAGE ก่อนนำไปใช้เป็น antigen สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันให้หนู Swiss mouse และใช้เป็นโปรตีนสำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Dot blotting และ .strn lot

hepatopancreas ของกิ้งกูดที่ติดเชื้อ HPV อีกส่วนหนึ่ง รวบรวม fix ใน Davidson's fixative สำหรับใช้ในการทดสอบการติดเชื้อ HPV โดยวิธี immunohistochemistry

การปลูกภูมิคุ้มกัน

หนู Swiss mouse 3 ตัว นำมาฉีดด้วย HPV ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการข้างต้นประมาณ 0.2 mg/ml โดยทำให้เสียสภาพด้วย SDS และ (-mercaptoethanal หลังจากนั้น dialyze ในน้ำกลั่น เพื่อกำจัด SDS และ (-mercaptoethanal ออกไป นำไปฉีดหนู 100 (1 ต่อตัว โดยครั้งแรกผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 หลังจากนั้นฉีดซ้ำ 3 ครั้งด้วย HPV ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บซีรัม นำมาทดสอบกับ HPV ที่เตรียมได้โดยวิธี dot blot และทดสอบกับเนื้อเยื่อส่วน hepatopancreas จากกิ้งกูด และกิ้งกูดที่ติดเชื้อ โดยวิธี immunohistochemistry หนูตัวที่ตอบสนองดีจะถูกปลูกภูมิคุ้มกันซ้ำก่อน

ที่จะเริ่มทำ fusion 3 วัน

การผลิต hybridoma

นำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย HPV ที่ตอบสนองดีที่สุดมาแยก spleen cell นำมาหลอมรวมกับ myeloma cell โดยใช้ polyethelene glycol กระจายเซลล์ออกเลี้ยงใน 96 well microculture plate จำนวน 30 plate จำนวน 30 plate/fusion เลือก hybridoma clone ที่สร้าง Mab ต่อ HPV เซลล์ที่ถูกคัดเลือกลำมา reclone อีกสองครั้ง โดยวิธี limitation dilution method (Sithigorngul et al. 2000)

การคัดเลือก hybridoma

ทำการคัดเลือก hybridoma clone ที่สร้าง Mab จำเพาะต่อ HPV ขั้นตอนแรกโดย dot blotting จากนั้นนำมาคัดเลือกลงโดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry

Dot blotting

ใช้ HPV ที่เตรียมได้ข้างต้นนำมาทำให้เสียสภาพด้วย SDS และ (-mercaptoethanal แล้ว dialyze ในน้ำกลั่น เพื่อกำจัด SDS และ (-mercaptoethanal ออกไป นำมาหยดบนกระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 (/หยด อบที่ 60(C เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จาก hybridoma ในแต่ละหลุม (เจือจาง 1:20 ใน 5% blotto = 5% non - fat dry milk 0.1% triton X 100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto นำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP; Niotsk) เจือจาง 1 : 1,500 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างใน 0.5% blotto และบ่มให้สารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เลือก hybridoma clone ที่แสดงปฏิกิริยากับ HPV ที่เตรียมได้ นำมาคัดเลือกลงโดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry ก่อนนำไป reclone และ Cryopreservation สำหรับการศึกษาต่อไป

SDS-PAGE และ Western blot

HPV ที่เตรียมได้ นำมาแยกใน 10% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดย electrophoresis ที่ 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บางส่วนของ gel นำมาย้อมโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue R - 250 บางส่วนนำมาถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่กระดาษ nitrocellulose โดยใช้ transblot apparatus (BioRad) สำหรับกระบวนการ Western blot จากนั้นนำ nitrocellulose membrane จุ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มใน Mab แต่ละชนิดเจือจาง 1 : 200 ใน 5% blotto เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับกรณีของ

dot-blot เพื่อหาตำแหน่งของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

Immunohistochemistry

hepatopancreas ของกุ้งปกติและกุ้งที่ติดเชื้อ HPV รวมรวมแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 (m คัดบนสไลด์ นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านมาลง butanol (100%) 95% - 70% ethanol และน้ำ บ่มใน Mab ชนิดต่าง ๆ เจือจางประมาณ 1 : 5 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่ 37(C ล้าง section ด้วย PBS บ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1 : 1,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂ ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin Y (H & E) ค้างน้ำด้วย ethanol เปอร์เซ็นต์ต่าง butanol ทำให้ใส่ใน xylene ทำเป็น slide ถาวรโดยใช้ permount บริเวณที่ติดเชื้อไวรัส HPV จะปรากฏเป็นสีน้ำตาล

การตรวจสอบ class และ subclass ของ Mab

Class และ subclass ของ mouse immunoglobulin สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของ hybridoma ตรวจสอบโดย sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

HPV จากกึ่งกลาดำแคะที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี urografin gradient ultracentrifugation นำมาวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนมีขนาด 54 kD เป็นโปรตีนหลัก (รูปที่ 1) สอดคล้องกับ Bonami et al (1995) ที่พบโปรตีนของ HPV ใน *P. chinensis* เป็น polypeptide มีขนาด 54 kD

จากการหลอมรวมเซลล์จากม้ามหนู 1 ตัวได้ hybridoma clones ประมาณ 1,000 โคลน (30% จาก 30 plates) พบว่าเซลล์เหล่านี้สร้างแอนติบอดีที่ให้ผลบวกต่อไวรัสโดยวิธี dot blot 30 โคลน แล้วนำไปตรวจสอบต่อด้วยวิธี Western blot และ immunohistochemistry พบ 4 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 54 kD (รูปที่ 2) และทั้ง 4 โคลนก็สามารถจับกับ asophilic intrauclear inclusion body ในเซลล์ของ hepatopancreas ของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ HPV (รูปที่ 2 B) โดยไม่พบปฏิกิริยาใด ๆ กับเนื้อเยื่อ hepatopancreas ของกึ่งกลาดำปกติ นอกจากนั้นยังไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสอื่น ๆ ได้แก่ YHV, non-virulent YHV, MBV และ WSSV (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ HPV เนื่องจากไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกึ่งกลาดำปกติ และเนื้อเยื่อของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวอื่น ๆ (ตารางที่ 1) subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของ hybridoma พบว่าเป็น IgG2b 2 โคลน และ IgG1 2 โคลน (ตารางที่ 1)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HPV ที่ได้ อาจนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจ strip test เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวกโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือ สำหรับตัวอย่างที่ใช้ตรวจไม่จำเป็นต้องฆ่ากุ้งเพื่อนำ hepatopancreas มาตรวจเสมอไป เพราะเคยมีรายงานการใช้ feces ตรวจวินิจฉัย HPV โดยวิธี PCR ในกุ้งสกุล penaeid (Pantoja & Lightner 2000) และโดยวิธี *in situ* hybridization, dot blot hybridization และ PCR ในกึ่งกลาดำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย (Phromjai et al. 2002) จึงเป็นการง่ายที่จะเก็บ feces ในภาคสนาม เพื่อนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

เอกสารอ้างอิง

ชะลอ ถิ่นสุวรรณ (2543) กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์

Bonami JR, Mari, Poulos BT, Lightner DV (1995) Characterization of hepatopancreatic parvo-like Virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. J Gen Virol 76: 813-817

Flegel TW, Fegan DF, Sriurairatana S (1993) Shrimp health management: an environmental Approach. In: Subasinghe RP, Shariff M (eds) Diseases in aquaculture : the current issues. Malaysian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, p1-41

Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Pantoja CR, Lightner DV (2002) A non destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid Shrimp. Dis Aquat Org 39: 177-182

Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, Lightner CV, Flegel Tw (2001) Different Reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean Hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Org 46: 153-158

Phromjai J, Boonsaeng V, Withyachummarnkul B, Flegel TW (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai Shrimp *Tenaeus monodon* by in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. Dis Aquat Org 51: 227-232

Sithigorngul P, Chauchuwong P, Sithigorngul W, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Menasveta P (2000) Development of a monoclonal antibody specific to yellow head Virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 42: 27-34

Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul W, Menasveta P (2002) Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 49: 71-76

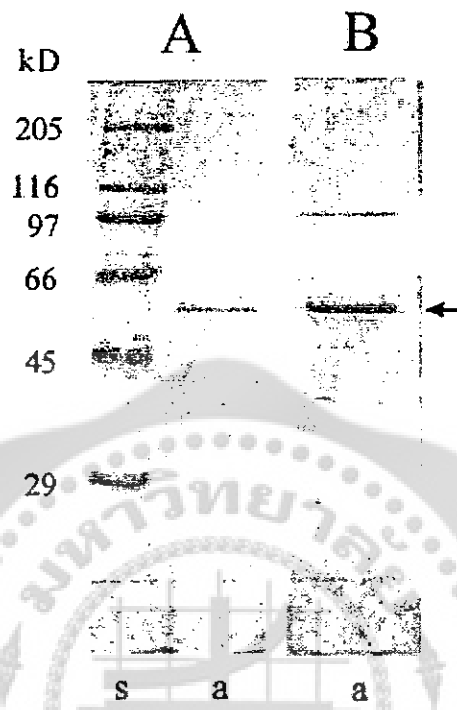
Spann KM, Aklard RD, Hudson DA, Pyecroft SB, Jones TC, Voigt MOC (1997) Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. Dis Aquat Org 31: 239-241

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

Withyachummmarmkul B, Flegel TW (1999) Characterization and PCR detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aquat Org* 38: 1-10

Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, Withyachummmarnkul B, Flegel TW, Boonsaeng V, Panyim S (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Molecular and Cellular Probes* 16: 409-413



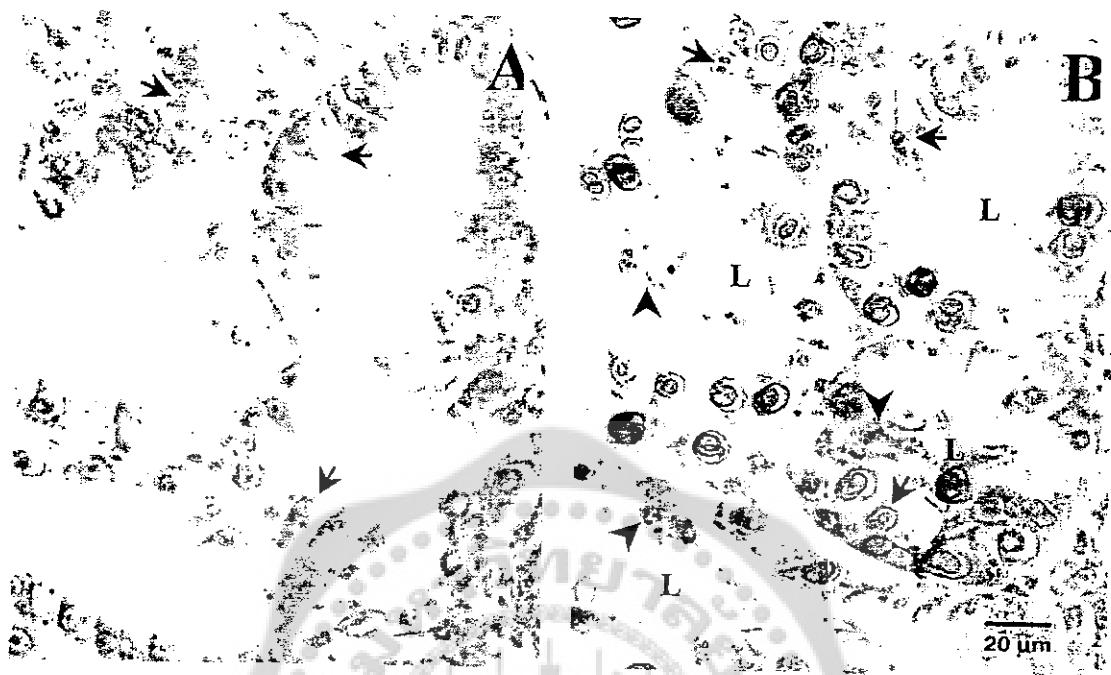


รูปที่ 1 SDS-PAGE (A) ของโปรตีนอนุภาคไวรัส HPV จากกึ่งกลาดำแคะที่ข้อมด้วย Coomassie blue

แถบ s = โปรตีนมาตรฐาน

a = โปรตีนจากอนุภาคไวรัส HPV

และ Western blot (B) ที่บ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV 16-9C ซึ่งจับกับโปรตีนขนาด 54 & 97kD เมื่อเทียบกับโปรตีนใน SDS-PAGE (ลูกศรชี้)



รูปที่ 2 Immunohistochemistry ของ patopancrea จากกึ่งกลางค้ำแคระ โดย (A) ไม่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (B) ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV 16-9C : immunoreactivity เข้ม พบใน basophilic intranuclear inclusion body

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV

MAb (subclass)	Immuno detection method			ปฏิกิริยาข้ามกับไวรัส			
	Dot blot	Western blot	IHC	YHV	YHV (nonvirulent)	WSSV	MBV
HPV6-12B (IgG _{2b})	+	++	++	-	-	-	-
HPV12-10C(IgG ₁)	+	+	+	-	-	-	-
HPV16-9C* (IgG _{2b})	+	++	++	-	-	-	-
HPV 17-1G(IgG ₁)	+	+	+	-	-	-	-

- * ตัวแทนของโคลนที่ใช้ในการศึกษา
- ไม่แสดง immunoreactivity
- + แสดงผล immunoreactivity อ่อน
- ++ แสดงผล immunoreactivity เข้ม