

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ
Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus (PemoNPV)

ปริญญาโท
ของ
ธวัชชัย สุวรรณนาคะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มกราคม 2553

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ
Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus (PemoNPV)

ปริญญาโท
ของ
รัชชัช สุวรรณาคะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มกราคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ
Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus (PemoNPV)

บทคัดย่อ
ของ
ธวัชชัย สุวรรณนาคะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มกราคม 2553

รัชชัย สุวรรณาคะ. (2553). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ *Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus* (PemoNPV). ปรินทูนีพันธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์, ดร. ภัทริน ศรีตุลยกุลย์.

ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus* (PemoNPV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยกระตุ้นแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน ซึ่งแบ่งทำเป็น 2 ส่วนคือ ด้านปลาย N (OB-N) และด้านปลาย C (OB-C) ในรูปของ intein tagged OB-N และ glutathione-S-transferase (GST) tagged OB-C ตามลำดับ เมื่อแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินให้บริสุทธิ์ พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินทั้งสองชนิดที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 83.2 และ 48.4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นในหนูขาว และเมื่อนำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ PemoNPV ได้ 6 โคลน ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 โคลน สามารถจับกับโปรตีน OB-N ได้แก่ MBV13-5D, MBV12-8B และโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 โคลน สามารถจับกับโปรตีน OB-C ได้แก่ MBV3-9H, MBV4-5C, MBV17-5H และ MBV19-10F โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนสามารถจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน และ PemoNPV จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดจากกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนสามารถจับกับโปรตีนโพลีฮีตรินธรรมชาติของ PemoNPV ที่มีน้ำหนัก 58 กิโลดาลตัน ตรวจโดย Western blotting และสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โพลีฮีตรินโปรตีนมาใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อในเนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำโดยวิธี immunohistochemistry ได้ นอกจากนี้เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV3-9H ผสมรวมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV8-5G ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มาตรวจสอบ PemoNPV จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ พบว่ามีความไวในการตรวจจับสูงขึ้นจากเดิม 2 เท่า เมื่อศึกษาด้วยวิธี dot blotting

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT
POLYHEDRIN PROTEIN OF *PENAEUS MONODON* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS

AN ABSTRACT
BY
THAWATCHAI SUWANNAKA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degree of Biotechnology
to Srinakharinwirot University
January 2010

Thawatchai suwannaka. (2010). *Production of monoclonal antibodies against recombinant polyhedrin protein of Penaeus monodon Nucleopolyhedrovirus (PemoNPV)*. Master thesis , M.Sc. (Biotechnology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura, Dr. Pattarin Sridulyakul.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies (MAbs) that can be used to detect *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) in *Penaeus monodon*. Polyhedrin protein gene of PemoNPV was expressed in two parts as the N-terminal (OB-N) and the C-terminal (OB-C) parts. After induction, *E.coli* strain BL21(DE3) and *E.coli* strain BL21 produced intein tagged OB-N protein and glutathione-S-transferase (GST) tagged OB-C protein with molecular masses of 83.2 and 48.4 kDa, respectively. The recombinant proteins were separated using sodium dodecyl sulfhate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), purified and used for immunization into Swiss mice for monoclonal antibody production. Two hybridoma clones (MBV13-5D, MBV12-8B) producing antibodies specific to OB-N protein and four hybridoma clones (MBV3-9H, MBV4-5C, MBV17-5H and MBV19-10F) producing antibodies specific to OB-C protein were obtained. All MAbs bound to the native PemoNPV polyhedrin protein without cross-reactivity to WSSV-infected shrimp or YHV-infected shrimp as determined by dot blotting. The MAbs bound to native PemoNPV polyhedrin protein with molecular mass of 58 kDa as determined by Western blot assay and can be used to detect PemoNPV infection in hepatopancreas tissue of infected shrimps by immunohistochemistry. Furthermore, a combination of MAb MBV3-9H and MAb MBV8-5G obtained from a previous study can increase the PemoNPV detection limit about two fold higher than that of a single antibody by dot blot assay.

ปริญญาบัตร

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ *Penaeus monodon*
nucleopolyhedrovirus (PemoNPV)

ของ

ธวัชชัย สุวรรณาคะ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

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

คณะกรรมการควบคุมปริญญาบัตร

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

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

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ภัทริน ศรีดุษฎยกุลย์)

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

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

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาโทสำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานกรรมการควบคุมปริญญาโท ดร. ภัทริน ศรีดุลยกุลย์ กรรมการควบคุมปริญญาโท ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปริญญาโท ดร.นริศรา จันทราทิพย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบปริญญาโทและอาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณมังกุล ที่ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ คุณสมบัติ รักปรารถนาพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำต่างๆ ในงานวิจัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ คุณชลินันท์ เฟิงสุข คุณวารุณี หะยีมะสา คุณอภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์ และพี่ น้อง ในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดีและห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน รวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัยและขอเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนุทดลอง และกึ่งกุลาดำทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ธวัชชัย สุวรรณนาคะ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
สมมติฐานในการวิจัย	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
อุปกรณ์และสารเคมี	24
วิธีดำเนินการทดลอง.....	26
4 ผลการทดลอง	35
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	57
ประวัติย่อผู้วิจัย	68

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
3 ความจำเพาะและความไวของการตรวจหาแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบ โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry	45

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 วงจรชีวิตของกึ่งกุลาดำ	6
2 แผนภาพแสดง morphology ของ Baculoviruses	8
3 ลักษณะของอนุภาคไวรัส PemoNPV	9
4 แสดงโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV	10
5 ลำดับเบสของโปรตีนโพลีฮีตรินที่ได้จากการแปลรหัส	12
6 การวิเคราะห์ tblastn ของโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV เปรียบเทียบกับ ลำดับกรดอะมิโนต่างๆในฐานข้อมูล	13
7 แสดงลักษณะของกึ่งกุลาดำที่เกิดอาการแคระแกร็น	16
8 กราฟรูปแท่งแสดงค่าเฉลี่ยความยาวของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV และ PmDNV เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ	16
9 ลักษณะ occlusion bodies ขนาดใหญ่ภายในนิวเคลียสย้อมติดสีเขียวของ มอลาไคท์กรีน	17
10 แสดงลักษณะ hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV	18
11 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้	32
12 การเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ	33
13 การเติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด	33
14 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน OB-N และ OB-C	36
15 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยวิธี Western blotting	38
16 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting	39
17 การตรวจการติดเชื้อ PemoNPV ภายใน hepatopancreatic tubule epithelial cells ของ กึ่งกุลาดำด้วยวิธี immunohistochemistry	40
18 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่ จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ	41
19 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	43

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
20 การทดสอบความไวของโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก Boonsanongchoking และคนอื่นๆ (2006: 371-376)	44
21 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมนโคลอนอลแอนติบอดีกับสารสกัดจากชาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV	46
22 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry ของโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PemoNPV กับองค์ประกอบต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อชนิดต่างๆ	47

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp : *Penaeus monodon*) เป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้ให้กับประเทศผู้ส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูง ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมาได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นจำนวนมากในประเทศต่างๆ ของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย เวียดนาม ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน และประเทศไทย (สิริทุกขวินาศ; และ ชุตินา ชมวิสัย. 2545: ออนไลน์) สำหรับประเทศไทยได้ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวออกไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วตามพื้นที่จังหวัดในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเกิดปัญหาผลผลิตลดลงมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 พบว่ากุ้งกุลาดำที่จับขายหน้าฟาร์มมีขนาดเล็กจำนวนมาก และอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำนั้นลดลงอย่างมาก (ชลอ ลิมสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรัชชกุล. 2547) ซึ่งเกิดจากปัญหามลพิษและความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม และปัญหาที่เกิดจากการระบาดของโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ (Flegel; Fegan; & Sriurairatana. 1995: 65–79) เป็นสาเหตุหลักส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก ได้แก่ โรคติดเชื้อไวรัสแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57–112) เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งสกุล *Penaeid* ได้แก่ (1) ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) (2) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) (3) ไวรัส *Penaeus monodon* densovirus (PmDNV) หรือชื่อเดิม ไวรัสเอชพีวี (hepatopancreatic parvovirus; HPV) (4) ไวรัส *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) หรือชื่อเดิม ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus; MBV) (5) ไวรัส *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) หรือชื่อเดิม ไวรัสไอเอชเอช-เอ็นวี (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; IHNV) และ (6) ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) (Loh; et al. 1997: 263–312) สำหรับไวรัสที่เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ได้แก่ YHV, WSSV, PmDNV, และ PemoNPV (Flegel; et al. 2006: 1-33)

ไวรัส PemoNPV เป็นเชื้อไวรัสชนิดหนึ่งที่ก่อโรคในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีรายงานพบการติดเชื้อครั้งแรกในประเทศไต้หวัน (Lightner; & Redman. 1981: 299–302) หลังจากนั้นมีการพบการติดเชื้อในหลายประเทศทั่วโลก โดยกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV อาจจะไม่แสดงอาการติดเชื้ออย่างชัดเจนแต่เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงก็จะเกิดความเครียด กินอาหารลดลง ซึ่งทำให้เกิดลักษณะแคะแกระมีขนาดเล็กกว่าปกติ และการติดเชื้อสามารถพบ occlusion bodies ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับซึ่งทำให้เซลล์ตับตายเป็นสาเหตุหลักต่อสุขภาพโดยรวมของกุ้ง มีผลทำให้

ระบบการทำงานอวัยวะต่างๆผิดปกติ และอัตราการรอดชีวิตลดลง (Lightner. 1996: unpagged) โดยความรุนแรงของโรคนั้นอาจเกิดจากการติดเชื้อร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และโปรโตซัว (Ramasamy; et al. 2000: 45-66) ซึ่งผลการติดเชื้อทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตของกุ้งกุลาดำน้อยลง ส่งผลต่อต้นทุนการเลี้ยงที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกษตรกรขาดทุน การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถทำได้ ดังนั้นหากสามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วจึงเป็น วิธีป้องกันความเสียหายกับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้

เมื่อเกิดการติดเชื้อ PemoNPV จะแสดงลักษณะการติดเชื้ออย่างเด่นชัดโดยจะตรวจพบ occlusion bodies รูปทรงกลม ภายในนิวเคลียสของ epithelial cell ของ hepatopancreas และ midgut และพบได้ในเศษชิ้นส่วนของเซลล์ภายในมูลกุ้ง (Lightner; & Redman. 1981: 299–302) โดยพบว่า occlusion bodies ประกอบขึ้นมาจากโปรตีนโพลีฮีตรินซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสในจีโนม nucleopolyhedrovirus (NPV) ตระกูล *Baculoviridae* ซึ่งคาดว่าสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันอนุภาคไวรัสจากสภาพแวดล้อมภายนอก (Ramasamy; et al. 2000: 45-66) เนื่องจากโปรตีนโพลีฮีตรินเป็นโปรตีนที่ผลิออกมาเป็นจำนวนมากจึงน่าจะเป็นแอนติเจนเป้าหมายที่ดีในการตรวจวินิจฉัย PemoNPV ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ (Satidkanitkul; et al. 2005: 79-84)

สำหรับวิธีการตรวจเชื้อ PemoNPV นั้นได้มีการพัฒนาขึ้นหลายวิธี โดยวิธีอย่างง่ายในการตรวจจะพบ occlusion bodies มีลักษณะเป็นเม็ดกลม ๆ ภายในนิวเคลียสของเนื้อเยื่อตับ อาจนำเนื้อเยื่อตับกุ้งมาบีบนสไลด์และหยดสารละลายมาลาไคท์กรีน 0.05 % หรือย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin Y (Flegel. 2006: 1-33) หรือการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) (Lightner. 1996: unpagged) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูงและอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยมีราคาแพง ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากยิ่งขึ้น เช่น เทคนิค *in situ* hybridization (Poulos; et al. 1994: 187-194) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงแต่มีความไวต่ำและต้องการ probe ที่จำเพาะ ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยวิธี polymerase chain reactions (PCR) (Chang; et al. 1993: 116-120, Lu; et al. 1993: 551-559, Belcher; & Young. 1998: 21-29, Hsu; et al. 2000: 93-99, Surachatpong; et al. 2005: 69-75) และวิธี real-time PCR (Yan; et al. 2009: 126–132) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถตรวจพบไวรัสแม้มีปริมาณน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรก และช่วยลดเวลาในการตรวจวินิจฉัยแบบเดิม แต่เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการนำไปตรวจเชื้อ PemoNPV ในฟาร์มกุ้ง เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยมีราคาแพง ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูง ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Chaivisuthangkura; et al. 2009: 188-193) ในการตรวจเชื้อ PemoNPV เช่นกัน แต่ยังคงเป็นวิธีที่ไม่สะดวกในการนำไปใช้ในฟาร์มโดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันมาใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ต่อเพปไทด์สังเคราะห์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 25 ลำดับแรก

ของโปรตีนโพลีฮีตรินทางด้าน N-terminal แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจสอบเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และตรวจเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry (Satidkanitkul; et al. 2005: 79-84) ได้ แต่ประสิทธิภาพการใช้งานยังไม่ดีนัก เนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี affinity ต่ำ ต่อมาได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) มาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อ PemoNPV โดยใช้โปรตีนโพลีฮีตรินที่แยกจากกึ่งกุลาตำที่ติดเชื้อ PemoNPV เป็นแอนติเจน แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และตรวจเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (Boonsanongchoking; et al. 2006: 371-376)

จะเห็นว่าเทคนิคทางวิทยามีคุ่มกันเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมาก ทำให้สามารถตรวจเพื่อติดตามการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลา อันเป็นการลดความเสียหายของเกษตรกร สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อตามแบบธรรมชาติเป็นแอนติเจนนั้นมีขั้นตอนในการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์หลายขั้นตอนและอาจมีเนื้อเยื่อกึ่งปะปนมาด้วยทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้อาจจับกับเนื้อเยื่อของกึ่งปกติด้วย และจากความรู้การเกี่ยวกับลำดับยีนของโพลีฮีตรินและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267) ทำให้มีข้อมูลมากพอที่จะนำไปผลิตเป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของเชื้อ PemoNPV ให้มีความจำเพาะต่อส่วนต่างๆ ของโปรตีนโพลีฮีตรินเพิ่มมากยิ่งขึ้นและเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัย สำหรับนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ PemoNPV ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจอย่างง่ายต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจการติดเชื้อ PemoNPV ในกุ่ม
กุลาดำด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

1. การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli*
ให้บริสุทธิ์
2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ PemoNPV โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน
3. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PemoNPV โดยวิธี dot blotting,
Western blotting และ immunohistochemistry
4. การพิสูจน์ทราบคุณสมบัติโดยการตรวจสอบอีพีโทป การจำแนก class และ subclass
รวมทั้งการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV อาจทำ
โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV เป็นแอนติเจนกระตุ้นหนูขาว

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของเชื้อ PemoNPV
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจการติดเชื้อ PemoNPV ในกุ่ม
กุลาดำด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) มีชื่อสามัญว่า giant tiger prawn ชื่อไทย กุ้งกุลาดำ กุ้งทะเล กุ้งเสือดำ กุ้งเสื่อ กุ้งลาย

1.1 ออนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiae

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

1.2 ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำ

น่านน้ำแถบใต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย และอินเดีย กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึก ห่างจากฝั่งและชอบพื้นที่ที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน เป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531: 5)

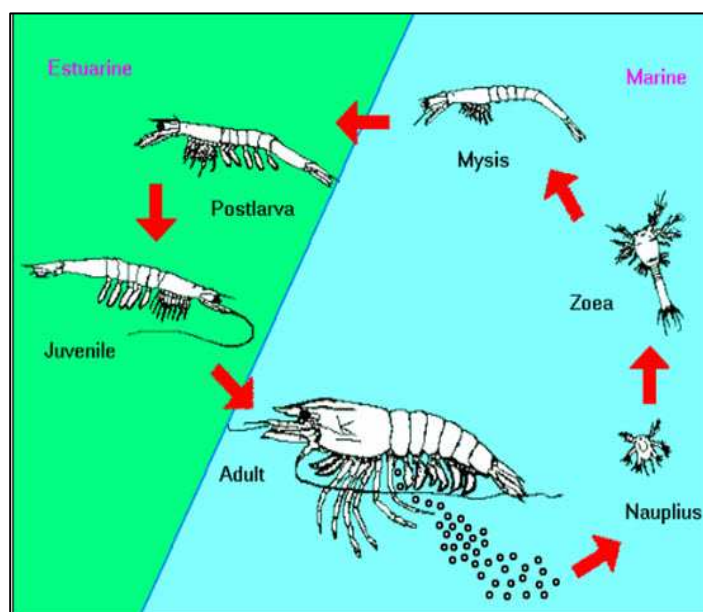
1.3 ลักษณะทั่วไป

ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลาย และสีออกน้ำตาล เข้มข้างแถบสีขาว ด้านบนของกรีมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ สันกริยาวเกือบถึงคาราเปสมีสันดับ (hepatic crest) ยาวตรงขนานไปกับลำตัว หนวดยาวไม่มีลายชัดเจน ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาวายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงินโคนสีขาว ขาเดินคู่ที่ห้าไม่มี exopod ขนาดความยาวประมาณ 8-25 เซนติเมตร (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531: 5)

1.4 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำวางไข่ในทะเล กุ้งที่มีอายุประมาณ 12 ถึง 18 เดือนจะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15 ถึง 30 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเล กุ้งขนาด 70 ถึง 150 กรัม จะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000 ถึง 1,200,000 ฟอง ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะ nauplius ภายใน 12 ชั่วโมง หลังได้รับการปฏิสนธิ ระยะ nauplius มีขนาด 0.30 ถึง 0.33 มิลลิเมตร ยังไม่กินอาหาร ดำรงชีวิต

แบบแพลงก์ตอน จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้งภายใน 40 ถึง 50 ชั่วโมง มีขนาดประมาณ 0.50 มิลลิเมตร จะเจริญเข้าสู่ระยะ protozoa มีขนาด 1.00 ถึง 3.30 มิลลิเมตร เริ่มกินแพลงตอนพืชเป็นอาหาร การเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลาประมาณ 4 วัน จะเจริญเข้าสู่ระยะ mysis ซึ่งจะมีรูปร่างคล้ายพ่อแม่มากขึ้น มีขนาดประมาณ 3.30 ถึง 5.00 มิลลิเมตร กินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร เปลี่ยนแปลงรูปร่าง 3 ระยะ ใช้เวลาประมาณ 7 วัน จะเข้าสู่ระยะ postlarvae (PL) มีขนาด 5.50 มิลลิเมตร ลูกกุ้งมีระยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย โดยแบ่งเป็น 25 ระยะ ภายใน 25 วัน เรียกว่า PL1 เรื่อยไปจนถึง PL25 จนมีขนาดประมาณ 2 ถึง 3 เซนติเมตร จะเข้าสู่ระยะ juvenile มีลักษณะต่างๆสมบูรณ์เหมือนตัวเต็มวัย แต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้จนเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ และใช้เวลา 10 เดือนจะเป็นตัวเต็มวัย (ภาพประกอบ 1) (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531: 5-8)



ภาพประกอบ 1 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

ที่มา : กุ้งกุลาดำ. (2551). (ออนไลน์)

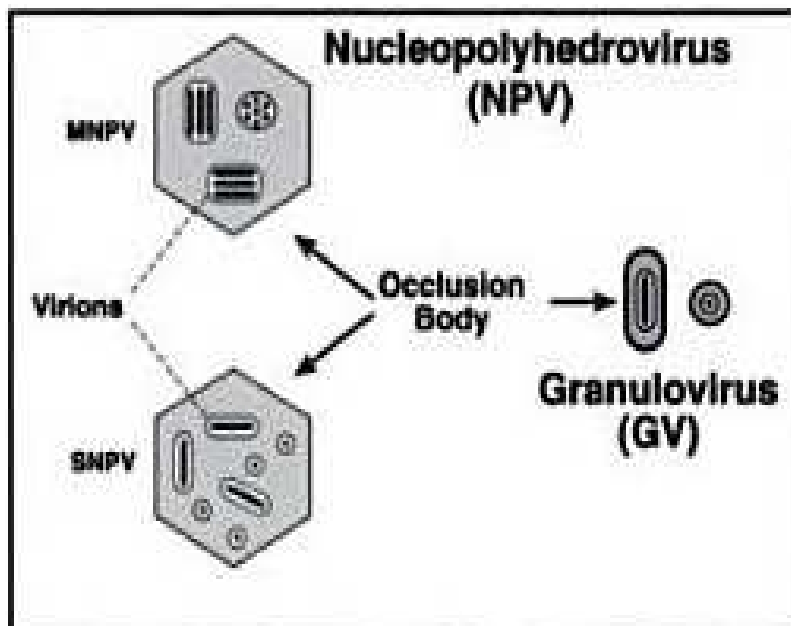
2. การเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

โรคที่เกิดในกุ้งกุลาดำส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมากทำให้ผลผลิตของกุ้งกุลาดำลดลง สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งเกิดจากสารเคมีตกค้างและสภาพแวดล้อมที่ไม่ดีในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยโรคที่เกิดกับกุ้งที่เพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ โรคไม่ติดเชื้อและโรคติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมีสาเหตุมาจากสภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด ส่วนโรคติดเชื่อนั้นเป็นสาเหตุหลัก ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำที่สำคัญเกิดจากการติด

เชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียดังกล่าวสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112) สำหรับไวรัสที่เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ได้แก่ YHV, WSSV, PmDNV, และ PemoNPV (Flegel; et al. 2006: 1-33)

3. *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus

Baculoviruses เป็นไวรัสที่ก่อโรคได้ในสัตว์กลุ่ม arthropods ลักษณะสำคัญของไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ (dsDNA) ขนาดจีโนมประมาณ 88-160 กิโลคู่เบส รูปร่างท่อนยาว มี nucleocapsid และ envelope แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ granulosis viruses (GVs) เมื่อติดเชื้อจะสร้าง occlusion bodies ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ และ nucleopolyhedroviruses (NPVs) เมื่อติดเชื้อจะสร้าง occlusion bodies ขนาดใหญ่ภายในนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ โดย NPV มีลักษณะของ nucleocapsid ภายใน envelope แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ single nucleocapsid polyhedrosis viruses (SNPV) ซึ่งจะมีการสร้าง 1 nucleocapsid ภายใน 1 envelop เท่านั้น และ multiple nucleocapsid polyhedrosis viruses (MNPV) ซึ่งจะสร้างหลาย nucleocapsid ภายใน 1 envelop โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ occlusion bodies ของ NPV เรียกว่า polyhedrin ส่วน GV เรียกว่า granulin (ภาพประกอบ 2) ซึ่งมีรายงานพบการก่อโรคของ Baculovirus ในพวกแมลง order Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera และ Trichoptera แล้วยังพบการก่อโรคใน Crustacean order Decapoda หรือในกุ้งนั่นเอง (Rohrmann. 1986: 1499-1511, Rohrmann. 1992: 749–761) โดยพบว่า baculovirus ก่อโรคได้ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เรียกว่า *Penaeus vannamei* nucleopolyhedrovirus (PvSNPV) หรือ Baculovirus penaei (BP) ซึ่งพบรายงานติดเชื้อในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือ (Bonami; et al. 1995: 59-66) และในกุ้งกุลาดำ เรียกว่า *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) ซึ่งพบรายงานติดเชื้อได้หลายประเทศในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย แอฟริกา ตะวันออกกลาง ยุโรปตอนใต้ และเขตเมดิเตอร์เรเนียน (Lightner. 1996: unpagged)



ภาพประกอบ 2 แผนภาพแสดง morphology ของ Baculoviruses แบ่งออกเป็น 2 จี๊นส์ ได้แก่ granulosis viruses (GVs) และ nucleopolyhedroviruses (NPVs) ซึ่ง PemoNPV จัดอยู่ใน จี๊นส์ NPV เป็นแบบ single nucleocapsid polyhedrosis viruses (SNPV) ซึ่งสร้างเพียง 1 nucleocapsid ภายใน 1 envelop เท่านั้น โดยมีโปรตีนโพลีฮีตรินหุ้มอนุภาคไวรัสอีกชั้นหนึ่ง เรียกว่า Occlusion bodies

ที่มา : Fauquet, C. M.; et al. (2005). Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: p. 177.

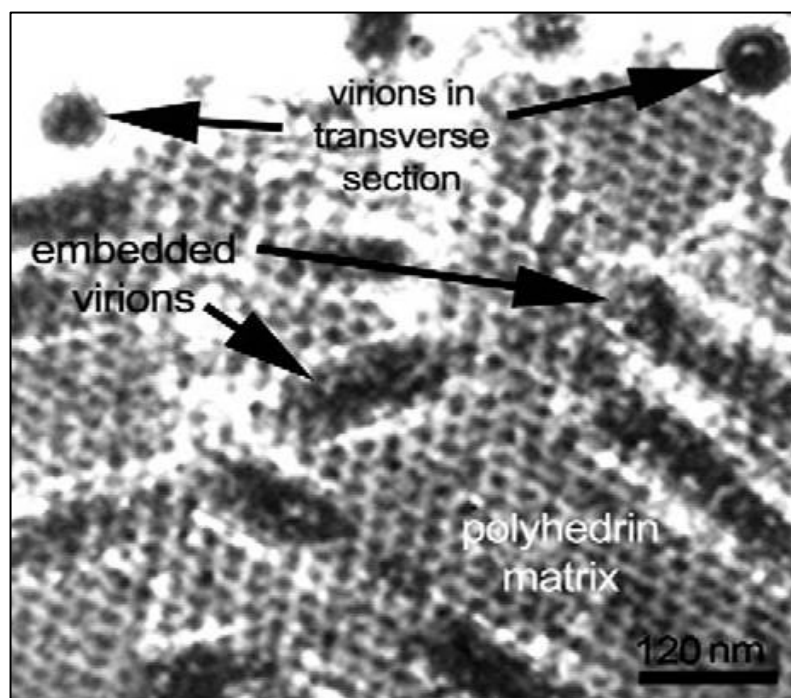
เชื้อ PemoNPV มีรายงานพบการติดเชื้อครั้งแรกในกุ่มกุลาดำในประเทศไต้หวันปี ค.ศ.1981 (Lightner; & Redman. 198: 299–302) ซึ่งไวรัสดังกล่าวมีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ (dsDNA) รูปร่างท่อนยาว เป็น type-A baculoviruses มีการสร้าง occlusion bodies รูปทรงกลม ภายในนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ซึ่งมีขนาดใหญ่ เกิดมาจากการประกอบกันของ polyhedrin protein ที่มีลักษณะของ nucleocapsid ภายใน envelope เป็นแบบ SNPV (ภาพประกอบ 3) โดยขนาด nucleocapsid ของ PemoNPV นั้นมีขนาดความกว้าง ประมาณ 42 ± 3 นาโนเมตร และยาว ประมาณ 246 ± 15 นาโนเมตร ส่วน envelope มีขนาดความกว้าง ประมาณ 75 ± 4 นาโนเมตร และยาวประมาณ 324 ± 33 นาโนเมตร (Lightner. 1996: unpagged)

จากข้อมูลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆพบว่า PemoNPV จัดอยู่ใน Family Baculoviridae

SubFamily Eubaculoviridae

Genus Nucleopolyhedrovirus

ซึ่งชื่อเดิมคือ Monodon Baculovirus (MBV) (Fauquet; et al. 2005: 177-180)

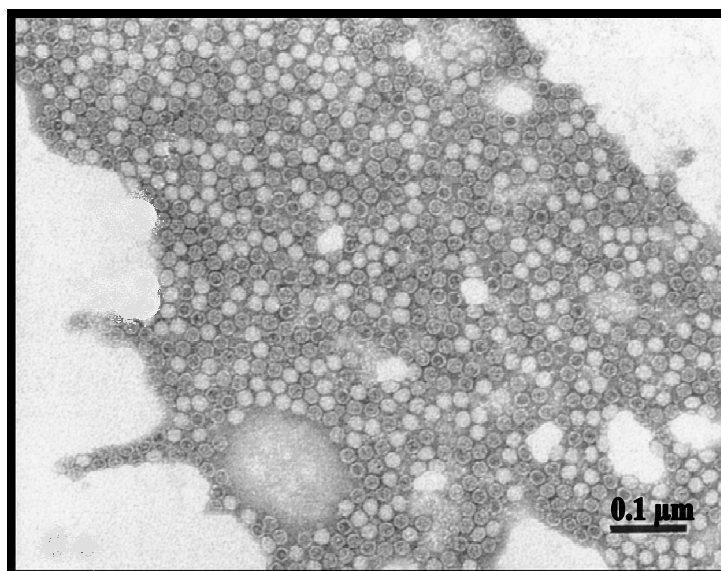


ภาพประกอบ 3 ลักษณะของอนุภาคไวรัส PemoNPV ที่ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รูปร่างท่อนยาวมี envelope จำนวนหลายอนุภาคถูกหุ้มอยู่ภายใน occlusion bodies ซึ่งเกิดจากการประกอบกันของ polyhedrin protein ในนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์
ที่มา : Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. (258): p. 5.

4. โปรตีนโพลีฮีดรินของ PemoNPV

การติดเชื้อ PemoNPV ที่แสดงลักษณะการติดเชื้ออย่างเด่นชัดจะพบ occlusion bodies ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสจำพวก NPV ตระกูล Baculoviridae โดย occlusion bodies ประกอบขึ้นมาจากโครงสร้างผลึกโปรตีน (crystalline protein matrix) ที่เรียกว่า โปรตีนโพลีฮีดริน polyhedrin protein subunits (SuOBs) มีรูปร่างเป็น hexagonal มีขนาดประมาณ 22-23 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 4) (Bonami; et al. 1997: 134-

145) โปรตีนโพลีฮีตรินนั้นมีความสำคัญต่ออนุภาคของไวรัสเป็นอย่างมากเนื่องจากโปรตีนโพลีฮีตรินจะหุ้มอนุภาคไวรัสไว้ภายในช่วยปกป้องอนุภาคไวรัสเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมภายนอก (Ramasamy; et al. 2000: 45-66)



ภาพประกอบ 4 แสดงโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ที่ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy) ลักษณะของ polyhedrin protein subunits (SuOBs) รูปร่างเป็น hexagonal มีขนาดประมาณ 22-23 นาโนเมตร
ที่มา : ดัดแปลงจาก Bonami, J. R.; et al. (1997). The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacean: a unique structure, crystal organization, and proposed model. *Journal of Structural Biology*. (120): p. 139.

Chaivisuthangkura และคนอื่นๆ (2008: 261-267) ได้แยกยีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV โดยนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโน 25 ลำดับแรกของโปรตีนโพลีฮีตรินทางด้านปลาย N (Satidkanitkul; et al. 2005: 79-84) มาทำการออกแบบ degenerated primer จากนั้นทำ PCR เพื่อหาลำดับเบสของกรดอะมิโน 25 ลำดับแรกทางด้านปลาย N ได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 74 คู่เบส และใช้ลำดับดีเอ็นเอนี้ในการออกแบบ primer เพื่อนำไปหาลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของยีนโพลีฮีตริน โดยนำเทคนิค homo-oligomeric tailing มาใช้ในการแยกยีนครั้งนี้ พบว่ายีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ที่แยกได้มีความยาว 1,588 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนของ open reading frames (ORF) ความยาว 1,359 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้กรดอะมิโน 452 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณ 50.6 กิโลดาลตัน และพบว่าน่าจะมีตำแหน่งของ N-linked glycosylation 5 ตำแหน่ง (134NLT, 307NGT, 332NNT, 333NTT, 352NTS) และ O-linked glycosylation 1 ตำแหน่งที่

threonine ลำดับ 450 (ภาพประกอบ 5) ตำแหน่ง glycosylation เหล่านี้น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ขนาดของโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ในธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58 กิโลดาลตัน (Satidkanitkul; et al. 2005: 79-84) ต่างจากที่คำนวณได้จากการแปลรหัส (deduced molecular weight) และเมื่อนำลำดับยีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ไปเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอต่างๆ ในฐานข้อมูลพบว่าไม่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับลำดับดีเอ็นเอใดๆ ในฐานข้อมูล ยกเว้น ORF ที่ไม่ทราบหน้าที่ (uncharacterized ORF) ของไวรัส PvSNPV ของ *Penaeus vannamai* หรือกุ้งขาว ซึ่งมีค่าความเหมือน (identity) 67% เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย blastn ดังนั้นยีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV นี้จึงเป็นยีนใหม่และเป็นยีนแรกของ PemoNPV ที่แยกได้และมีการวิเคราะห์ในระดับชีววิทยาโมเลกุล นอกจากนี้จากการวิเคราะห์โดย blastp, FASTA และ psi-blast พบว่าโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV นี้ไม่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับโปรตีนใดๆ ในฐานข้อมูล แต่จากการวิเคราะห์ด้วย tblastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 353 ถึง 1135 ซึ่งแปลรหัสเป็น ORF ที่ไม่ทราบหน้าที่ของ PvSNPV มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่ 11 ถึง 296 ของโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV โดยมีค่าความเหมือน 49% และค่าความคล้าย (similarity) 61% (ภาพประกอบ 6) ดังนั้นโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV จึงเป็นโปรตีนชนิดใหม่ และจากงานวิจัยนี้ยังได้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินซึ่งเมื่อนำยีนโพลีฮีตรินทั้งยีนมาผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน พบว่าไม่สามารถที่จะกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ จึงได้แยกทำเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (OB-N) ตรงลำดับดีเอ็นเอที่ 1 ถึง 759 ของ open reading frame และส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย C (OB-C) ตรงลำดับดีเอ็นเอที่ 760 ถึง 1359 ของ open reading frame

TCTGCAGTA-161

TCTACTAATATTTAGCTGATATGTTTGTATTTTCTTGCCAATAAAGATGATTTAGAATACTGTATTAATTTTAAATGTT-81
 CATTFTTATAAGCATATGTAAAAAATTGCTAATTAGGTATTTGTATTTTTTAAAAATTTACGATTTAAATATCTAAGTC -1
 ATG TTC GAC GAT AGC ATG ATG ATG GAA AAT ATG GAC GAC CTT AGT GGA GAT CAG AAG ATG 60
 M F D D S M M M E N M D D L S G D Q K M 20
 GTG CTC ACA CTT GCT GCG GCT GGT GCT GTG GCT GGA GCA TCG AAG ATG TTG AAC GAA GCT 120
 V L T L A A A G A V A G A S K M L N E A 40
 GCA GAC CTG AAG AAA AAT TAC AAG GAT ACT CCA CTT GAA GAA TAT TTC AAA GAT AAG TAT 180
 A D L K K N Y K D T P L E E Y F K D K Y 60
 TCA GGC AAC AAA AAA AGA AAG ATC ACT GAT CAG GAA TTT GAA CTC CCT AAG TCT ATT GAT 240
 S G N K K R K I T D Q E F E L P K S I D 80
 CCA CTT GAA AAT CAT TTC AAA GGA CTG TCC CGT CCT CGT GTA GGC CCT CGA ATG GCA AAA 300
 P L E N H F K G L S R P R V G P R M A K 100
 CAG CTT GCA AAT AAA ATG AGT GAC AAC AAA ATG CAT TAT AAA TTT AAC AGC TTT CAG ACA 360
 Q L A N K M S D N K M H Y K F N S F Q T 120
 AAT AAA CAC TTT AAT ACT CAC ACA ATT TAC AAG CGA ACA AAT CTC ACT TCT TCT AAA CTA 420
 N K H F N T H T I Y K R T N L T S S K L 140
 ATG GGC TTT TCG GGT CAG AGT GAT TTT GGC GTA CCC AAA TAC AAC AGT GCA GTC ACA CTT 480
 M G F S G Q S D F G V P K Y N S A V T L 160
 CCT CTG GAA GTA TTG GAA TTT TGG GTA GGT GAC AAC ACA AAT CCT AAT GTT GAA CAT TCT 540
 P L E V L E F W V G D N T N P N V E H S 180
 AAG GGT AGT ATG GCA TTG AAA AAT AGT GAA TGT ATG ATT GCA TCT ATG AAA CTT AAA CTT 600
 K G S M A L K N S E C M I A S M K L K L 200
 AGT AAT CTG CAA AAT CTA GAA GAC ACA GAC CTT GAC CAT ACA GGA GTT GCT ATA TCT AGC 660
 S N L Q I L E D T E L D H T G V A S S S 220
 AGT AGG AAT GTC AAT GAA GTT AGT AGC TAT ATT ATT CCA GTA GAA TCT CAT TTG GGT GCC 720
 S R N V N E V S S Y I I P V E S H L G A 240
 AAT GCT AAT GGT GCA CTG TGC AAG ATT TTC TCA GAA AAT ACT TCT ATA CAA GAT GAT ACA 780
 N A N G A L C K I F S E N T S I Q D D T 260
 TCA GAT GCT GTC ACA ACT AAA GAT ATG ATG ATG GGT AAA CTA GTA ACC AAG TCA ACT GAA 840
 S D A V T T K D M M M G K L V T K S T E 280
 GAT AGA CTA AAT CTA AAT CCA CAC AAC ATG CTT TGG ACT CCA GGG GAT AAT CCA ATT GAA 900
 D R L N L N P H N M L W T P G D N P I E 300
 TTA GAA TTC AAC GAT ATG AAC GGA ACT TGG TTC ATT ATG CCA GAG TTA GAG AAT GGA AAG 960
 L E F N D M N G T W F I M P E L E N G K 320
 TAT CAT CTA TTG CCT ATG GAA TCT GGA ATT GGA AAC AAC ACA ACA GAC ACT TAT GAG ATG1020
 Y H L L P M E S G I G N N T T D T Y E M 340
 CCA TCA AAT GAC GAA AGA GGA AAT TTC ATT AGC AAT ACT TCT TCC CGC ACA CCA ACA TCA1080
 P S N D E R G N F I S N T S S R T P T S 360
 TCT ACT CTT GGA AGT CTC CTC ATT GGC GTC CCC TTC GTT CTC GAT GCC AAC GGT CAA CCC1140
 S T L G S L L I G V P F V L D A N G Q P 380
 AAG AAT TAC AGA GTT GCC TTT TCT ATG GAA CAA GAA GTG TTG CTT GTA TCT AGG TCA GAA1200
 K N Y R V A F S M E Q E V L L V S R S E 400
 TGG ATG CAG AAC AAT AGC GCT GCC AAC TGG AAC TCC AAT CTT GGT GTG CGT CTA GCC CCC1260
 W M Q N N S A A N W N S N L G V R L A P 420
 AGG TCT ACC CAA ATT TCC AAG TTT AGA CAC ATG GTT GGA CCC TAC CAC TTC CCA GAA GAC1320
 R S T Q I S K F R H M V G P Y H F P E D 440
 GGA CAT CCA AAC CTG AAG ACG CAT CAT ACA AAT GAA TAA GTTAACAACACTATATCAAAATATT1386
 G H P N L K T H H (T) N E * 452
 TAAAAATTAACCTATTATATTTATATATATTATA 1419

ภาพประกอบ 5 ลำดับเบสของยีนโปรตีนโพลีฮีตริน มีความยาว 1,588 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ส่วนของ open reading frame (ORF) ความยาว 1,359 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสได้กรดอะมิโน 452 ตัวโดยมีตำแหน่งของ N-linked glycosylation 5 ตำแหน่ง (134NLT, 307NGT, 332NNT, 333NTT, 352NTS) (ลูกศรชี้) และ O-linked glycosylation 1 ตำแหน่งที่ threonine ลำดับ 450 (วงกลม)

ที่มา : Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology*. (381): p. 264.

PemoNPV	11	MDDLSGDQKMVLTLAAAGAVAGASKMLNEAADLKKNYKDTPLLEEFKDKYSGNKKRKITD	70
		+ DL+ ++K+ L L+A G V GA+KM+NEAA+L++NY + P E + S K	
PvSNPV	353	LRDLNSEEKLTGLSAVGGVVGATKMMNEAAELRRNYGNRPYERLLE--LSKRKYESTPT	526
PemoNPV	71	QEFELPKSIDPLENHFKGLSRPRVGPMAKQLANKMSDNKMHYKFNSFQTNKHFNTHTIY	130
		FE RV P MA+QL K K N F N H+N H I	
PvSNPV	527	SGFE-----ERVRPSMAEQLDR---STKRPRKANRFPVNTHYNMHKIC	646
PemoNPV	131	KRTNLTSSKLMGFSGQSDFGVPKYNSAVTLPLEVLFEFWVDNTNPNVEHSGSMALKNSE	190
		KRTNLTSSKL+GFSGQ+ VPKYNSAVTLPLE LEFWVDN NP V HS GS L + E	
PvSNPV	647	KRTNLTSSKLLGFSGQAGPDVPKYNSAVTLPLEALEFWVDNINPEVAHSMGSKVLSDE	826
PemoNPV	191	CMIASMKLKLSNLQILEDELTEDHTGVAISSSRNVNEVSSYIIPVESHGANANGALCKIF	250
		C + SMKLKLSNLQ+ ED + G S +VS ++IPVES++G+ +NG LCK+F	
PvSNPV	827	CRVKSMLKLSNLQVYEDRQY---GSGDRLSETAKDVSCFVIPVESYMGSKSNGTLCKMF	997
PemoNPV	251	SENTSIQDDTSDAVTTKDMMGKLVTKSTEDRLNLPNMLWTPGD	296
		S NTS + D +TTKD+MMGKLVTKS DR+N+NP +W+ D	
PvSNPV	998	SANTSANSNVGDFITTKDIMMGKLVTKSDVDRMNVNPEMYMWSSED	1135

ภาพประกอบ 6 แสดงการวิเคราะห์ tblastn ของโปรตีนโพลีอีตริโนของ PemoNPV เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนต่างๆ ในฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับ ORF ที่ไม่ทราบหน้าที่ของ PvSNPV โดยมีค่าความเหมือน (identity) 49% และค่าความคล้าย (similarity) 61%

ที่มา : Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology*. (381): p. 265.

5. การติดเชื้อ PemoNPV ในกึ่งกุลาดำ

PemoNPV เป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่พบการติดเชื้อในกึ่งกุลาดำ เริ่มมีรายงานการติดเชื้อครั้งแรกในประเทศไต้หวันโดย Lightner และ Redman ในปี ค.ศ. 1981 หลังจากนั้นมีการพบหลายประเทศในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย แอฟริกา ตะวันออกกลาง ยุโรปตอนใต้ เขตเมดิเตอร์เรเนียน โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบรายงานการติดเชื้อในกึ่งกุลาดำอย่างรุนแรงในหลายประเทศ (Lightner. 1996: unpagged) ซึ่งพบว่า PemoNPV ติดเชื้อใน epithelial cell ของตับ และ midgut ของกึ่งกุลาดำ ลักษณะสำคัญจะพบ occlusion bodies รูปร่างทรงกลมขนาดใหญ่จำนวนมากภายในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ (Lightner; & Redman. 1981: 299-302) ซึ่งพบว่ากึ่งกุลาดำทุกระยะสามารถติดเชื้อได้ยกเว้นระยะไข่ และระยะ nauplius และไม่พบการติดต่อผ่านสัตว์พาหะ โดยส่วนมากพบการติดเชื้อในระยะ postlarvae มากกว่า 80% (Ramasary; et al. 1995: 129-135)

ในขณะที่กึ่งระยะ juvenile และกึ่งโตเต็มวัยอาจพบการติดเชื้อลดลง ส่วนการถ่ายทอดของเชื้อ PemoNPV เป็นแบบ horizontal transmission ซึ่งเกิดจากการกินกันเองของลูกกึ่งที่ติดเชื้อหรือการปนเปื้อนจากการขับถ่ายคาดว่าน่าจะเกิดจากมูลของกึ่งพ่อแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ PemoNPV ทำให้เกิดการแพร่กระจายไปในโรงเพาะฟัก (Fegan; et al. 1991: 205-217) กึ่งที่ติดเชื้อ PemoNPV อาจจะไม่แสดงอาการติดเชื้ออย่างชัดเจนแต่เมื่อสภาพแวดล้อมที่เครียดอาจจะส่งเสริมการติดเชื้อและความรุนแรงของการก่อโรคของ PemoNPV ในกึ่งให้มากยิ่งขึ้น ซึ่งกึ่งที่ติดเชื้อจะกินอาหารลดลง มีลักษณะแคระแกร็น และมีขนาดเล็กกว่าปกติ (Lightner. 1996: unpagued) โดยความรุนแรงของโรค คาดว่ามีสาเหตุมาจากการตายของเซลล์ตับและ midgut epithelium มีผลทำให้ระบบการทำงานของอวัยวะต่างๆ ผิดปกติ และทำให้อัตราการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำในระยะ postlarvae ลดลงมากกว่า 90% นอกจากนี้ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และโปรโตซัวจะเพิ่มมากขึ้น (Natividad; et al. 1992: 139-160, Ramasamy; et al. 2000: 45-66)

สำหรับในประเทศไทยพบรายงานการติดเชื้อ PemoNPV ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 โดย Fegan และคนอื่นๆ (1991: 205-217) ได้ศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดจากเชื้อไวรัส PemoNPV ในกึ่งระยะ postlarvae และกึ่งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์ทางภาคใต้ของประเทศไทยเป็นเวลา 1 ปี พบการติดเชื้อในได้เกือบทุกระยะของการเจริญเติบโตยกเว้นระยะไข่ และระยะ nauplius โดยเริ่มพบการติดเชื้อตั้งแต่ช่วงที่ 3 ของระยะ protozoa ส่วนมากพบการติดเชื้อในระยะ postlarvae และจากการศึกษายังพบว่าเมื่อเลี้ยงกึ่งกุลาดำในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมกึ่งเมื่ออายุมากขึ้นการติดเชื้อ PemoNPV จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งคาดว่าสิ่งแวดล้อมที่เครียดนั้นส่งผลต่อการก่อโรคของ PemoNPV ต่อมาในปี พ.ศ. 2535 ระเบิด และนางลักษณะ (2535: 77-81) ทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของกุลาดำระยะ postlarvae ที่ติดเชื้อ PemoNPV พบการติดเชื้อรุนแรงที่ตับโดยไม่พบการติดเชื้อที่อวัยวะอื่นๆ และพบการติดเชื้อร่วมกับโปรโตซัว *Zoothamnium* ตามเปลือก ขา และเหงือก ในปีเดียวกัน ระเบิด จิรศักดิ์ และนันทริกา (2535: 8-13) ได้ทำการศึกษาพยาธิสภาพและพยาธิกำเนิดของไวรัส PemoNPV ในเซลล์ตับของกึ่งกุลาดำอย่างละเอียด โดยการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบสาเหตุการตายของกึ่งมาจากความเสียหายของเหงือกอย่างรุนแรงร่วมกับความเสียหายอย่างมากของตับซึ่งเกิดร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ สุมนา (2535: 124) ทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัส PemoNPV ร่วมกับแบคทีเรียในกึ่งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการศึกษาพบการติดเชื้อ PemoNPV ร่วมกับแบคทีเรีย โดยพบการติดเชื้อ PemoNPV ที่ตับและตับอ่อนถึง 53% ของตัวอย่างที่ได้ทำการทดลอง ต่อมาในปี พ.ศ. 2548 ฉันทนา (2548: 464-469) ทำการศึกษาการติดเชื้อ PemoNPV ในกึ่งกุลาดำระยะ post larvae จากฟาร์มเพาะฟักในจังหวัดภูเก็ต โดยใช้วิธี wet-mount ย้อมด้วยสีมาลาโคท์กรีน จากการศึกษาพบการติดเชื้อ PemoNPV มากในระยะ PL11-15 ถึง 82.71% ของตัวอย่างที่ได้ทำการทดลอง และพบว่าความยาวเฉลี่ยของกึ่งกุลาดำในระยะนี้ต่ำกว่ากึ่งปกติอย่างชัดเจน โดยสาเหตุการติดเชื้อเกิดจากการปนเปื้อนเชื้อของไข่มาจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ PemoNPV ต่อมาในปี พ.ศ. 2550 วรินธา และคนอื่นๆ (2550: 564-573) ได้ศึกษาการติด

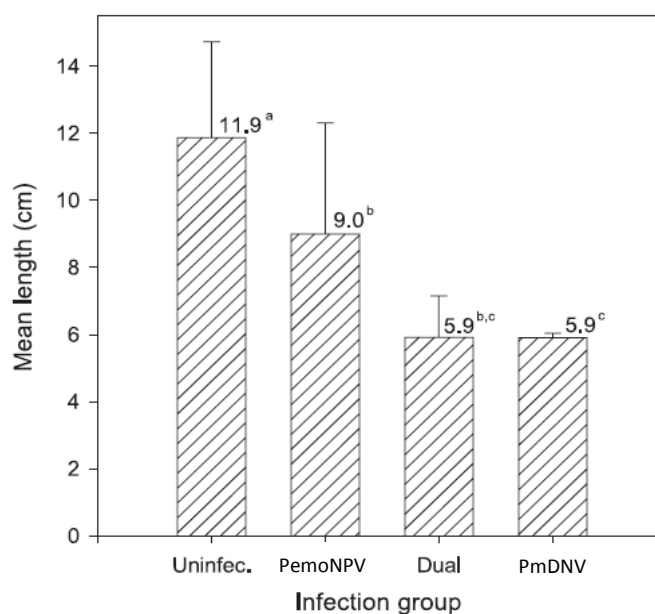
เชื้อ PemoNPV และ PmDNV ในกึ่งกลางดำที่มีขนาดแตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าปริมาณการติดเชื้อ PemoNPV ลดลงเมื่อกึ่งมีอายุมากขึ้น และพบการติดเชื้อร่วมกันของ PemoNPV และ PmDNV มากในกึ่งขนาดเล็ก ซึ่งไวรัสทั้งสองชนิดนี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของกึ่งทำให้เกิดโรคแคระแกร็น และในปี พ.ศ. 2551 อุมารุณ และคนอื่นๆ (2551: 423-429) ได้ศึกษาผลของการติดเชื้อ PemoNPV ในลูกกึ่งกลางดำต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์กึ่งที่มีขนาดเล็กในการเลี้ยงกึ่งกลางดำ โดยนำกึ่งกลางดำระยะ PL15 ที่ปกติ มาเลี้ยงเปรียบเทียบกับกึ่งกลางดำระยะ PL15 ที่ติดเชื้อ PemoNPV 15% เป็นเวลา 120 วัน จากการศึกษาพบว่ากึ่งกลางดำระยะ PL15 ที่ติดเชื้อ PemoNPV มีผลผลิตและอัตราการรอดตายต่ำกว่ากึ่งปกติ และมีปริมาณกึ่งแคระแกร็นมากกว่ากึ่งปกติ แม้ว่าจะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติก็ตาม

ประเทศไทยประสบปัญหาประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงกึ่งกลางดำมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 เป็นต้นมา โดยพบว่ากึ่งกลางดำเติบโตช้าขนาดของกึ่งที่จับขายหน้าฟาร์มจะมีกึ่งขนาดเล็กหรือกึ่งแคระแกร็น (ภาพประกอบ 7) มีน้ำหนัก 3- 5 กรัม เป็นจำนวนมาก เมื่อนำกึ่งขนาดเล็กเหล่านั้นไปศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อพบว่า มีไวรัส PemoNPV และ PmDNV เป็นจำนวนมากอยู่ภายในตัว (ชโล ลิมสุวรรณ; และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2549: 21-27) ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส PemoNPV และ PmDNV ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกึ่งกลางดำ โดยพบว่ากึ่งที่ติดเชื้อ PemoNPV จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของกึ่งน้อยกว่ากึ่งที่ติดเชื้อ PmDNV และจากการศึกษาพบว่าขนาดของกึ่งกลางดำที่ติดเชื้อ PemoNPV และกึ่งปกติจะมีขนาดใกล้เคียงกันขณะทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งผลกระทบของการติดเชื้อ PemoNPV ที่มีผลต่อการเจริญโตของกึ่งกลางดำจะเห็นได้อย่างชัดเจนในช่วงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงก่อนการจับขายจะมีขนาดเล็กกว่ากึ่งปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบ 8) (Flegel; et al. 2004: 55-68) ซึ่งถ้าไวรัสทั้งสองชนิดมีปริมาณมากจะส่งผลทำให้กึ่งโตช้าเนื่องจากการดูดซึมอาหาร การย่อย และการสะสมอาหารไม่เป็นปกติ จะทำให้ลูกกึ่งที่ปล่อยมีอัตราการรอดต่ำและมีปริมาณกึ่งแคระมากกว่าปกติ ทำให้ผลผลิตต่ำกว่าเป้าหมายและระยะเวลาเลี้ยงนานเพิ่มขึ้นเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตให้สูงตามไปด้วย (ชโล ลิมสุวรรณ. 2543: 14) การแก้ปัญหาของเกษตรกรหรือผู้ประกอบการเลี้ยงกึ่งกลางดำของประเทศไทยจะทำการคัดเลือกลูกกึ่งระยะ postlarvae โดยเฉพาะการตรวจหาเชื้อไวรัส PemoNPV ในลูกกึ่งก่อนที่ตัดสินใจซื้อลูกกึ่ง ซึ่งถ้าทำการสุ่มลูกกึ่งระยะ postlarvae ไปตรวจโดยนักวิชาการในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบหรือพบ PemoNPV ไม่เกิน 20% ถือว่าลูกกึ่งมีคุณภาพดี เหมาะสมที่จะนำไปเพาะเลี้ยงได้ต่อไป (Flegel. 2001: 48-63)



ภาพประกอบ 7 แสดงลักษณะของกุ้งกุลาดำที่เกิดอาการแคระแกร็นทำให้มีขนาดที่แตกต่างกัน

ที่มา : การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. (2547). (ออนไลน์)



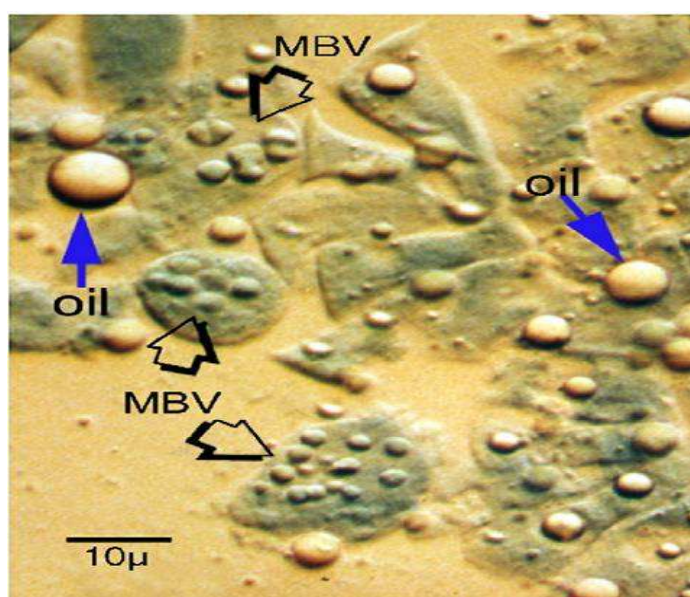
ภาพประกอบ 8 กราฟรูปแท่งแสดงค่าเฉลี่ยความยาวของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV และ PmDENV เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ จะเห็นได้ว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV มีค่าเฉลี่ยความยาวมากกว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PmDENV แต่ก็มีมีความยาวน้อยกว่ากุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่มา : Flegel, T. W.; et al. (2004). Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*. (240): p. 60.

6. การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ PemoNPV

6.1 การตรวจเชื้อโดยวิธี wet-mount

เป็นวิธีที่ง่ายที่ใช้ตรวจการติดเชื้อ PemoNPV โดยใช้วิธี wet-mount นำเนื้อเยื่อตับหรือมูลของกุ้งมาบีบบนสไลด์และหยดสารละลายมาลาไคท์กรีน 0.05% จะพบ occlusion bodies มีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดใหญ่ติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีนเมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาพประกอบ 9) (Lightner. 1996: unpagued, Flegel; et al. 2006: 1-33)

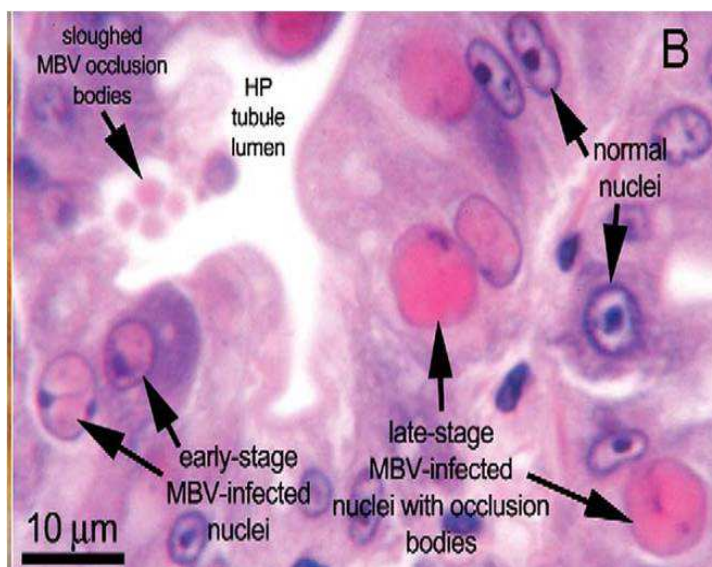


ภาพประกอบ 9 ลักษณะ occlusion bodies ขนาดใหญ่ภายในนิวเคลียสย้อมติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีน ส่วนหยดไขมันที่มีลักษณะคล้าย occlusion bodies จะไม่ติดสีมาลาไคท์กรีน

ที่มา : Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. (258): p. 3.

6.2 การตรวจเชื้อทางพยาธิวิทยา

จากการศึกษากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV โดยนำเนื้อเยื่อส่วนตับกุ้งมาตรวจโดยวิธีพยาธิวิทยา ย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin ในระยะแรกจะเห็นนิวเคลียสติดสีแดงของ eosin ส่วนเส้นใยโครมาติน (chromatin) จะถูกดันไปติดส่วนของเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจะติดสีน้ำเงินของ hematoxylin เมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายจะเห็น occlusion bodies ติดสีแดงจำนวนมากภายในนิวเคลียส (ภาพประกอบ 10) จนเซลล์มีขนาดใหญ่และจะแตกออก occlusion bodies จะหลุดออกไปยัง lumen ของตับ หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระบบลำไส้และขับถ่ายออกมาปนกับอุจจาระกุ้ง (Flegel; et al. 2006: 1-33)



ภาพประกอบ 10 แสดงลักษณะของ hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV จะเห็นว่าในระยะแรกของการติดเชื้อนิวเคลียสจะติดสี eosin ส่วนโครมาตินจะถูกดันไปติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ จะติดสี hematoxylin ส่วนในระยะสุดท้ายของการติดเชื้อจะเห็น occlusion bodies รูปร่างทรงกลมขนาดใหญ่อัดแน่นภายในนิวเคลียสติดสี eosin

ที่มา : Timothy Flegel. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. (258): p. 4.

6.3 การตรวจเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การตรวจเชื้อโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเป็นวิธีที่ช่วยในการยืนยันผลการตรวจการติดเชื้อร่วมกับวิธีอื่นๆ โดยจะใช้วิธี negative stain ในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV จะพบลักษณะของอนุภาคไวรัสมี envelope รูปร่างท่อนยาวมีจำนวนหลายอนุภาคอยู่ภายในและภายนอก occlusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ (Lightner. 1996: unpagged)

6.4 การตรวจเชื้อโดยวิธี nucleic acid-based detection

Poulos และคนอื่นๆ (1994: 187-194) พัฒนาการตรวจโดยวิธี *in situ* hybridization โดยออกแบบ probe ที่ใช้ตรวจสอบเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV โดยทำการคัดเลือกโคลนจาก genomic DNA library ของ PemoNPV ที่แยกได้จากกุ้งที่ติดเชื้อ มาติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) และทำ *in situ* hybridization พบว่าสามารถตรวจสอบเนื้อเยื่อตับและ mid gut ของกุ้งที่ติดเชื้อ PemoNPV ได้และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ PvSNPV ที่ก่อโรคในกุ้งขาว *Penaeus vannamei*

Chang และคนอื่นๆ (1993: 116-120) ได้นำตั้บักุงกุลาดำระยะ postlarvae มาแยกเชื้อ PemoNPV ให้บริสุทธิ์ด้วย caesium chloride gradients เพื่อนำไปใช้ในการสกัดเป็นดีเอ็นเอ ต้นแบบของ PemoNPV และออกแบบ primer จาก conserved sequences ของ insect baculovirus polyhedrin genes จากนั้นมาทำ PCR ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส แล้วได้ทำการพิสูจน์ผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค dot-blot hybridization นำผลผลิต PCR ที่ได้มาใช้เป็น probe ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG)-11-dUTP ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ PemoNPV ด้วย chemiluminescence แสดงผลใน X-ray film

Lu และคนอื่นๆ (1993: 551-559) งานวิจัยที่ได้ก่อนข้างคล้ายงานของ Chang และคนอื่นๆ (1993: 116-120) แตกต่างกันโดยใช้ primer ที่ออกแบบจาก conserved sequences polyhedrin genes ของ *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 674 คู่เบส แล้วนำมาใช้เป็น probe ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG)-11-dUTP ตรวจสอบโดยเทคนิค dot-blot hybridization เช่นเดียวกัน

Hsu และคนอื่นๆ (2000: 93-99) ได้พัฒนาวิธีวินิจฉัย PemoNPV ด้วยวิธี PCR และ ELISA โดยนำตั้บักุงกุลาดำระยะ postlarvae ที่ติดเชื้อ PemoNPV มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย sucrose gradients centrifugation เพื่อนำไปใช้ในการสกัดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR โดย primer ออกแบบจาก conserved sequences ของ polyhedrin genes ของ AcMNPV และ *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus (LdMNPV) ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 714 คู่เบส และเมื่อนำผลผลิต PCR ขนาด 714 คู่เบสไปหาลำดับดีเอ็นเอและเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอของ ชิ้น PCR ที่ได้การเพิ่มผลผลิตของ AcMNPV จาก primer คู่เดียวกันซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 621 คู่เบส พบว่ามีความแตกต่างอย่างมาก จึงได้ทำการนำลำดับดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ขนาด 714 คู่เบสที่ได้ข้างต้นมาออกแบบ primer คู่ที่ 2 ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 511 คู่เบส และไม่เกิดการทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของ AcMNPV, WSSV และเนื้อเยื่อของตั้บักุงกุลาดำที่ปกติเมื่อนำไปทำ PCR เช่นเดียวกัน และงานวิจัยนี้ยังได้นำตัวอย่างตั้บักุงกุลาดำระยะ postlarvae ที่ติดเชื้อ PemoNPV มาแยกด้วย sucrose gradients centrifugation มาใช้เป็นแอนติเจนนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่าย เพื่อให้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจสอบ ตั้บักุงกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี competitive ELISA

อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัย PemoNPV โดยใช้ primer ที่ออกแบบจาก conserved sequences ของ insect baculovirus polyhedrin genes จากทั้งสามงานวิจัยข้างต้น (Chang; et al. 1993: 116-120, Lu; et al. 1993: 551-559, Hsu; et al. 2000: 93-99) พบว่าไม่สามารถตรวจสอบ PemoNPV ที่พบรายงานการติดเชื้อในประเทศต่างๆ ได้ นอกจากตั้บักุงกุลาดำที่ติดเชื้อในประเทศใต้หวัน (Flegel; et al. 2006: 1-33) ซึ่งเหตุผลอาจมาจาก conserved sequences ของ insect baculovirus polyhedrin genes แตกต่างกับ polyhedrin gene ของ PemoNPV อย่างมาก (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267)

Belcher และ Young (1998: 21-29) ได้พัฒนาการตรวจวินิจฉัย PemoNPV ให้ความไวมากยิ่งขึ้นด้วยวิธี nested PCR โดย primer ออกแบบจากชิ้นส่วน DNA ของ PemoNPV ที่ได้จากการสกัดแยกเชื้อ PemoNPV จากกึ่งกุลาตัวที่ติดเชื้อในระยะ postlarvae ซึ่งเมื่อนำไปทำ PCR จะให้ผลผลิตของ outer primer ขนาด 533 คู่เบส และ inner primer ขนาด 361 คู่เบส จาก primer 2 คู่ ตามลำดับดังนี้

Outer primer MBV1.4F 5'-CGA-TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'

MBV1.4R 5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'

Inner primer MBV1.4NF 5'-TCC-AAT-CGC-GTC-TGC-GAT-ACT-3'

MBV1.4NR 5'-CGC-TAA-TGG-GGC-ACA-AGT-CTC-3'

โดยพบว่าการพัฒนาวิธี nested PCR ครั้งนี้สามารถที่จะตรวจสอบกึ่งกุลาตัวที่ติดเชื้อ PemoNPV ที่พบการติดเชื้อในประเทศออสเตรเลีย ประเทศไต้หวัน และประเทศไทยได้ (Flegel; et al. 2006: 1-33)

Surachetpong และคนอื่นๆ (2005: 69-75) ได้พัฒนาวิธี PCR มาใช้ในการตรวจสอบ PemoNPV โดยออกแบบ primer จาก PemoNPV genomic sequence จากงานวิจัยของ Mari และคนอื่นๆ (1993: 207-215) ได้ primer 261F และ 261R ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 261 คู่เบส พบว่าสามารถตรวจสอบตัวอย่างกึ่งกุลาตัวที่ติดเชื้อ PemoNPV ได้จากประเทศไต้หวัน ประเทศมาเลเซีย ประเทศฟิลิปปินส์ รัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศไทย และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างกึ่งที่พบการติดเชื้อจากไวรัสชนิดอื่นๆ

Chaivisuthangkura และคนอื่นๆ (2009: 188-193) ได้พัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification ในการตรวจเชื้อ PemoNPV โดยออกแบบ primer 6 ตัว ที่จำเพาะต่อยีนโพลีอีตริทของ PemoNPV (GenBank accession no. EU251062) โดยมีอุณหภูมิเหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที มีความไวในการตรวจสอบประมาณ 50 viral copies ng⁻¹ genomic DNA (มีค่าเท่ากับ 150 viral copies per reaction) และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของกึ่งที่ติดเชื้อ PemoNPV ต่ำสุดที่ประมาณ 0.7 เฟมโตกรัม ซึ่งมีค่าน้อยกว่าวิธี nested PCR ของ Belcher และ Young (1998: 21-29) ซึ่งตรวจสอบได้ต่ำสุดที่ 70 เฟมโตกรัม นอกจากนี้พบว่าวิธี LAMP ที่ตรวจสอบเชื้อ PemoNPV ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่พบการรายงานที่ติดเชื้อในกึ่ง ได้แก่ WSSV, TSV, PmDENV, PstDENV และ YHV

Yan และคนอื่นๆ (2009: 126-132) ได้พัฒนาวิธี real-time PCR ในการตรวจเชื้อ PemoNPV โดยออกแบบ primer และ TaqMan probe จาก PemoNPV genomic sequence (GenBank accession no. AY494591) พบว่าสามารถตรวจสอบตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและมูสของกึ่งกุลาตัวที่ติดเชื้อ PemoNPV ในประเทศไทย และอินโดนีเซีย โดยให้ผลผลิต 135 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของกึ่งที่ติดเชื้อ PemoNPV ต่ำสุดที่ประมาณ 1 copy ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ

กับวิธี PCR ของ Surachetpong และคนอื่นๆ (2005: 69-75) พบว่ามีค่าน้อยกว่า ซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของกึ่งที่ติดเชื้อ PemoNPV ต่ำสุดที่ประมาณ 100 copies ของ PemoNPV DNA และวิธี nested PCR ของ Belcher และ Young (1998: 21-29) ต่ำสุดที่ประมาณ 8 copies ของ PemoNPV DNA นอกจากนี้พบว่าเมื่อนำไปตรวจสอบไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคในกึ่งก็ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม ได้แก่ WSSV, PmDNV และ PstDNV

6.5 การตรวจเชื้อ PemoNPV โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

Satidkanitkul และคนอื่นๆ (2005: 79-84) ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโพลีอีตรินของเชื้อ PemoNPV โดยแยกโพลีอีตรินจากตับของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ในธรรมชาติด้วยวิธี density gradient ultracentrifuge และทำการยีนย่นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโปรตีนโพลีอีตรินที่แยกด้วย SDS-PAGE ได้แถบโปรตีนโพลีอีตรินขนาด 58 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปหาลำดับกรดอะมิโน 25 ลำดับแรกของโปรตีนโพลีอีตรินทางด้านปลาย N จากนั้นสังเคราะห์เพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 25 ตัวแรกนั้น เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจสอบเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และตรวจเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้

Boonsanongchoking และคนอื่นๆ (2006: 371-376) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโพลีอีตรินของเชื้อ PemoNPV โดยแยกโปรตีนโพลีอีตรินจากตับของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ในธรรมชาติด้วยวิธี density gradient ultracentrifuge และทำการยีนย่นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และ SDS-PAGE จากนั้นนำโปรตีนโพลีอีตริน ที่แยกได้ไปฉีดกระตุ้นหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจากหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นกับ P3X myeloma cell และคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีอีตรินของเชื้อ PemoNPV พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry และไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับกึ่งที่ไม่ติดเชื้อหรือกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น

7. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจาก บี-เซลล์เซลล์เดี่ยว จึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในตำแหน่งของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทป เป็นผลให้มี

การสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปรวมอยู่ด้วยกันเรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กัน เช่น จับกับแอนติเจนหรือระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัมทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะที่ต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่น ซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-95)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คิดค้นในช่วงกลางปี ค.ศ. 1975 (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดคือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่ไม่สามารถมีชีวิตได้ยาวนานจึงมีอายุที่จำกัด ขณะที่ไมอีโลมาเซลล์จะไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่สามารถแบ่งตัวเติบโตไม่มีขีดจำกัดให้คุณสมบัติเป็นอมตะ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ทั้งสองชนิดมาหลอมรวมกัน ทำให้ได้เซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุดซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-95)

การหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ การใช้ไมอีโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอีโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-95)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมอีโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ได้ เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์มะเร็ง และไมอีโลมาเซลล์เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือก

ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แกสเตร์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไป ได้แก่ ELISA และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันรูปแบบต่าง ๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่น ๆ ตามความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-95)

ประโยชน์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้เป็นเครื่องมือในด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวมีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจนจึงมีความจำเพาะสูง นักวิทยาศาสตร์ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์ หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์การตรวจวินิจฉัยโรคและการบำบัดโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-95)

จากความรู้เกี่ยวกับยีนโพลีอีตริโนของ PemoNPV การโคลนและการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริโนของ PemoNPV น่าจะเป็นแอนติเจนที่ดีในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี และพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป เนื่องจากโปรตีนโพลีอีตริโนเป็นโปรตีนที่ผลิตออกมาเป็นจำนวนมากจึงเป็นเป้าหมายที่เหมาะสมในการใช้ตรวจวินิจฉัยกุงที่ติดเชื้อ PemoNPV โดยใช้แอนติบอดี นอกจากนี้การใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริโนสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุงที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริโนส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (OB-N) และส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย C (OB-C) ของ PemoNPV มาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267) ซึ่งช่วยให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตมามีความจำเพาะต่อส่วนต่างๆ ของโปรตีนโพลีอีตริโนเพิ่มมากยิ่งขึ้น และเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PemoNPV ให้มากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พลาสมิด

พลาสมิด pTYB1 ที่มียีนของโปรตีนโพลีฮีตรินซึ่งเป็นรหัสทางปลาย N (OB-N-pTYB1) และ พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีนของโปรตีนโพลีฮีตรินซึ่งเป็นรหัสทางปลาย C (OB-C-pGEX-6P-1) ของ PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และสายพันธุ์ BL21

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB)

3. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

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

2.2 กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ได้รับการอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex shrimp) มหาวิทยาลัยมหิดล และบรจจฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา

4. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
2. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
3. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
4. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinet)	NUAIRE
5. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ incubator)	NUAIRE
6. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JANWAY
7. เครื่อง rotary microtome รุ่น RM2135	LEICA

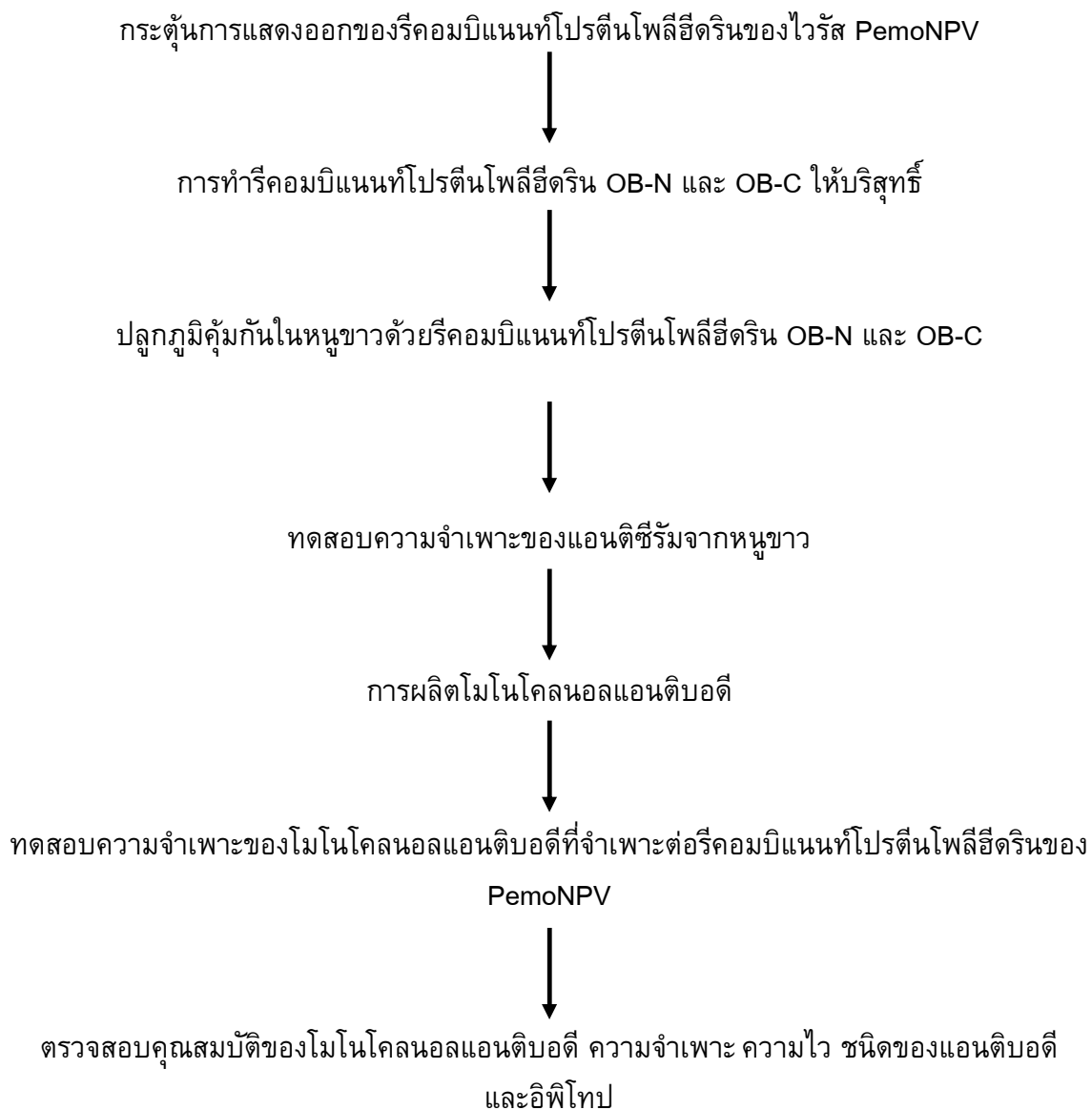
5. เคมีภัณฑ์

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ยาปฏิชีวนะ (ampicillin และ kanamycin)	Sigma
2. fetal bovine serum	Starrate
3. polyethylene glycol (PEG)	Sigma
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
5. hypoxanthine	Gibco
6. aminopterin	Sigma
7. nitrocellulose membrane	Sigma
8. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
9. diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
10. Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินงานสรุปได้ดังนี้



1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตรินของ PemoNPV ส่วน OB-N และ OB-C

จากวิธีของ Sambrook; Fritsch; & Maniatis (2000: 17.1-17.10) ทำการกระตุ้นการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตรินของ PemoNPV เริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ OB-N และ OB-C (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267) ตามลำดับ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ บ่มข้ามคืนใน shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นใส่ลงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมี ampicillin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้น แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติม buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) จากนั้นนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาผสมกับบัฟเฟอร์ 2X SDS-treatment ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970: 680-689) โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีเฉพาะพลาสมิด pTYB1 ซึ่งจะผลิตโปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งจะผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 กิโลดาลตัน เป็น positive control (เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่) และ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ไม่มีพลาสมิดเป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์โพลีอีตรินโปรตีน OB-N และ OB-C เทียบกับโปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีและไม่มีพลาสมิด pTYB1 และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ตามลำดับ

3. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C ให้บริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N (ขนาด 83.2 กิโลดาลตัน) และ OB-C (ขนาด 48.4 กิโลดาลตัน) มาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาแยกโดยใช้ 12% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 แล้วแช่เจลในสารละลาย 0.3 M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที (Hang. 2007: 24) ตัดแถบที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนนำไปแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน เก็บสารละลาย

ที่ได้ใส่ในถุง dialysis แล้วแช่ในน้ำกลั่นเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV

4.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ที่ได้จากข้อ 3 ผสมในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วจึงผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 เช่นกัน จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว จำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร และทุกๆ 2 สัปดาห์ ฉีดรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บซีรัมหนูแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้รับรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ PemoNPV โดยวิธี immunohistochemistry เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน

4.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษาคั้งนี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี 1979 (Mosmann; Bauman; & Williamson 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยฆ่าหนู ผ่าตัดม้าม และกระจายเซลล์ม้ามออกไปเป็นเซลล์เดี่ยวแล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ 40% polyethylene glycol (PEG) หลังจากนั้นนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (selective medium - HAT medium) ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal calf serum ใน RPMI medium และมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่างๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมาไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้าง

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีอีตรินของ PemoNPV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

4.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

เนื่องจากการผลิตไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plate ทำให้ได้ไฮบริโดมาจำนวนมากจึงต้องคัดเลือกชั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อน โคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting จึงนำมาคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry ต่อไป

4.3.1 การคัดเลือกชั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้ pTYB1 และ pGEX- 6P-1 expression vector ในการผลิตโปรตีนทำให้ได้โปรตีนลูกผสมของ intein และ GST จากพลาสมิดกับโปรตีนที่ต้องการตามลำดับ ดังนั้นในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting จึงต้องหยุด lysate ของโปรตีน 4 ชนิดคือ lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด OB-N-pTYB1 (OB-N) และ pTYB1 (intein) กับ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด OB-C-pGEX-6P-1 (OB-C) และ pGEX-6P-1 (GST) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อโปรตีน OB-N และ OB-C เท่านั้น จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำยาเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto = 1% non fat dry milk และ 0.1% tritonX 100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1:1,500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidas โดยบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อโปรตีน OB-N และ OB-C แต่ไม่จำเพาะต่อ intein และ GST นำมาคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และ immunohistochemistry ต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 215-218)

4.3.2 การคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting

โดยนำ lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด OB-N-pTYB1 และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด OB-C-pGEX-6P-1, มาแยกบน 12% SDS-PAGE ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของเจลนำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่ กระดาษ

ไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:200 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 219-224)

4.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Immunohistochemistry

โดยนำกึ่งกลาดำระยะ post larvae ที่ติดเชื้อ PemoNPV และกึ่งกลาดำปกติ แช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งเพื่อกำจัด fixative ออก นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และ xylene จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินแล้วนำไปอบที่ตู้อบ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene (deparaffination) จากนั้นผ่านลง butanol และแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากมากไปน้อย ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอर्मาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่นและ PBS จากนั้น block ด้วย P_1^+ (10% calf bovine serum ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 ใน P_1^+ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย hematoxylin และ eosin Y ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากนั้นนำไปมาก และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลที่ tubular epithelial cells ของตับกึ่ง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 232-239)

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ขั้นจะนำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar. 1985: 1-42) จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนและเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป และทำการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

5. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการโคลนซ้ำไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA การตรวจสอบชนิดของ heavy chain and light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหาคอมมิแนนท์โปรตีนโพสส์ทีรินของ PemoNPV ด้วยวิธี ด้วยวิธี dot blotting ดังต่อไปนี้

5.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA

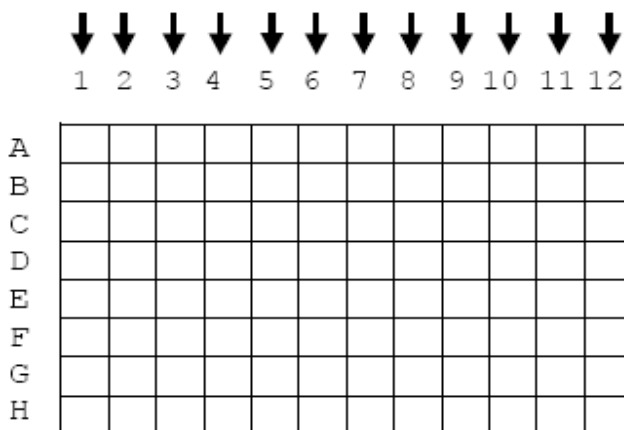
ทำการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยทำการตรึงรีคอมมิแนนท์โปรตีนโพสส์ทีริน OB-N หรือ OB-C ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 0.5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่าง ๆ ของ 96 wells microculture plate ดังตัวอย่างตามภาพประกอบ 11 จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto จากนั้นเติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H₂O₂ ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N H₂SO₄ ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 226-227)

MAbs PemoNPV	MBV1	MBV2	MBV3	MBV4	MBV5
MBV1	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5
MBV2		2+2	2+3	2+4	2+5
MBV3			3+3	3+4	3+5
MBV4				4+4	4+5
MBV5					5+5

ภาพประกอบ 11 การตรวจสอบอิมูโนโกลบูลินของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA แสดงส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโพสทีทีรีนของ PemoNPV ที่ใช้ในการตรวจสอบอิมูโนโกลบูลินของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

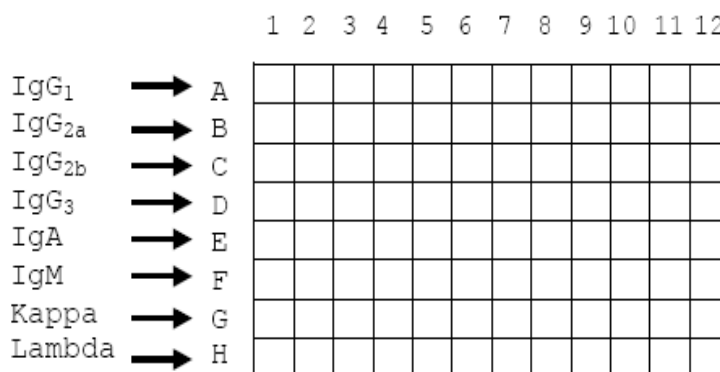
5.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โดยทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) ดังนี้ ทำการตรึง Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงที่ก้นหลุม 96 wells microculture plate ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๑ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1 : 20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 12)



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

เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม Rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1 : 50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 แสดงการเติม Rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H (ลูกศร) เพื่อใช้ในการจัดจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา

จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติม HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1 : 1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และผ่านกระบวนการ immunoperoxidase เช่นเดียวกับข้อ 5.1

5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ทำการเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีอีตริน (Boonsanongchoking; et al. 2006: 371-376) และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาผสมรวมกัน (combine) ในการตรวจหาคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีอีตรินของ PemoNPV และเชื้อ PemoNPV ที่แยกได้จากกุ่มกูด้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยนำรีคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C มาเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน โดยเจือจาง 1:200 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูระดับความเข้มข้นของรีคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก

5.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อ WSSV และ YHV ในกุ่มกูด้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ่มกูด้าที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV ตามธรรมชาติมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:200 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อ WSSV และ YHV โดยมีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) และ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก

5.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อ WSSV, YHV, TSV, PmDNV และ PstDNV ในเนื้อเยื่อของกุ่มกูด้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาตินั้นทำโดยวิธี immunohistochemistry ที่ใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PemoNPV จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาบริเวณที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายกุ่มกูด้าที่ติดเชื้อโดยมีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78) PmDNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) และ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132.) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก

บทที่ 4

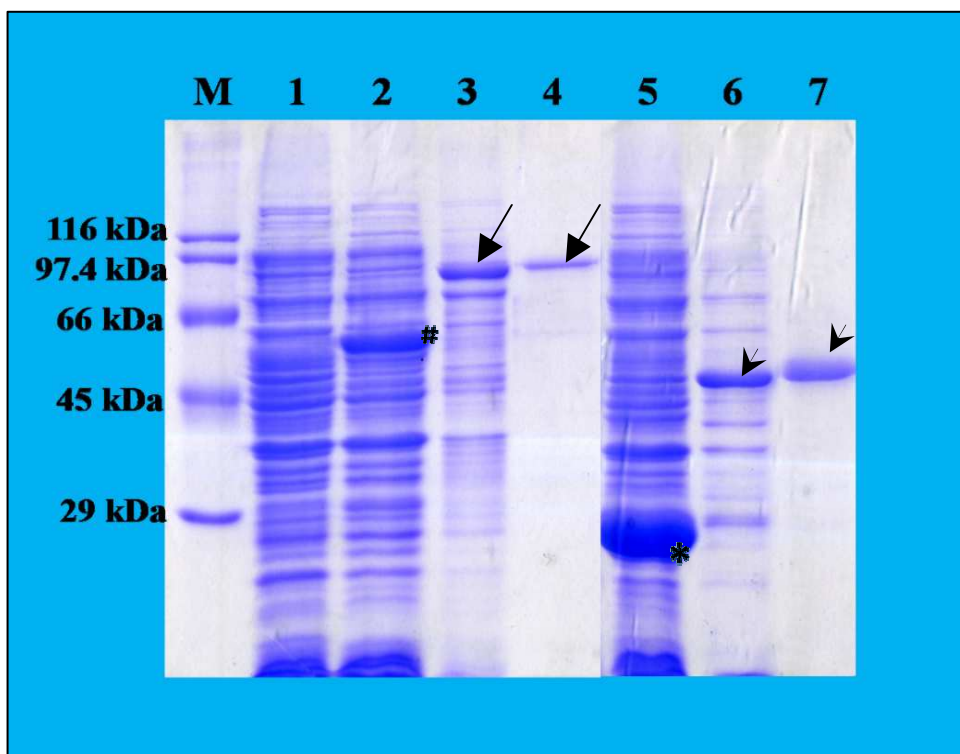
ผลการทดลอง

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตรินของไวรัส PemoNPV ด้านปลาย N (OB-N) และ ปลาย C (OB-C)

หลังจากนำ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-N-pTYB1 และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-C-pGEX-6P-1 (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267) มากระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน OB-N และ OB-C โดยใช้ 1mM IPTG จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกและวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C ซึ่งมีขนาดประมาณ 83.2 และ 48.4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 14 แถวที่ 3 และ 6) ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N ที่ได้มีโปรตีน intein เชื่อมอยู่ทางปลาย C และรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-C ที่ได้มีโปรตีน GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N โดยเทียบกับ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด และที่มีพลาสมิด pTYB1 หรือ pGEX-6P-1 ซึ่งจะมีการแสดงออกของโปรตีน intein และ GST มีขนาด 55 และ 26 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 14 แถวที่ 2 และ 5)

การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C ให้บริสุทธิ์

จากการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C ให้บริสุทธิ์โดยนำ lysate ของแบคทีเรียมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE และแช่เจลใน 0.3 M KCl จนเห็นแถบโปรตีนเป็นสีขาวขุ่นจากนั้นตัดแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตริน OB-N และ OB-C นำมาแยกโปรตีนออกจากเจลโดยแช่เจลใน 1% SDS และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น พบว่าสามารถแยกได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง เมื่อนำมาทดสอบด้วย 12% SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนอื่นๆ นอกจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีอีตรินที่ต้องการซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน OB-N เท่ากับ 83.2 กิโลดาลตัน และโปรตีน OB-C เท่ากับ 48.4 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 14 แถวที่ 4 และ 7)



ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C

โดยนำมาแยกใน 12% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

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

แถวที่ 2 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1

แถวที่ 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-N-pTYB1

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N ที่ทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 5 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 6 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-C-pGEX-6P-1

แถวที่ 7 รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-C ที่ทำให้บริสุทธิ์

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

คือ โปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน

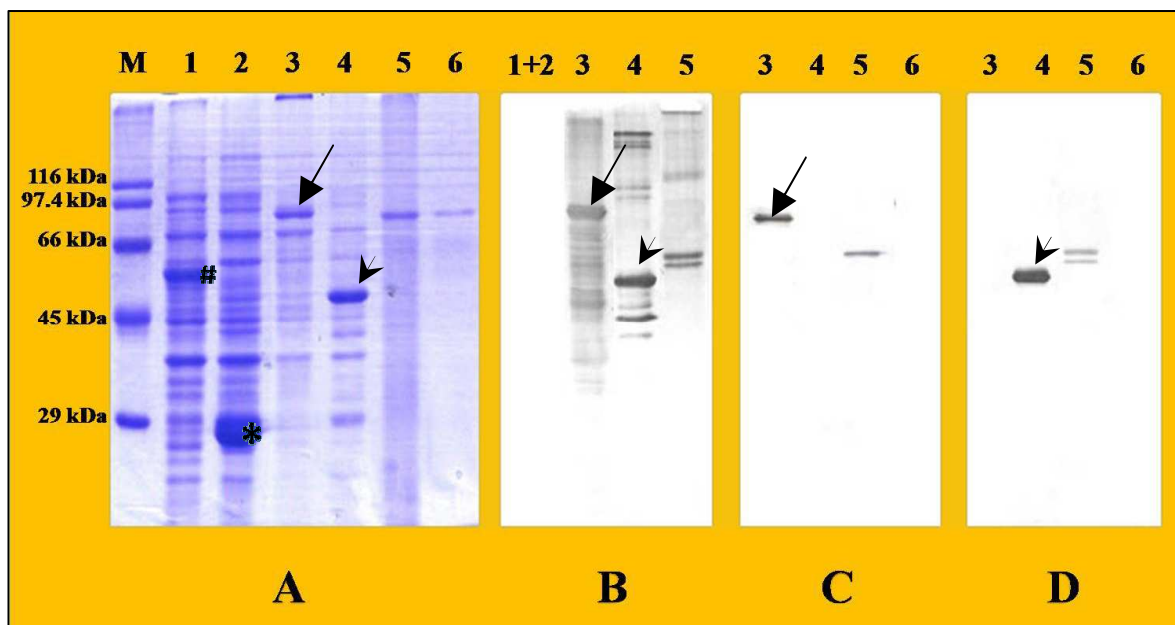
* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

▶ คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N ขนาดประมาณ 83.2 กิโลดาลตัน

◄ คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-C ขนาดประมาณ 48.4 กิโลดาลตัน

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PemoNPV

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ที่ทำให้บริสุทธิ์มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ได้ทุกตัวในระดับที่แตกต่างกัน โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C (ภาพประกอบ 15B) เลือกหนูตัวที่ตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C จากวิธี Western blotting และต่อเชื้อ PemoNPV จากวิธี immunohistochemistry ที่ดีที่สุด มาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ OB-N จำนวน 2 โคลน และจำเพาะต่อ OB-C จำนวน 4 โคลน (ตาราง 3) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ที่ได้จากกุ่มที่ติดเชื้อจากธรรมชาติได้ด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 16) และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนโพลีฮีตรินขนาด 58 กิโลดาลตันที่แยกได้จากกุ่มที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ OB-C สามารถตรวจจับโปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV ได้ 2 แถบ (ภาพประกอบ 15D แถวที่ 5) และสำหรับการตรวจเชื้อ PemoNPV ในเนื้อเยื่อตับกุ่มกุลาดำโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนสามารถจับโปรตีนโพลีฮีตรินบริเวณ occlusion bodies ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับกุ่มกุลาดำที่ติดเชื้อได้โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ กับเนื้อเยื่อตับกุ่มกุลาดำปกติ (ภาพประกอบ 17) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกตัวสามารถจับโปรตีนโพลีฮีตรินได้ชัดเจนมาก (ตาราง 3)



ภาพประกอบ 15 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B-D) โดยแยกโปรตีนด้วย (A) 12% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant blue R-50 เจลอีกส่วนนำมาทำ Western blotting โดยทดสอบกับ (B) โพลีโคลนอลแอนติบอดีของหนูที่มีความจำเพาะต่อ OB-N และ OB-C (C) โมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV13-5D ที่มีความจำเพาะต่อ OB-N และ (D) โมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV3-9H ที่มีความจำเพาะต่อ OB-C ตามลำดับ

แถวที่ 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1

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

แถวที่ 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-N-pTYB1

แถวที่ 4 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-C-pGEX-6P-1

แถวที่ 5 สารสกัดจากกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ตามธรรมชาติ

แถวที่ 6 สารสกัดจากกิ้งกูดดำปกติ

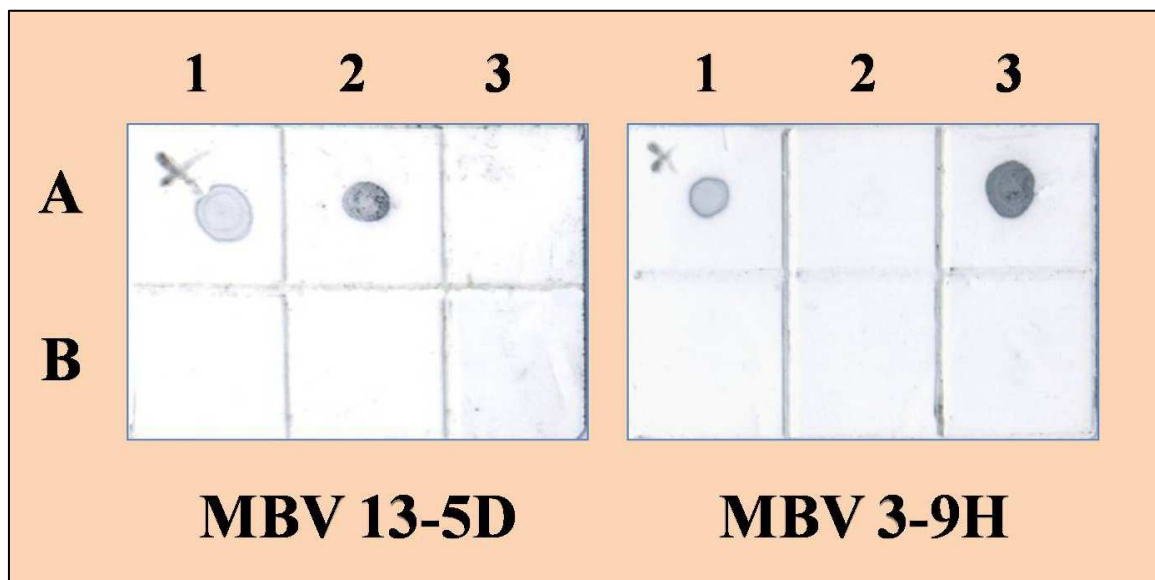
โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

คือ โปรตีน intein ขนาด 55 กิโลดาลตัน

* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

➤ คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N ขนาดประมาณ 83.2 กิโลดาลตัน

➤ คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-C ขนาดประมาณ 48.4 กิโลดาลตัน



ภาพประกอบ 16 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้

แถว A (1) สารสกัดจากกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ตามธรรมชาติ

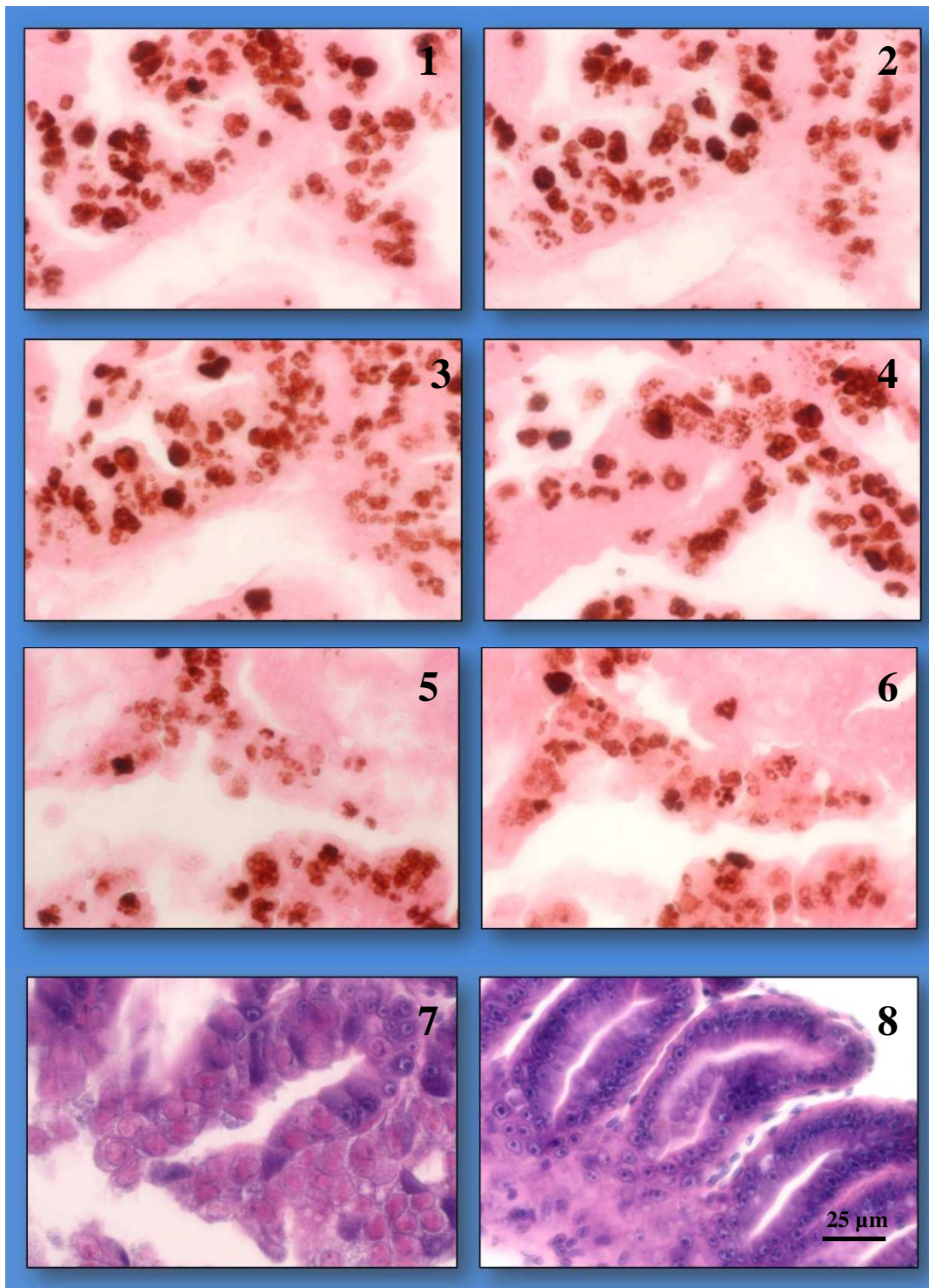
(2) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-N-pTYB1

(3) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด OB-C-pGEX-6P-1

แถว B (1) สารสกัดจากกึ่งกุลาดำปกติ

(2) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1

(3) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1



ภาพประกอบ 17 การตรวจการติดเชื้อ PemoNPV ภายใน hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (1) MBV3-9H (2) MBV4-5C (3) MBV17-5H และ (4) MBV19-10F (5) MBV13-5D (6) MBV12-8B ซึ่งจะพบ immunoreactivity บริเวณ occlusion bodies (7) ตับกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ย้อมด้วย haematoxylin และ eosin Y พบ occlusion bodies ติดสี eosin (8) ตับกุ้งกุลาดำปกติย้อมด้วย haematoxylin และ eosin

การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

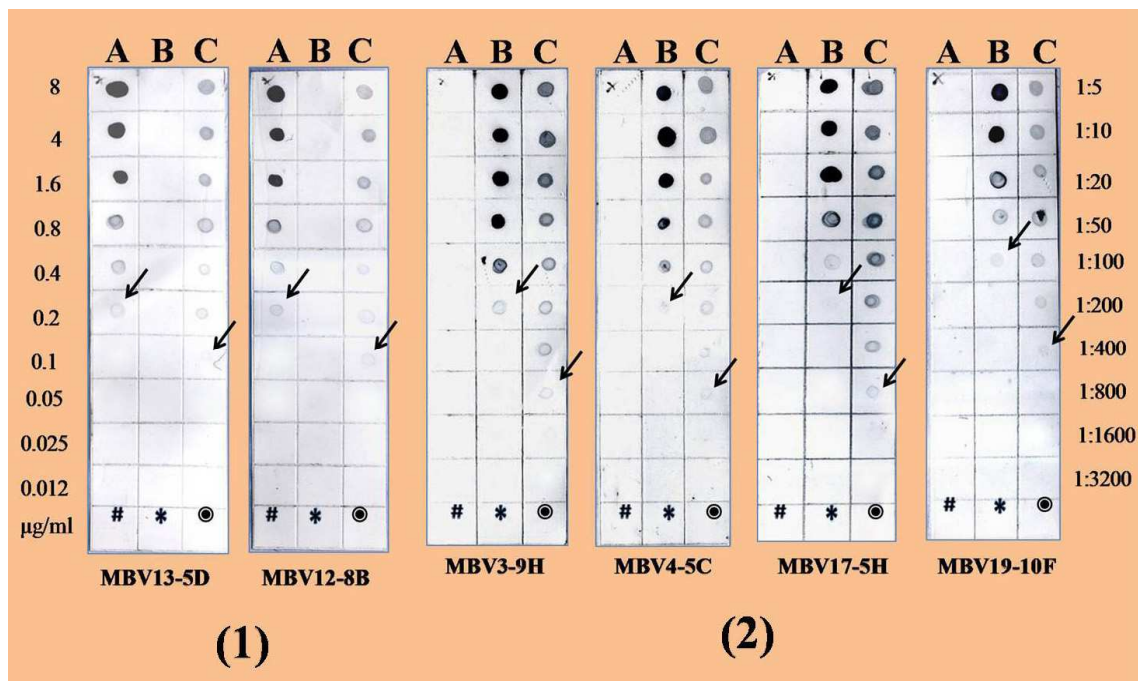
จากการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OB-N แต่ละชนิดมาผสมรวมกัน (combine) ได้แก่ (MBV13-5D และ MBV12-8B) มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวกันเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสมรวมกัน แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีจับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OB-C มาผสมรวมกัน ได้แก่ (MBV3-9H, MBV4-5C, MBV17-5H และ MBV19-10F) พบว่ามีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวกันทั้งหมด เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสมรวมกัน (ภาพประกอบ 18)

MAbs	13-5D	12-8B	3-9H	4-5C	17-5H	19-10F
PemoNPV						
13-5D	1.533	1.528				
12-8B		1.275				
3-9H			1.667	1.676	1.648	1.714
4-5C				1.754	1.753	1.743
17-5H					1.703	1.693
19-10F						1.640

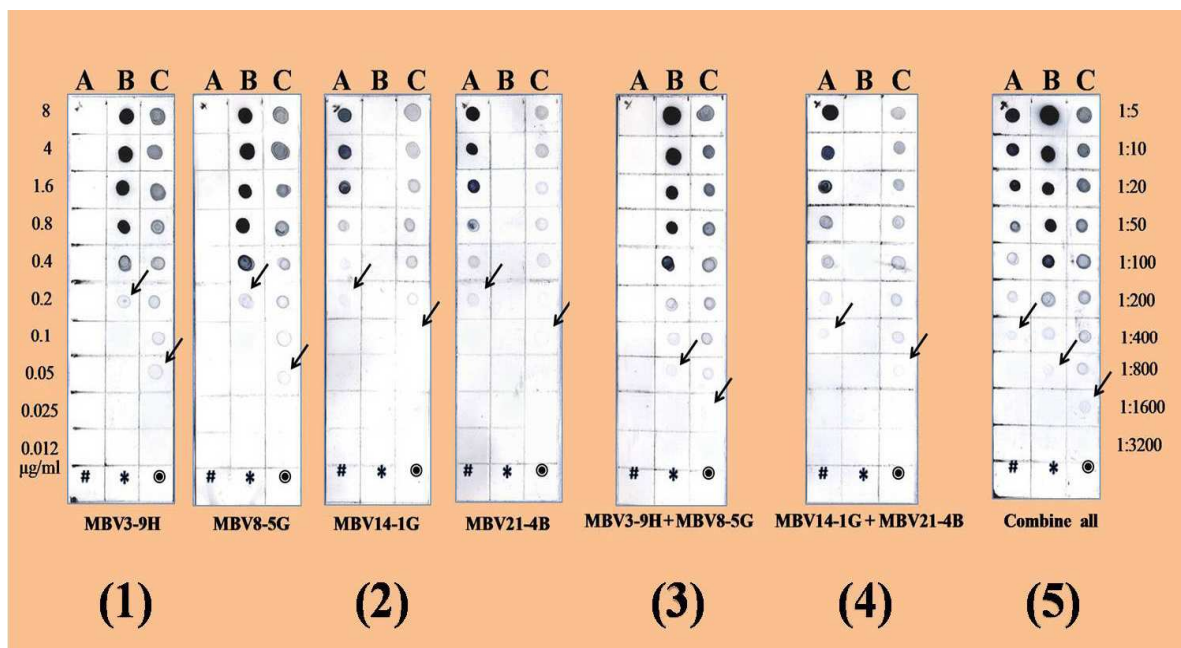
ภาพประกอบ 18 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ (ตัวเลขเหนือค่า OD คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่าง ๆ)

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนที่ผลิตได้มี class เป็น IgG₁ และ IgG_{2a} และ subclass เป็น kappa (**K**) (ตาราง 3)

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C โดยวิธี dot blotting พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.2 ถึง 0.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OB-N ได้แก่ MBV13-5D และ MBV12-8B สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 2.40 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OB-C ได้แก่ MBV3-9H, MBV4-5C และ MBV17-5H สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 4.13 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร ยกเว้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV19-10F มีความไวต่ำที่สุด สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับโปรตีนเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 8.26 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV3-9H, MBV4-5C และ MBV17-5H สามารถตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกุ่มกูดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:800 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV13-5D, MBV12-8B และ MBV19-10F ที่สามารถตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกุ่มกูดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:400 (ตาราง 3 และภาพประกอบ 19) นอกจากนี้เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ได้แก่ MBV3-9H ทำการเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก Boosanongchoking และคนอื่นๆ (2006: 371-376) ได้แก่ MBV8-5G, MBV14-1G และ 21-4B พบว่าสามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MBV8-5G คือ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 2.40 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร และสามารถตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกุ่มกูดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเท่ากับ MBV8-5G ที่เจือจาง 1:800 แต่เมื่อผสมรวมกันโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV3-9H และ MBV8-5G พบว่าสามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 1.02 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร และตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกุ่มกูดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:1600 ซึ่งเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV3-9H, MBV8-5G, MBV14-1G และ 21-4B มาผสมรวมกัน พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ PemoNPV จากกุ่มกูดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้มากขึ้นเมื่อสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพประกอบ 20) นอกจากนี้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ PemoNPV ทั้ง 6 โคลนนี้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดจากข่าว่ายน้ำของกุ่มขาวที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV (ภาพประกอบ 21) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเชื้อ PstDENV, PmDENV, WSSV, YHV และ TSV ในเนื้อเยื่อของกุ่มที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 19 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีฮีตริน OB-N ได้แก่ (1) MBV13-5D, MBV12-8B และที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีฮีตริน OB-C ได้แก่ (2) MBV3-9H, MBV4-5C, MBV17-5H, MBV19-10F ตามลำดับ ในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน (A) OB-N และ (B) OB-C ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 ถึง 0.012 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (C) เซลล์ PemoNPV ที่ได้จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ซึ่งเจือจาง 1: 5 ถึง 1: 3200 ด้วยวิธี dot blotting ซึ่งเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดย # คือ ช่องที่หยด lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1 * คือ ช่องที่หยด lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ● คือ ช่องที่หยดสารสกัดจากกึ่งกลาดำปกติ



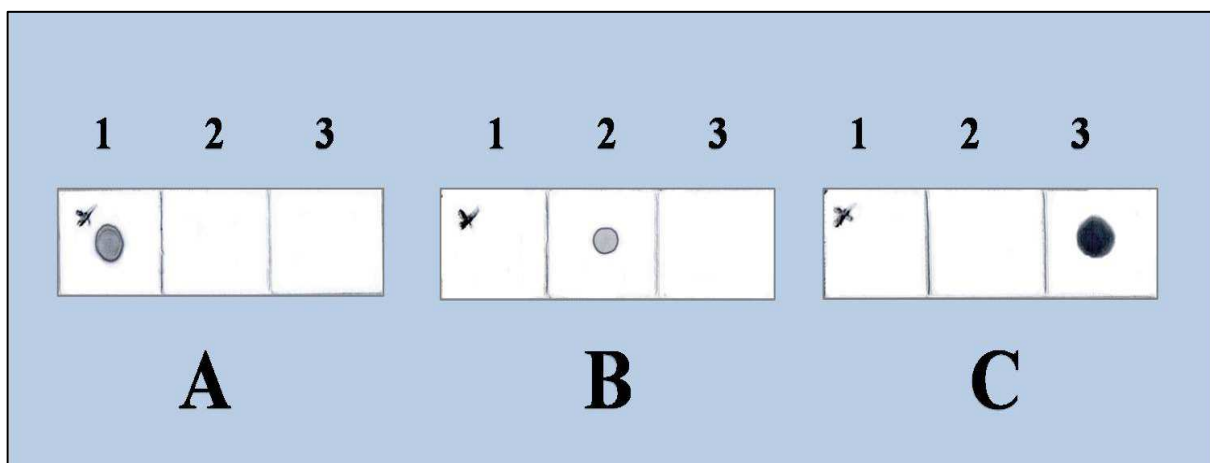
ภาพประกอบ 20 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (1) MBV3-9H เปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก Boosanongchoking และคนอื่นๆ (2006: 371-376)(2) MBV8-5G, MBV14-1G, MBV21-4B โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาผสมรวมกัน (3) MBV3-9H + MBV8-5G, (4) MBV14-1G + MBV21-4B และ (5) ผสมรวมกันทั้ง 4 ตัว ในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลิฮีตริน (A) OB-N และ (B) OB-C ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 ถึง 0.012 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (C) เซื้อ PemoNPV ที่ได้จากกึ่งกุลาต้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ซึ่งเจือจาง 1:5 ถึง 1: 3200 ด้วยวิธี dot blotting ซึ่งเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

- โดย # คือ ช่องที่หยด lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pTYB1
 * คือ ช่องที่หยด lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1
 ● คือ ช่องที่หยดสารสกัดจากกึ่งกุลาต้าปกติ

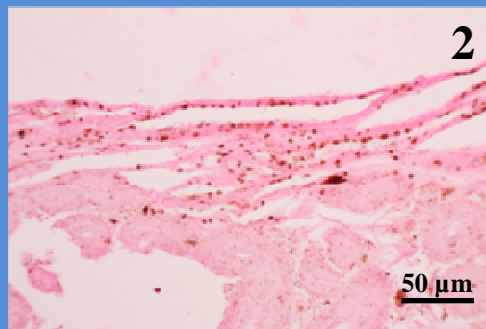
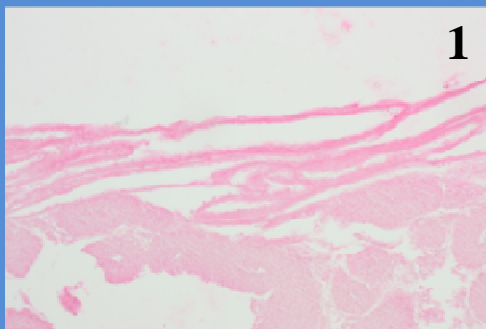
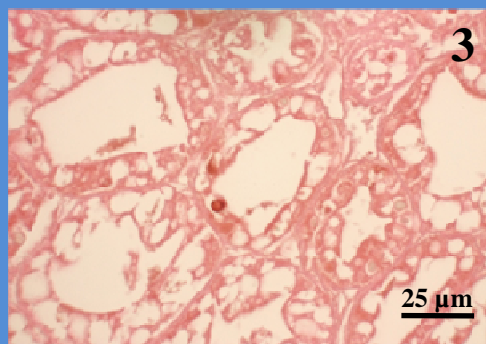
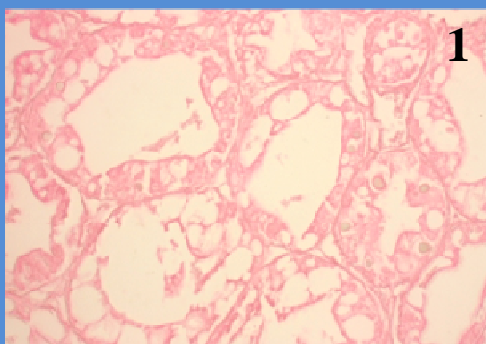
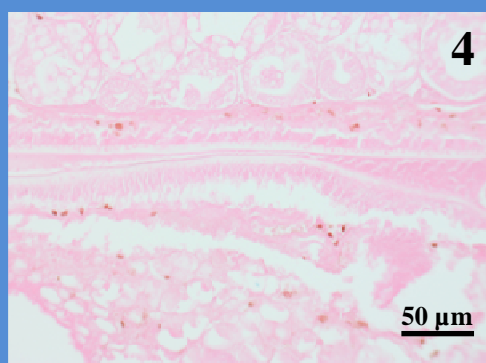
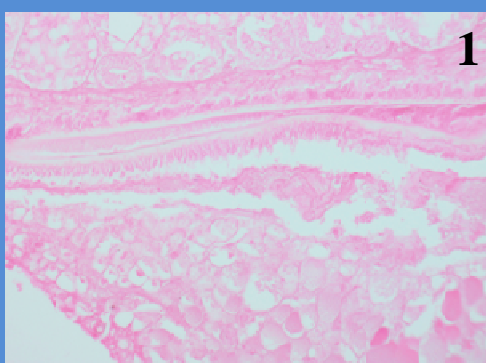
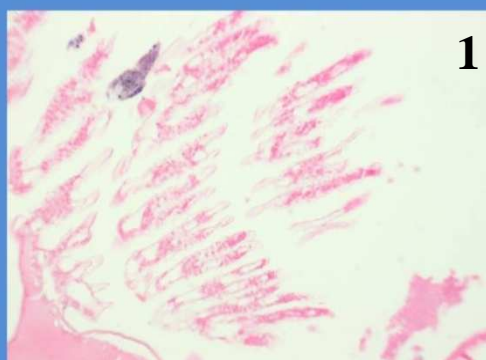
ตาราง 3 โคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C, class, ความจำเพาะและความไวของการตรวจหาแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

MAbs (isotype)	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี dot blotting (เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี Western blotting (เชื้อ PemoNPV ตาม ธรรมชาติ)	IHC	โปรตีนที่จับ
MBV13-5D (IgG _{2a})	2.40	+++	+++	OB-N
MBV12-8B (IgG ₁)	2.40	+++	+++	OB-N
MBV3-9H, MBV4-5C, MBV17-5H (IgG ₁)	4.13	+++	+++	OB-C
MBV19-10F (IgG ₁)	8.26	++	+++	OB-C

- หมายเหตุ - โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่สามารถจับกับโปรตีนหรือเชื้อ PemoNPV ได้
 + โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ PemoNPV ได้เล็กน้อย
 ++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ PemoNPV ได้ชัดเจน
 +++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ PemoNPV ได้ชัดเจนมาก
 IHC immunohistochemistry
 MAbs โมโนโคลนอลแอนติบอดี



ภาพประกอบ 21 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV โดยหยดสารสกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV และสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV ตามธรรมชาติ บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้ (1) สารสกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV (2) สกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV (3) สกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ YHV จากนั้นปมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) MBV3-9H (B) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) และ (C) Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76)

A**B****C****D****E**

ภาพประกอบ 22 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PemoNPV กับองค์ประกอบต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ (A) เยื่อบุผิวรอบ lymphoid organ ที่ติดเชื้อ PstDNV (B) ตับของกึ่งที่ติดเชื้อ PmDNV (C) เยื่อบุผิวหนังใต้เปลือกที่ติดเชื้อ WSSV (D) เหงือกกึ่งที่ติดเชื้อ YHV และ (E) เหงือกกึ่งที่ติดเชื้อ TSV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) MBV3-9H ที่จำเพาะต่อเชื้อ PemoNPV (2) IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126–132) (3) HPV16-9C ที่จำเพาะต่อเชื้อ PmDNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85–89) (4) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) (5) Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) (6) TSV3-666 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

เมื่อกระตุ่นการแสดงออกของโปรตีนโพลีฮีตรินของเชื้อ PemoNPV สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ได้โดยโปรตีนมีขนาดประมาณ 83.2 และ 48.4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สามารถแยกโปรตีน OB-N และ OB-C ได้ โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยไม่พบแถบของโปรตีนอื่นๆ เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตริน OB-N และ OB-C ได้ทุกตัว จึงเลือกหนูที่ตอบสนองดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ OB-N จำนวน 2 โคลนได้แก่ MBV13-5D, MBV12-8B และจำเพาะต่อ OB-C จำนวน 4 โคลนได้แก่ MBV3-9H, MBV4-5C, MBV17-5H และ MBV19-10F ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลน เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG₁ และ IgG_{2a} ส่วน light chain เป็น kappa (K) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเชื้อ PemoNPV ที่แยกได้จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ด้วยวิธี dot blotting ได้ และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนโพลีฮีตรินขนาด 58 กิโลดาลตันที่แยกได้จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ แต่พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ OB-C สามารถตรวจจับกับโปรตีนโพลีฮีตรินได้ 2 แถบ ซึ่งอาจเกิดจากตำแหน่งของ glycosylation ภายในโปรตีนโพลีฮีตรินซึ่งทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกัน (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกึ่งขาวที่ติดเชื้อ WSSV และ YHV (ภาพประกอบ 20) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจการติดเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธีดังกล่าวได้อย่างดี สำหรับการตรวจเชื้อ PemoNPV ในเนื้อเยื่อตับของกึ่งกุลาดำโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนสามารถจับกับโปรตีนโพลีฮีตรินบริเวณ occlusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ตับกึ่งที่ติดเชื้อได้อย่างชัดเจน โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกุลาดำปกติ และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อ PstDNV, PmDNV, WSSV, YHV และ TSV ในเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry เช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 21) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จึงสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ดี ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับวิธี *in situ* hybridization โดยใช้ genomic DNA ของ PemoNPV เป็น probe (Poulos; et al. 1994: 187-194)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินและเชื้อ PemoNPV ที่ได้จากกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OB-N สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 2.40 เฟมโตโมล/ไมโครลิตรและ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OB-C ทุกโคลน สามารถตรวจหาอีคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่าเท่ากับ 4.13 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร (ยกเว้น MBV19-10F) เมื่อไปเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก Boosanongchoking และคนอื่นๆ (2006: 371-376) พบว่าความไวในการตรวจหาอีคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินมีระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.2 ถึง 0.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:800 นอกจากนี้เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (MBV3-9H) มาผสมรวมกันกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก Boosanongchoking และคนอื่นๆ (2006: 371-376) (MBV8-5G) พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมีความไวในการตรวจจับสูงขึ้นจากเดิม 2 เท่า เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองมีตำแหน่งอิพิโทปที่จับบนโปรตีนโพลีฮีตรินที่ต่างกัน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ PemoNPV จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามใดๆ กับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ และองค์ประกอบต่างๆ ของกึ่งปกติโดยวิธี dot blotting

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้รีคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินของ PemoNPV เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์จากตับของกึ่งที่ติดเชื้อและช่วยลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อตับของกึ่งกุลาดำ และช่วยให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตมามีความจำเพาะต่อส่วนต่างๆ ของโปรตีนโพลีฮีตรินมากยิ่งขึ้น และเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PemoNPV นอกจากนี้ยังสามารถนำรีคอมมิแนนท์โปรตีนโพลีฮีตรินนี้ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายเพื่อใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไป จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นำมาใช้ตรวจโรคกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ PemoNPV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry ได้ จึงคาดว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ PemoNPV ที่ผลิตได้สามารถนำไปพัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย เช่น strip test ทำให้ตรวจสอบกึ่งกุลาดำที่การติดเชื้อในฟาร์มเพาะเลี้ยงได้อย่างทันท่วงที โดยเฉพาะการตรวจหาเชื้อไวรัส PemoNPV ในลูกกึ่งควรตรวจตั้งแต่วัย postlarvae ก่อนที่ตัดสินใจซื้อลูกกึ่งเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นเมื่อนำกึ่งกุลาดำไปเพาะเลี้ยง (Flegel. 2001: 48-63) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกึ่งกุลาดำได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. (2547). สืบค้นเมื่อ 27 สิงหาคม 2552, จาก http://www.thailandshrimp.com/agriculture_tiger1.html
- กุ้งกุลาดำ. (2551). สืบค้นเมื่อ 27 สิงหาคม 2552, จาก <http://thaigoodview.com/node/2805>
- ฉันทนา แก้วตาปี. (2548). การติดเชื้อไวรัส MBV (*Monodon Baculovirus*) ในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. รายงานการสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2547. กรมประมง.
- ชลอ ลี้มสุวรรณ. (2543). กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์.
- ชลอ ลี้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. (2547). อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษาระดับปริญญาโท การเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- ระบิล รัตนพานิช; และ นงลักษณ์ ตันติลีปิกร. (2535). สภาวะโรคไวรัส MBV ในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วารสารโรคสัตว์น้ำ 13 (1): 77-81
- ระบิล รัตนพานิช, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา. (2535). พยาธิสภาพและพยาธิกำเนิดของโรคไวรัสในตับ (เอ็ม บี วี) ในกุ้งกุลาดำ. วารสารโรคสัตว์น้ำ 13 (2): 27-41
- วรินธา วศิณะเมฆินทร์; และคนอื่นๆ. (2550). การศึกษาการติดเชื้อ *Monodon Baculovirus*, *Hepatopancreatic Parvovirus* และพยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีขนาดแตกต่างกัน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. (2531). กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน
- สุนณา คงสม. (2535). การศึกษาการติดเชื้อโมโนคอนบาคุโลไวรัสและแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สิริ ทุกษ์วินาศ; และ ชุตติมา ขมวิลัย. (2545, พฤษภาคม-มิถุนายน). แนวทางการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. วารสารการประมง. สืบค้นเมื่อ 27 สิงหาคม 2552, จาก http://nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=122
- อุมาภรณ์ จรดลย์; และคนอื่นๆ. (2551). ผลของการติดเชื้อ *Monodon Baculovirus* ในลูกกุ้งต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและเปอร์เซ็นต์กุ้งที่มีขนาดเล็กในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46.
- Belcher, C. R. & Young, P. R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* baculovirus. *Journal of Virology Methods*. 74: 21-29.

- Bonami, J. R.; et al. (1995). Partial characterization and cloning of the genome of PvSNPV (BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23: 59–66.
- Bonami, J. R.; et al. (1997). The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacean: a unique structure, crystal organization, and proposed model. *Journal of Structural Biology*. 120: 134–145.
- Boonsanongchokying, C.; et al. (2006). Production of monoclonal antibodies to polyhedrin of monodon baculovirus (MBV) from shrimp. *ScienceAsia*. 32: 371–376.
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2004). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp. *ScienceAsia*. 30: 359–363.
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2008). Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 381: 261-267
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2009). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*. 162: 188-193.
- Chang, P. S.; et al. (1993). Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *Journal of Invertebrate Pathology*. 62: 116–120.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer (ed), *Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine*. New York: Plenum Press.
- Fauquet, C. M.; et al. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego. : 177-180.
- Fegan, D. F.; et al. (1991). The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand. *Aquaculture*. 96: 205–217.
- Flegel, T. W.; et al. (1992). Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL (eds) *Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States*. *Oceanic Institute, Honolulu*. : 57–112.

- Flegel, T. W.; Fegan, D. F.; & Sriurairatana, S. (1995). Environmental control of infectious Shrimp diseases in Thailand. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture, vol. II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila*. : 65–79.
- Flegel, T. W.; et al. (2001). Effects of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) Monodon baculovirus (MBV) and multiple viral infections on cultivated shrimp in Thailand. *In The 3rd National Symposium on Marine Shrimp* : 48-63.
- Flegel, T. W.; et al. (2004). Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*. 240: 55–68.
- Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 258: 1-33.
- Hang, Bui. Thi. Bich. (2007). *Devopment of a monoclonal antibody assay for infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) of shrimp*. M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Mahidol university. Photocopied.
- Hsu, Y. L.; et al. (2000). Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Diseases of Aquatic Organisms*. 40: 93–99.
- Köhler, G.; & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology*. 6: 511-519.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bactenophge T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1981). A baculovirus-caused disease of penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 38: 299–302.
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge.
- Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201–220.
- Loh, P. C.; et al. (1997). Viral pathogens of the penaeid shrimp. *Advances in Virus Research*. 48: 263–312.
- Longyant S.; et al. (2008). Specific monoclonal antibodies raised against Taurasyndrome virus (TSV) capsid protein VP3 detect TSV in single and dual infections with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 79: 75-81.

- Lu, C. C.; et al. (1993). Development of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *Journal of Fish Diseases*. 16: 551–559.
- Mari, J.; et al. (1993). Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV=MBV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 16: 207–215.
- Mosmann, T. R.; Bauman, R.; & Williamson, A. R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. *European Journal of Immunology*. 9: 511-516.
- Natividad J. M.; & Lightner D. V. (1992). Prevalence and geographic distribution of MBV and Other diseases in cultured giant tiger prawns (*Penaeus monodon*) in the Philippines. *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. : 139-160.
- Poulos, B. T.; et al. (1994). Use of nonradioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by in situ hybridization on fixed tissue. *Journal of Virology Methods*. 49: 187–194.
- Ramasamy, P.; et al. (1995). A record and prevalence of Monodon baculovirus from post-larval *Penaeus monodon* in Madras, India. *Aquaculture*. 130: 129–135.
- Ramasamy, P.; et al. (2000). Ultrastructure and pathogenesis of Monodon baculovirus (PmSNPV) in culture larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 184: 45–66.
- Rohrmann, G. F. (1986). Polyhedrin structure. *Journal of General Virology*. 67: 1499–1513.
- Rohrmann, G. F. (1992). Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology*. 73: 749-761.
- Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of Monoclonal antibodies specific to Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 85–89.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; & Maniatis, T. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). New York.
- Satidkanitkul, A.; et al. (2005). Synthetic peptide used to develop antibodies for detection of polyhedrin from *P. monodon* baculovirus (MBV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 79-84.

- Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to Yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 71-76.
- Sithigorngul, P.; et al. (2009). Simple immunoblot and immunohistochemical detection of *Penaeus stylirostris* densovirus using monoclonal antibodies to viral capsid protein expressed heterologously. *Journal of Virology Methods*. 162: 126–132.
- Surachetpong, W.; et al. (2005). Improvement of PCR method for detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture*. 249: 69–75.
- Yan, D.; Tang, K. F. J.; & Lightner, D. V. (2009). Development of a real-time PCR assay for detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102: 97–100.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

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

2. LB agar

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

ภาคผนวก ข
บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 10X TBE buffer		
Tris-HCl (ปรับ pH 8.3)	108.0	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
EDTA	9.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร
2. 100mM IPTG		
IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
3. Buffer B (100mM NaH ₂ PO ₄ , 10mM Tris-HCl, 8M Urea; pH 6.3)		
NaH ₂ PO ₄	1.38	กรัม
Tris-HCl (ปรับ pH 6.3)	0.12	กรัม
Urea	48.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.00	มิลลิลิตร
4. 100mM PMSF		
PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol (conc.)	1.0	มิลลิลิตร
5. 0.15M Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2		
NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.00	มิลลิลิตร
6. 5% Blotto		
นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS	100.0	มิลลิลิตร
1% Merthiolate (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร
7. 1% Merthiolate		
Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

8. 1M KCl		
KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.00	มิลลิลิตร
9. 1% SDS		
SDS	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. RPMI medium		
RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4000	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6000	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
C ₃ H ₃ O ₃ Na (Sigma)	1.1005	กรัม
NaHCO ₃	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
Penicillin G)	20,000	units
Streptomycin	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร		
2. 20% Fetal bovine serum		
RPMI medium	80.0	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)		
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร
3. HAT medium		
เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%		
ใน RPMI medium	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100 X HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร
4. 40% Polyethylene glycol		
Polyethylene glycol	2.0	กรัม
RPMI medium	3.0	มิลลิลิตร
5. 12% Dimethylsulfoxide		
Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium	88.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE และ Western blotting

1. Stock solution		
1.1 Monomer solution (30% T, 2.7% C _{Bis})		
Acrylamide	58.4	กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	1.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
1.2 4 X Running gel buffer (1.5 M tris-HCl, pH 8.8)		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		
1.3 4 X Stacking gel buffer (0.5 M tris-HCl, pH 6.8)		
Tris	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		
1.4 10% SDS		
sodium dodecyl sulfate	50.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร
1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 %		
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1.0	มิลลิลิตร
1.6 Running gel overlay		
0.15 M Tris-HCl (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร
1.7 2 X Treatment buffer		
0.5 M Tris-HCl (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 12% separating gel

Monomer solution (1.1)	8.0	มิลลิลิตร
0.15 M Tris-HCl (1.2)	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.7	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 % (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	7.0	ไมโครลิตร

2.2 4% Stacking gel

Monomer solution (1.1)	2.7	มิลลิลิตร
0.5 M tris-HCl (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

3. Running buffer

4X Tank buffer

Tris	12.0	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
10% SDS (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

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

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน		
4.2.1 Destain 1		
Methanol	500.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
4.2.2 Destain 2		
Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
5. Towbin transfer buffer pH 8.8		
Tris	3.0	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร
6. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma) ประกอบด้วย		
β -Galactosidase, <i>Escherichia coli</i>	116.0	กิโลดาลตัน
Phosphorylase b, rabbit muscle	97.0	กิโลดาลตัน
Albumin, bovine serum	66.0	กิโลดาลตัน
Ovalbumin, chicken egg	45.0	กิโลดาลตัน
Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29.0	กิโลดาลตัน

ภาคผนวก จ
สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

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

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. 0.1 M Citrate buffer, pH 4.5

Sodium citrate	29.4	กรัม
1%Merthiolate	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

2. 1 N H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. coated slide solution			
Gelatin	1.0	กรัม	
CrK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	50.0	มิลลิกรัม	
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร	
2. Davidson's fixative			
95% ethanol	30.0	มิลลิลิตร	
100% formalin	20.0	มิลลิลิตร	
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร	
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร	
4. Calf serum 10% (P ₁ ⁺)			
Calf serum	10.0	มิลลิลิตร	
PBS	100.0	มิลลิลิตร	
5. สี Enrilich's acid hematoxylin			
Hematoxylin	8.0	กรัม	
95% ethanol	400.0	มิลลิลิตร	
Aluminium Potassium Sulphate	8.0	กรัม	
Glycerine	400.0	มิลลิลิตร	
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร	
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร	
6. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol			
Eosin Y	0.2	กรัม	
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร	

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายรัชชัย สุวรรณนาคะ
วันเดือนปีเกิด	7 เมษายน พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	ระยอง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	43 หมู่ 10 ตำบลบ้านนา อำเภอแกลง จังหวัดระยอง 21110
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนมกุฏเมืองราชวิทยาลัย จังหวัดระยอง
พ.ศ. 2551	วท.บ. (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2553	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ