

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
ประติษฐ์ หวังมาน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
ประติษฐ์ หวังมาน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV)

บทคัดย่อ
ของ
ประติษฐ์ หวังมาน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553

ประดิษฐ์ หวังมาน. (2553). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV). ปรินซ์นิพนธ์ วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะกรรมการควบคุม: ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล ลิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร.

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) ในกุ้ง โดยกระตุ้นแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด MrNV-pGEX ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนสายผสมกับ glutathione-S-transferase (GST) เมื่อแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนให้บริสุทธิ์ พบว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 64 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ MrNV ได้ 5 โคลน ดังนี้ MrNV-2, MrNV-7, MrNV-9, MrNV-11 และ MrNV-12 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้ สามารถจับกับ MrNV ในกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ด้วยวิธี dot blotting และจับกับแคปซิดโปรตีนของเชื้อ MrNV ขนาด 43 กิโลดาลตันได้ด้วยวิธี Western blotting อีกทั้งสามารถตรวจเชื้อ MrNV โดยวิธี immunohistochemistry ได้ โดยพบการติดเชื้อบริเวณไซโตพลาสซึมในเส้นประสาท กล้ามเนื้อลาย เหยือก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อกุ้งปกติหรือกุ้งที่ติดเชื้อ *Penaeus monodon* densovirus (PmDNV), *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV), Taura syndrome virus (TSV), white spot syndrome virus (WSSV), และ yellow head virus (YHV) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_{2a}, IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa (K) และจากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ MrNV โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี MrNV-2 และ MrNV-12 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไวสูงสุดประมาณ 625 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) ซึ่งเมื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ MrNV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ พบว่ามีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 20 เท่า

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT CAPSID
PROTEIN OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* NODAVIRUS (MrNV)

AN ABSTRACT
BY
PRADIT WANGMAN

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
September 2010

Pradit Wangman. (2010). *Production of monoclonal antibodies against recombinant capsid protein of Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV)*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Prof.Dr. Paisarn Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies (MAbs) that can be used to detect *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) in shrimp. The gene encoding the capsid protein of MrNV was cloned into pGEX-6P-1 expression vector and then transformed into *E. coli* strain BL21. After induction of recombinant plasmid MrNV-pGEX in the *E. coli* strain BL21, the glutathione-S-transferase (GST) tagged MrNV capsid protein (rMrNV) with a molecular mass of 64 kDa was obtained. Five hybridoma clones (MrNV-2, MrNV-7, MrNV-9, MrNV-11 and MrNV-12) against MrNV capsid protein were generated using purified recombinant protein for immunization into Swiss mice. They can be used to detect natural capsid protein of MrNV at molecular mass of 43 kDa in infected *Macrobrachium rosenbergii* as determined by dot blotting and Western blot assay, respectively. All MAbs can be used to detect MrNV infection in ventral nerve cord, muscle, gill, and connective tissue by immunohistochemistry without cross-reactivity to *Penaeus monodon* densovirus (PmDNV), *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV), Taura syndrome virus (TSV), white spot syndrome virus (WSSV), and yellow head virus (YHV). The monoclonal antibodies belong to IgG; subclass IgG_{2a} and IgG_{2b} with kappa (K) light chain. The detection sensitivity of the MAbs (MrNV-2, MrNV-12) was approximately 600 ng/ml or 10 fmole/ μ l of purified recombinant protein. However, the sensitivity of the MAbs was approximately 20 times lower than that of RT-PCR.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ
Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV)
ของ
ประติษฐ์ หวังมาน
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

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

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล ลิทธิกรกุล)

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล ลิทธิกรกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ
(ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน

จาก

หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง

(ทุนส่งเสริมกลุ่มนักวิจัยอาชีพ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล ผู้คอยตักเตือน สั่งสอนและแนะนำทั้งในด้านวิชาการและจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณชต ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ภัทธิน ศรีจุลยกุลย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประวิติ อังประภาพรชัย ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากยิ่งขึ้น และอาจารย์ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน จากหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (CENTEX Shrimp) มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ อีกทั้งกรุณาอนุเคราะห์ทุนสนับสนุนและตัวอย่างกุ้งสำหรับงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้เงินอุดหนุนการศึกษาและงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวราวุธ หะยีมาสาและ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำสิ่งที่ดีเสมอมา ขอขอบคุณคุณชลินันท์ เพ็งสุข และคุณชุตติมา ศรีสุข รวมทั้งรุ่นพี่ทุกท่านในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอล แอนติบอดีและห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ขอขอบคุณ คุณสิริจันทรา สานนท์ และคุณอภิรดี ศรีภิรมรักษ์ รวมทั้งเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขุไกรต่อเอกองค์อัลลอฮ์ พระผู้ทรงอภิบาลแห่งสากลโลกเพราะหากปราศจากความช่วยเหลือจากพระองค์ งานวิจัยครั้งนี้คงไม่สำเร็จ ขอขอบคุณมารดาและคุณป้า ที่เป็นแรงใจ ขอขอบคุณแรงผลักดันที่ทำให้ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัยได้เรียนรู้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ประดิษฐ์ หวังมาน

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
กุ่มก้ามกราม.....	5
การเกิดโรคในกุ่ม.....	7
โรคหางขาว (White tail disease).....	8
พยาธิสภาพของกุ่มก้ามกรามที่ติดเชื้อ <i>MrNV</i>	11
การศึกษาลักษณะของเชื้อ <i>MrNV</i>	12
แคปซิดโปรตีนของเชื้อ <i>MrNV</i>	13
การศึกษาและการตรวจการติดเชื้อ <i>MrNV</i>	14
โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	20
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
อุปกรณ์และสารเคมี.....	24
วิธีดำเนินการทดลอง.....	27
4 ผลการทดลอง.....	42
การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ <i>MrNV</i>	42
การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ <i>MrNV</i> ให้บริสุทธิ์.....	42
การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ <i>MrNV</i>	44
การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	48
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	56
บรรณานุกรม.....	59

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	66
ภาคผนวก ก.....	67
ภาคผนวก ข.....	69
ภาคผนวก ค.....	71
ภาคผนวก ง.....	73
ภาคผนวก จ.....	77
ภาคผนวก ฉ.....	79
ภาคผนวก ช.....	81
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	83

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	24
2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
3 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR.....	29
4 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ <i>MnV</i>	30
5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>MnV</i>	55

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	6
2 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogen) กับการเกิดโรคในกุ้ง.....	7
3 ลักษณะของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ <i>MrNV</i>	9
4 แผลงน้ำที่เป็นพาหะของเชื้อ <i>MrNV</i>	10
5 ลักษณะทางพยาธิสภาพสภาพเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อลายของลูกกุ้งที่ติดเชื้อ <i>MrNV</i>	11
6 อนุภาคไวรัส <i>MrNV</i> ที่ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน....	12
7 Phylogenetic tree ที่ได้จากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส <i>MrNV</i>	13
8 Phylogenetic tree ที่ได้จากการทำ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแคปซิดโปรตีนของ <i>MrNV</i> 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย.....	15
9 การตรวจสอบการติดเชื้อ <i>MrNV</i> โดยวิธี <i>in situ</i> hybridization.....	17
10 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีน <i>MrNV</i>	19
11 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	21
12 แนวทางการสังเคราะห์ DNA ในวิถี <i>de novo</i> pathway และ salvage pathway และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในวิถี <i>de novo</i> pathway.....	22
13 แผนผังการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	32
14 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งสำหรับการวิเคราะห์ Immunohistochemistry (IHC).....	35
15 แผนผังกระบวนการย้อมโดยวิธี Immunohistochemistry.....	36
16 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	38
17 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	39
18 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ <i>MrNV</i>	43
19 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวและโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Western blotting.....	45
20 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting...	46
21 การตรวจการติดเชื้อ <i>MrNV</i> ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของกุ้งฝอยและกุ้งก้ามกรามโดยวิธี immunohistochemistry.....	47

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting.....	49
23 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry.....	50
24 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA.....	52
25 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting.....	53
26 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ <i>MnV</i> ด้วยวิธี RT-PCR.....	54

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เนื่องจากสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละมากกว่าหมื่นล้านบาท โดยประเทศไทยเป็นผู้นำในด้านการผลิตและการส่งออกกุ้ง ตั้งแต่ปี 1992 (Flegel; Fegan; & Sriurairatana. 1995: 65–79) สำหรับ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบภูมิภาคเอเชีย รวมทั้งประเทศไทยมาเป็นระยะเวลานาน (ธีรพันธุ์ ภูคาสุวรรณ. 2523) จากข้อมูลของสมาคมผู้เลี้ยงกุ้งในพื้นที่น้ำจืดปี พ.ศ. 2547 พบว่า มีพื้นที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่ภาคกลางประมาณ 80,000 ไร่ และมีพื้นที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามกระจายอยู่ภูมิภาคอื่นแทบทุกภาคของประเทศอีกประมาณ 50,000 ไร่ (นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. 2547) กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่มีราคาแพงและนิยมบริโภคมาก โดยส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นเพื่อการส่งออก

แม้ว่าอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยมีมาเป็นเวลานานแล้ว แต่รูปแบบการเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรยังมีการพัฒนาไม่มาก โดยเริ่มมีการส่งเสริมแนวทางการเลี้ยงแบบพัฒนามากขึ้นทดแทนการเลี้ยงแบบดั้งเดิมที่ให้ผลผลิตต่ำ และมักมีปัญหาขาดก้าง โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ ปล่อยลูกกุ้งน้อยลง มีเครื่องให้อากาศ ใช้อาหารสำเร็จรูปแทนอาหารที่เกษตรกรทำเองและเลี้ยงแบบมีการย้ายบ่อเพื่อให้มีโอกาสดักกุ้งก้ามกรามที่มีขนาดใหญ่ขึ้น อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่เป็นอุปสรรคในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามคือ ปัญหาการเกิดโรค โดยเฉพาะในช่วงการเพาะอนุบาลลูกกุ้ง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรักษ์ชกุล. 2547) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบภูมิภาคเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57–112) โดยเชื้อแบคทีเรียและไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งก้ามกรามได้แก่ *Vibrio* spp. (Tonguthai; 1995), *Penaes stylirostris* densovirus (PstDNV) (Hsieh; et al. 2006), extra small virus (XSV) (Qian; et al. 2003: 521-527) และ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) (Romestand; & Bonami. 2003: 71-75)

สำหรับโรคระบาดที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายกับการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม คือ โรคหางขาว (White tail disease; WTD) มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) เมื่อตรวจวินิจฉัยทางพยาธิสภาพจะพบการตายของกล้ามเนื้อลาย (striated muscle necrosis) ที่บริเวณส่วนหัว ส่วนท้อง ส่วนหาง และรยางค์ของกุ้งที่ติดเชื้อ MrNV (นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. 2547) โดยโรคดังกล่าวส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอย่างมาก เนื่องจากลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ MrNV มีอัตราการตายที่สูงและมีการระบาดอย่างรวดเร็วบางครั้งอาจพบลูกกุ้งก้ามกรามมีอัตราการตายสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2-3 วัน

หลังจากที่พบว่าลูกกุ้งก้ามกรามมีอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่น (Hameed; et al. 2004: 127-133) การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถทำได้ ดังนั้นหากสามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วจึงเป็นวิธีป้องกันความเสียหายกับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งได้

สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *MnV* นั้นได้มีการพัฒนาขึ้นหลายวิธี เช่น การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (histopathology) (Arcier; et al. 1999: 177-181) และการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) (Qian; et al. 2003: 521-527) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูงและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อ *MnV* โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี dot blot hybridization และ *in situ* hybridization (Widada; et al. 2003: 583-590) ทั้งสองวิธีต้องใช้ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *MnV* ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงแต่ต้องใช้ระยะเวลานานในการทราบผลของการติดเชื้อ ส่วนการตรวจโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR) (Hameed; et al. 2004: 127-133, Shekhar; et al. 2006: 128-132, Wang; et al. 2008: 415-422) และ nested RT-PCR (Sudhakaran; et al. 2007: 27-35) เป็นวิธีที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้ปริมาณมาก ทำให้สามารถตรวจเชื้อไวรัสได้แม้จะมีปริมาณน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรก ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการตรวจวินิจฉัยแบบเดิมและมีความไวสูง แม้ว่าวิธีดังกล่าวในปัจจุบันได้นำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจเชื้อไวรัส แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถ และมีความชำนาญเป็นอย่างดี อีกทั้งราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูง นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำและมีความไวกว่าวิธี RT-PCR และใช้เวลาน้อย (Pillai; et al. 2006: 275-283) แต่ยังคงมีความจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ และมีความชำนาญเช่นกัน อีกทั้งเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการนำไปตรวจเชื้อในฟาร์มกุ้ง

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) มาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจการติดเชื้อ *MnV* (Qian; et al. 2006: 1,144-1,150) ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจเชื้อ *MnV* ด้วยวิธี triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) นอกจากนี้ยังได้มีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้พัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย เช่น strip test สำหรับตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) (Sithigorngul; et al. 2007: 193-199) ซึ่งไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นไวรัสที่มีการระบาดในกุ้งทะเล เช่น กุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว จะเห็นได้ว่าเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106) อีกทั้ง

เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมากและช่วยประหยัดเวลา ทำให้สามารถตรวจเพื่อติดตามการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลา อันเป็นการลดความเสียหายของเกษตรกร สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ไวรัสจากกึ่งที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติเป็นแอนติเจนนั้น มีขั้นตอนในการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์หลายขั้นตอนและอาจมีเนื้อเยื่อที่ปนมาด้วยซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้รุนแรง (high immunogenicity) ทำให้มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อาจจับกับเนื้อเยื่อของกึ่งปกติจำนวนมาก

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของเชื้อ *MrNV* (Bonami; et al. 2005: 23-31) ทำให้ทราบองค์ประกอบต่างๆ ของสารพันธุกรรมไวรัสและสามารถจำแนกยีนที่ทำหน้าที่ผลิตแคปซิดโปรตีน (capsid protein) ของไวรัสได้ ซึ่งแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน (recombinant capsid protein) ของเชื้อ *MrNV* เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงเป็นอีกแนวทางในการผลิตแอนติบอดีต่อ *MrNV* เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามปริมาณที่ต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *MrNV* ในกุ่มด้วยวิธี

dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

1. กระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)
2. การทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli*
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *MrNV* โดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน
4. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *MrNV* โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry
5. การพิสูจน์ทราบคุณสมบัติโดยการตรวจสอบอีพิโทป การจำแนก class และ subclass รวมทั้งการทดสอบความไวและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของเชื้อ *MrNV* อาจทำได้โดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่สร้างจากยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัสเป็นแอนติเจนกระตุ้นหนูขาว

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *MrNV* ในกุ่มด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Macrobrachium rosenbergii* มีชื่อสามัญ Giant Freshwater Prawn และชื่อภาษาไทย กุ้งก้ามกราม กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งใหญ่ และกุ้งแม่น้ำ

1.1 อนุกรมวิธาน

Houlthuis (1995) ได้จัดจำแนกอนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกรามไว้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Palaemonidae

Genus *Macrobrachium*

Species *Macrobrachium rosenbergii*

1.2 การแพร่กระจาย

กุ้งก้ามกรามมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย แพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำจืดที่มีทางน้ำติดต่อกับทะเล และแหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำลำคลองและทะเลสาบ พบชุกชุมในประเทศไทย พม่า เวียดนาม มาเลเซีย บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ตลอดจนหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรอินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิกตอนใต้ สำหรับในประเทศไทยพบกุ้งก้ามกรามแพร่กระจายอยู่เกือบทุกภาค (บรรจง เทียนสงรัสมิ. 2535)

1.3 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามมีขนาด 2 คู่ ขาเดิน 5 คู่ และขาว่ายน้ำ 5 คู่ ปลายหางจะมีลักษณะเป็นหนามแหลมและมีแพนหาง 2 ข้าง มีเปลือกคลุมตัว ลำตัวแบ่งออกได้ 3 ส่วน คือ หัว อกและท้อง ส่วนหัวและอกรวมกันเป็นปล้องเดียวกันบนเปลือกคลุมหัว ทางส่วนหน้ามีหนาม 2 อัน สองข้างแก้มมีร่องปรากฏอยู่เห็นชัด กริมีลักษณะแบนข้างยาวเรียว โคนกริหนาและหนูน ตรงกลางโค้งแอ่นลง ปลายงอนขึ้น มีหยักคล้ายฟันเลื่อย สันกริล่างมีหยักประมาณ 10-14 หยัก สันกริบบนมีหยักประมาณ 12-15 หยัก ก้านตวยาวยื่นออกนอกเบ้าตา เคลื่อนไหวไปมาได้ ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ส่วนปลายเป็น

ก้าม ส่วน คู่ที่ 3, 4 และ 5 มีลักษณะเป็นปลายแหลมธรรมดา ขาเดินคู่ที่ 2 จะเป็นก้ามที่มีขนาดใหญ่ ยาวมาก โดยเฉพาะในกุ้งเพศผู้ จะมีก้ามใหญ่ยาวสีครามสดถึงสีครามเข้ม ขาคู่ที่ 1 ใช้ในการจับอาหารเข้าปากและทำความสะอาดร่างกาย ขาคู่ที่ 2 มีขนาดยาวและใหญ่กว่าขาคู่ที่ 1 ใช้สำหรับต่อสู้ และจับเหยื่อ ส่วนท้องมีหำปล้อง โดยทั่วไปมีสีน้ำเงินเข้มทั้งตัว โดยเฉพาะขาเดินคู่ที่เป็นก้าม ปลายของขามีสีชมพูอมแดงตลอดจนแพนหางตอนปลายทั้งด้านในและด้านนอก (ภาพประกอบ 1) (ยนต์ มุลิก. 2529)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

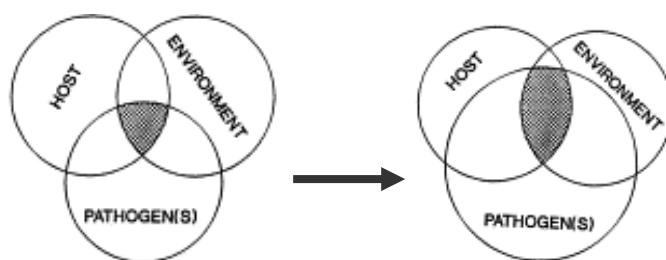
ที่มา: *Macrobrachium rosenbergii*. (2010). (Online).

1.4 วงชีวิตกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามโตเต็มวัยจะอาศัยในน้ำจืด แต่เมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์จะออกไปผสมพันธุ์ และวางไข่บริเวณปากแม่น้ำซึ่งเป็นบริเวณน้ำกร่อยที่มีน้ำทะเลขึ้นถึง ในระยะวัยอ่อน (larvae) จะอาศัยอยู่บริเวณปากแม่น้ำระยะหนึ่ง (ชูชาติ ชัยรัตน์; และ ประวิทย์ อินทรโชติ. 2515) ไข่จะฟักออกเป็นตัวในเขตน้ำกร่อย ลูกกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนจะว่ายล่องลอยตามกระแสน้ำในลักษณะ หายท้องว่ายน้ำ และต้องอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำกร่อยจึงจะมีชีวิตอยู่รอดและพัฒนาไปเรื่อยๆ เข้าสู่ระยะต่างๆ 11 ระยะ โดยการลอกคราบแล้วจึงจะกลายเป็นกุ้งคว่ำที่มีลักษณะเหมือนกุ้งโตเต็มวัยทุกประการ และว่ายน้ำคว่ำหน้าลงตามปกติจึงกลับเข้าไปหากินในแหล่งน้ำจืด (ยนต์ มุลิก. 2529) ลูกกุ้งก้ามกรามที่ฟักออกเป็นตัวแล้วแม่กุ้งจะปล่อยให้เลี้ยงตัวเอง อาหารของลูกกุ้งระยะนี้ ได้แก่ สิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่ลอยอยู่ในน้ำจำพวก ลูกกุ้ง ลูกปลาวัยอ่อน หรือแพลงก์ตอนที่ล่องลอยอยู่ในน้ำ (ไพโรจน์ พรหมานนท์; และ ทรงชัย สหวัชรินทร์. 2512)

2. การเกิดโรคในกุ้ง

โรคระบาดในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นปัญหาที่สำคัญมาก เนื่องจากทำให้ผลผลิตกุ้งลดลงอย่างมาก โดยโรคที่เกิดกับกุ้งเป็นผลของความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรค (ภาพประกอบ 2) เมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิพลเพิ่มมากขึ้น เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค การปรากฏของเชื้อก่อโรคหลายๆ ชนิด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงหรือภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสมก็จะส่งผลทำให้การก่อเกิดหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Snieszko; 1973: 55-56) โรคส่วนใหญ่ที่เกิดกับกุ้งที่เพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ โรคไม่ติดเชื้อและโรคติดเชื้อ โดยโรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (Bachere; 2000: 3-11) ส่วนโรคติดเชื้อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบภูมิภาคเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112)



ภาพประกอบ 2 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogen) กับการเกิดโรคในกุ้ง โดยพื้นที่สีเทาเป็นบริเวณที่เกิดโรคซึ่งมีปัจจัย เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค เมื่อเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลทำให้การก่อโรคหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ที่มา: Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. P. 164: 201–220.

3. โรคหางขาว

โรคหางขาว (White tail disease; WTD) หรือเรียกอีกอย่างว่าโรคกล้ามเนื้อซีด (whitish muscle disease; WMD) มีรายงานการระบาดครั้งแรกในโรงเพาะฟักลูกกุ้งก้ามกรามในหมู่เกาะกัวเดอลุป (Arcier; et al. 1999: 177-181) ต่อมาพบการระบาดในประเทศไต้หวัน (Tung et al. 1999: 319-322) ประเทศจีน (Qian; et al. 2003: 521-527) ประเทศอินเดีย (Hameed; et al. 2004: 127-133) ประเทศไทย (Yoganandhan; et al. 2006: 255-258) และเมื่อไม่นานนี้พบการระบาดที่ประเทศออสเตรเลีย (Owens; et al. 2009: 175-180) จากการแยกเชื้อที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตายของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักในประเทศจีน พบว่าเกิดจากจากอนุภาคไวรัส 2 ชนิด (Arcier; et al. 1999: 177-181) จากการศึกษาของ Tung และคนอื่นๆ (1999: 319-322) พบว่าไวรัสที่ทำให้เกิดโรคจะแสดงให้เห็นการตายของส่วนต่างๆ ในร่างกายของกุ้งก้ามกราม ซึ่งจากการศึกษาต่อมาพบว่าสาเหตุของโรคหางขาวเกิดจากเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) (Romestand; & Bonami. 2003: 71-75) และเชื้อไวรัส extra small virus (XSV) (Qian; et al. 2003: 521-527) โดยโรคดังกล่าวส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอย่างมากเนื่องจากลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ MrNV และ XSV มีอัตราการตายที่สูงและมีการระบาดอย่างรวดเร็ว ซึ่งในปัจจุบันยังพบการระบาดของโรคนี้อยู่

สำหรับในประเทศไทยพบรายงานการติดเชื้อ MrNV ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน (larvae) อย่างรวดเร็วในหลายพื้นที่ตั้งแต่ปี 2003 และรุนแรงขึ้นในปี 2004 โดยเฉพาะในเขตพื้นที่จังหวัดราชบุรีและสุพรรณบุรีพบว่าลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมักพบในช่วงก่อนระยะลูกกุ้งคว่ำตัว (post-larvae) ซึ่งส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอย่างมาก (ชัยวุฒิ สุธทองคง. 2550: 293-301)

อาการของกุ้งที่เป็นโรคหางขาวสามารถสังเกตได้จาก การที่กุ้งกินอาหารน้อยลง เคลื่อนไหวช้า เนื้อขาว สีซีด กล้ามเนื้อขุ่นทึบสีขาวคล้ายสีของน้ำมัน (ภาพประกอบ 3) กล้ามเนื้อส่วนหางมีลักษณะขาวขุ่นโดยจะเห็นลักษณะสีซีดเกิดขึ้นบริเวณปลายหางและลามถึงกล้ามเนื้อส่วนลำตัว อาจมีหรือไม่มีกล้ามเนื้อขาวขุ่นทั้งตัวหรือบางส่วน เช่น บริเวณหลังหรือปลายหาง (Hameed; et al. 2004: 127-133) ซึ่งลักษณะกล้ามเนื้อขาวขุ่นนี้เกิดขึ้นที่ละน้อยและขยายออกไปทั่วลำตัวคล้ายกับอาการของกุ้งที่เป็นโรค idiopathic muscle necrosis (IMN) ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากความเครียดที่มาจากสภาพแวดล้อมและคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม (Nash; et al. 1987: 109-120) บางครั้งอาจพบว่าลูกกุ้งก้ามกรามมีอัตราการตายสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2-3 วันหลังจากที่พบลูกกุ้งก้ามกรามมีอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่น (Hameed; et al. 2004: 127-133) แต่ในขณะเดียวกันกุ้งระยะวัยอ่อนบางตัวที่มีการติดเชื้อ MrNV แต่ไม่พบลักษณะขาวขุ่นในกล้ามเนื้อ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสสามารถทำให้กุ้งตายได้รวดเร็ว โดยกุ้งยังไม่แสดงลักษณะอาการของโรค โดยเฉพาะในช่วงก่อนหรือหลังการลอกคราบของกุ้งใหญ่ และช่วงก่อนและหลังระยะการคว่ำตัวของลูกกุ้ง (ชัยวุฒิ สุธทองคง. 2550: 293-301)



ภาพประกอบ 3 ลักษณะของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MnNV* โดยกุ้งจะมีลักษณะขุนขาวของกล้ามเนื้อส่วนลำตัว (ภาพขวา) เมื่อเทียบกับกุ้งก้ามกรามปกติ (ภาพซ้าย)

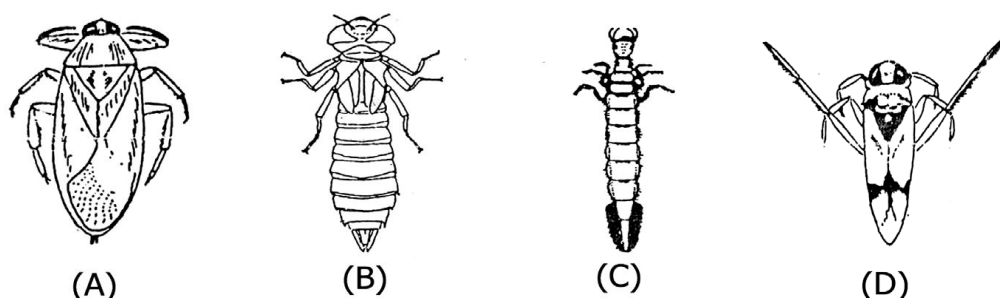
ที่มา: Network Aquaculture Centres in Asia-Pacific. (2009). (Online).

จากการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัส *MnNV* และ *XSV* มีความสัมพันธ์กันและทำให้เกิดโรคทางขาวในกุ้งก้ามกราม โดยเชื้อ *MnNV* มีความสำคัญในการทำให้เกิดโรค เนื่องจากเชื้อ *XSV* จัดเป็น satellite virus ไม่สามารถติดเชื้อได้โดยลำพังตนเอง เนื่องจากขาดเอนไซม์ RdRp ที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ที่เป็นตัวช่วยในการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม จึงจำเป็นต้องอาศัยร่วมกับไวรัสอื่นซึ่งทำหน้าที่เป็น helper virus (Widada; & Bonami. 2004: 643-646) โดยส่วนใหญ่กุ้งที่เป็นโรคทางขาวมักตรวจพบการติดเชื้อ *MnNV* ร่วมกับเชื้อ *XSV* แต่มีบางตัวอย่างของกุ้งที่เป็นโรคที่ตรวจพบเฉพาะเชื้อ *XSV* (Hameed; et al. 2004: 127-133) เช่นเดียวกับที่มีการตรวจพบเฉพาะเชื้อ *MnNV* ในตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคทางขาวในประเทศไทย (Yoganandhan; et al. 2006: 255-258)

การติดเชื้อ *MnNV* พบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามโดยเฉพาะการติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน พบว่าอาจทำให้เกิดการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับการติดเชื้อในกุ้งที่โตเต็มวัยแล้วอาจไม่แสดงอาการของโรคแต่สามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปยังกุ้งตัวอื่นๆ ในโรงเพาะฟักได้ (Qian; et al. 2003: 521-527) นอกจากจะพบการติดเชื้อ *MnNV* ในกุ้งก้ามกรามซึ่งเป็นโฮสต์หลักแล้ว ยังพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งชนิดอื่นๆ โดยในปี 2009 มีรายงานพบการติดเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ในลูกกุ้งระยะวัยอ่อน ได้แก่ กุ้ง *Penaeus indicus* และกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ในโรงเพาะฟักของประเทศอินเดีย โดยพบว่าลูกกุ้งมีอาการกล้ามเนื้อขาวขุ่นบริเวณลำตัวและปลายหางคล้ายกับที่พบในลูกกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน (Ravi; et al. 2009: 117-

120) โดยเชื้อไวรัส *MnNV* และ *XSV* มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถตรวจพบการติดเชื้อตามอวัยวะต่างๆ ของกุ้ง ได้แก่ เหงือก หัวใจ กระเพาะอาหาร ลำไส้ กล้ามเนื้อบริเวณส่วนลำตัว หัว อวัยวะ และหาง แต่ไม่พบการติดเชื้อที่ ก้านตา ตับและตับอ่อน (Yoganandhan; et al. 2005: 1-5)

สำหรับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส *MnNV* มี 2 แบบ คือ แบบ horizontal transmission เป็นการถ่ายทอดเชื้อที่เกิดจากการติดต่อผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยง การใช้อุปกรณ์ต่างๆ ร่วมกัน การกินอาหารที่มีเชื้อไวรัสแฝงอยู่ รวมทั้งการติดเชื้อผ่านทางพาหะ เช่น อาร์ทีเมีย และแมลงน้ำบางชนิด ได้แก่ *Belostoma* sp. (มวนน้ำ), *Aesohna* sp. (ตัวอ่อนแมลงปอ), *Cybister* sp. (ตัวอ่อนด้วงดิ่ง), และ *Notonecta* sp. (มวนกรรเชียง) (ภาพประกอบ 4) (Qian; et al. 2003: 521-527; Sudhakaran; et al. 2008: 141-145) ส่วนการถ่ายทอดเชื้อแบบ vertical transmission เกิดจากการติดต่อผ่านทางแม่พันธุ์ที่เป็นพาหะสู่ลูกกุ้ง เนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม (Sudhakaran; et al. 2007: 27-35)

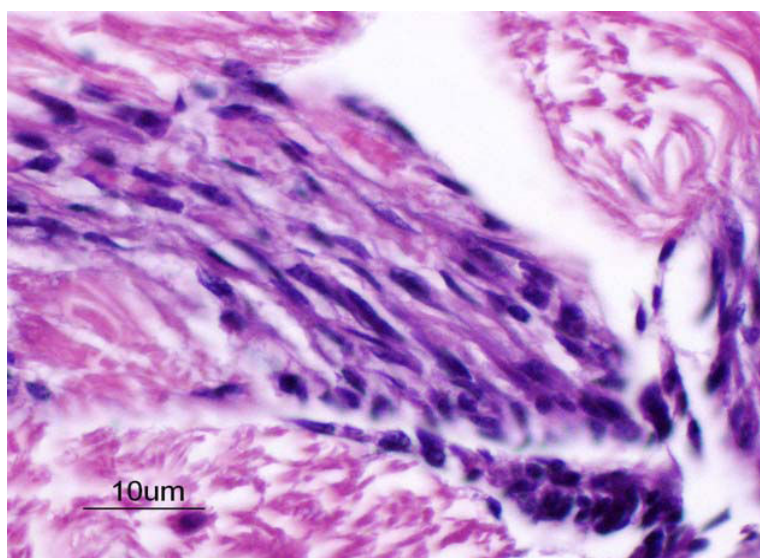


ภาพประกอบ 4 แมลงน้ำที่เป็นพาหะของเชื้อ *MnNV* ได้แก่ *Belostoma* sp. (A), *Aesohna* sp. (B), *Cybister* sp. (C) และ *Notonecta* sp. (D)

ที่มา: Sudhakaran, R.; et al. (2007). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MnNV*) and extra small virus (*XSV*). *Disease of Aquatic Organisms*. p. 142.

4. พยาธิสภาพของกิ้งก่ามกราคมที่ติดเชื้อ *MrNV*

จากการศึกษาการกักกั่มการที่ติดเชื้อ *MrNV* และมีอาการกล้ามเนื้อสีขาวขุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณส่วนท้อง เมื่อตรวจวินิจฉัยทางพยาธิสภาพจะพบการตายของกล้ามเนื้อลาย (striated muscle necrosis) ที่บริเวณส่วนหัว ส่วนท้อง ส่วนหาง และรอยางค์ของลูกกิ้งก่าที่ติดเชื้อ *MrNV* (นิตี ชูเชิด; และคนอื่น ๆ. 2547: 65-81) และพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (haemocyte infiltration) ในหลายๆ ส่วนของกล้ามเนื้อ (ภาพประกอบ 5) บางครั้งพบลักษณะการหดตัวอัดรวมกันแน่นของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) ภายในกลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อที่ตาย (จักพงศ์ นิละมนต์. 2549) นอกจากนี้ยังพบการเกิด inclusion bodies ติดสีน้ำเงิน (basophilic inclusions) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและอวัยวะต่างๆ (Arcier; et al. 1999: 177-181)

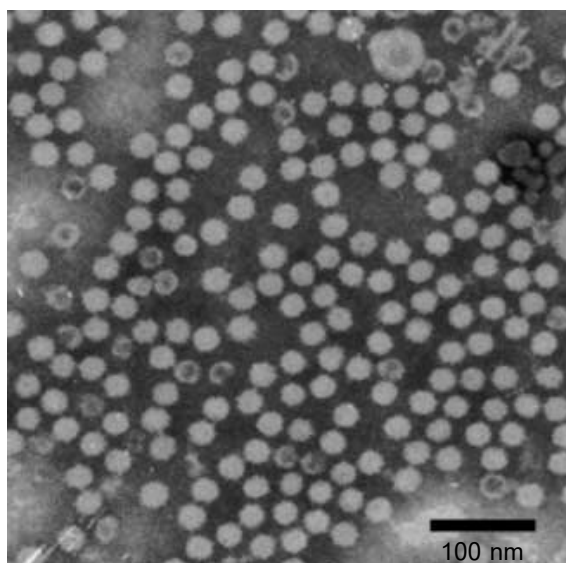


ภาพประกอบ 5 ลักษณะทางพยาธิสภาพสภาพเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อลาย (striated muscle) ของลูกกิ้งก่าที่ติดเชื้อ *MrNV* พบการตายของกล้ามเนื้อ (striated muscle necrosis) และเกิดแทรกตัวของเม็ดเลือด (haemocyte infiltration) (Davidson's; H&E)

ที่มา: จักพงศ์ นิละมนต์. (2549). ผลของไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) และ extra small virus (XSV) ในแม่พันธุ์กิ้งก่ามกราคมต่อคุณภาพลูกกิ้งก่า. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตรการประมง). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 36.

5. การศึกษาลักษณะของเชื้อ *MrNV*

การศึกษานุภาคไวรัส *MrNV* พบว่ามีลักษณะเป็น icosahedral ไม่มี envelope เส้นผ่านศูนย์กลางยาวประมาณ 26-27 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 6) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA; ssRNA) จำนวน 2 โมเลกุล คือ RNA-1 และ RNA-2 ที่มีขนาด 22.9 และ 1.3 กิโลเบส (kb) ตามลำดับ มีความหนาแน่น (buoyant density) เฉลี่ย 1.258 กรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัสด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) พบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน (kDa) (Bonami; et al. 2005: 23-31) จากการศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (morphology) โครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ของจีโนม (genomic structure and composition) พบว่าไวรัส *MrNV* จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Nodaviridae* (Garzon; and Charpentier. 1992, Van Regenmortel; et al. 2000) ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างจีโนมของไวรัสในวงศ์ *Nodaviridae* พบว่าภายในจีโนมของไวรัสประกอบด้วยบริเวณที่มีการถอดรหัสเป็นโปรตีน 2 บริเวณ คือ RNA-1 เป็นบริเวณที่ถอดรหัสเป็น RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) และ RNA-2 เป็นบริเวณที่ถอดรหัสเป็นแคปซิดโปรตีน (Sommerset; & Nerland. 2004: 117-125)

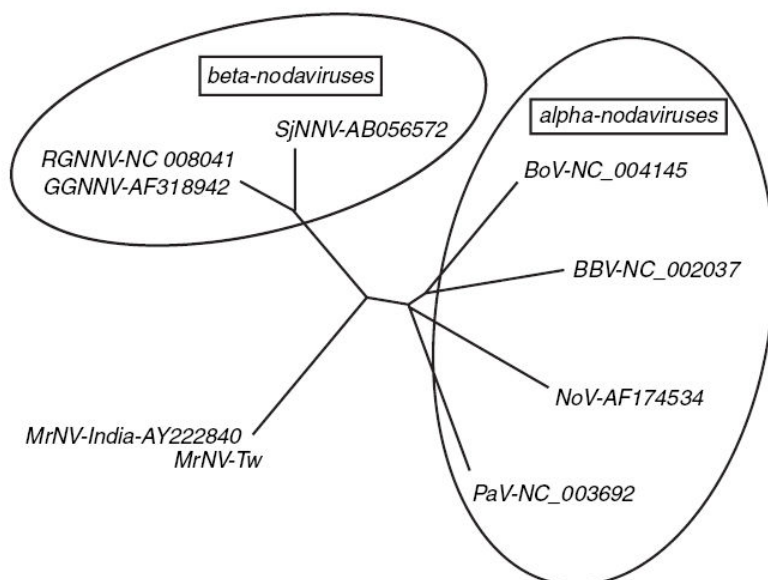


ภาพประกอบ 6 อนุภาคไวรัส *MrNV* ที่ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มีลักษณะรูปร่างเป็น icosahedral และมีขนาดประมาณ 26-27 นาโนเมตร

ที่มา: Romestand, B.; & Bonami, J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Fish Disease*. p. 74.

6. แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*

แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* มีขนาด 43 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบนเปลือกหุ้มอนุภาคของไวรัส โดยที่ RNA-2 เป็นบริเวณที่มีการถอดรหัสแคปซิดโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ open reading frame (ORF) ที่มีความยาว 1,116 นิวคลีโอไทด์ ที่ถอดรหัสได้กรดอะมิโน 371 หน่วย โดยในปี 2008 ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส *MrNV* กับไวรัสในวงศ์ *Nodaviridae* ซึ่งประกอบด้วย 2 จีโนม คือ จีโนม *Betanodavirus* (fish nodaviruses) และ จีโนม *Alphanodavirus* (insect nodaviruses) จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ClustalW และนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้วิธี neighbour-joining พบว่าไวรัส *MrNV* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสในจีโนม *Alphanodavirus* มากกว่าไวรัสในจีโนม *Betanodavirus* (ภาพประกอบ 7) ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานในปี 2001 ของ Bonami และคนอื่นๆ (2005: 23-31) ที่เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัส *MrNV* กับไวรัสในวงศ์ *Nodaviridae* (Wang; et al. 2008: 415-422)



ภาพประกอบ 7 Phylogenetic tree ที่ได้จากการทำ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส *MrNV* กับไวรัสในวงศ์ *Nodaviridae* จีโนม *Betanodavirus* และจีโนม *Alphanodavirus* โดยพบว่าไวรัส *MrNV* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสในจีโนม *Alphanodavirus* มากกว่าไวรัสในจีโนม *Betanodavirus*

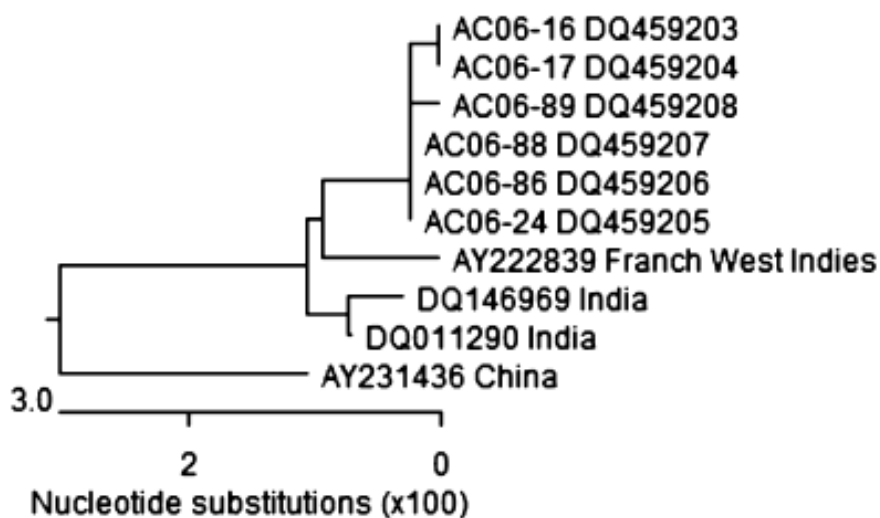
ที่มา: Wang, C.S.; et al. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *Fish disease*. p. 420.

7. การศึกษาและการตรวจการติดเชื้อ *MnNV*

7.1 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *MnNV*

ในปี 2006 Shekhar และคนอื่นๆ (2006: 128-132) ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัส *MnNV* ที่แยกได้จากลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศอินเดีย โดยนำผลผลิต RT-PCR ขนาด 850 คู่เบส ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ RNA-1 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *MnNV* ที่พบในประเทศอินเดียมีค่าความเหมือน (identity) กับสายพันธุ์ที่พบในหมู่เกาะมาร์ตีนิก (French West indies) และสายพันธุ์ที่พบในประเทศจีนเท่ากับ 98 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *MnNV* ที่พบในประเทศอินเดียมีค่าความเหมือนกับ *MnNV* สายพันธุ์ที่พบในหมู่เกาะมาร์ตีนิกและ fish nodaviruses เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ระหว่าง 33-35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคมในปี 2006 เกิดการระบาดของโรคทางขาในโรงเพาะฟักและแหล่งอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามของประเทศไต้หวัน โดยพบว่าลูกกุ้งมีลักษณะสีขาวขุ่นและมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2-3 วัน Hsieh และคนอื่นๆ (2006: 665-671) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *MnNV* โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 428 คู่เบส ที่ตำแหน่ง 1,569-1,996 ของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัส *MnNV* 6 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไต้หวัน กับไวรัส *MnNV* สายพันธุ์ที่มีการพบในประเทศต่างๆ จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส *MnNV* 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 99.5-100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา มีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 98.2-98.6 เปอร์เซ็นต์ กับ 2 สายพันธุ์ที่พบในประเทศอินเดีย และ 1 สายพันธุ์ที่พบในหมู่เกาะมาร์ตีนิก และมีค่าความเหมือน 95.2 เปอร์เซ็นต์ กับสายพันธุ์ที่พบในประเทศจีน และจากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ClustalW และนำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าไวรัส *MnNV* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่พบในหมู่เกาะมาร์ตีนิก (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 Phylogenetic tree ที่ได้จากการทำ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแคปซิดโปรตีนของ *MrNV* 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไต้หวันกับ *MrNV* สายพันธุ์ที่มีการพบจากประเทศต่าง ๆ โดยพบว่า *MrNV* สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่พบในหมู่เกาะมาร์ตีนิก

ที่มา: Hsieh, C.Y.; et al. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *Fish Disease*. p. 669.

7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *MrNV*

Sudhakaran และคนอื่นๆ (2007: 112-118) ได้ทำการเพาะเลี้ยงไวรัส *MrNV* และ XSV ในเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 mosquito *Aedes albopictus* cell line จากการศึกษพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนไวรัส *MrNV* และ XSV ได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ซึ่งยืนยันผลการศึกษาโดยวิธี RT-PCR การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและจากการศึกษาการติดเชื้อในกุ้งก้ามกราม พบว่าไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบช่องว่าง (vacuolation) เป็นจำนวนมากและพบอนุภาคไวรัสกระจายอยู่ภายในเซลล์ สำหรับการศึกษการติดเชื้อในลูกกุ้งก้ามกรามระยะ post-larvae พบว่ากุ้งที่ผ่านการแช่น้ำที่มีเชื้อไวรัสซึ่งเตรียมได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ที่ติดเชื้อ พบว่ากุ้งจะมีอาการเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร กล้ามเนื้อบริเวณลำตัวมีสีขาวขุ่น และมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 6 วัน

7.3 การตรวจการติดเชื้อ *MrNV* โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

Widada และคนอื่นๆ (2003: 583-590) ได้พัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อ *MrNV* โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี *in situ* hybridization, dot-blot hybridization และ RT-PCR จากการตรวจสอบโดยวิธี *in situ* hybridization โดยใช้ DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ซึ่งจำเพาะต่อ RNA-1 พบการติดเชื้อที่กล้ามเนื้อบริเวณส่วนท้อง หัว ออก และ รัยางค์ของกุ้ง จากการตรวจสอบโดยวิธี dot-blot hybridization และ RT-PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับ 8 พิกโตกรัม และ 7 เฟมโตกรัม ของอาร์เอ็นเอจากเชื้อ *MrNV* ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจเชื้อได้แม้นในกุ้งที่ยังไม่แสดงอาการของโรค

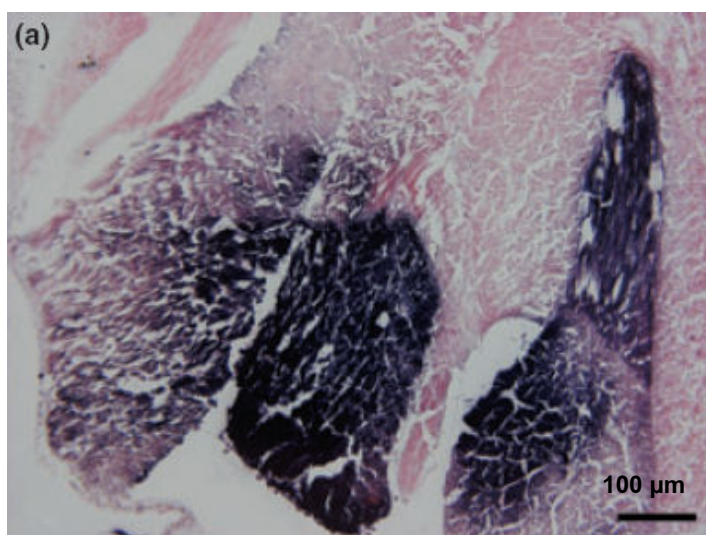
Hameed และคนอื่นๆ (2004: 127-133) ศึกษาสาเหตุการตายของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนที่เกิดขึ้นในหลายพื้นที่ของประเทศอินเดีย โดยเก็บตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและตายมาตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR พบการติดเชื้อ *MrNV* และ XSV เกือบทุกตัวอย่างที่ศึกษา โดยมีบางตัวอย่างเท่านั้นที่พบการติดเชื้อ XSV แต่ไม่พบการติดเชื้อ *MrNV* และจากการทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ *MrNV* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น คือ MrNV1F, MrNV1R ที่จำเพาะต่อ RNA-1 และ MrNV2aF, MrNV2aR ที่จำเพาะต่อ RNA-2 ซึ่งให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 590 และ 495 คู่เบส ตามลำดับ พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นสามารถเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อ โดยสามารถตรวจเชื้อได้ถึงที่ระดับ 0.25 เฟมโตกรัม ของ RNA เมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ของ Widada และคนอื่นๆ (2003: 583-590) ที่จำเพาะต่อ RNA-1 และให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 850 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจเชื้อได้ถึงที่ระดับ 25 เฟมโตกรัม ของ RNA จากตัวอย่างกุ้งที่มีการติดเชื้อ

Yoganandhan และคนอื่นๆ (2005: 1-5) ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *MrNV* และ XSV ในกุ้งก้ามกรามโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR (mRT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่พร้อมกันในปฏิกิริยา ซึ่งให้ผลผลิต RT-PCR ของ *MrNV* และ XSV มีขนาด 681 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ โดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจการติดเชื้อ *MrNV* และ XSV ได้ในเวลาพร้อมกันจากในตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติ และกุ้งที่ติดเชื้อจากการทดลองโดยผ่านการแช่ในสารละลายที่มีไวรัส จากการตรวจสอบพบการติดเชื้อ *MrNV* และ XSV ในอวัยวะต่างๆ ของกุ้ง ได้แก่ หัวใจ รัยางค์ กระเพาะอาหาร ลำไส้ เลือด กล้ามเนื้อบริเวณส่วนลำตัว หัว ออก รัยางค์ และหาง แต่ไม่พบการติดเชื้อที่ก้านตา ตับและตับอ่อน จากการทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ พบว่าวิธี mRT-PCR สามารถตรวจการติดเชื้อ *MrNV* และ XSV ได้ในเวลาพร้อมกัน ที่ระดับ 25 เฟมโตกรัม ของ RNA จากตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อ

Pillai และคนอื่นๆ (2006: 275-283) ได้พัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *MrNV* ในกุ้งก้ามกรามโดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ที่ออกแบบจำเพาะต่อ RNA-2 ผลจากการตรวจสอบพบว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจและความไวสูงกว่าการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ประมาณ 10 เท่า นอกจากนี้ความขุ่น (turbidity) ที่

เกิดขึ้นเนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลาย จึงสามารถรายงานผลโดยการสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าหรือวัดค่าการดูดกลืนแสงของความขุ่นของสารละลายที่เกิดขึ้นแทนการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

Wang และคนอื่นๆ (2008: 415-422) ได้ใช้วิธี RT-PCR และ *in situ* hybridization ในการตรวจการติดเชื้อ *MNV* ในโรงเพาะพักลูกกุ้งก้ามกรามของประเทศไต้หวัน จากการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RNA-1 (Widada; et al. 2003: 583-590) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RNA-2 (Hameed; et al. 2004: 127-133) ซึ่งให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 850 และ 425 คู่เบส ตามลำดับ พบการติดเชื้อ *MNV* และจากการตรวจสอบโดยวิธี *in situ* hybridization โดยใช้ DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ซึ่งจำเพาะต่อ RNA-2 พบการติดเชื้อที่บริเวณกล้ามเนื้อลาย (striated muscle) ของกุ้งที่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ 9) โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามปกติ



ภาพประกอบ 9 การตรวจสอบการติดเชื้อ *MNV* โดยวิธี *in situ* hybridization โดยใช้ DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ซึ่งจำเพาะต่อ RNA-2 พบการติดเชื้อ *MNV* ที่บริเวณกล้ามเนื้อลายของกุ้งที่ติดเชื้อ

ที่มา: Wang, C.S.; et al. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *Fish Disease*. p. 418.

7.4 การตรวจการติดเชื้อ *MnNV* โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

Romestand และ Bonami (2003: 71-73) ใช้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *MnNV* ในกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA) โดยการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) จากการใช้เชื้อไวรัส *MnNV* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู และเมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในวิธี indirect sandwich ELISA พบว่าสามารถตรวจสอบเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MnNV* ตามธรรมชาติได้โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ในเนื้อเยื่อกุ้งปกติ และ nodavirus ชนิดอื่นๆ

Qian และคนอื่นๆ (2006: 1144-1150) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ต่อ *MnNV* จากการใช้เชื้อไวรัส *MnNV* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 12 โคลน ที่มีความจำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนขนาด 43 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจเชื้อ *MnNV* ด้วยวิธี triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) โดยใช้ rabbit anti *MnNV* เป็น capture antibody โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2B2 เป็น detector antibody และ goat anti-mouse Ig-HRP antibody (GAM-HRP) เป็น reporting antibody พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ที่ระดับ 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารสกัดเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ และมีความไวสูงกว่าการตรวจด้วยวิธี sandwich ELISA ประมาณ 10 เท่า (Romestand; & Bonami. 2003: 71-73)

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของ *MnNV* นี้เป็นประโยชน์ในการนำลำดับดีเอ็นเอของยีนแคปซิดโปรตีนมาโคลนและแสดงออกเพื่อใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป เนื่องจากแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียวจึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยกุ้งที่ติดเชื้อ *MnNV* โดยใช้แอนติบอดี นอกจากนี้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนสามารถผลิตโปรตีนได้ตามปริมาณที่ต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งที่ติดเชื้อโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีการเติมบริเวณตัดจำเพาะ (restriction site) ของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างแคปซิดโปรตีนของ *MnNV* โดยไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ *MnNV* จะให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 1,041 คู่เบส (ภาพประกอบ 10) จากนั้นโคลนยีนแคปซิดโปรตีนของ *MnNV* ที่บริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI เข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector และกระตุ้นการแสดงออกของยีนแคปซิดโปรตีนต่อไป

MrNVF91															
	→														
88	aat	ccg	cag	acg	gtt	ccc	aac	ttc	aac	ccc	att	gtc	gca	aag	ccg
	N	P	Q	T	V	P	N	F	N	P	I	V	A	K	P
133	acg	gtt	gcc	cca	ctt	caa	act	aac	att	aga	agt	gct	agg	agt	gac
	T	V	A	P	L	Q	T	N	I	R	S	A	R	S	D
178	gtt	aat	gcc	atc	act	gtt	tta	aat	ggc	agt	gat	ttt	ctt	aca	act
	V	N	A	I	T	V	L	N	G	S	D	F	L	T	T
223	gtc	aaa	gtc	cga	ggt	tct	aac	aac	tta	act	gat	tcc	aag	tct	aga
	V	K	V	R	G	S	N	N	L	T	D	S	K	S	R
268	atc	ttg	gtt	aag	caa	cca	att	tct	gcg	agt	tct	ttt	ctt	ggt	acc
	I	L	V	K	Q	P	I	S	A	S	S	F	L	G	T
313	aga	att	tct	ggc	cta	tcg	caa	ttt	tgg	gag	cgt	tat	aga	tgg	cac
	R	I	S	G	L	S	Q	F	W	E	R	Y	R	W	H
358	aag	gct	gca	gtc	aga	tat	gtt	cct	gca	gta	ccc	aat	act	tta	gct
	K	A	A	V	R	Y	V	P	A	V	P	N	T	L	A
403	tgc	caa	ctt	att	ggt	tac	atc	gat	aca	aat	cca	cta	gat	gac	cct
	C	Q	L	I	G	Y	I	D	T	N	P	L	D	D	P
448	aac	gtt	atc	ctc	gat	gtt	gat	cag	tta	ctt	agg	cag	gct	acg	tca
	N	V	I	L	D	V	D	Q	L	L	R	Q	A	T	S
493	caa	gtg	ggt	gcg	cgg	cag	tgg	aat	ttc	tct	gat	aca	aca	act	att
	Q	V	G	A	R	Q	W	N	F	S	D	T	T	T	I
538	cca	ttg	att	gtc	agg	cgt	gat	gat	caa	ttg	tac	tat	act	ggt	caa
	P	L	I	V	R	R	D	D	Q	L	Y	Y	T	G	Q
583	gat	aaa	gag	aac	gtt	cgt	ttc	tct	cac	cag	ggt	gta	ttt	tac	ttc
	D	K	E	N	V	R	F	S	H	Q	G	V	F	Y	F
628	ttg	caa	ggg	act	aca	cta	ctt	aat	att	agt	ggt	gaa	gcc	att	aca
	L	Q	G	T	T	L	L	N	I	S	G	E	A	I	T
673	aat	gat	tta	att	tca	ggt	tca	cta	tat	tta	gat	tgg	gtc	tgt	gga
	N	D	L	I	S	G	S	L	Y	L	D	W	V	C	G
718	ttt	tcc	atg	cca	caa	att	aat	cct	aca	cca	gtg	gaa	gtt	tca	cag
	F	S	M	P	Q	I	N	P	T	P	V	E	V	S	Q
763	cta	act	tac	gat	gcg	gat	act	att	ggc	agt	tgg	gtt	cca	cca	aca
	L	T	Y	D	A	D	T	I	G	S	W	V	P	P	T
808	gaa	ctc	aag	caa	act	tat	act	caa	gat	att	act	ggt	ttg	aag	cca
	E	L	K	Q	T	Y	T	Q	D	I	T	G	L	K	P
853	aat	tct	aaa	ttc	att	atc	gta	ccc	tat	atg	gat	aga	gta	agt	tct
	N	S	K	F	I	I	V	P	Y	M	D	R	V	S	S
898	gaa	gta	ttg	cag	aag	tgc	aca	atc	act	tgt	aat	gag	gtt	gac	gca
	E	V	L	Q	K	C	T	I	T	C	N	E	V	D	A
943	gtt	ggt	tca	atc	tca	tac	ttc	gat	act	aac	gct	atc	aaa	tgt	gac
	V	G	S	I	S	Y	F	D	T	N	A	I	K	C	D
988	ggg	tac	ata	tca	ttc	cag	gcc	aat	agc	att	ggt	gaa	gca	acc	ttc
	G	Y	I	S	F	Q	A	N	S	I	G	E	A	T	F
1033	acc	tta	gtg	acc	gat	tat	cag	ggt	gcg	gtt	gac	cct	aaa	ccc	tat
	T	L	V	T	D	Y	Q	G	A	V	D	P	K	P	Y
1078	cag	tat	agg	att	atc	aga	gct	atc	gtc	ggc	aat	aat	tag		
	Q	Y	R	I	I	R	A	I	V	G	N	N	*		
	←														
	MrNVR														

ภาพประกอบ 10 ลำดับเบสของยีนแคปซิดโปรตีน *MrNV* (Wang; et al. 2008: 415-422) โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง primer ที่ใช้ในการทดลอง โดยชื่อของ primer กำกับอยู่บนลูกศร ซึ่ง primer MrNVF91 มีการเติม *Bam*HI restriction site ที่ปลาย 5' ส่วน primer MrNVR ได้ทำการเติม *Eco*RI restriction site ที่ปลาย 5'

8. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบีเซลล์เซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์ (B-lymphocytes หรือ B-cells) จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากหนึ่งโคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

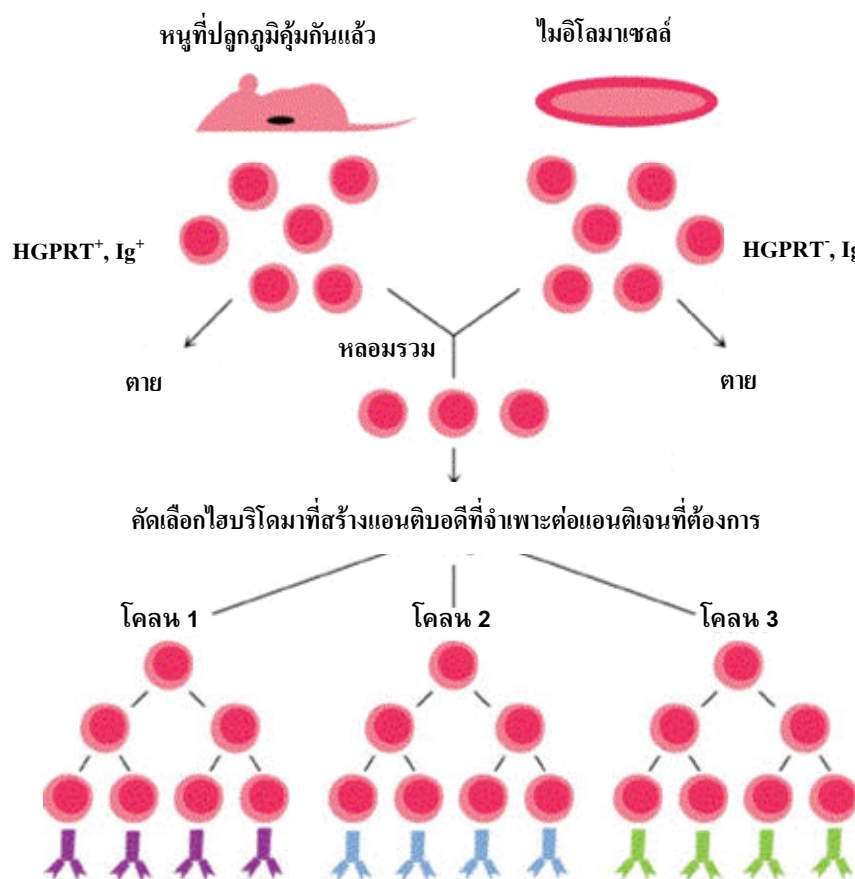
8.1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้ถูกคิดค้นเป็นผลสำเร็จโดย Köhler และ Milstein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่มีอายุจำกัด และไมอีโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวได้ตลอด ให้คุณสมบัติในการเจริญเติบโตได้โดยไม่มีขีดจำกัด ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุด (ภาพประกอบ 11) เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

8.2 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากที่มีการหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีโดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่จะมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหา

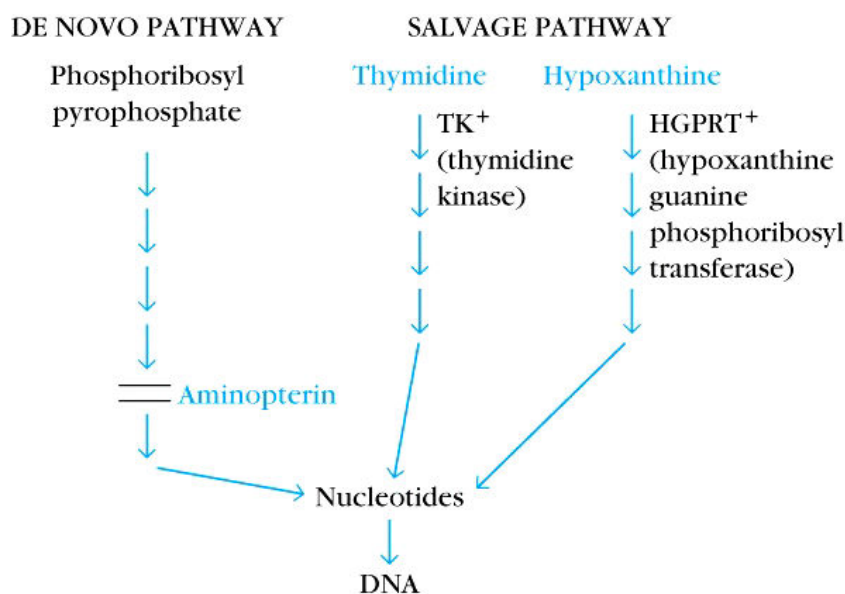
ภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ การใช้ไมโอโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในกระบวนการ salvage pathway คือมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) อะมิโนปเทอริน (aminopterin) และไทมิดีน (thymidine) หรือ HAT medium ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมโอโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมโอโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล ลิทธิกรกุล. 2548)



ภาพประกอบ 11 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ดัดแปลงจาก http://www2.hawaii.edu/.../Chap5_Ag_Ab_reactions.htm)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 กระบวนการ คือ de novo pathway และ salvage pathway (ภาพประกอบ 12) ในกรณีของ de novo pathway จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่เมทิล (methyl) หรือฟอร์มิล (formyl) จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อ de novo pathway ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้ salvage pathway โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน salvage pathway นั้นได้แก่เอนไซม์ HGPRT และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใน salvage pathway ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวาง de novo pathway ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)



ภาพประกอบ 12 แนวทางการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo pathway และ salvage pathway และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo pathway

ที่มา: Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; & Pober, J.S. (1991). Cellular and Molecular Immunology. p. 417.

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมโอโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกัน คือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻ mutant) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์มะเร็ง ส่วนไมโอโลมาเซลล์เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยามัคคุ่มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆ เช่นวิธี dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านได้แก่ ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียงหนึ่งตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการใช้รักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่างๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้มข้นได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พลาสมิด *MrNV*-pGEX

พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีนแคปซิดโปรตีนของ *MrNV* (*MrNV*-pGEX) (กิตติยา ศรีบุรินทร์; และ จิตติยา ลอยแก้ว. 2550)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรีย

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB broth)

2.2 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

3. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1 หนูขาว (Swiss mice) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ. นครปฐม

3.2 กุ้งก้ามกรามระยะ post-larvae ที่ติดเชื้อ *MrNV* (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น, มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.3 กุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MrNV* (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ธนัชพร อุทัยรังษี, มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.4 กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) ที่ติดเชื้อ *MrNV* จากบ่อปลา อ. บางป่อ จ. สมุทรปราการ

4. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 1

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์	Bio-Rad
2. ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
3. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad

ตาราง 1 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
4. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
5. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinate)	NUAIRE
6. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ incubator)	NUAIRE
7. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JANWAY
8. เครื่อง rotary microtome รุ่น RM2135	LEICA
9. เครื่อง thermal cycler	Eppendorf
10. เครื่อง autoclave รุ่น HA-36	Hirayama
11. เครื่องชั่ง รุ่น A200S	Satorius
12. ตู้ป้อนเชื้อ รุ่น RO8	Memmert

5. เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

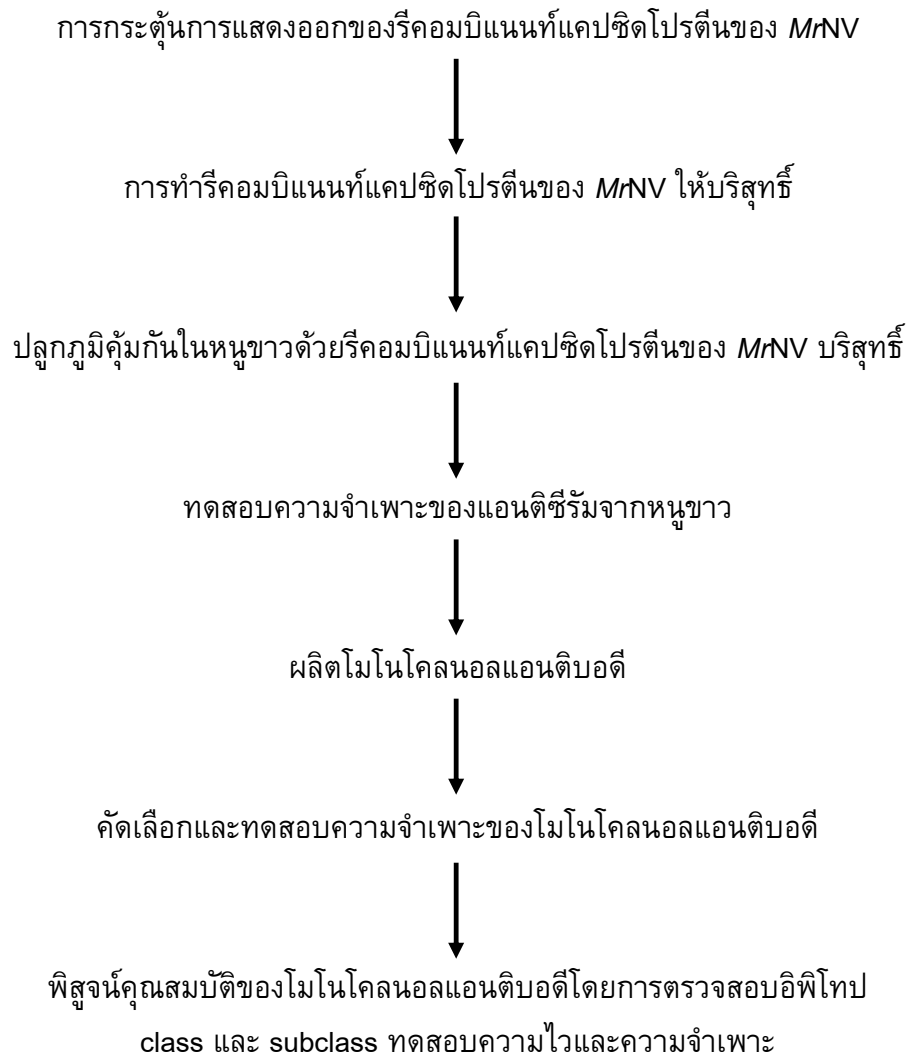
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
ชุด SuperScript TM III One-Step RT-PCR System	Invitrogen
ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	Gibco
ยาปฏิชีวนะ ampicillin	Sigma
ยาปฏิชีวนะ penicillin, streptomycin	M & H
fetal bovine serum	Starrate
calf bovine serum	Starrate
sodium pyruvate	Sigma
sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	Amresco
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulfonic acid)	Amresco
HT supplement	Gibco
polyethylene glycol (PEG)	Sigma

ตารางที่ 2 (ต่อ)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
hypoxanthine	Gibco
aminopterin	Sigma
sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad
acrylamide	Bio-Rad
Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	Bio-Rad
glycine	Research Organics
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Promega
2-mercaptoethanol	Sigma
thimerosal	Sigma
triron x-100	Sigma
ammonium persulfate	Bio-Rad
TEMED (N',N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Promega
diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Sigma
coomassie brilliant blue R-250	Sigma
eosin Y	Harleco
hematoxylin	Harleco
paraplast	Sherwood
o-phenylenediamine (OPD)	Sigma
Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้



1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*

จากวิธีของ Sambrook; Fritsch; & Maniatis (2000: 17.1-17.10) ได้ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* เริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ *MrNV* (*MrNV*-pGEX) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ บ่มข้ามคืนใน shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นใส่ลงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมี ampicillin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ 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) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) แล้วนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*

นำ lysate ที่ได้มาผสมกับบัฟเฟอร์ 2X SDS-treatment ในอัตราส่วน 1:1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 กิโลดาลตัน เป็น positive control (เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด เป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* เทียบกับโปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

3. การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ให้บริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate มาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 แล้วแช่เจลใน 0.3 M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที ตัดแถบเจลที่เป็นตำแหน่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตัน นำไปแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis ซะโปรตีนออกจากเจล (elute) ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ ประมาณ 8 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis แล้วแช่ในน้ำกลั่นเพื่อกำจัดเกลือและ SDS ออกโดยเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง Speed-Vac (Savant) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ

Bradford (1976) จากนั้นแบ่งสารละลายเป็นส่วนๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4. การตรวจการติดเชื้อ *MrNV* ในกึ่งก้ามกรามด้วยวิธี RT-PCR

4.1 การเตรียม RNA ของ *MrNV*

นำตัวอย่างขาวว่ายน้ำหรือเนื้อเยื่อส่วนลำตัวของกึ่งก้ามกรามมาบดใน lysis buffer (Flegel pers. comm.) นำสารละลายที่บดได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรมาสกัด RNA โดยใช้ชุด high pure viral nucleic acid kit (Roche Molecular Biochemicals) ตามขั้นตอนต่างๆ ที่ระบุไว้ในคู่มือ RNA ที่ได้จะละลายใน elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจการติดเชื้อ *MrNV* ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจการติดเชื้อ *MrNV* ในกึ่งก้ามกรามด้วยวิธี RT-PCR ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ *MrNV* โดยนำ RNA ที่สกัดได้มาเป็น template ใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ Taq DNA polymerase ซึ่งผสมสารต่างๆ ดังตารางที่ 3 จากนั้นนำหลอด thin wall ที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อย ใส่ในเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีน (ตาราง 4) โดย primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ *MrNV* มีลำดับเบสดังนี้ (ทิตยา ศรีบุรินทร์; และ จิตติยา ลอยแก้ว. 2550)

Forward primer : (MrNVF91) 5'-CGGGATCCCCGACGACGGTTCCCAAC-3'

มีการเติม *Bam*HI restriction site (ขีดเส้นใต้)

Reverse primer : (MrNVR) 5'-GGAATTCCTAATTATTGCCGACGATAG-3'

มีการเติม *Eco*RI restriction site (ขีดเส้นใต้)

ตาราง 3 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR

ส่วนผสมของการทำ RT-PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA ที่สกัดจากกึ่งก้ามกราม	2
SuperScript TM III RT/Platinum [®] Taq Mix	0.5
2X Reaction Mix (0.4 mM dNTP, 2.4 mM MgSO ₄)	12.5
Forward primer (MrNVF91) (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Reverse primer (MrNVR) (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Deionized Water	8
ปริมาตรสุทธิ	25.0

ตาราง 4 ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ด้วยวิธี RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
1. cDNA synthesis	50	30.00	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3-5 เป็นจำนวน 35 รอบ
2. pre-denaturation	95	5.00	
3. denaturation	95	1.00	
4. annealing	55	0.45	
5. extension	72	1.00	
6. final extension	72	15.00	

นำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิต RT-PCR ของ *MrNV* มีขนาด 1041 คู่เบส โดยกึ่งก้ำมGRAMที่ติดเชื้อ *MrNV* นี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *MrNV* ต่อไป

5. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ *MrNV*

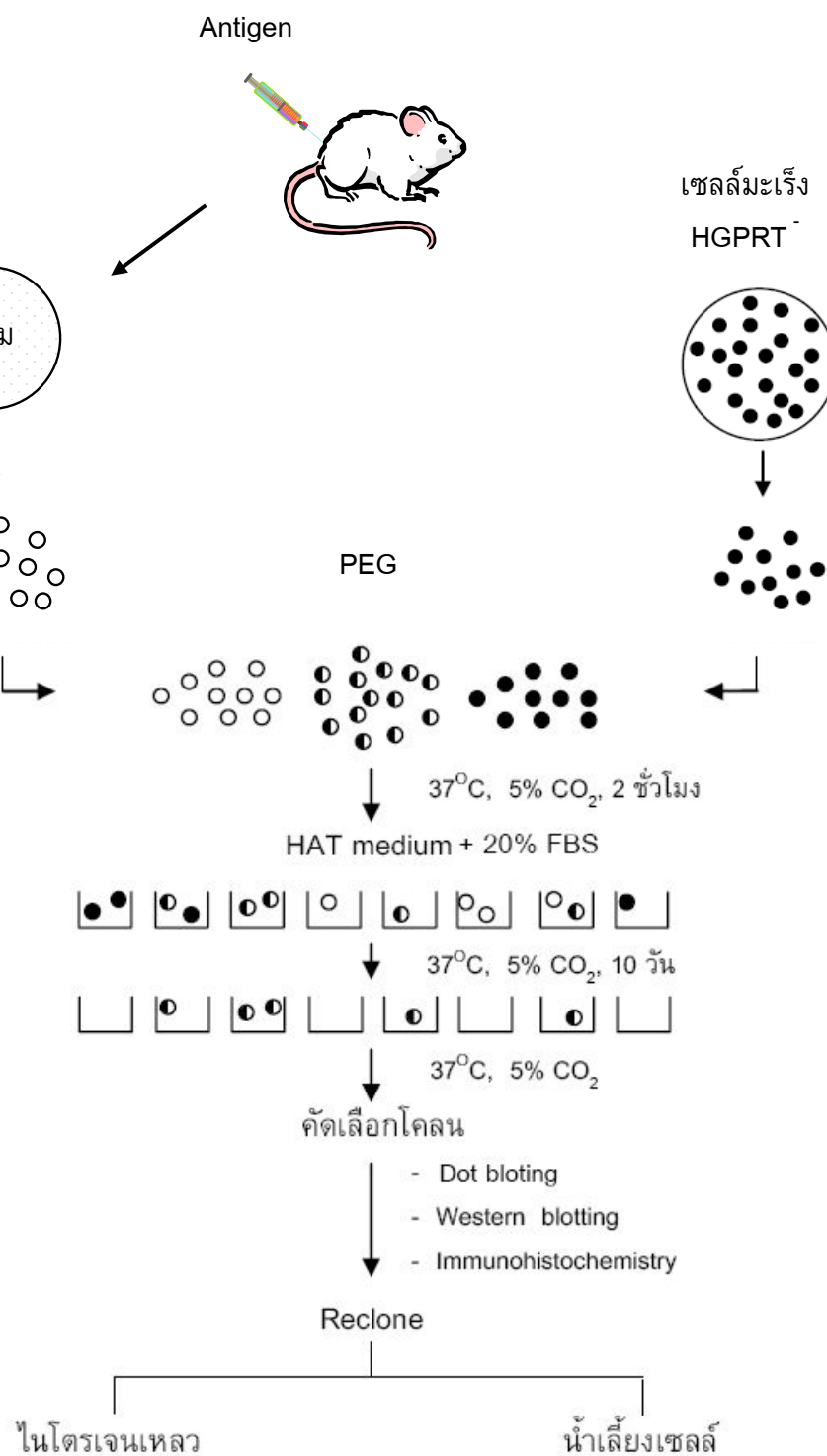
5.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง ด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* บริสุทธิ์ ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์เก็บซีรัมหนูแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ *MrNV* โดยวิธี immunohistochemistry เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* บริสุทธิ์ ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีกครั้ง ก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน

5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ *MrNV*

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษานี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี 1979 (Mosmann; Bauman; & Williamson 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ที่ให้ผล

ของปฏิกิริยาระหว่างแอนติชีรั่มกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยฆ่าหนู ผ่าตัดม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วนำมาหลอมรวมกับ 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 เพลต บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่างๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมา ไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ MNV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 แผนผังการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี
(ดัดแปลงจากไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 94)

5.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

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

5.3.1 การคัดเลือกชั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้พลาสมิด pGEX-6P-1 ในการผลิตโปรตีนทำให้ได้โปรตีนลูกผสมของ GST จากพลาสมิดกับโปรตีนที่ต้องการ ดังนั้นในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting จึงต้องหยด lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด MrNV-pGEX และ pGEX-6P-1 (GST) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ MrNV เท่านั้น จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำยาเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto = 1% non fat dry milk, 0.1% TritonX 100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1:1,500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS นำไปทำปฏิกิริยาโดยบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (Sithigorngul; et al. 2000: 27-34) เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ MrNV แต่ไม่จำเพาะต่อ GST นำมาคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และ immunohistochemistry ต่อไป

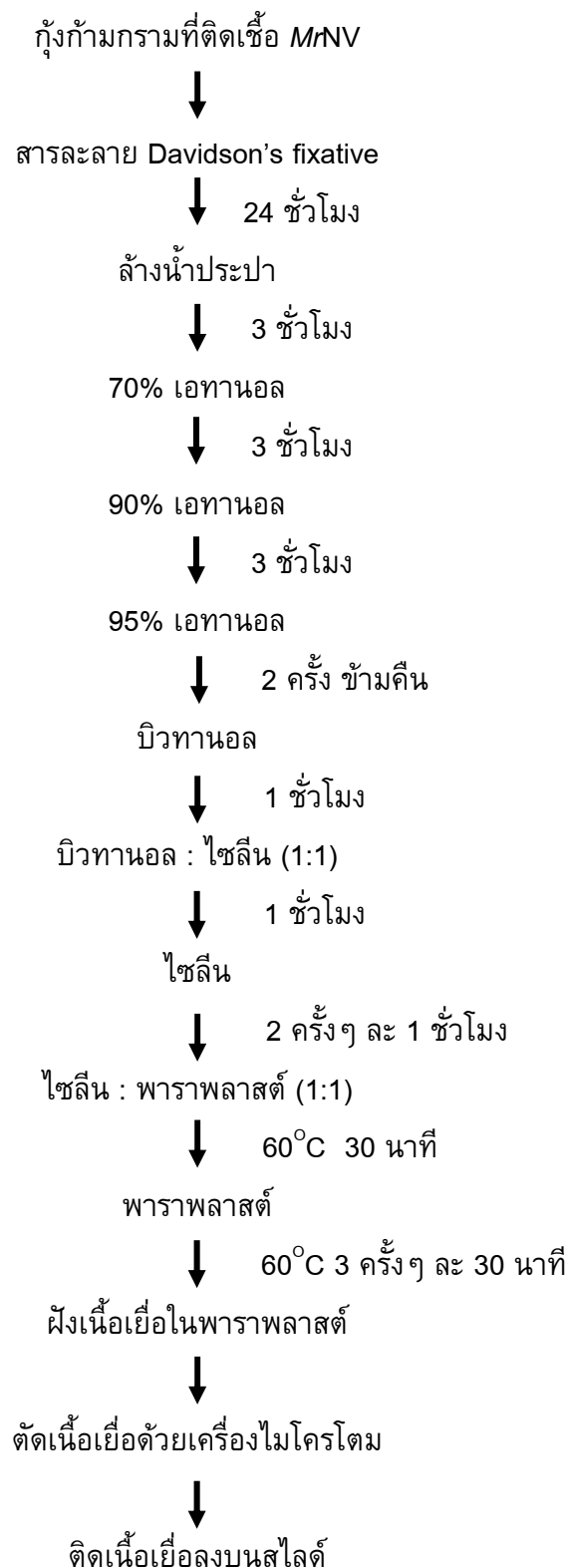
5.3.2 การคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting

นำ lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด MrNV-pGEX และสารสกัดเนื้อเยื่อของกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อ MrNV ตามธรรมชาติมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลที่ได้ส่วนหนึ่งไปย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ชุด transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:50 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดี

5.3.3 การคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี Immunohistochemistry

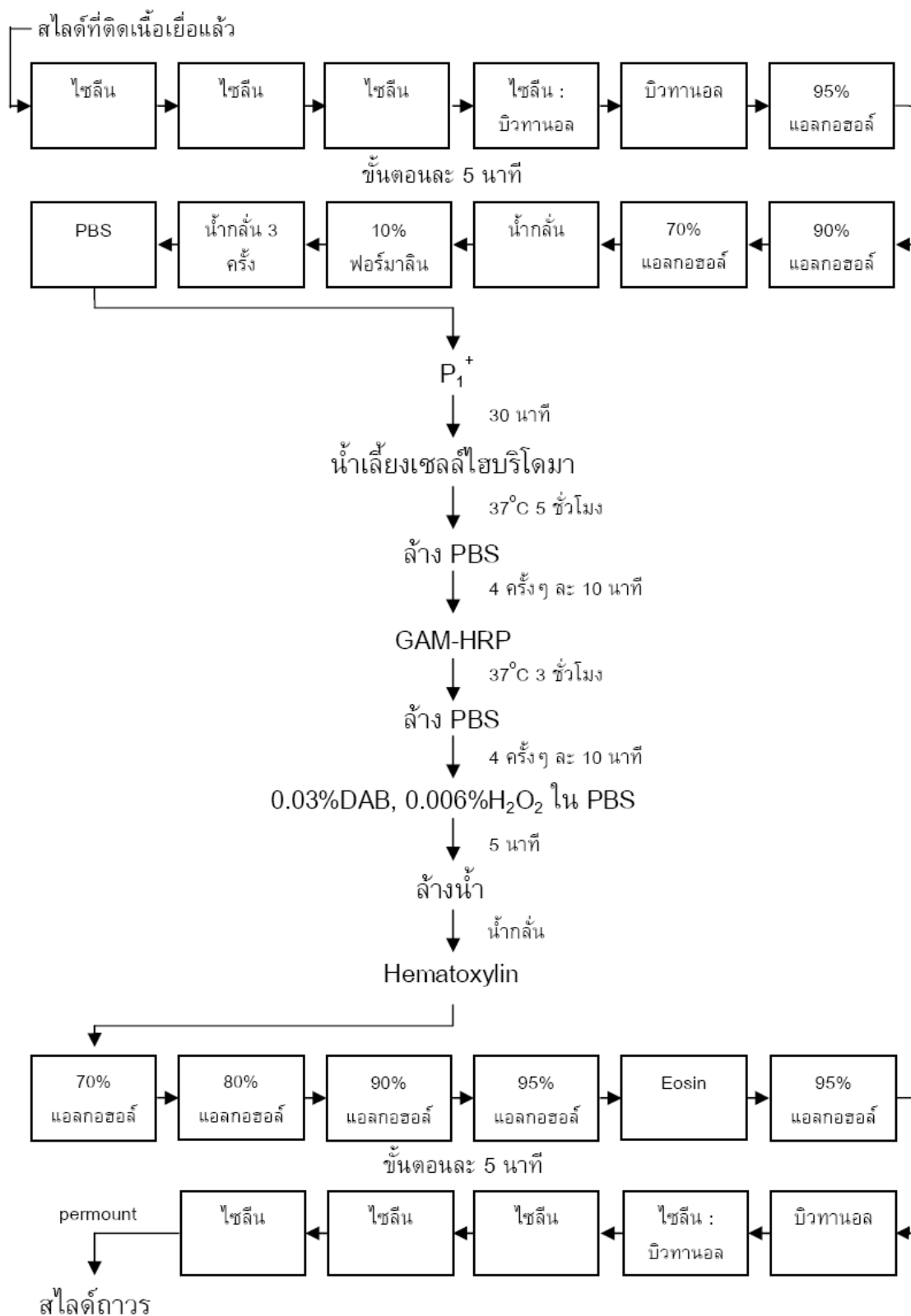
จากวิธีของ Sithigorngul และคนอื่นๆ (2000; 27-34) นำกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MNV* และกุ้งก้ามกรามปกติทำให้คงสภาพในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งเพื่อกำจัด fixative ออก นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่างๆ ได้แก่ 70% เอทานอล 90% เอทานอล 95% เอทานอลและนอร์มัลบิวทานอล จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltration) ด้วยพาราฟลาสต์และฝังเนื้อเยื่อในพาราฟลาสต์ (embedding) นำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อแบบโรตารี (rotary microtome) ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin solution) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 14) ภายหลังนำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase โดยนำสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อมาละลายเอพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene (deparaffination) และผ่านกระบวนการเติมน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ ด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่างๆ และนอร์มัลบิวทานอล ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอर्मาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่นและ PBS จากนั้น block ด้วย P_1^+ (calf bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 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 haematoxylin และ eosin Y (H & E) ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวร โดยหยดด้วย permount และปิดทับด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยบริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 15)

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ *MNV* ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ชั้นนำมาโคลนซ้ำ (reclone) ด้วยวิธี limited dilution (Eshhar, 1985: 1-42) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมามีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวและทดสอบด้วยวิธี dot blotting จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ และเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป และทำการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้



ภาพประกอบ 14 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการวิเคราะห์ Immunohistochemistry (IHC)

(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000: 27-34)



ภาพประกอบ 15 แผนผังกระบวนการย้อมโดยวิธี Immunohistochemistry
(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000: 27-34)

6. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการโคลนซ้ำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA จำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ *M/NV* และยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry ดังต่อไปนี้

6.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

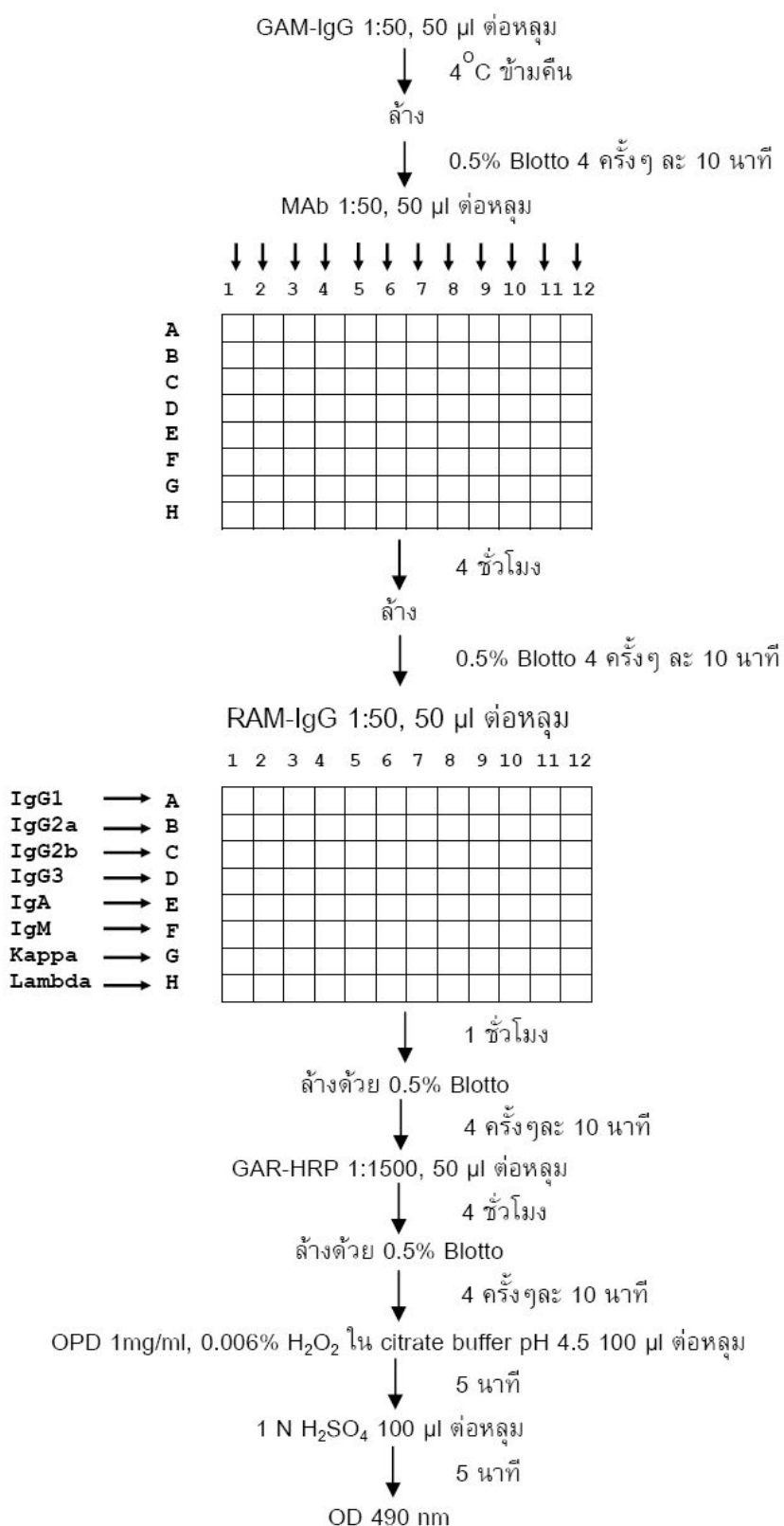
จากวิธีของ อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล (2548: 24) ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *M/NV* ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในหลุมต่างๆ ของ ELISA microtiter plate (ภาพประกอบ 16) จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นเติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N H_2SO_4 ลงในทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

MAbs <i>MrNV</i>	1	2	3	4	5
1	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5
2		2+2	2+3	2+4	2+5
3			3+3	3+4	3+5
4				4+4	4+5
5					5+5

ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

6.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID kit (HRP) ดังนี้ ทำการตรึง goat anti-Mouse Ig heavy and light chain specific antibody (GAM-H+L) ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ (1-12) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว (A-H) จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 แล้วเติม goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1:1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 4 ครั้งๆ 10 นาที และผ่านกระบวนการ immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของการตรวจสอบอิพิโทป (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
(ดัดแปลงจาก Winotaphan; et al. 2005: 189-198)

6.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting

ทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV (อารีรัตน์ คุณานพรัตน์. 2553), PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), XSV และ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) โดยนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:100 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase จากนั้นตรวจดูปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IMNV, PemoNPV, PstDNV, TSV, WSSV, XSV และ YHV โดยสามารถสังเกตเห็นด้วยตาเปล่า

6.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry

ทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อ PmDNV, PstDNV, TSV, WSSV, และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยวิธี immunohistochemistry เช่นเดียวกับที่ใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *MnNV* จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาบริเวณที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PmDNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85–89), PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) และ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก

6.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* และสารสกัดจากเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MnNV* ตามธรรมชาติมาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:100 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูระดับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* และสารสกัดจากเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MnNV* ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

6.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *MnV* จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ

นำสารสกัดจากเนื้อเยื่อรกัมกรามที่ติดเชื้อ *MnV* ตามธรรมชาติมาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting ในข้อ 6.5 และนำตัวอย่างเดียวกันมาสกัด RNA โดยใช้ชุด high pure viral nucleic acid kit (Roche Molecular Biochemicals) ตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือ ทำการเจือจาง 10 fold serial dilution ด้วยสารสกัด RNA จากกึ่งกัมกรามปกติ นำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบด้วยวิธี RT-PCR เช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1 เปรียบเทียบระดับความเจือจางสูงสุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting และวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้

บทที่ 4

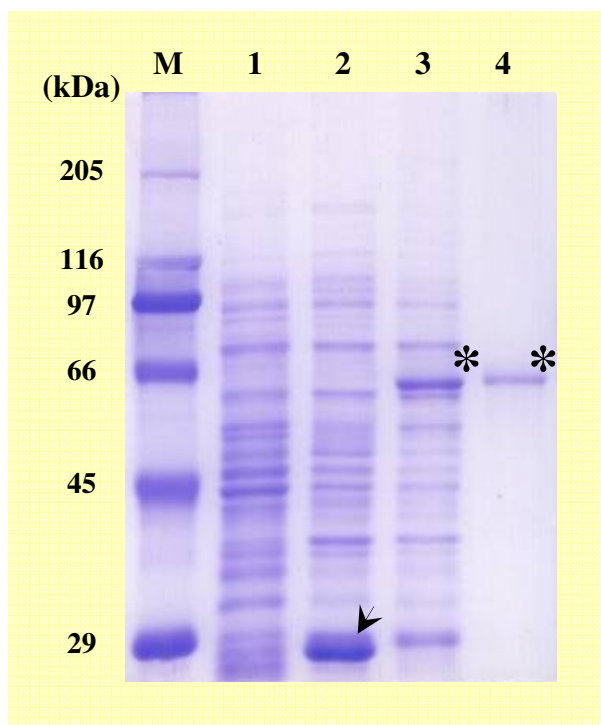
ผลการทดลอง

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV*

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* เริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* (*MrNV*-pGEX) โดยใช้ 1 mM IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ T7 promoter จากนั้นเก็บเซลล์ของแบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง และวิเคราะห์ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนโดยแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ซึ่งมีขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 18 แถวที่ 3) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ที่ได้จะมีโปรตีน GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N โดยที่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่พบโปรตีนดังกล่าว (ภาพประกอบ 18 แถวที่ 1) ส่วนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 จะมีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 18 แถวที่ 2)

การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ให้บริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* มาแยกด้วย 10% SDS-PAGE แล้วแช่เจล ใน 0.3 M KCl จะพบแถบโปรตีนเป็นสีขาวขุ่น จากนั้นตัดแถบเจลที่เป็นตำแหน่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตัน นำไปแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis ชะโปรตีนออกจากเจล (elute) ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ ประมาณ 8 ชั่วโมง ใน Transblot apparatus (BioRad) และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น เมื่อทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง Speed-Vac (Savant) นำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ซึ่งมีขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 18 แถวที่ 4)



ภาพประกอบ 18 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* โดยนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE แล้วย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250

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

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

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด *MnNV*-pGEX

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* ที่ทำให้บริสุทธิ์

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

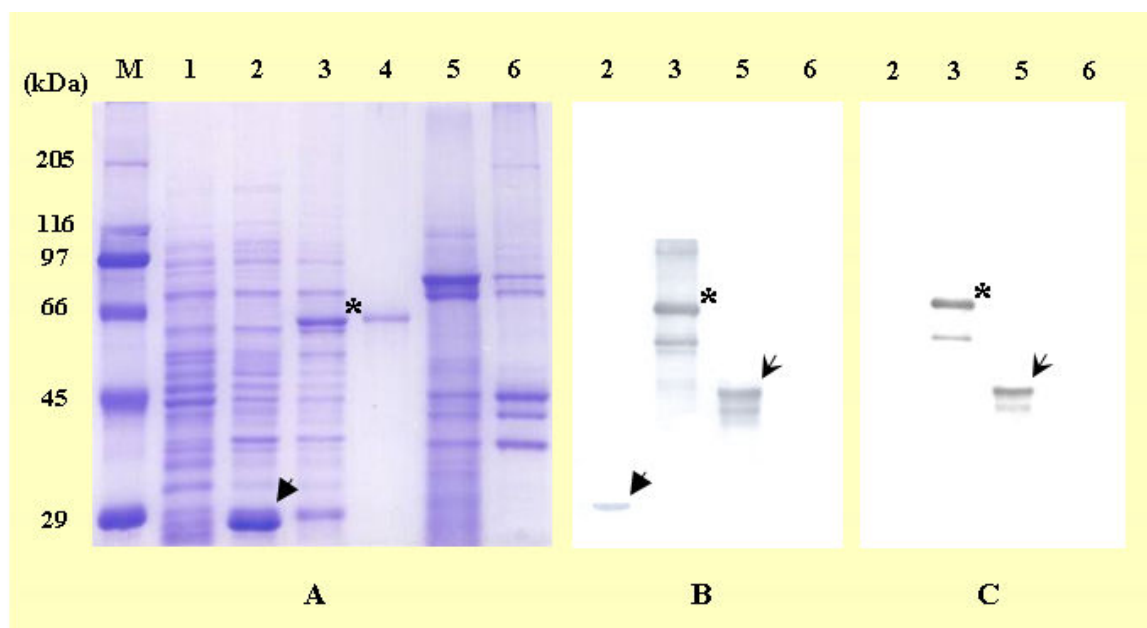
➤ คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

* คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* ขนาด 64 กิโลดาลตัน

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *MrNV*

จากการนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* (GST-*MrNV*) ที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว โดยฉีดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ที่บริสุทธิ์ปริมาณ 20 ไมโครกรัม/ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ได้ทุกตัวในระดับที่แตกต่างกัน โดยแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* และสามารถจับกับโปรตีนขนาดเล็กกว่าแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน คาดว่าอาจเกิดจากการสลายของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในระหว่างการเตรียม โดยได้เลือกหนูตัวที่สามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนและสารสกัดเนื้อเยื่อของกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MrNV* ตามธรรมชาติ ด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 19-B) และต่อเชื้อ *MrNV* ด้วยวิธี Immunohistochemistry ที่ดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *MrNV* โดยวิธี dot blotting และวิธี Western blotting พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *MrNV* ได้จำนวน 5 โคลน ดังนี้ *MrNV*-2, *MrNV*-7, *MrNV*-9, *MrNV*-11, และ *MrNV*-12 (ตาราง 5) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับแคปซิดโปรตีนขนาด 43 กิโลดาลตันของ *MrNV* ที่ได้จากสารสกัดเนื้อเยื่อกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 19 แถวที่ 5) และวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 20)

สำหรับการตรวจเชื้อ *MrNV* ในกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับเชื้อ *MrNV* บริเวณไซโทพลาซึมของเซลล์กล้ามเนื้อลาย เหงือก เซลล์ประสาท และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ (ภาพประกอบ 21) โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ในเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MrNV*-12 สามารถจับกับเชื้อ *MrNV* ได้ชัดเจนที่สุด ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MrNV*-2 สามารถจับได้ต่ำกว่าเล็กน้อย และโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MrNV*-7, *MrNV*-9, *MrNV*-11 สามารถจับกับเชื้อ *MrNV* ได้แต่ไม่ดีเท่า *MrNV*-2 (ตาราง 5)



ภาพประกอบ 19 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้จากหนูขาวและโมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B-C) โดยแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE แล้วย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เจลส่วนหนึ่งนำมาทำ Western blotting โดยทดสอบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับแอนติบอดีที่เจือปนก่อน (preabsorption) ด้วย lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน (B) และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-12 (C)

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

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

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด *MnNV*-pGEX

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* ที่ทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 5 สารสกัดเนื้อเยื่อของกิ้งก่ามGRAM ที่ติดเชื้อ *MnNV* ตามธรรมชาติ

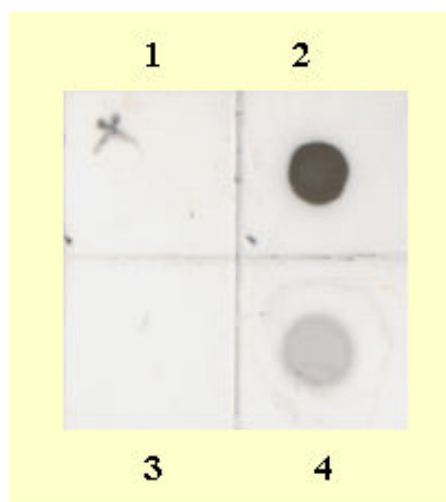
แถวที่ 6 สารสกัดเนื้อเยื่อของกิ้งก่ามGRAM ปกติ

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

▶ คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

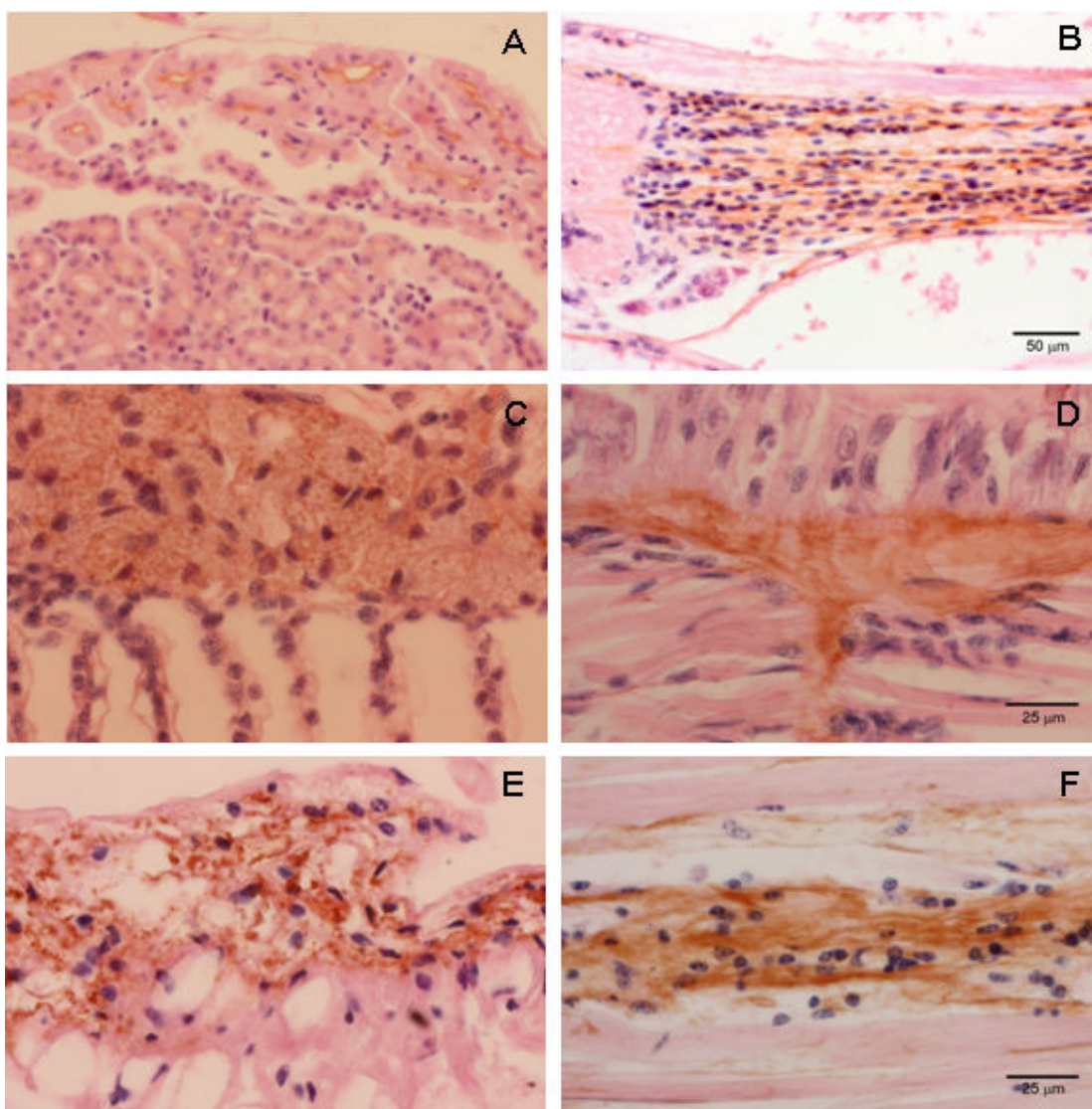
* คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* ขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตัน

➤ คือ แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* ขนาดประมาณ 43 กิโลดาลตัน



ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MrNV-12*

- (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1
- (2) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด *MrNV-pGEX*
- (3) สารสกัดเนื้อเยื่อของกิ้งก่ามกกรมปกติ
- (4) สารสกัดเนื้อเยื่อของกิ้งก่ามกกรมที่ติดเชื้อ *MrNV* ตามธรรมชาติ



ภาพประกอบ 21 การตรวจการติดเชื้อ *MNV* ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของกุ้งฝอย (A-D) และกุ้งก้ามกราม (E-F) ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี *MNV*-12 และย้อมทับด้วยสี haematoxylin และ eosin (A) antennal gland (B) ventral nerve cord (C) เหงือก (D) กล้ามเนื้อ (E) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และ (F) กล้ามเนื้อ พบ immunoreactivity บริเวณไซโทพลาซึมของเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเห็นติดเป็นสีน้ำตาล

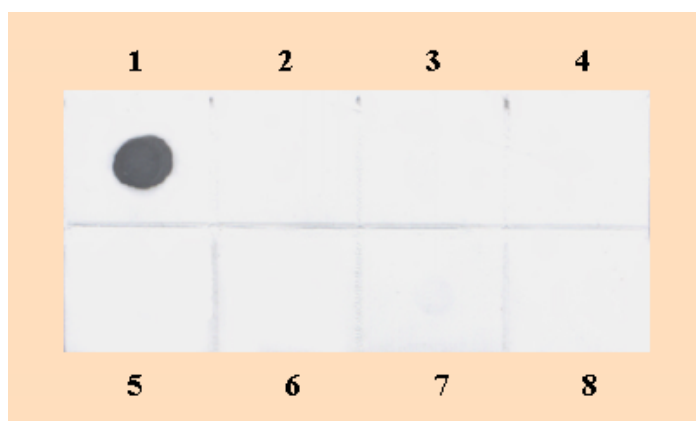
การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting และวิธี Immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV (อารีรัตน์ คุณานพรัตน์. 2553), PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), XSV และ YHV (Chaivisuthangkura ; et al. 2008: 1-8) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 22) และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเชื้อ PmDNV, PstDNV, TSV, WSSV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเมื่อทดสอบด้วยวิธี Immunohistochemistry (ภาพประกอบ 23)

เมื่อตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *MnNV* แต่ละโคลนที่ผลิตได้มาผสมรวมกันทีละคู่ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนมีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดจากการผสมแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดไม่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกัน (ภาพประกอบ 24)

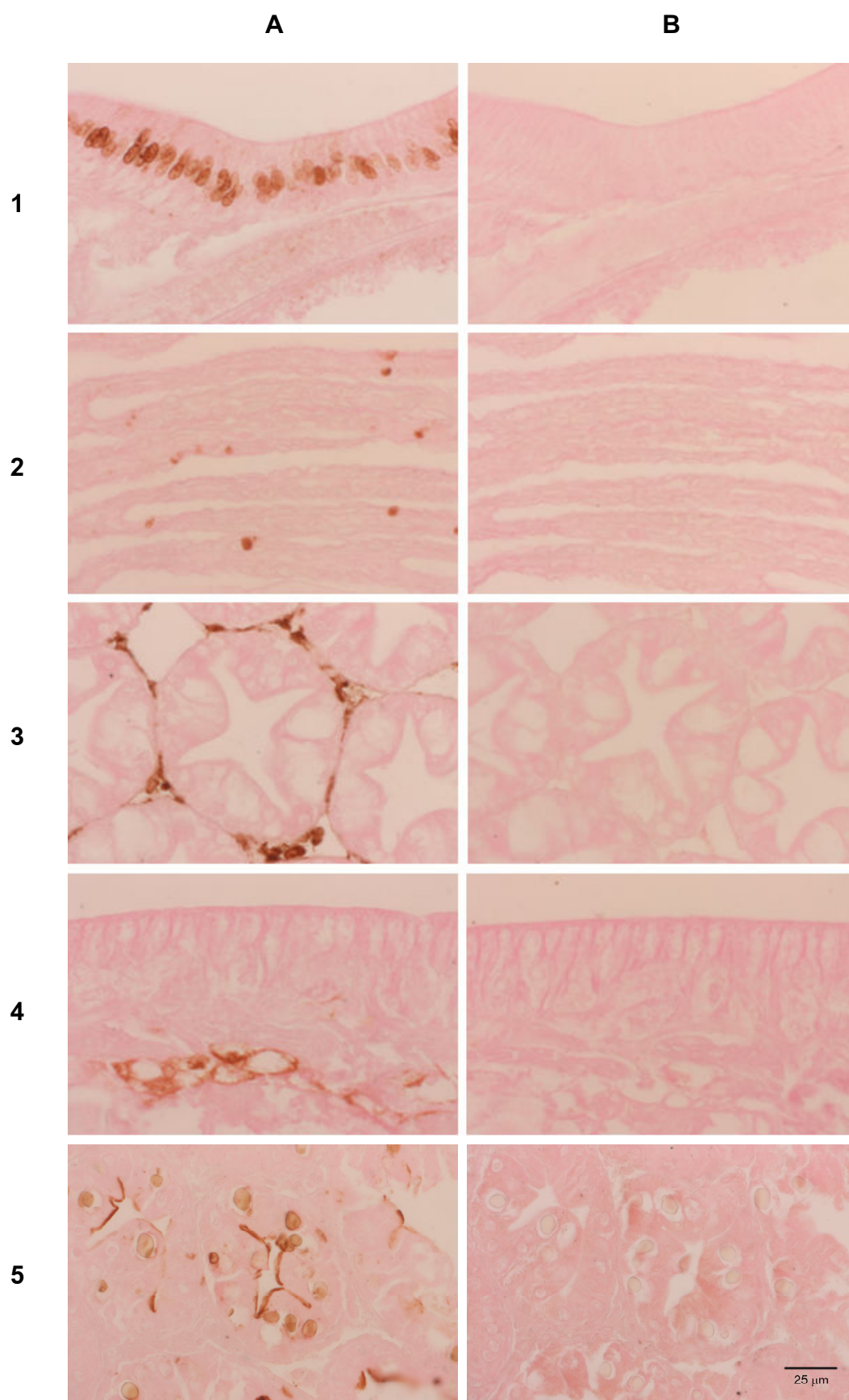
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_{2a}, IgG_{2b} และ light chain เป็น Kappa (K) (ตาราง 5)

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-2 และ *MnNV*-12 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไวสูงสุดประมาณ 625 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือประมาณ 10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-7, *MnNV*-9 และ *MnNV*-11 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไวประมาณ 1,250 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือประมาณ 20 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร (ภาพประกอบ 25) สำหรับการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *MnNV* จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-2, *MnNV*-7, *MnNV*-9 และ *MnNV*-12 สามารถตรวจพบเชื้อ *MnNV* จากสารสกัดเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ *MnNV* ตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:640 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-11 สามารถตรวจพบเชื้อ *MnNV* จากกุ้งที่ติดเชื้อ *MnNV* ตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:320 และเมื่อนำตัวอย่างกุ้งนี้ไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *MnNV* จากสารสกัด RNA ที่ทำการเจือจาง 1:10,000 เท่า ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในวิธี dot blotting มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 20 เท่า (ภาพประกอบ 26)



ภาพประกอบ 22 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV (อารีรัตน์ คุณานพรัตน์. 2553), PemoNPV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 128-132), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), XSV และ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้

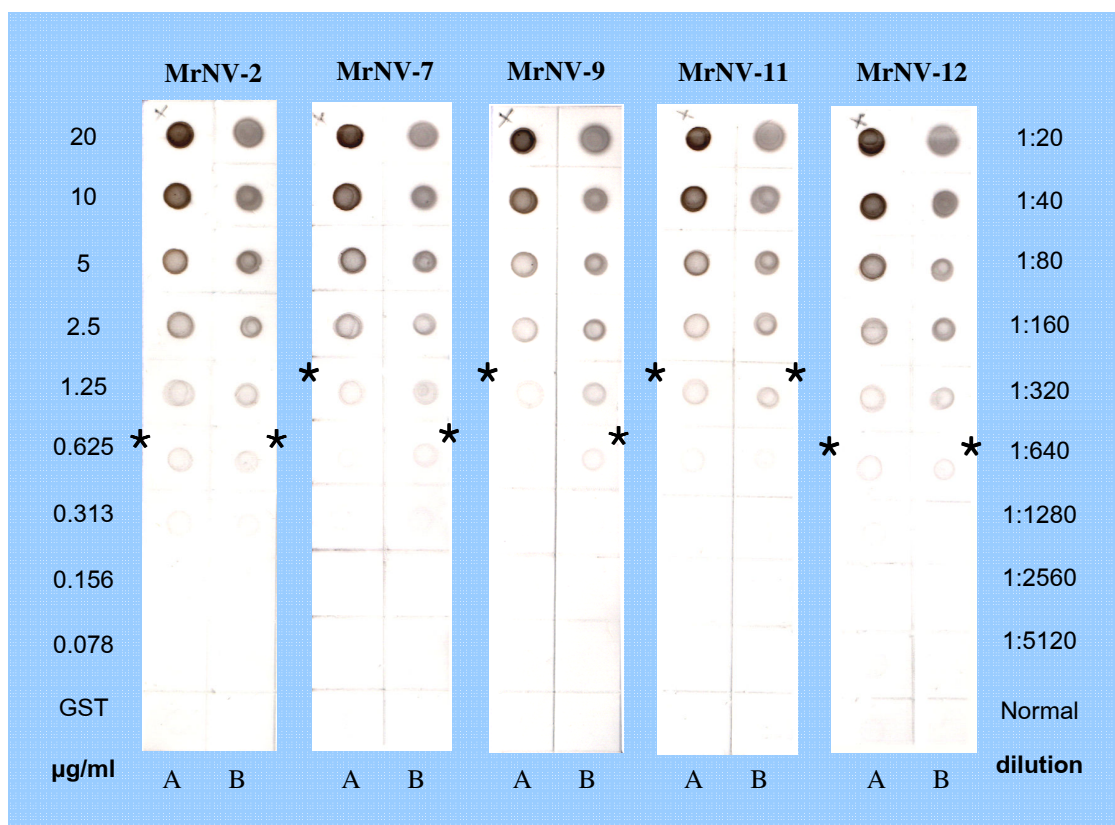
- (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ MNV
- (2) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน GST-IMNV-C
- (3) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน polyhedron (OBC) ของ PemoNPV
- (4) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ PstDNV
- (5) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน VP3 ซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของ TSV
- (6) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือก (envelop) ของ WSSV
- (7) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ XSV
- (8) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน gp116N ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ YHV



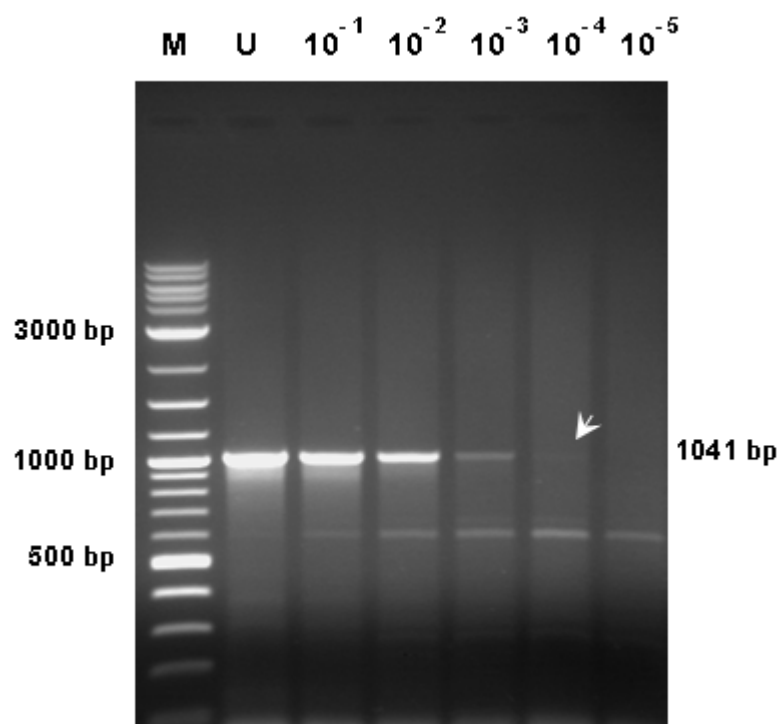
ภาพประกอบ 23 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *MnNV* กับองค์ประกอบต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ตามธรรมชาติ ได้แก่ (1) เยื่อผิวหนังที่ติดเชื้อ PstDNV, (2) เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, (3) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ YHV, (4) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดเชื้อ TSV, และ (5) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ PmDNV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ (A) คือ (1A) IH1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ PstDNV (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132), (2A) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), (3A) Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76), (4A) TSV3-666 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78) และ (5A) HPV16-9C ที่จำเพาะต่อเชื้อ PmDNV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) เทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-12 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *MnNV* (B1-5) และย้อมทับด้วยสี eosin

MAbs MrNV	MrNV-2	MrNV-7	MrNV-9	MrNV-11	MrNV-12
MrNV-2	0.547¹	0.506	0.480	0.452	0.509
MrNV-7		0.386¹	0.394	0.388	0.408
MrNV-9			0.406¹	0.410	0.415
MrNV-11				0.393¹	0.395
MrNV-12					0.435¹

ภาพประกอบ 24 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA (ตัวเลขที่เหมือนกันเหนือค่า OD คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ที่จับกับอีพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน)



ภาพประกอบ 25 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting ในการจับกับ (A) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MrNV* ความเข้มข้น 20 ถึง 0.078 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (B) สารสกัดเนื้อเยื่อของกิ้งก่ามGRAM ที่ติดเชื้อ *MrNV* ตามธรรมชาติ ซึ่งเจือจาง 1:20 ถึง 1:5120 โดยเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (*) แสดงความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้)



ภาพประกอบ 26 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ *MNV* ด้วยวิธี RT-PCR จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยทำการเจือจาง RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-5} ด้วยสารสกัด RNA จากกึ่งก้ามกรามปกติ โดยผลผลิตของ PCR มีขนาด 1041 คู่เบส (ถูกคราสแสดงค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

U คือ สารสกัดที่ได้จากเนื้อเยื่อของกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MNV* ตามธรรมชาติ

ตาราง 5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *MnNV* ที่ผลิตได้ ซึ่งทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ Immunohistochemistry (IHC)

MAbs (class)	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี dot blotting (เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	การตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี Western blotting (สารสกัดเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ- กล้ามเนื้อที่ติดเชื้อ <i>MnNV</i>)	IHC	ปฏิกิริยาข้ามกับ <i>IMNV</i> , <i>PmDNV</i> , <i>PemoNPV</i> , <i>TSV</i> , <i>PstDNV</i> , <i>WSSV</i> , <i>XSV</i> และ <i>YHV</i>
<i>MnNV</i> -2 <i>IgG</i> _{2a}	10	+++	++	-
<i>MnNV</i> -7, 9, 11 <i>IgG</i> _{2a}	20	++	+	-
<i>MnNV</i> -12 <i>IgG</i> _{2b}	10	+++	+++	-

หมายเหตุ - โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่แสดงปฏิกิริยา
 + โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้เล็กน้อย
 ++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจน
 +++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจนมาก

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการกระตุ้นการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของ *MnNV* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 พบโปรตีนที่มีขนาด 64 กิโลดาลตัน และสามารถทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ โดยพบแถบของโปรตีนที่คาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาฉีดให้หนูขาว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนได้ทุกตัว เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ *MnNV* ในกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี immunohistochemistry จึงเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดตามผลผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 5 โคลน ดังนี้ *MnNV*-2, *MnNV*-7, *MnNV*-9, *MnNV*-11, และ *MnNV*-12 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_{2a}, IgG_{2b} และ light chain เป็น Kappa (K) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับกึ่งที่ติดเชื้อ *MnNV* ตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting และสามารถจับกับแคปซิดโปรตีนของเชื้อ *MnNV* ขนาด 43 กิโลดาลตัน ได้ด้วยวิธี Western blotting โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IMNV, PemoNPV, PstDNV, TSV, WSSV, XSV และ YHV เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting สำหรับการตรวจเชื้อ *MnNV* ในเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับเชื้อ *MnNV* บริเวณไซโทพลาซึมในเส้นประสาท กล้ามเนื้อลาย เหนือก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-12 สามารถจับกับเชื้อ *MnNV* ได้ชัดเจนที่สุด โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อกึ่งปกติและต่อเชื้อ PmDNV, PstDNV, TSV, WSSV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ดี ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับวิธี *in situ* hybridization ซึ่งต้องใช้ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *MnNV* (Wang; et al. 2008: 415-422)

จากการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนมีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน และจากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *MnNV* โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnNV*-2 และ *MnNV*-12 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไวสูงสุดประมาณ 625 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือประมาณ 625 พิโคกรัม/จุล (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร) ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อเชื้อ *MnNV* พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ระดับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากสารสกัดเนื้อเยื่อกึ่งที่ติดเชื้อโดยวิธี indirect sandwich ELISA (Romestand; & Bonami. 2003: 71-73) และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *MnNV* บริสุทธิ์ได้ที่ระดับ 0.98 นาโนกรัม โดยวิธี

triple antibody sandwich ELISA (Qian; et al. 2006: 1144-1150) จากการเปรียบเทียบความไวของทั้ง 3 วิธี พบว่าไม่สามารถทำได้เนื่องจากชนิดของแอนติเจนที่ใช้มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีความไวใกล้เคียงกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ในกุ้ง เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV พบว่าสามารถใช้ตรวจโปรตีน VP19 ได้ที่ปริมาณ 70-280 พิโคกรัม/จุด (Chaivisuthangkura; et al. 2010: 583-590) และโปรตีน VP28 ได้ที่ปริมาณ 500 พิโคกรัม/จุด (Anil; et al. 2002: 67-75) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV พบว่าสามารถใช้ตรวจโปรตีน VP3 ได้ที่ปริมาณ 400-800 พิโคกรัม/จุด (Longyant; et al. 2008: 75-81) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PstDNV พบว่าสามารถใช้ตรวจโปรตีน GST-CP3 ได้ที่ปริมาณ 300 พิโคกรัม/จุด (Sithigorngul; et al. 2009: 126-132) สำหรับการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *MnV* จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnV*-2, *MnV*-7, *MnV*-9 และ *MnV*-12 สามารถตรวจพบเชื้อ *MnV* จากกุ้งที่ติดเชื้อ *MnV* ตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:640 และเมื่อนำตัวอย่างกุ้งนี้ไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *MnV* จากสารสกัด RNA ที่ทำการเจือจาง 1:10,000 เท่า ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในวิธี dot blotting มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 20 เท่า

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของเชื้อ *MnV* เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามปริมาณที่ต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งที่ติดเชื้อ และช่วยลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ในเนื้อเยื่อกุ้ง โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *MnV* จึงสามารถนำไปใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อ *MnV* ในกุ้งด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry ได้

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *MnV*-12 ซึ่งมีความไวสูงสุดในการตรวจหาเชื้อ *MnV* จากตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry นั้นอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสอย่างง่าย เช่น strip test เช่นเดียวกับชุดตรวจเชื้อ WSSV (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106), *Vibrio harveyi* (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) และ YHV (Sithigorngul; et al. 2007: 193-199) ด้วยวิธี sandwich ELISA โดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่ต่างจาก *MnV*-12 เพิ่มเติม จากผลของชุดตรวจเชื้อ WSSV ที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28 เชื่อมกับ colloidal gold เป็นแอนติบอดีที่สามารถตรวจการติดเชื้อ WSSV ได้อย่างจำเพาะ โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อสูงกว่าการใช้วิธี dot blotting 4 เท่า แต่ยังคงมีความไวต่ำกว่าวิธี PCR อย่างไรก็ตามชุดตรวจดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวได้ (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106) ดังนั้นชุดตรวจไวรัสอย่างง่ายสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับการใช้วิธีทางวิทยามุมักกัน เช่น dot blotting หรือ Western blotting เนื่องจากชุดตรวจมีความจำเพาะ

ใช้งานง่ายและมีความรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 15 นาที (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียที่เลี้ยงในฟาร์มกุ้งได้อย่างทันท่วงที จึงคาดหวังว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของเชื้อ *MNV* ที่ผลิตได้นี้จะสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสแบบง่ายเพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จักพงษ์ นีละมนต์. (2549). ผลของไวรัส *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) และ *extra small virus* (XSV) ในแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อคุณภาพลูกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- ชลอ ลิมสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทร์รัชกุล. (2547). อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: บริษัท เมจิค แพปบลิคชั่น จำกัด.
- ชูชาติ ชัยรัตน์; และ ประวิทย์ อินทรโชติ. (2515). การศึกษาอาหารในกระเพาะของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) ในทะเลสาบสงขลา. รายงานประจำปี 2515. กรุงเทพฯ: สถานีประมงสงขลา กรมประมง.
- ชัยวุฒิ สุตทองคง. (2550). การจำแนกไวรัสที่เป็นสาเหตุการตายของลูกกุ้งก้าม (*Macrobrachium rosenbergii*). สมุทสาคร: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร กรมประมง. 293-301
- ทิตยา ศรีปรีนทร์; และ ฐิตียา ลอยแก้ว. (2550). การโคลนและการแสดงออกของยีนแคปซิดโปรตีนของ *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) ในกุ้งก้ามกราม. ปัญหาพิเศษ วท.บ. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ธีรพันธุ์ ภูคาสวรรค์. (2523). บทบรรณาธิการกุ้งก้ามกราม. วารสารการประมง. 33: 511-518.
- นิติ ชูเชิด; และคนอื่นๆ. (2547). รายงานการวิจัยการศึกษาความสัมพันธ์คุณภาพน้ำ การเกิดโรค และอัตราการรอดในการอนุบาลกุ้งก้ามกรามสายพันธุ์ที่ปรับปรุงแล้ว. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 65-81
- บรรจง เทียนสงรัสมิ. (2535). หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไพโรจน์ พรหมานนท์; และ ทรงชัย สหวัชรินทร์. (2512). ผลการทดลองเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่สถานีประมงทะเลสงขลา, รายงานประจำปี 2512. กรุงเทพฯ: สถานีประมง ทะเลสงขลา กรมประมง.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษากุ้งก้ามกรามเพื่อการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ.
- ยนต์ มุสิก. (2529). การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- อารีรัตน์ คุณานพรัตน์. (2553). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ infectious myonecrosis virus (IMNV) . วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- Anil, T.M.; Shankar, K.M.; Mohan, C.V. (2002) Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Diseases of Aquatic Organisms*. 51: 67-75.
- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; & Pober, J.S. (1991). Cellular and Molecular Immunology. London: W.B. Saunders Company.
- Arcier, J.M.; et al. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 38: 177-18.
- Bachere, E. (2000). Introduction shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191: 3-11.
- Bonami, J.R.; et al. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *Journal of Fish Diseases*. 28: 23–31.
- Bradford, M.M.; (1976). A rapid and sensitivity method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- 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. (2008). Preferential suppression of yellow head virus (YHV) envelope protein gp116 in shrimp that survive challenge with YHV. *Diseases of Aquatic Organisms*. 79: 1-8.

- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2010). Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein. *Aquaculture*. 299: 15–20.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer (ed), *Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine*. New York: Plenum Press.
- Flegel, T. W.; et al. (1992). Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL (eds) Diseases of 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.
- Garzon, S.; & Charpentier, G. (1992). Nodaviridae. In: Adams, J.R.; Bonami, J.R. (Eds.), *Atlas of Invertebrate Viruses*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hameed, S.A.S.; et al. (2004). Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* in India. *Aquaculture*. 238: 127–133.
- Houlthuis, L.B.; (1995). Note on Indo-West Pacific Crustacea Decapoda III to IX. *Zoologische Mededelingen*. 69: 139-151.
- Hsieh, C.Y.; et al. (2006). Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 258: 73–79.
- Hsieh, C.Y.; et al. (2006). In situ hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 29: 665–671.
- Köhler, G.; & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology*. 6: 511-519.
- Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201–220.
- Loh, P. C.; et al. (1997). Viral pathogens of the penaeid shrimp. *Advances in Virus Research*. 48: 263–312.

- Longyant S.; et al. (2008). Specific monoclonal antibodies raised against Taurasynndrome 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.
- Macrobrachium rosenbergii*. (2010). Retrived January 10, 2010, from http://www.jjphoto.dk/animal_archive/macrobrachium_rosenbergii.htm
- 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.
- Nash, G.; Chinabut, S.; and Limsuwan, C. (1987). Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man , cultured in Thailand. *Journal of Fish Diseases*. 10: 109-120.
- Network Aquaculture Centres in Asia-Pacific. (2010). Nodavirus: an Emerging Threat to Freshwater Prawn Farming. Retrived December 5, 2010, from <http://www.enaca.org/modules/news/article.php?storyid=1802>
- Owens, Leigh.; et al. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 85: 175–180.
- Pillai, D.; Bonami, J.R.; & Sri Widada, J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases*. 29: 275–283.
- Qian, D.; et al. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fish Diseases*. 26: 521–527.
- Qian, D.; et al. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*. 261: 1,144–1,150.
- Ravil, M.; et al. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by MrNV and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*. 292: 117-120.
- Romestand, B.; & Bonami, J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Journal of Fish Diseases*. 26: 71–75.

- Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of Monoclonal antibodies specific to 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.
- Shekhar, M.S.; Azad, I.S.; & Jithendran, K.P. (2006). RT-PCR and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: Indian isolate. *Aquaculture*. 252: 128-132.
- Sithigorngul, P.; et al. (2000). Development of monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42: 27-34.
- 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. (2007). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogen isolates of *Vibrio harveyi*. *Journal of Microbiology Methods*. (71): 256-264
- 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 Virological Methods*.
- Sithigorngul, W.; et al. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 72: 101-106.
- Sithigorngul, W.; et al. (2007). A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection. *Journal of Virological methods*. 72: 193-199.
- Snieszko, S.F., (1973). Disease of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. Janon, London, 55-56.
- Sommerset, I.; & Nerland (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 58: 117-125
- Sudhakaran, R.; Parameswaran, V.; & Sahul Hameed, A.S. (2007). In vitro replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in C6/36 cell line. *Journal of Virological Methods*. 146: 112–118.
- Sudhakaran, R.; et al. (2007). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases*. 30: 27-35

- Sudhakaran, R.; et al. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 79: 141–145.
- Tonguthai, K. (1995). Diseases of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. The Aquat. Anim. Health Res. Inst. Newsletter. 42: 1–4.
- Tung, C.W.; Wang, C.S.; & Chen, S.N. (1999). Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium rosenbergii* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), culture in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*. 22: 319-323.
- Van, Regenmortel.; et al (2000). Virus Taxonomy: *Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press.
- Wang, C. S.; et al. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*. 31: 415–422.
- Widada, S.J.; et al. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*. 26:583–590.
- Widada, S.J.; & Bonami, J.R. (2004). Characteristics of the monocistronic genome of extra small virus, a virus-like particle associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: possible candidate for a new species of satellite virus. *Journal of General Virology*. 85: 643–646.
- Winotaphan, P.; et al. (2005). Monoclonal Antibodies Specific to Haemocytes of Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 189-198.
- Yoganadhan, K.; et al. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *Journal of Fish Diseases*. 28: 1–5.
- Yoganandhan, K.; et al. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*. 69: 255–258.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

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

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 100 mM IPTG

IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

2. Buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 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	100.0	มิลลิลิตร

3. 100 mM PMSF

PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol	1.0	มิลลิลิตร

4. 0.15 M 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	1,000.00	มิลลิลิตร

5. 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

6. 1% Merthiolate

Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

7. 1 M KCl

KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

8. 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	1.1005	กรัม
NaHCO ₃	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
Penicillin G	20,000.0000	units
Streptomycin	200.0000	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0000	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
100X HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50X 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 4X Running gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

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

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

Tris	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N 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 2X Treatment buffer

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

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 12% separating gel

Monomer solution (1.1)	10.0	มิลลิลิตร
0.15 M Tris-HCl (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.1	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	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
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เข้มข้น 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	4,000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

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

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 Destain 1

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

4.2.2 Destain 2

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

5. Towbin transfer buffer pH 8.8

Tris	3.0	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	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
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

2. 1 N H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	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

3. Calf serum 10% (P₁⁺)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

4. สี Enrilich's acid hematoxylin

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

5. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นายประดิษฐ์ หวังมาน
วันเดือนปีเกิด	25 มีนาคม 2528
สถานที่เกิด	พระนครศรีอยุธยา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	1 หมู่ 10 ต. คลองตะเคียน อ. พระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา 13000
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนอิสลามศรียุทธยามูลนิธิ
พ.ศ. 2551	วท.บ. (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2553	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ