

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545

การหาลำดับ cDNA บางส่วน ที่เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีนส่วน
เปลือกของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

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

- 3 ก.พ. 2547

ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิธำรงกูร ไพศาล สิทธิกรกุล
ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๗๒๖๖๖๖

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2546



บทคัดย่อ

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



Abstract

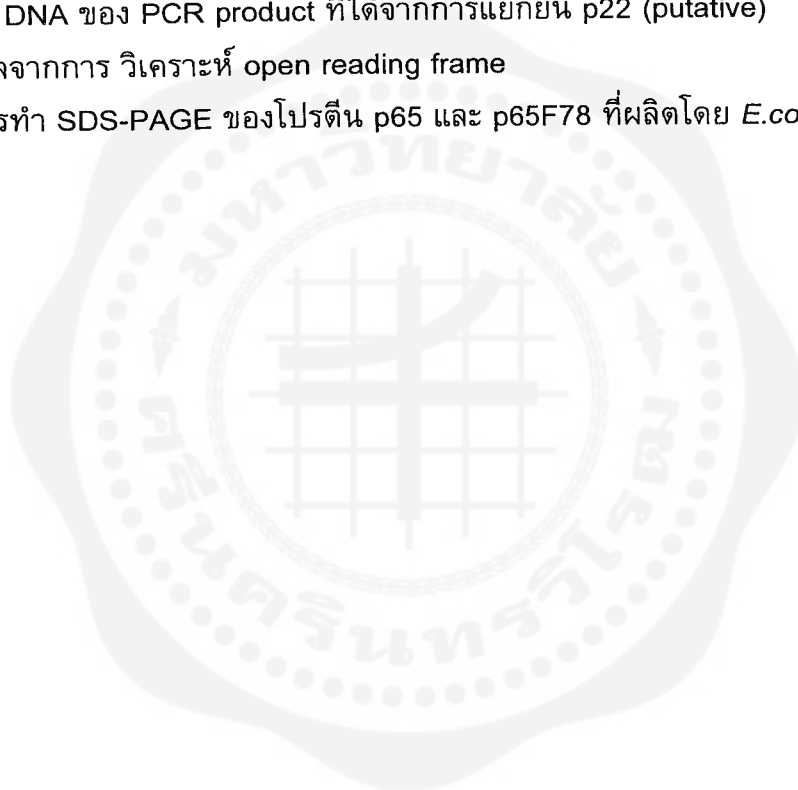
Isolation of p135 gene of YHV by RT-PCR using cDNA, synthesized from RNA of YHV, as a template had been performed. The RT-PCR product of 4200 bp was obtained and partial DNA sequence (1720 bp) of this RT-PCR product was elucidated. The comparison of this partial DNA sequence with Genbank database revealed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

สารบัญ

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

สารบัญรูป

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





บทนำ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

จะเห็นได้ว่าการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งนั้น น่าจะมีความเป็นไปได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักในโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้คือ การพัฒนาวัคซีน เพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะกระทำโดย นำยีนที่สร้างส่วนประกอบของไวรัสในยีนพาหะที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน (expression vector) จากนั้นก็จะกระตุ้นให้แบคทีเรียหรือยีสต์ที่มียีนพาหะนี้ผลิตโปรตีนที่ต้องการในปริมาณมาก เพื่อนำไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

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

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

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

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

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

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

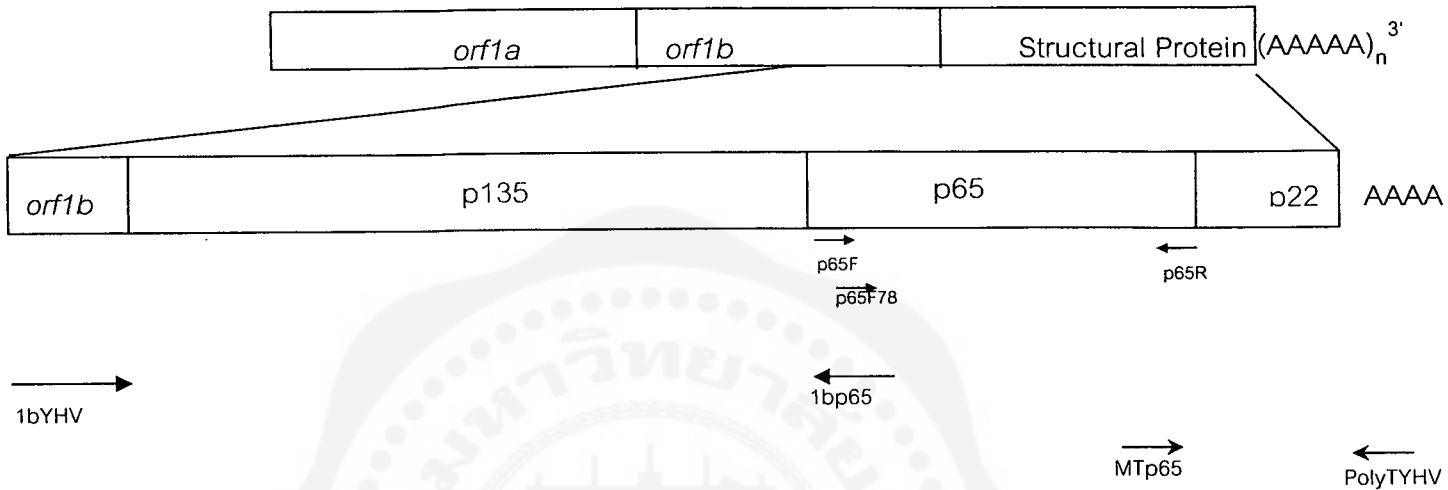
ดังนั้น Pasharawipas et al., (1997) ได้เสนอว่า กุ้งน่าจะมีความกลไกการจดจำ (recognition mechanism) ซึ่งจะต้านทาน (tolerance) ต่อการติดเชื้อไวรัสได้ โดยกลไกนี้อาจจะเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาของระยะ larva โดยได้เรียกกลไกนี้ว่า tolerance hypothesis สมมติฐานนี้กล่าวว่า การต้านทานไวรัสนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับการจับของไวรัสในขั้นต้น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

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

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

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

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



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



วิธีการทดลอง

1. การเพิ่มจำนวนไวรัสและการทำให้บริสุทธิ์

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

2. การสกัด RNA จากไวรัส

นำไวรัสที่ตกตะกอนได้มาแยก RNA โดยใช้ RNeasy kit (QIAGEN) โดยทำการทดลองตามคู่มือของบริษัท

3. การสร้าง cDNA ของ YHV


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

4. การทำ PCR เพื่อแยกยีน p65 และ p65F78

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

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





ผลการทดลอง

1. การเตรียมไวรัส YHV

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

2. การสกัด RNA จากไวรัส YHV

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

3. การแยกยีน p65 และ p65F78

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

4. การแยกยีน p135 (putative)

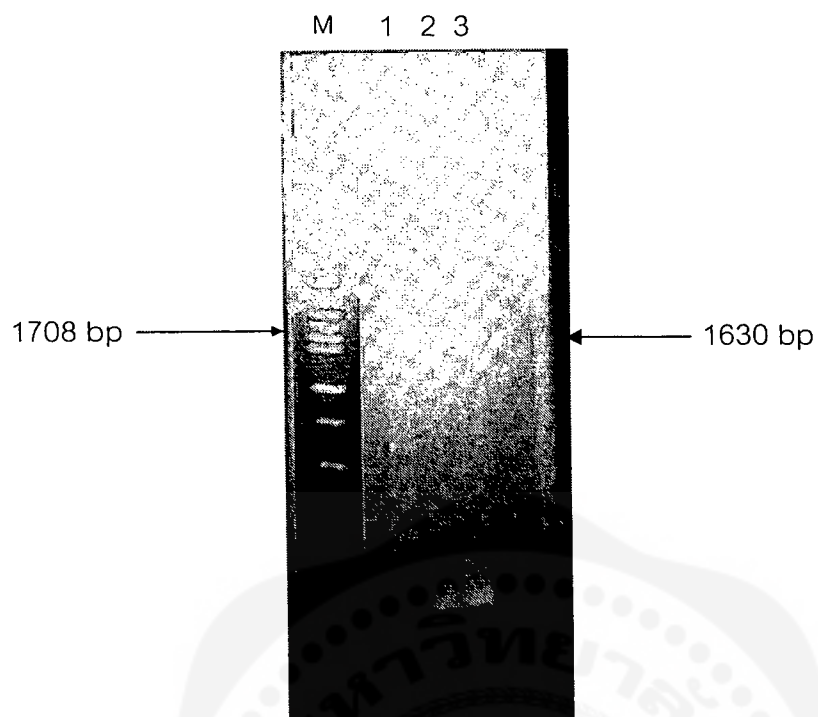
จากการทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative) โดยใช้ cDNA ของ YHV เป็น template พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 4200 bp (รูปที่ 3) เมื่อนำ PCR product นี้ ไปหาลำดับ DNA บางส่วน (1720 bp) ของยีน p135 พบว่าได้ลำดับ DNA ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 เมื่อนำลำดับ DNA นี้ไปแปลรหัส โดยใช้โปรแกรม DNASIS พบว่าได้ open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

5. การแยกยีน p22 (putative)

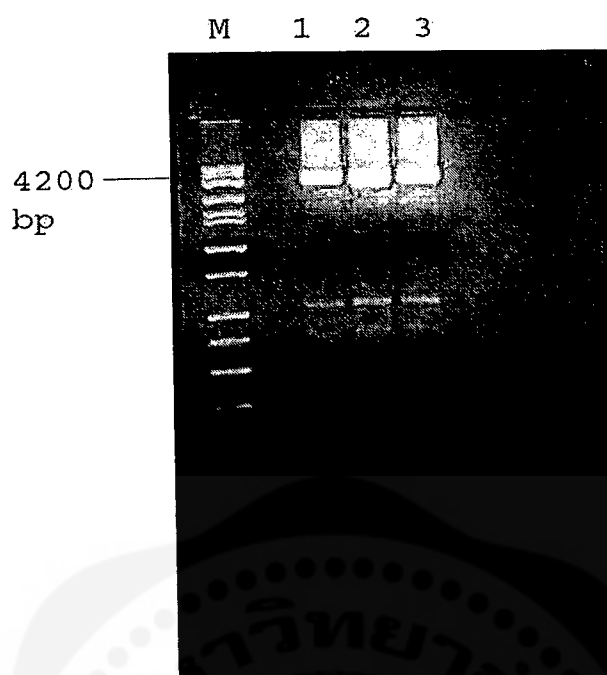
จากการทำ RT-PCR โดยใช้ RNA ของ YHV เป็น template พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 750 bp (รูปที่ 5) เมื่อนำ PCR product นี้ ไปหาลำดับ DNA พบว่าได้ลำดับ DNA ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6 เมื่อนำลำดับ DNA นี้ไปวิเคราะห์ open reading frame ทั้ง 6 frame โดยใช้โปรแกรม DNASIS พบว่าได้ผลแสดงไว้ในรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าไม่มี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

7. การแสดงออกของยีน p65 และ p65F78

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



รูปที่ 2 PCR product ของยีน p65 และ p65F78
Lane M : Hi-Lo™ DNA Marker
Lane 1 : p65 PCR product
Lane 2-3 : p65F78 PCR product



รูปที่ 3 ผลการทำ PCR เพื่อแยกยีน p135 (putative)

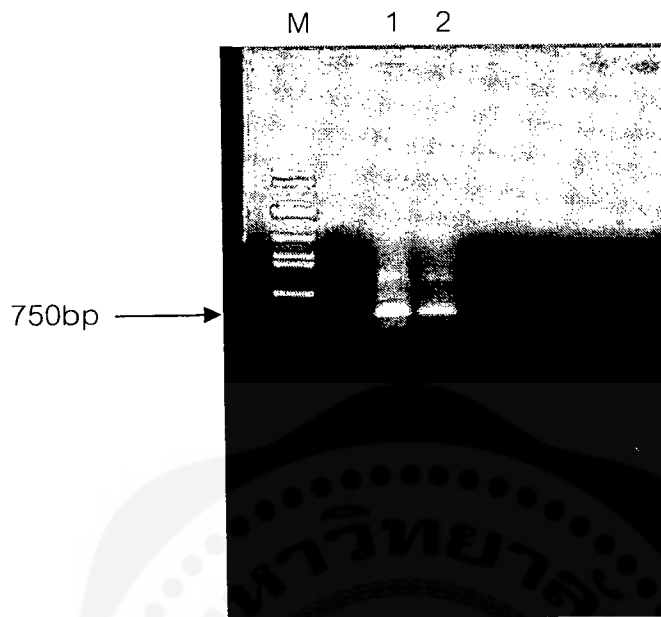
Lane M : Hi-Lo™ DNA Marker

Lane 1-3 : p135 PCR product

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

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

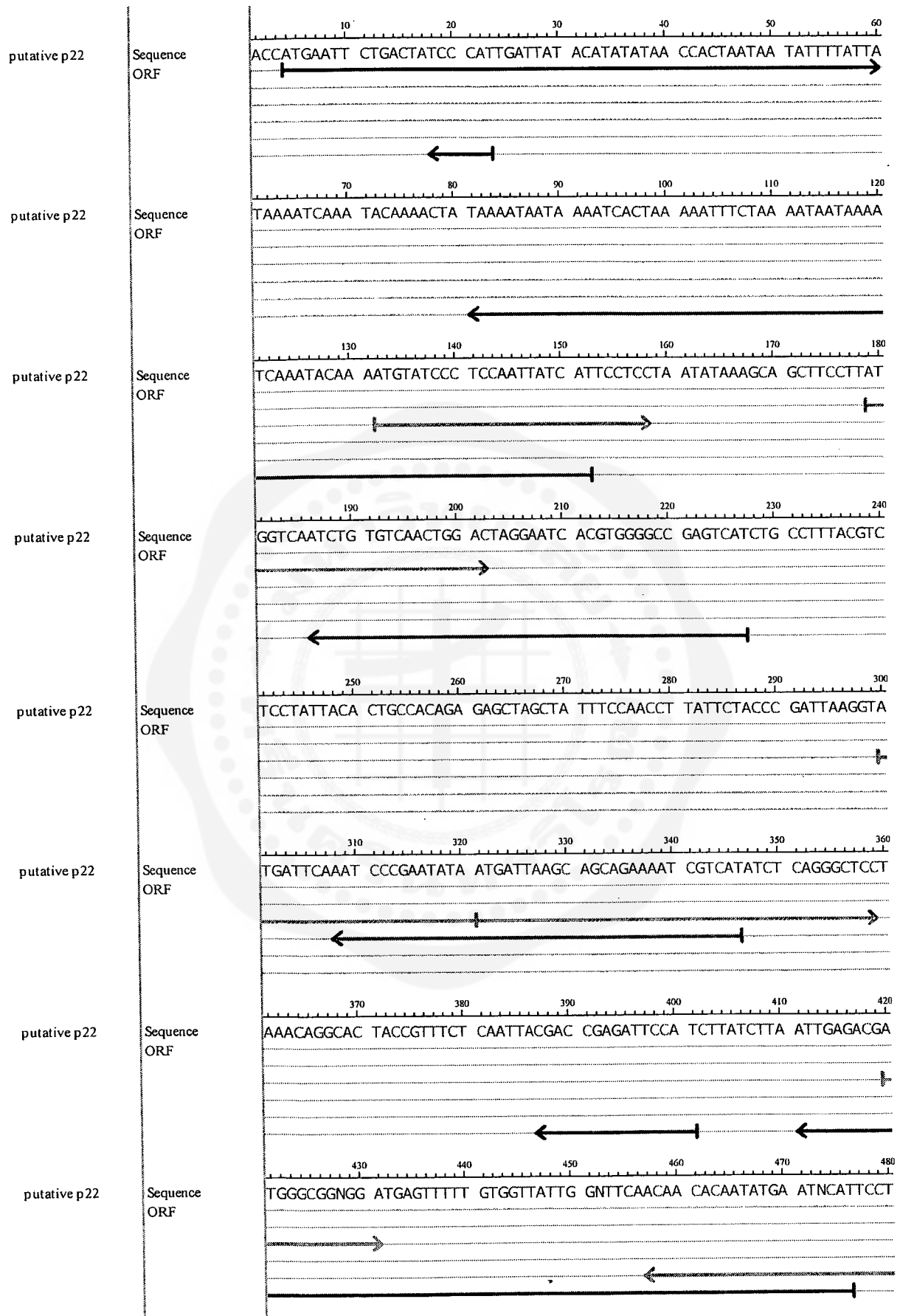
รูปที่ 4 ลำดับ DNA บางส่วนของ PCR product ที่ได้จากการแยกชิ้น p135 และ
ผลจากการแปลรหัส

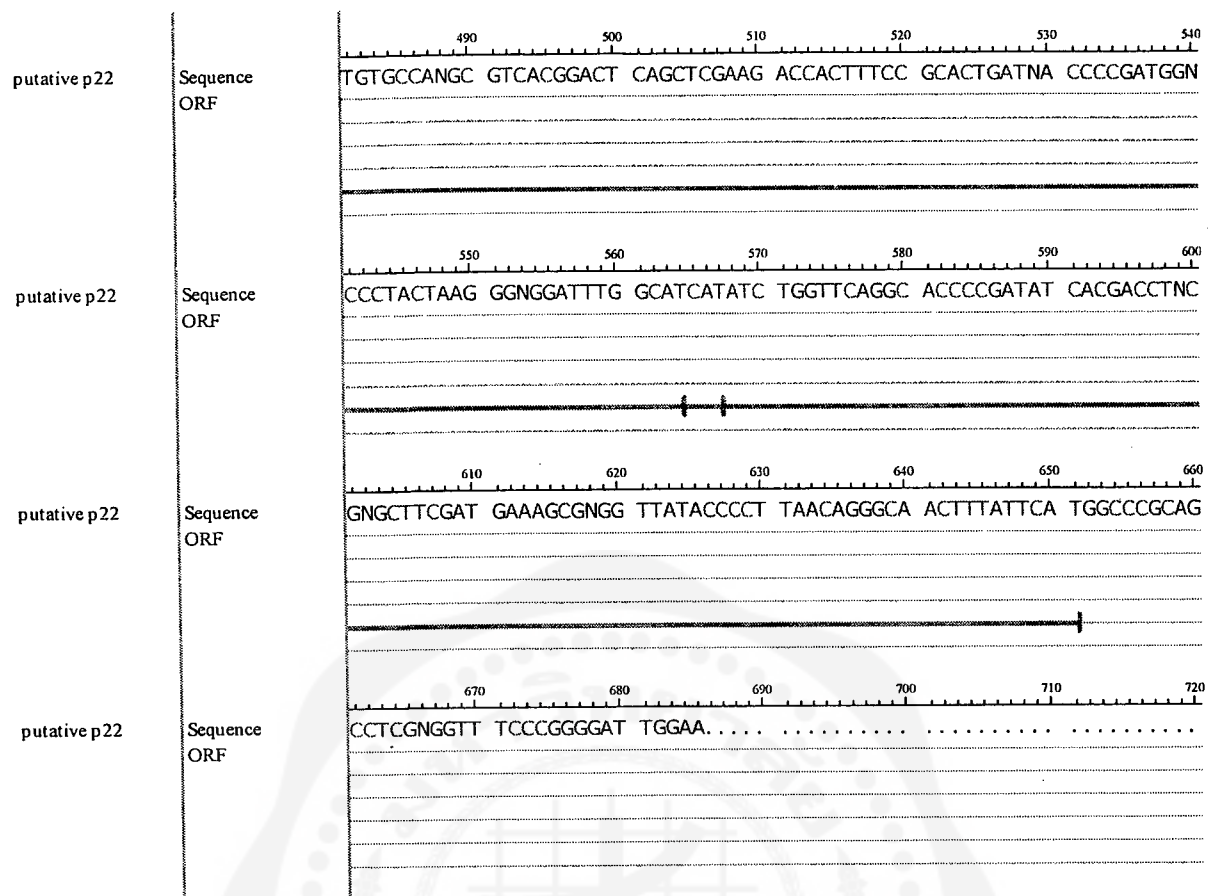


รูปที่ 5 ผลการทำ RT-PCR เพื่อแยกยีน p22 (putative)

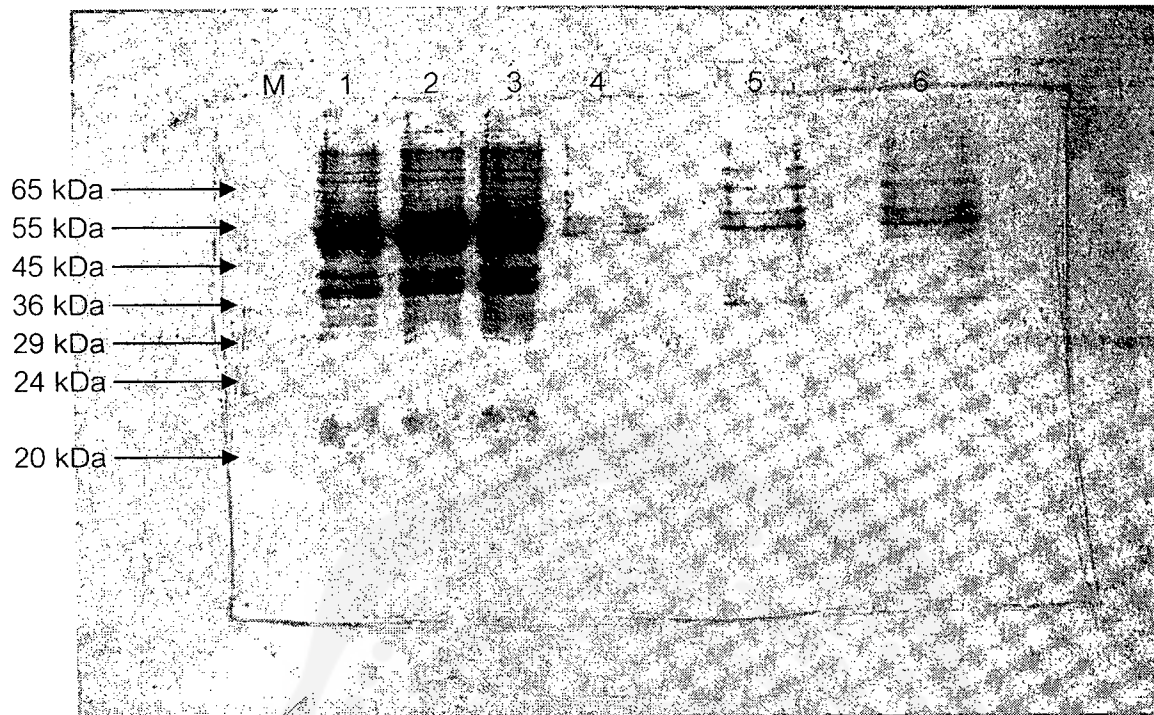
Lane M : Hi-Lo™ DNA Marker

Lane 1-2 : p22 RT-PCR product





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



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

Lane M : Low Molecular Weight Range

Lane 1 : Pellet จากแบคทีเรียที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 2 : Pellet จากแบคทีเรียที่มียีน p65 ใน pQE30

Lane 3 : Pellet จากแบคทีเรียที่มียีน p65F78 ใน pQE30

Lane 4 : supernatant จากแบคทีเรียที่มีเฉพาะ pQE30(control)

Lane 5 : supernatant จากแบคทีเรียที่มียีน p65 ใน pQE30

Lane 6 : supernatant จากแบคทีเรียที่มียีน p65F78 ใน pQE30

สรุปผลการทดลอง




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

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

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

จากการแยกยีน p22 โดยวิธี RT-PCR และทำการหาลำดับ DNA บางส่วนของยีนนี้พบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 6 แต่ผลจากการวิเคราะห์ open reading frame (ORF) ของลำดับ DNA ที่ได้ นี้ พบว่าไม่มี ORF ที่สอดคล้องกับโปรตีนขนาด 22 kD ดังนั้นจึงคาดว่าลำดับ DNA ที่ได้ น่าจะเป็นส่วนของ 3' untranslated region ของ YHV และในปัจจุบันยังไม่พบว่ามีกรายงานของยีน p22 นี้แต่อย่างใด

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



เอกสารอ้างอิง

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

- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Panyim, S., Boonsaeng, V., 2001. Molecular cloning of p65 structural protein of the yellow head virus. งานวิจัยด้านอนุชีววิทยา ประจำปี 2544 เมธีวิจัยอาวุโส สกว. สกล พันธุ์ยิ้ม 14 กันยายน 2544
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P.J., Panyim, S., Boonsaeng, V., 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84; 863-873
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 ; 680-685.
- Lightner, D.V., Redman, R.W., 1998. Shrimp diseases and current diagnosis methods. Aquaculture. 164 ; 201-220.
- Loh, P.C., Cesar, E., Nadala, B., Tapay, L.M., Lu, Y., 1998. Recent development in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogen. Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.255-259.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Follin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193 ; 256-275.
- Nadala, Jr. E.C.B., Tapay, L.M., Loh, P.C., 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 31, 141-146
- Pasharawipas, T., Flegel, T.W. Sriurairatana, S., Morrison, D.J., 1997. Latent yellow-head infections in *Penaeus monodon* and implications regarding disease tolerance or resistance. In Flegel, T.W., Menasaveta, P., Paisarnrat, S. (Eds) Shrimp biotechnology in Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 45-53.
- Sithigorngul, P., Chauyuchwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Menasveta, P., 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 42, 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Menasveta, P., 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 49, 71-76.
- Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. Dis. Aquat. Org. 35, 165-173.

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