639.58
ว451

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก
เงินงบประมาณแผ่นดิน ปี 2545
เรื่อง

การพัฒนาโมโนโกลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสเอชพีวีในกุ้งกุลาดำ

Development of monoclonal antibodies for diagnosis of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Peneus monodon*

15 มิ.ย. 2547

หัวหน้าโครงการวิจัย :

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒ

ผู้ร่วมวิจัย:

รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล

ดร. ศิวาพร ลงยันต์

ดร. วิสุทธิ์ ประดิษฐ์อาชีพ

10 กันยายน 2546

h238460

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	3
สารบัญรูป	4
กิตติกรรมประกาศ	6
บทคัดย่อไทย	7
บทคัดย่ออังกฤษ	9
บทนำ	10
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยครั้งนี้	13
วัตถุประสงค์	14
ระเบียบวิธีวิจัย	15
ผลการทดลอง	22
สรุปและอธิปรายผลและข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาตรของ urografin และบัฟเฟอร์ NTE ในการเตรียม 20%-40% urografin gradient	16
ตารางที่ 2 แสดง Subtype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้	30

หน้า

รูปที่ 13 แสดงผลของ SDS-PAGE และ ผลของ Western blot hybridization ของโปรตีนโครงสร้างของ HPV ที่แยกจากกุ้งกุลาดำ 34

รูปที่ 14 Immunohistochemistry โดยใช้ mouse anti-HPV antiserum และ monoclonal antibody HPV1 35

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงภาพของกุ้งปกติและกุ้งที่ติดเชื้อ HPV	11
รูปที่ 2	ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV	11
รูปที่ 3	ภาพแสดงตับกุ้งปกติและตับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV ที่ย้อมด้วยสี H&E	12
รูปที่ 4	แสดงขั้นตอนการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี	21
รูปที่ 5	การตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV จากตับกุ้งโดย PCR	22
รูปที่ 6	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอไวรัสที่สกัดได้จากตับของกุ้งโดย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซีส	24
รูปที่ 7	การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณ ดีเอ็นgvที่สกัดได้ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซีส	26
รูปที่ 8	การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE	27
รูปที่ 9	การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE และการทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Western blot hybridization	29
รูปที่ 10	การคัดเลือกไฮบริโดม่าโดย Dot blot assay	31
รูปที่ 11	การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้ จากหนู โดยเทคนิค Western blot hybridization	32
รูปที่ 11	การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Western blot hybridization	33

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545 ขอขอบคุณเกษตรกรเจ้าของบ่อกุ้งที่ให้ตัวอย่างกุ้งแคระ เพื่อนร่วมงานและนิสิตที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างกุ้ง

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีและคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ความสนับสนุนในเรื่องสถานที่และอุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ

หัวหน้าโครงกรวิจัย

บทคัดย่อ

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัส (Hepatopancreatic parvovirus: HPV) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคกุ้งแคระ ซึ่งมีผลกระทบทำให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำของเกษตรกรลดลงและเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV เพื่อจะนำไปพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ที่ง่าย สะดวก แม่นยำและราคาถูก ในการทำวิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างตับกุ้งแคระจากบ่อต่างๆ ในจังหวัดราชบุรี ชลบุรีและฉะเชิงเทรา ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโดยพีซีอาร์ ทำการสกัดอนุภาคไวรัสจากตับกุ้งโดยเทคนิค urografin gradient ultracentrifugation แยกเอา fraction ที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30% และ 35% ซึ่งมีอนุภาคไวรัสไปวิเคราะห์หาโปรตีนโครงสร้างโดย SDS-PAGE จากนั้นนำอนุภาคไวรัสฉีดเข้าไปในหนูขาวเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ตรวจสอบโมโนโคลนอลที่ได้โดย Western blot hybridization, dot blot hybridization และ immunohistochemistry

ผลการวิเคราะห์โปรตีนของไวรัสโดย SDS-PAGE พบโปรตีนหลายแถบ โดยโปรตีนหลักมีขนาด 54 kD เมื่อนำโปรตีนเหล่านี้ไปฉีดเข้าหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถคัดเลือก hybridoma ได้จำนวน 12 โคลนที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบโดย dot blot hybridization และ immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 12 โคลนนี้สามารถจับกับโปรตีนโครงสร้างของ HPV ในสภาพธรรมชาติและถูกทำให้เสียสภาพ โดยทั้งหมดจับกับโปรตีนขนาด 97 kD ซึ่งไม่ใช่โปรตีนหลัก แต่สามารถจับกับเซลล์ของกุ้งที่มีลักษณะ hypertrophied nuclei ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความจำเพาะต่อไวรัส HPV อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ยังสามารถจับกับเซลล์ที่ยังไม่แสดงลักษณะของ hypertrophied nuclei เด่นชัด ซึ่งคาดว่าเซลล์อยู่ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ จากการวิเคราะห์ subtype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าส่วนมากเป็นชนิด

IgM มีเพียง 1 ชนิดที่เป็น IgGza ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยต่อไปเพื่อพัฒนาโมโนโคลนอลที่มีความจำเพาะและมีความเสถียรมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อจะนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ต่อไป

Abstract

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) can cause stunted growth in several penaeid shrimp including *Penaeus monodon* which reduced production for shrimp farmer and cause economic losses. In this study specific monoclonal antibody for detection of HPV infection was developed. The viral particle was isolated from hepatopancreas of *Penause monodon* by urografin gradient ultracentrifugation. Fractions 30% and 35% containing high amount of viral particles were analyzed for structural protein by SDS-PAGE. The viral particle was injected into Swiss mouse for production of monoclonal antibodies. The monoclonal antibodies obtained were characterized using Western blot hybridization, dot blot hybridization and immunohistochemistry.

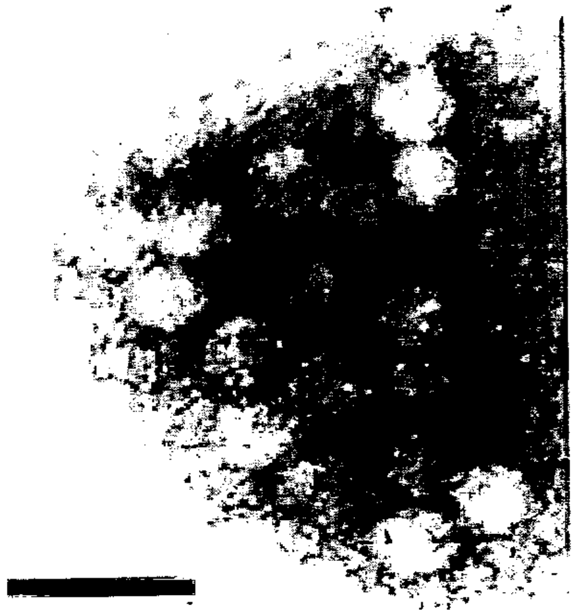
There were several protein bands after SDS-PAGE analysis. The major protein band was appeared at 54 kD. Twelve clones of hybridomas, obtained after the injection of purified vial particle into mice, gave positive results based on dot blot hybridization and immunohistochemistry screening. These 12 clones bind to both native and denatured protein at molecular weight of 97 kD which was not the major protein of viral structural proteins. These monoclonal antibodies reacted with hypertrophied nuclei in hepatopancreatic cell of shrimp showing the specifically for HPV detection. However, they also bind to some nuclei without hypertrophied nuclei as well. It is possible that these antibodies may bind to protein at the early stage of infection. Most of the antibodies were IgM subtype only one was IgG. Thus, the development of monoclonal antibody need to be further study in order to develop a fast, specific and cheap diagnostic kit.

บทนำ

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์ไวรัส (Hepatopancreatic parvovirus : HPV) เป็น ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง *Penaeids* หลาย สปีชีส์ โดยเฉพาะกุ้งเศรษฐกิจที่ สำคัญ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ และกุ้งแชบ๊วย การระบาดของไวรัสเหล่านี้พบในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ออสเตรเลีย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จีน ไต้หวัน เกาหลี อิสราเอล คูเวต และประเทศแถบอเมริกาใต้ สำหรับประเทศไทย ได้มีรายงานว่าพบการติดเชื้อไวรัส HPV ในกุ้งกุลาดำครั้งแรกทางภาคใต้ เมื่อปี 2535 โดยทั่วไปแล้วกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV ในระยะเริ่มต้นมักไม่แสดงอาการที่จำเพาะ แต่ในระยะที่มีการติดเชื้อรุนแรงกุ้งมักมีอาการโตช้าหรือแคระแกร็น (รูปที่ 1) ซึ่งเกษตรกรมักเรียกกุ้งนี้ว่า "กุ้งจิ๊กโก๋" จากการศึกษาวิจัยพบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัส HPV (% infection) มีความสัมพันธ์กับขนาดของกุ้งและความรุนแรงของโรค โดยพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอชพีวีจะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งปกติมาก (Flegel TW. *et al.*, 1999) ทำให้ไม่คุ้มค่ากับการลงทุนและเป็นการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน จึงต้องอาศัยวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ง่าย รวดเร็วและแม่นยำ เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อในขณะที่กุ้งยังไม่แสดงอาการ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งที่นำมาเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อไวรัส

ไวรัส HPV เป็นไวรัสพาร์โวไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวขนาดประมาณ 6 กิโลเบส มีรูปร่างเป็น icosahedral ที่มีขนาดประมาณ 22-24 นาโนเมตร (รูปที่ 2) การติดเชื้อมักพบที่ตับกุ้ง (hepatopancreas) ลักษณะของเซลล์ตับกุ้งที่ติดเชื้อ HPV จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่มากจนเกือบเต็มเซลล์ (Hypertrophied nuclei) ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยจากการย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H & E staining) ดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 1 แสดงภาพของกุ้งปกติและกุ้งที่ติดเชื้อ HPV



รูปที่ 2 ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV

bar = 50 nm

รูปที่ 3 ภาพแสดงตับกุ้งปกติและตับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV ที่ย้อมด้วยสี H&E

a = เซลล์ของตับกุ้งปกติ

b, c = เซลล์ของตับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV จะมีลักษณะ hypertrophied nuclei

ในการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากไวรัส อาศัยการตรวจหาไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ ลูกกุ้ง และพาหะซึ่งในปัจจุบันมักใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) เนื่องจากมีความไวสูงและสามารถตรวจสอบการติดเชื้อในขณะที่ยังไม่มีอาการ (Sukhumsirichart *et al.*, 1999 และ Belcher, C.R. and P.R.,Young., 1998, Wongteerasupaya etal., 1997, 1998, Kachanaphum *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR มีข้อจำกัด คือต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและบุคลากรต้องได้รับการฝึกฝนเป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาค่าตรวจสอบต่อหนึ่งตัวอย่างค่อนข้างแพง

ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาการตรวจทางด้านอิมมิวโนสำหรับการตรวจสอบไวรัสต่างๆ ในกุ้งขึ้น Nadala, Loh และคณะ (1997, 1998) ได้สร้างแอนติบอดีต่อไวรัสหัวเหลือง

และไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่วิธีการตรวจสอบที่ใช้ คือ Western blot analysis มีความไวต่ำและไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ ต่อมาได้พัฒนาการตรวจหาไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassay (Nadala EC Jr and PC Loh, 2000) ซึ่งทำให้การตรวจหาไวรัสทั้งสองง่ายและรวดเร็วขึ้น ต่อมา รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ (Sithikornkul *et al.*, 2000) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAbs) ต่อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ไทยได้สำเร็จ

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการพัฒนาการสร้างโมโนโคลนแอนติบอดีต่อไวรัส HPV เพื่อนำแอนติบอดีนี้ไปใช้สำหรับพัฒนาวิธีการตรวจหาไวรัสเอชพีวี ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว แม่นยำและราคาถูก ซึ่งจะทำให้เกษตรกรสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้บ่อยขึ้นและทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำมักวิใช้การตรวจโดยใช้เทคนิค PCR เนื่องจากมีความไวและสามารถตรวจในขณะกุ้งไม่มีอาการได้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง และต้องการผู้ปฏิบัติงานที่ได้รับการฝึกเป็นอย่างดี ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการตรวจทางอิมมิวโน ซึ่งทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปใช้ในการตรวจภาคสนามได้โดยมีการพัฒนาโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่างๆ ได้แก่ Taura syndrome virus (Poulos *et al.*, 1999) หัวเหลืองและ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (Sithikornkul *et al.*, 2000, Nadala *et al.*, 1997, 1998,

2000 และ Loh *et al.*, 1998) โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง ที่มีการติดเชื้อระดับต่ำจนถึงการติดเชื้อรุนแรงได้ผลเป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส HPV
2. เพื่อใช้เทคนิค dot-ELISA และ immunocytochemistry เพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัส HPV
3. เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาชุดตรวจสอบ HPV ในกุ้งกุลาดำที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว และแม่นยำ ในโครงการต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกุ้งจากบ่อที่มีกุ้งแคระและคาดว่าติดเชื้อไวรัสเอชพีวี จากจังหวัด ชลบุรีและฉะเชิงเทรา ประมาณ 700 ตัว แยกเอาตับกุ้งออกมาใส่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตับกุ้งที่แช่ในไนโตรเหลวไปเก็บในตู้เย็น -70°C เพื่อใช้ในการสกัดแยกไวรัส นอกจากนี้ทำการเก็บตับกุ้งประมาณ 20-50 ตับต่อบ่อ แช่ใน Davidson' s fixative เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบทางเนื้อเยื่อ

การตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV จากตับกุ้งโดยเทคนิค PCR

นำตับกุ้งที่แช่ใน –70°C ไปละลายน้ำแข็ง บดตับในสารละลาย 0.05 N NaOH-0.25% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ hand homogenizer นำสารละลายไปต้มเป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใส (crude lysate) ใส่หลอดทดลองใหม่ ปิเปต crude lysate ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ใน PCR mixture ซึ่งประกอบด้วย 10xPCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTP, 1 μM Primer 121F และ 276R แล้วนำไปทำ PCR ที่ตั้งสภาวะไว้ดังนี้ Pre-denaturation 94°C, 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่ 94°C, 30 วินาที, Annealing ที่ 52 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ นำ PCR product ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโตรฟอรีซิส (0.8% gel)

การสกัดไวรัสจากตับกุ้ง

ทำการสกัดเอาไวรัส HPV ออกจากตับกุ้งโดยวิธี urografin gradient ultracentrifuga-tion ตามวิธีที่เคยมีรายงานมาแล้วโดย วาสนา สุขุมศิริชาติและคณะ (1999) ดังนี้ แบ่งตับกุ้งออกมาละลายน้ำแข็งแล้วบดตับให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ NTE (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris, pH 7.4, 0.02 M EDTA) ปริมาตร 40 มล.ต่อ 80 ตับ โดยใช้ hand homogenizer จากนั้นทำการแยกเศษเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง จำนวน 2 รอบ ที่ความเร็ว 7,000 และ 13,000 รอบต่อนาที ตามลำดับ ที่ 4°C ครั้งละ 15 นาที (Sorvall RC 5 C Plus, ss 34 rotor) เก็บสารละลาย(supernatant) ใส่ในหลอด quick-seal (Sorvall tube No. 03987) นำไปปั่นที่ 140,000xg หรือ 46,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ NTE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการละลายตะกอนตลอดทั้งคืนในห้องเย็น เตรียมสารละลายของ urografin แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาตรของ urografin และบัฟเฟอร์ NTE ในการเตรียม 20%-40% urografin gradient

ความเข้มข้นของ urografin	Urografin (76%) มล.	บัฟเฟอร์ NTE มล.
40%	3.158	2.842
35%	2.763	3.237
30%	2.369	3.631
25%	1.974	4.026
20%	1.580	4.420

เตรียม urografin gradient ตั้งแต่ 20%-40% ในหลอด Sorvall Ultra Pro 80 โดยแต่ละความเข้มข้นใช้ urografin แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1.6 มล. ปล่อยทิ้งไว้ในห้องเย็นตลอดทั้งคืน เพื่อให้เกิด continuous gradient จากนั้นนำสารละลายไวรัสปริมาตร ประมาณ 1 มล. มาหยอดบน gradient แล้วนำไปปั่นโดยใช้ swinging rotor (Sorvall TH 641 rotor) ที่ความเร็ว 140,000xg หรือ 34,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที แยกเอาแต่ละ fraction ออกมาแล้วใส่ในหลอด Ultra Pro 80 ใหม่ เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ NTE นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างสารละลาย urografin ออก เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ TE

การสกัดดีเอ็นเอของไวรัส

นำสารละลายไวรัสปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ Protenase K ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 1%SDS แล้วนำไปอุ่นต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อย่อยโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดเอาโปรตีนออกจากสารละลายโดยใช้สารละลายผสมระหว่าง Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol (24:1:1) นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดจำนวน 2 ครั้ง นำสารละลายมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 1 ใน 10 ของสารละลาย 3 M NaOAc, pH 5.2 และ 2 ปริมาตรของ absolute ethanol นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนและปล่อยให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

การวิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-PAGE

นำสารละลายไวรัสปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปทำการระเหิดเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไวรัสและโปรตีน ละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 7 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลาย protein buffer 7 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบ ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% β-mercaptoethanol

การปลูกภูมิคุ้มกัน

หนู Swiss mouse 4 ตัว นำมาฉีดด้วย HPV ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการข้างต้น ประมาณ 0.5 mg/ตัว โดยครั้งแรกผสมกับ complete Freund 's adjuvant ในอัตรา 1 : 1 หลังจากนั้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วย HPV ผสมกับ incomplete Freund 's adjuvant ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บซีรัม นำมาทดสอบเนื้อเยื่อกุ้งติดเชื้อ โดย Western blot hybridization และ immunohistochemistry assay หนูตัวที่ตอบสนองดีจะถูกปลูกภูมิคุ้มกันซ้ำก่อนที่จะเริ่มทำ fusion

การผลิต hybridoma

นำหนู และแยก spleen cell นำมาหลอมรวมกับ myeloma cell โดยใช้ polyethelene glycol กระจายเซลล์ออกเลี้ยงใน 96 well microculture plate จำนวน 40 plate/fusion เลือก hybridoma clone ที่สร้าง MAb ต่อ HPV เซลล์ที่ถูกคัดเลือกนำมา reclone อีกสองครั้ง โดยวิธี limiting dilution method

การคัดเลือก hybridoma

ทำการคัดเลือก hybridoma clone ที่สร้าง MAb จำเพาะต่อ HPV ขั้นตอนแรกโดย dot blotting assay จากนั้นนำมาคัดเลือกต่อโดยวิธี Western blot hybridization และ immunohisto-chemistry

Dot blotting

ใช้ viral particle ที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วย SDS และ β-mercaptoethanal นำมาหยดบนกระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 μl/หยด อบที่ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จาก hybridoma ในแต่ละหลุม (เจือจาง 1: 20 ใน 5 % blotto = 5 % non fat dry milk 0.1 % triton X 100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 4 ช.ม. หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto นำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM–HRP; Biorad) เจือจาง 1 : 1500 เป็นเวลา 4- 8 ช.ม. จากนั้นล้างใน 0.5 % blotto และบ่มให้สารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03 % diaminoberzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เลือก hybridoma clone ที่แสดงปฏิกิริยาต่อ viral particle ของกุ้งที่ติดเชื้อ นำมาคัดเลือกต่อโดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry ก่อนนำไป reclone และ cryopreservetion สำหรับการศึกษาต่อไป

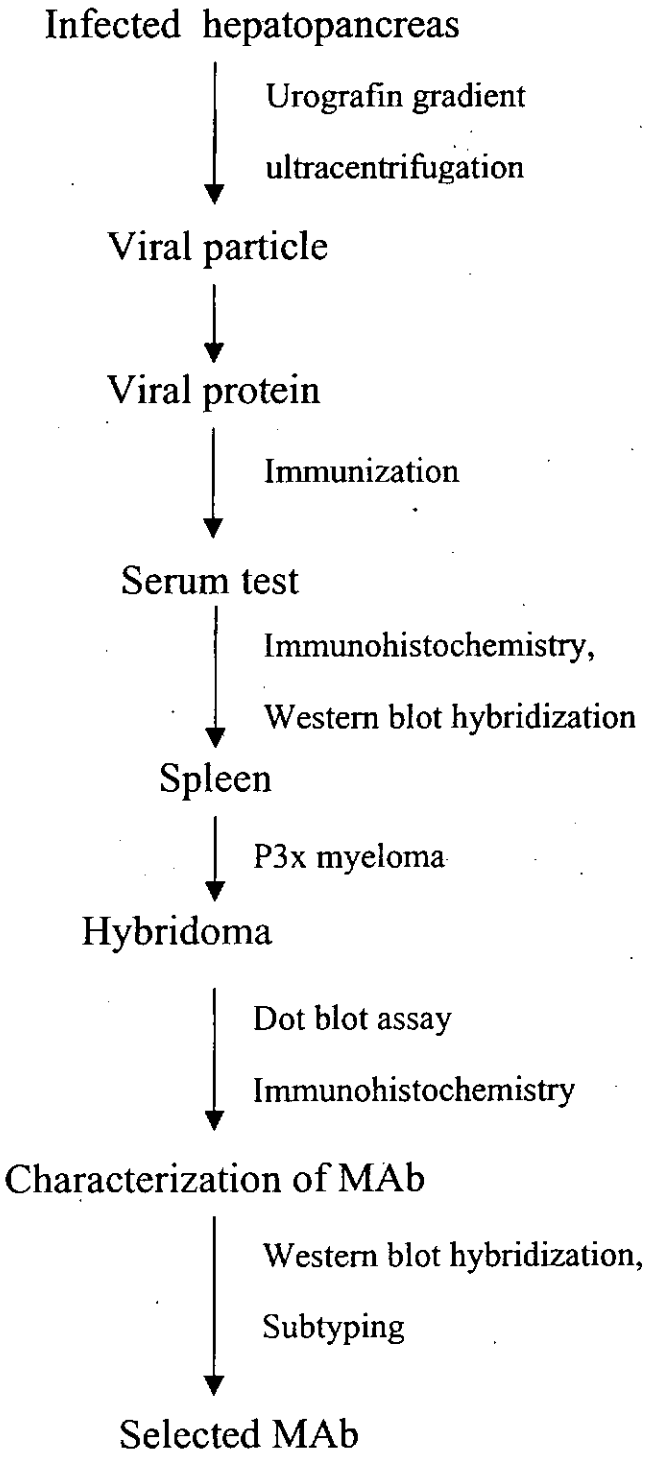
SDS–PAGE และ Western blot hybridization

นำ HPV particle ที่ผสมกับ dye แล้วมาแยกใน 10 % SDS–PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยทำอิเล็กโตรฟอริซีสที่ 30 V เป็นเวลา 6 ช.ม. ส่วนหนึ่งของเจลนำมาย้อมโปรตีนด้วย

coomassie brillant blue R–250 อีกส่วนนำมาถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่กระดาษ nitrocellulose โดยใช้ Transblot apparatus (Biorad) สำหรับทำ Western blot จากนั้นนำ nitrocellulose membrane จุ่มใน 5 % blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มใน MAb แต่ละชนิดเจือจาง 1 : 500 ใน 5 % blotto เป็นเวลา 4 ช.ม. และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot–blot เพื่อหาตำแหน่งของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

Immunohistochemistry

นำตับกุ้งที่ติดเชื้อ HPV แช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ช.ม. จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 μm ติดบนสไลด์ นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีการทำโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านลง butanol (100 %) 95 %-70 % ethylnol และน้ำ บ่มใน MAb ชนิดต่าง ๆ เจือจางประมาณ 1 : 50 เป็นเวลา 6 ช.ม. ที่ 37 °C ล้าง section ด้วย PBS บ่มใน GMP-HRP เจือจาง 1 : 1000 เป็นเวลา 6 ช.ม. และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03 % DAB, 0.006 % H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematocyalin และ eosin Y (H & E) ดึงน้ำด้วย ethyl alcohol เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็น slide ถาวรโดยใช้ permount (Sithigorngul et al., 1999) บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล



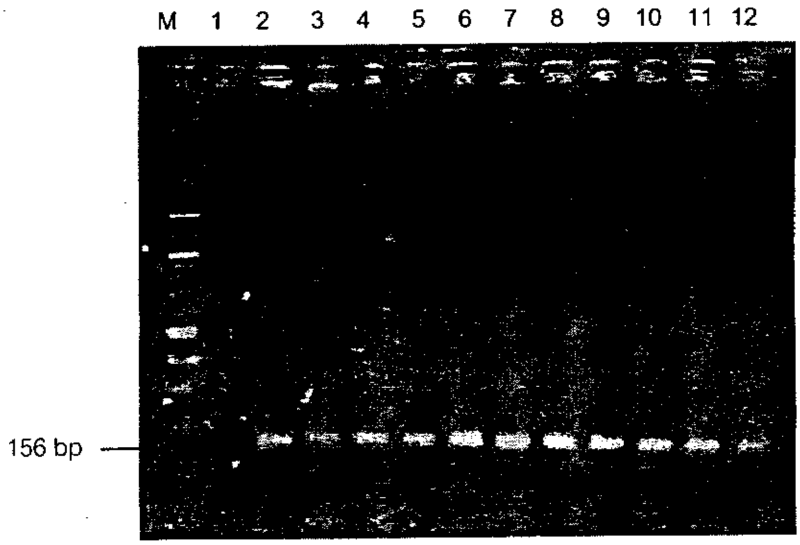
รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี

h 238460

ผลการวิจัย

การตรวจสอบการติดเชื้อจากตับกุ้งแคระโดย PCR

จากการสุ่มเอาตับของกุ้งแคระที่เก็บจากบ่อต่างๆ จากจังหวัดราชบุรี ชลบุรี และฉะเชิงเทรา มาตรวจสอบว่ามีการติดเชื้อไวรัส HPV หรือไม่ โดยเทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เท่านั้น ผลการวิเคราะห์ด้วย PCR แสดงในรูปที่ 5 ปรากฏว่าตับกุ้งที่เก็บจากบ่อต่างๆ มีการติดเชื้อไวรัส HPV ในอัตรา 55-80%



รูปที่ 5 การตรวจการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีจากตับกุ้งที่เก็บจากจังหวัดราชบุรี โดยเทคนิค PCR

แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตราฐาน

แถวที่ 1 Negative control

แถวที่ 2-11 Crude lysate ที่เตรียมจากตับกุ้ง

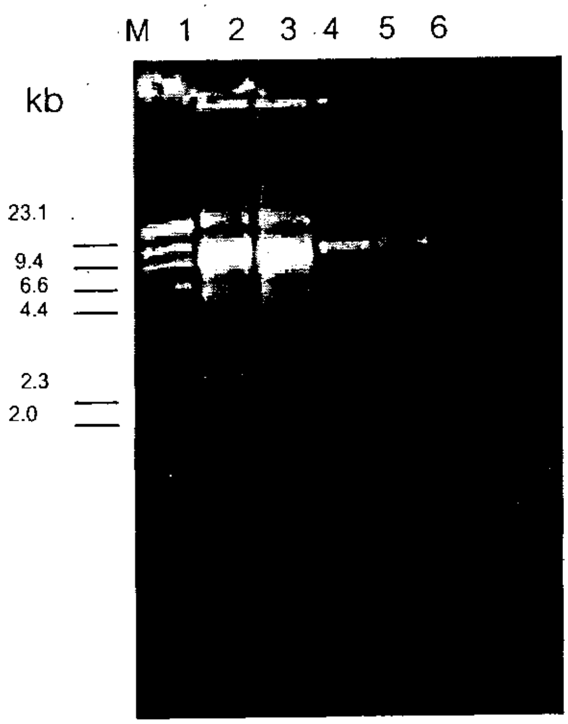
แถวที่ 12 Positive control

การสกัดดีเอ็นเอของไวรัส HPV และการวิเคราะห์

การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส

วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดย Agarose gel electrophoresis

เมื่อทำการสกัดอนุภาคไวรัส HPV ออกมาจากตับกุ้ง โดย urografin gradient ultracentrifugation และเก็บสารละลาย urografin ที่มีความเข้มข้นของ urografin ในช่วง 30%, 35% และ 40% ไปวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส โดยทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซีสแล้วพบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสมากที่สุดใน fraction ที่มีความเข้มของ urografin เท่ากับ 30% และรองลงมาคือทำ 35% ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 6.0 และ 4.2 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 6 ส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 23 กิโลเบสขึ้นไป คาดว่าเป็นของดีเอ็นเออื่น เช่น ดีเอ็นเอของกุ้ง หรือไวรัส MBV



รูปที่ 6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอไวรัสที่สกัดได้จากตับของกุ้งโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซีส

แถว M = λ-*Hind* III DNA

แถวที่ 1-2 = ดีเอ็นเอของไวรัสจากชั้น 30% urografin (หลอดที่ 1 และ2)

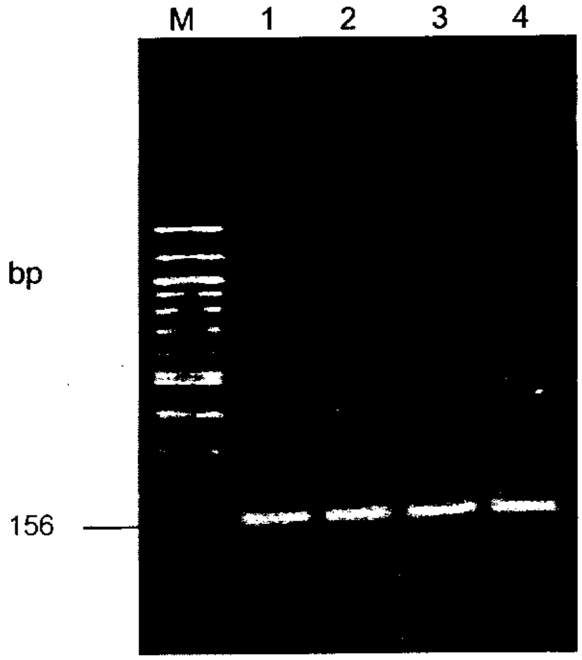
แถวที่ 3-4 = ดีเอ็นเอของไวรัสจากชั้น 35% urografin (หลอดที่ 1 และ 2)

แถวที่ 5-6 = ดีเอ็นเอของไวรัสที่สกัดจากชั้น 40% urografin (หลอดที่ 1 และ 2)

ผลการวิเคราะห์ปรากฏว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาด 6.6 และ 4.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นลักษณะของดีเอ็นเอของไวรัส HPV แต่อย่างไรก็ตามมีการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นๆ ด้วยสังเกตุจากแถบดีเอ็นเอขนาด 23.1 และ 2.2 กิโลเบส

การตรวจดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ทำการตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV จากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV คือ ไพรเมอร์ 156F (5'...GCA CTT ATC ACT GTC TCT AC ...3') และ 276R (5'...GTG AAC TTT GTA AAT ACC TTG...3') เมื่อนำผลผลิต PCR ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซีสแล้วปรากกฎว่าให้ผลผลิต PCR ขนาด 156 เบส ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เท่านั้น (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่า การสกัดอนุภาคไวรัสโดยเทคนิค urografin gradient ultracentrifugation สามารถสกัดได้ไวรัส HPV ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อได้



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นที่สกัดได้ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซีส (1% gel)

แถว M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder DNA)

แถวที่ 1 PCR product ของดีเอ็นเอไวรัสจากชั้น 30% urografin

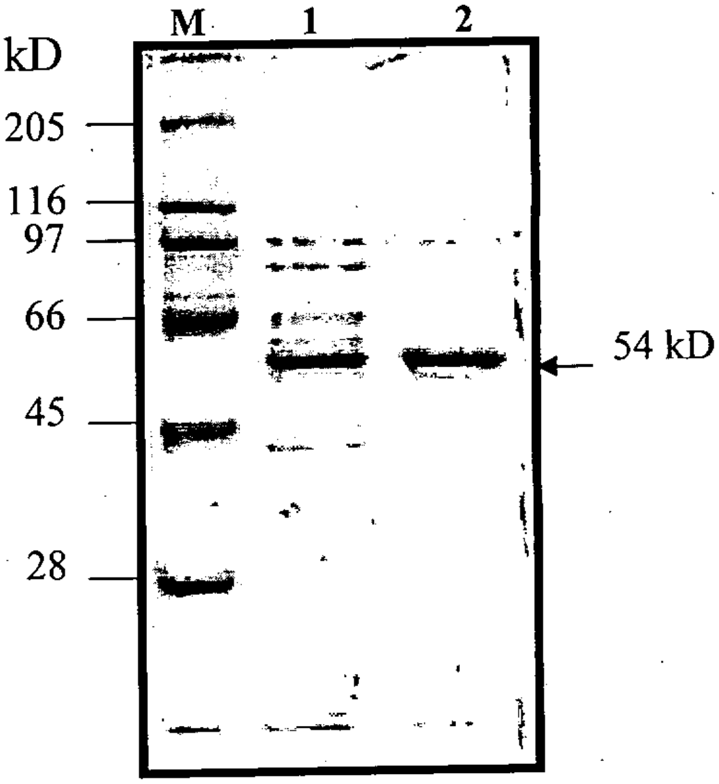
แถวที่ 2 PCR product ของดีเอ็นเอไวรัสจากชั้น 35% urografin

แถวที่ 3 PCR product จากดีเอ็นเอขนาด 4.2 kb

แถวที่ 4 PCR product จากดีเอ็นเอขนาด 6.0 kb

การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง ของไวรัส โดย SDS-PAGE

จากการวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง (capsid protein) ของไอนุภาคไวรัสที่เตรียมได้ โดย SDS-PAGE ผลการวิเคราะห์ในรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่ามีแถบโปรตีนหลายแถบ แต่โปรตีนหลักของไว้ส HPV มีขนาดประมาณ 54 kDa



รูปที่ 8 การวิเคราะห์โครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE

แถวที่ 1 = Molecular mass markers

แถวที่ 2 = โปรตีนของ HPV จาก fraction 30% urografin

แถวที่ 3 = โปรตีนของ HPV จาก fraction 35% urografin

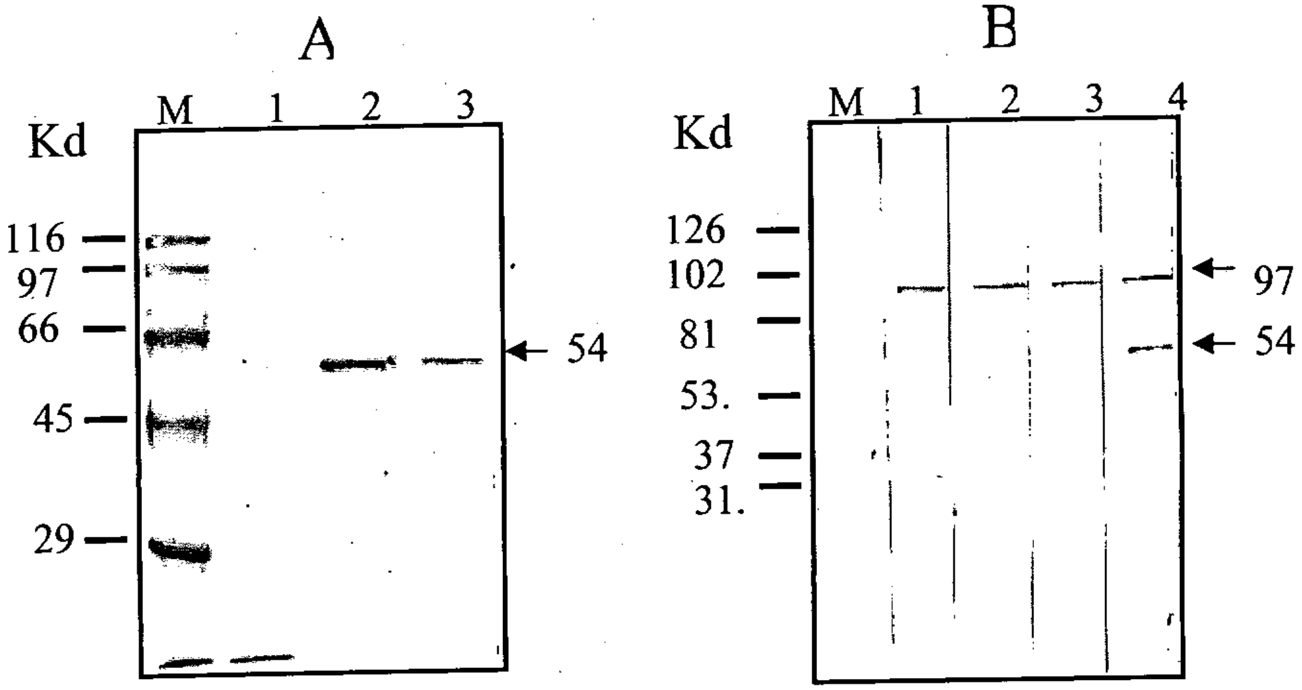
การทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV

หลังจากฉีดอนุภาคไวรัสฉีด เข้าไปในหนูขาว 4 ตัว ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง แล้วเจาะเอาเลือดมาแยกซีรั่ม แล้วนำไปทดสอบการตอบสนองการสร้างแอนติบอดี (Ab) ต่อไวรัส HPV โดยวิธี Western blot hybridization ปรากฏว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาด 97, 54 และ 52 กิโลดาร์ตัน (Kd) ตามลำดับ โดยแอนติบอดี ที่สร้างจากหนูตัวที่ 4 สามารถจับกับโปรตีนของไวรัส ขนาด 54 Kd ได้ดีที่สุด (ดูรูปที่ 9)

การทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV

เมื่อฉีดอนุภาคไวรัสเข้าไปในหนูขาวทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้งแล้วเจาะเอาเลือดไปแยกซีรั่ม แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีนของไวรัส HPV โดยเทคนิค Immunohisto-chemistry และ Western blot หนูตัวที่ 4 ที่ตอบสนองต่อโปรตีนขนาด 54 Kd มากที่สุด ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการ fusion เซลล์ของตับอ่อน เข้ากับ P3X myeloma cell จากการทดลองสามารถคัดเลือก hybridoma ได้ 12 โคลน ซึ่งจับกับโปรตีนของของไวรัส HPV ได้ทั้งในสภาพธรรมชาติหรือสภาพที่ถูกทำให้เสียสภาพ โดย Dot blotting assay (รูปที่ 10)

จากการวิเคราะห์โดย Western blot hybridization พบว่า แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเฉพาะโปรตีนขนาด 97 kD ซึ่งไม่ใช่โปรตีนหลัก (รูปที่ 11) จากการ subtype ของโมโนโคลนอล-แอนติบอดี ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgM มีเพียงชนิดเดียวที่เป็น IgG2a (ตารางที่ 2) โดยแอนติบอดีทั้งหมดจับกับโปรตีนขนาด 97 kD เท่านั้น (รูปที่ 12)



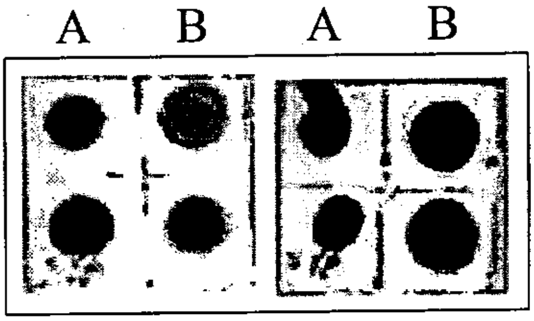
รูปที่ 9 การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE และการทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิค Western blot hybridization

(A) แสดงผลของ SDS-PAGE ของโปรตีนโครงสร้าง (Structural protein) ของไวรัสHPV (fraction 35%) จากจังหวัดชลบุรี (แถวที่ 1) และจังหวัดฉะเชิงเทรา (แถวที่ 2 และ 3)

(B) ผลการทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูตัวที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยเทคนิค Western blot hybridization โดยทำการเจือจางแอนติบอดี เท่ากับ 1 : 5,000

ตารางที่ 2 แสดง Subtype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้

ลำดับที่ 1	รหัสโมโนโคลนอลแอนติบอดี	Subtyping
1	HPV1	IgM
2	HPV 52	IgM
3	HPV 320	IgM
4	HPV 425	IgM
5	HPV 546	IgM
6	HPV 613	IgM
7	HPV 620	IgM
8	HPV 767	IgM
9	HPV 857	IgM
10	HPV 957	IgM
11	HPV 1675	IgM
12	HPV 2032	IgG2a

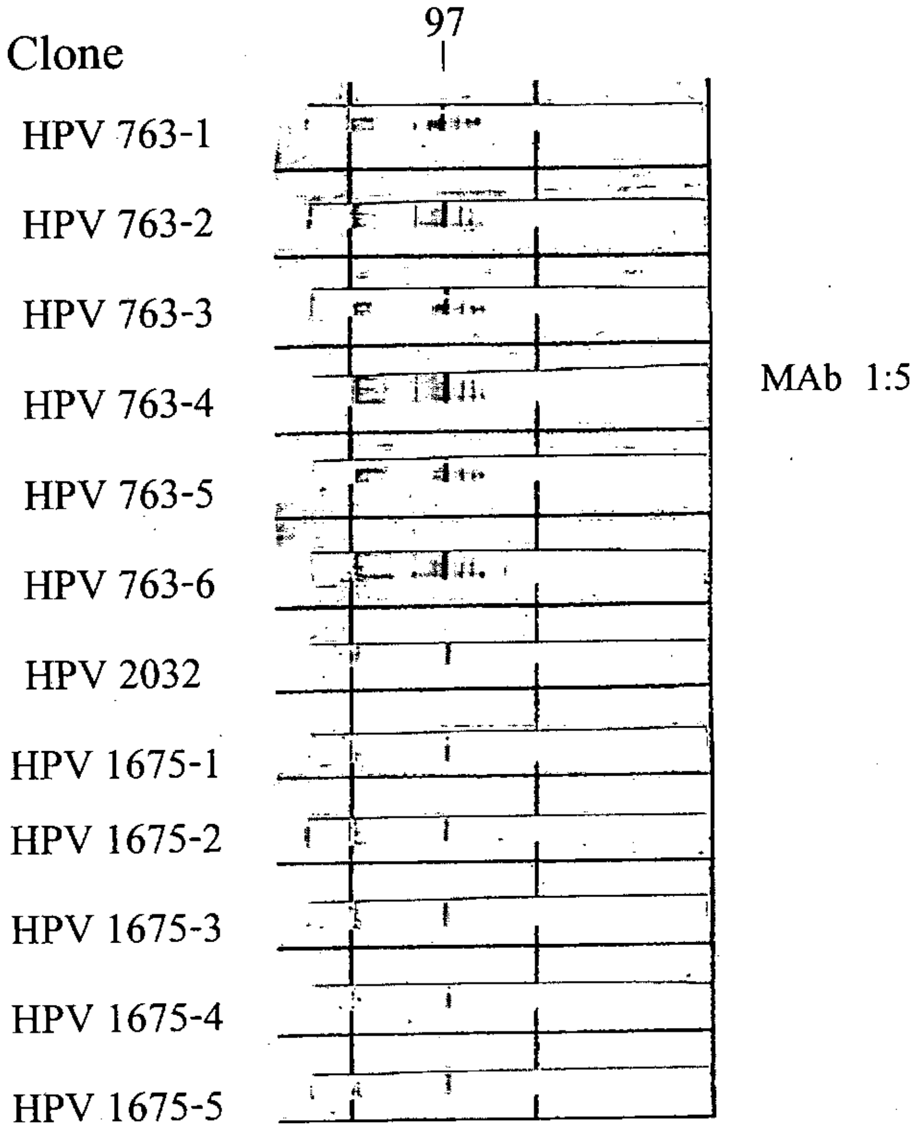


รูปที่ 10 การคัดเลือกไฮบริโดม่าโดย Dot blotting assay

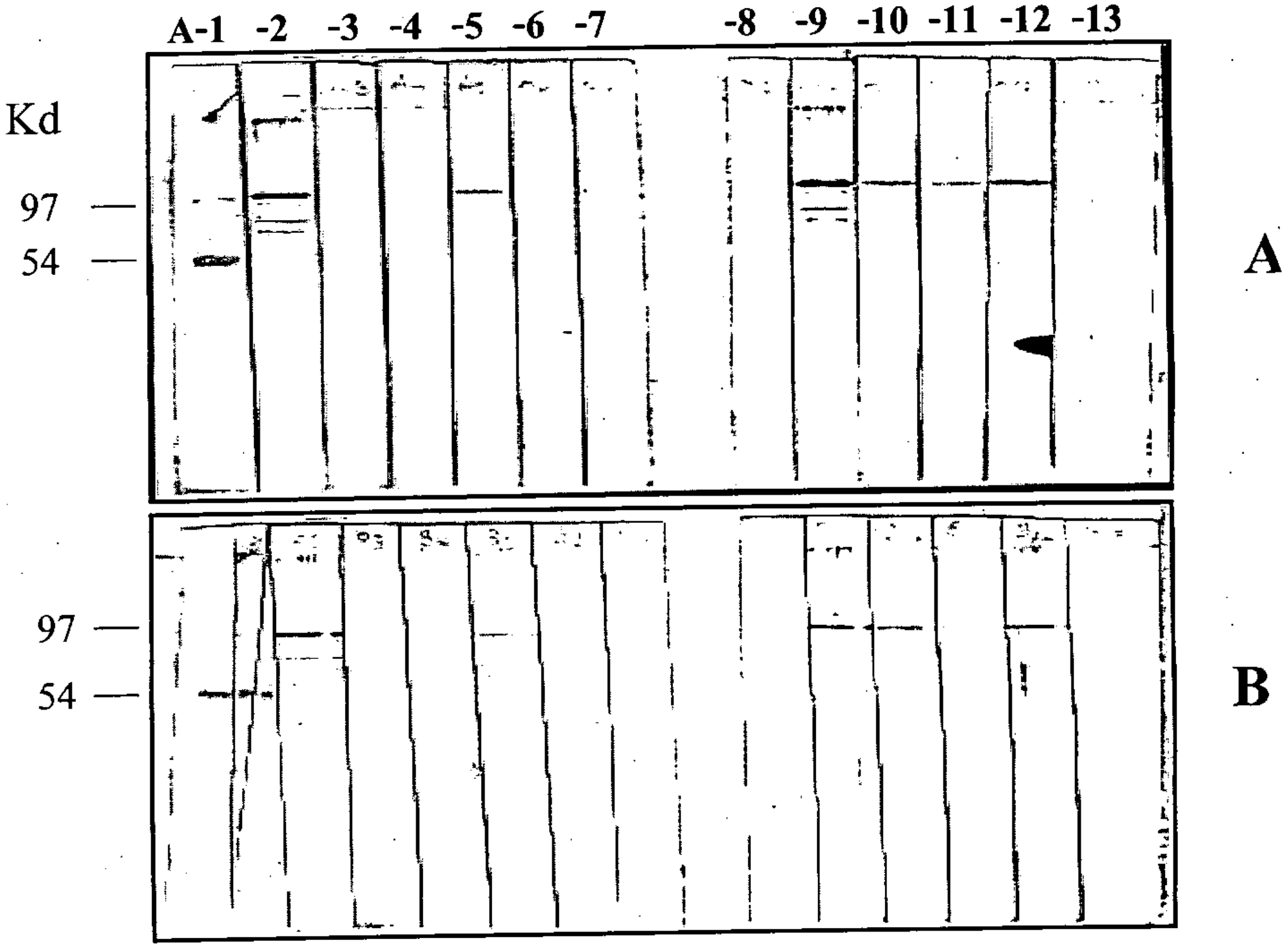
A = โปรตีนของไวรัสเมื่อทำให้เสียสภาพ

B = โปรตีนของไวรัสเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ

ได้ทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV1 และทดสอบอีกครั้งด้วย Western blot hybridization และ Immunohistochemistry ปรากฏว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV1 สามารถจับกับโปรตีนขนาด 97 kD ได้ดีที่สุด แต่ไม่จับกับโปรตีนขนาด 54 kD (รูปที่ 13) และจากผลของ Immunohistochemistry พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV1 ทำปฏิกิริยากับ inclusion bodies ที่เป็นลักษณะของการติดเชื้อไวรัส HPV นอกจากนี้ยังสามารถจับกับนิวเคลียสของเซลล์ตับกุ้งซึ่งยังไม่แสดงลักษณะของ hyper-trophied nuclei เด่นชัด คาดว่าอาจเป็นระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อไวรัส HPV (รูปที่ 14)



รูปที่ 11 การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้จากหนู 3 โดยเทคนิค Western blot hybridization



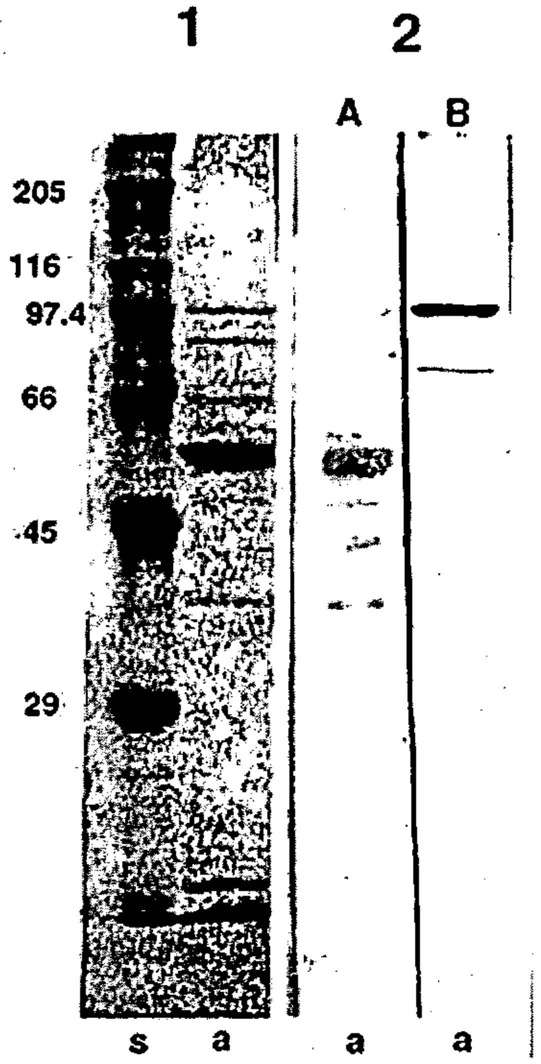
รูปที่ 12 การตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Western blot hybridization

แถวที่ 1 : Polyclonal antibody; dilution 1 : 10,000

แถวที่ 2-13 : Monoclone No. 1, 52, 320, 425, 546, 613, 620, 763, 857, 957, 1675, และ 2032; dilution 1:5

A : ใช้ สารละลายโปรตีนจาก HPV 10 ul/well

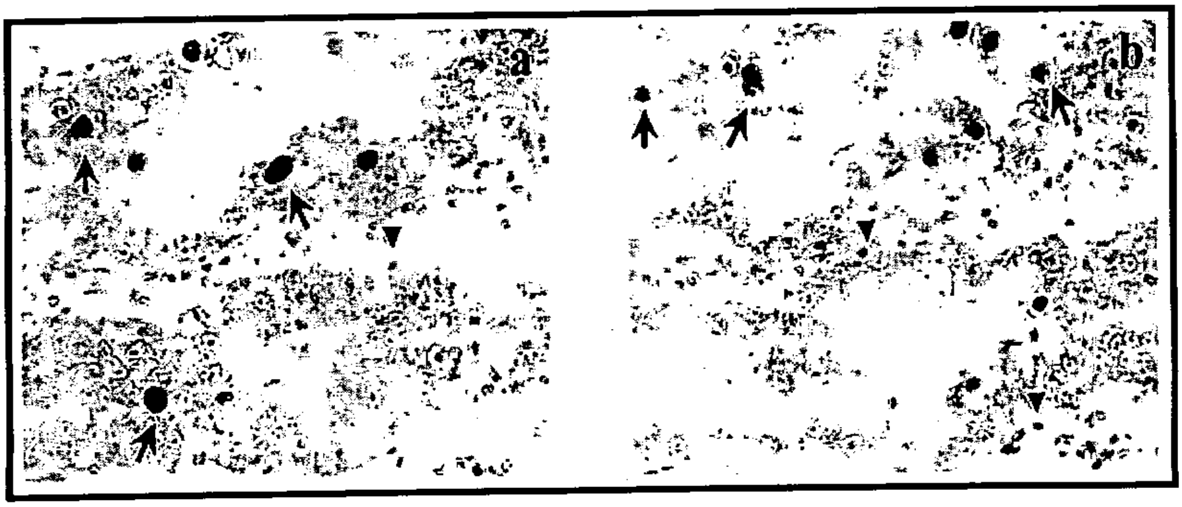
B : ใช้สารละลาย โปรตีนจาก HPV 5 ul/well



รูปที่ 13 แสดงผลของ SDS-PAGE และ ผลของ Western blot hybridization ของโปรตีนโครงสร้างของ HPV ที่แยกจากกุ้งกุลาดำ

(1) Coomassie blue-stained gel ของโปรตีน แถว s = Molecular weight marker; แถว a = purified HPV

(2) Western blot ของโปรตีนโครงสร้างของ HPV ไฮบริไดซ์กับ (A) mouse anti-HPV antiserum; (B) monoclonal antibody HPV



รูปที่ 14 Immunohistochemistry โดยใช้ (a) mouse anti-HPV antiserum (b) monoclonal antibody HPV1

ลูกศร แสดงตำแหน่งการจับกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโปรตีนในเซลล์ที่มีลักษณะ hypertrophied nuclei

หัวลูกศร แสดงตำแหน่งการจับกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโปรตีนในเซลล์ที่ไม่แสดงลักษณะของ hypertrophied nuclei เด่นชัด

สรุปและอภิปรายผล

จากการนำเอาโปรตีนของไวรัส HPV ฉีดเข้าไปในหนูขาว แล้วดูดเอาซีรั่มไปทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV ปรากฏว่าส่วนที่เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนอย่างน้อย 3 แถบ ซึ่งมีขนาด 97, 54 และ 52 กิโลดาร์ตัน แต่อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 12 โคลนที่ผลิตได้สามารถจับกับโปรตีนขนาด 97 กิโลดาร์ตัน ซึ่งไม่ใช่โปรตีนหลักของไวรัส แต่ผลจากการตรวจสอบในเนื้อเยื่อตับกุ้งที่ติดเชื้อพบว่า ทั้งโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอล สามารถจับกับ inclusion bodies ในนิวเคลียสที่มีลักษณะของการติดเชื้อไวรัส HPV และนิวเคลียสของเซลล์บางเซลล์ ซึ่งยังไม่แสดงลักษณะของ hypertroplired nuclei เด่นชัด คาดว่าอาจเป็นระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ โมโนโคลนอลส่วนใหญ่ที่ผลิตได้ในครั้งนี้ ส่วนใหญ่มี subtype เป็น IgM ซึ่งมีความจำเพาะ และความเสถียรน้อยกว่า IgG ดังนั้น ควรมีการพัฒนา การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไปเพื่อให้มีความจำเพาะต่อโปรตีนหลักที่มีขนาด 54 กิโลดาร์ตัน และมี subtype เป็น IgG ซึ่งจะทำให้โมโนโคลนอลที่ได้มีความจำเพาะและมีความเสถียรมากขึ้น และขณะนี้คณะผู้วิจัยกำลังทำการพัฒนาอยู่ นอกจากนี้แล้ว ยังได้ทำการโคลนนิ่งยีนที่สร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV หลังการแสดงออกของยีน จะนำโปรตีนที่ได้ไปฉีดเข้าไปในหนู เพื่อกระตุ้นการสร้างอนติบอดี คาดว่าจะสามารถผลิตโมโนโคลนอลได้ปริมาณมากและมีความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Belcher, C.R., and P.R. Young. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. J.Virol.Meth.74:21-29.

Chang, P.S., C.F, Lo,., G.H Kou, C.C., Lu and Chen. 1993. Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). J.Invert.Path.62; 116-20.

Flegel TW. 1997 Special topic overview; major viral diseases of the black tige prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microhiol Biotechnol 13: 433-442

Flegel TW., V. Thamavit, T. Pasharawipas, V Alday-Sanz. 1999 Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 174: 197-206.

Hudson, L. and F.C. Hay. 1976 Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, London U.K. p274.

Kachanaphum P, C. Wonteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel. 1998 Experimental transmission of white-spot syndrome virus (WSSV) from craps to shrimp (*Penaeus monodon*). Dis. Aquat. Org. 34: 1-7.

Kohler, G. and C. Milstein 1976 Derivative of specific antibody-producing tissue culture and tumor cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-9.

Lighter, D.V. and R.M. Redman. 1998 Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164: 201-20.

Loh, P.C., E. Cesar, B. Nadala, L.M. Tapay and Y. lu. 1998 Recent developments in immunological-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In Advance in Shrimp Biotechnology, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5 th Asian Fisheries Forum, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p 255-9.

Mosmann, T.R., R. Bauman and A.R. Wiiliamson. 1979 Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. Eur. J. Immunol 9: 511-6.

Nadala EC Jr, LM Tapay, PC Loh. 1997. Yellow-head virus: a rhadovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis.Aquat. Org.31:141-146.

Nadala EC Jr, LM Tapay, PC Loh. 1998. Characterization of a non-ocluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. Dis.Aquat Org.33:221-229..

Nadala EC Jr, PC Loh. 2000 Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. J. Virol. Methods; 84(2): 175-9.

Poulos BT, R kibler, D Bradley-Dunlop, LL Mohney, DV Lightner. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. Dis.Aquat.Org.37:99-106.

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

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

Wongteerasupaya, C, W. Tongchuea, V. Boonsaeng, S. Panyim, A Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel. 1997 Detection of yellow-headvirus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis Aquat. Org.31:181-6.

Wongteerasupaya, C, V. Boonsaeng, W. Tongchuea, N. Sitidilokratana, P. Kanchanaphum, R. Klinputosrn and S. Panyim. 1998 Multiplex PCR for detection of yellow-head virus and white spot syndrome virus in *Penaeus monodon,* in Advance in Shrimp Biotechnology, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5 th Asian Fisheries Forum, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p 265.