

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2544

สแกนเก็บตก	40	639.543 ก453	ร.2	31011103247235
------------	----	--------------	-----	----------------

การเตรียมโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มและการหาลำดับกรด
อะมิโนในบางส่วนของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

Preparation of Enveloped Protein and Determination
of Its Partial Amino Acid Sequence of Yellow Head
Virus from *Penaeus monodon*

639.543
ก453
ร.2

ปริญทร์ ชัยวิสุทธิธำรงกูร ไพศาล สิทธิกรกุล
ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๖๓๙.๕๔๓

๗๔๕๓

๘.๒

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี ๒๕๔๔ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม ๒๕๔๕

๒๓ ส.ค. ๒๕๔๕

บทคัดย่อ

ได้ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสหัวเหลือง (Yellow Head Virus; YHV) โดยการฉีดกึ่งกลาดำ ด้วย haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV การตรวจสอบ haemolymph ของกึ่งกลาดำที่ถูกทำให้ติดเชื้อ โดยวิธี dot-blot ที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 135 kD ของ YHV เป็นตัวตรวจสอบ พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อกึ่งที่ติดเชื้อ การแยกโปรตีนโครงสร้างของ YHV โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าได้โปรตีน 3 แถบ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนขนาด 135 kD 67 kD และ 22 kD การหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีนขนาด 135 kD พบว่ามีลำดับเป็น TILSGIPEKDKSVLMA สำหรับลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีนขนาด 67 kD พบว่ามีลำดับเป็น LAPRQARVRG จากการตัดย่อยโปรตีนขนาด 67 kD โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน พบว่าได้เปปไทด์ 4 ส่วน แต่สามารถหาลำดับของกรดอะมิโนที่ปลาย N ของเปปไทด์เหล่านั้นได้เพียง 3 เปปไทด์ โดยเปปไทด์ที่ 1 มีลำดับที่ปลาย N เป็น GALFTQGT เปปไทด์ที่ 3 มีลำดับที่ปลาย N เป็น YDAPPG และ เปปไทด์ที่ 4 มีลำดับที่ปลาย N เป็น YLPLGAIQK

Abstract

Yellow head virus (YHV) was prepared by injecting *Penaeus monodon* with YHV-infected haemolymph. A highly specific detection of YHV in the haemolymph of experimentally infected shrimps was obtained with dot-blotting using monoclonal antibody raised against 135 kD protein of YHV (V3-2B) as a probe. The SDS-PAGE of partially purified YHV displayed three bands of structural proteins consisting of 135 kD (putative envelope) 67 kD (putative capsid) and 22 kD (putative matrix). Determination of amino acid sequence at the N-terminal of the 135 kD protein was revealed as TILSGIPEKDKSVLMA. The amino acid sequence at the N-terminal of 67 kD protein was also identified as LAPRQARVRG. Tryptic digestion of the 67 kD protein was performed and four fragments of smaller peptides were obtained. However, only three peptides were able to be sequenced. The N-terminal amino acid sequences of those peptides are GALFTQGT, YDAPPG and YLPLGAIVQ.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ	3
วิธีการทดลอง	
การเพิ่มจำนวนไวรัส YHV การสกัดไวรัสและการทำให้บริสุทธิ์	7
Dot-blotting	7
การแยกโปรตีนของไวรัสด้วย SDS-PAGE และการถ่ายเทโปรตีนสู่แผ่นเมมเบรน PVDF	8
การหาลำดับกรดอะมิโน	8
ผลการทดลอง	
Dot-blotting	10
SDS-PAGE ของไวรัส YHV	10
ลำดับกรดอะมิโนในบางส่วนของโปรตีน 135 kD และ 67 kD	10
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	13
เอกสารอ้างอิง	16

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 การตรวจสอบ haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blotting ที่ใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 135 kD ของ YHV (V 3-2B) เป็นตัวตรวจสอบ	11
2 Coomassie blue stained SDS-PAGE ของโปรตีนจากไวรัส YHV	11
3 แสดงโปรตีนของ YHV บน Coomassie blue-stained SDS-PAGE ก่อนการถ่ายเท สู่แผ่นเมมเบรน PVDF	12

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

โรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำเป็นโรคร้ายแรงและเกิดการระบาดในปัจจุบันเป็นอย่างมาก อาการของกุ้งที่เป็นโรคนี้พบว่าบริเวณหัวของกุ้งจะมีสีเหลืองอ่อนผิดจากกุ้งปกติ บริเวณเหงือกบางครั้งจะพบสีค่อนข้างเหลือง กุ้งที่เป็นโรคจะกินอาหารน้อยลงและตายภายในเวลา 2-3 วัน ในบ่อเลี้ยงที่มีโรคระบาดพบว่าในวันแรกกุ้งจะว่ายน้ำอยู่ที่ผิวน้ำและตายที่ขอบบ่อให้เห็นประปรายในวันที่ 2 จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และในวันที่ 3 อาจตายหมดบ่อได้

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

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

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

อย่างไรก็ตามได้มีรายงานถึงผลสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000, Sithigorngul et al., 2002) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kD 67 kD และ 22 kD ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) capsid และ matrix ของ YHV (Nadala et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และ ในสภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีี้ในการตรวจหาไวรัสโรคหัวเหลืองได้ใน haemolymph และในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้เทคนิค dot-blot, Western blot และ immunocytochemistry

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

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

จะเห็นได้ว่าการใช้วัคซีนเพื่อการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งนั้น น่าจะมีความเป็นไปได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักในโครงการวิจัยต่อเรื่องนี้คือ การพัฒนาวัคซีน เพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะกระทำโดยนำยีนที่สร้างส่วนประกอบของไวรัสใส่ในยีนพาหะที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน (expression vector) จากนั้นก็จะกระตุ้นให้แบคทีเรียหรือยีสต์ที่มียีนพาหะนี้ผลิตโปรตีนที่ต้องการในปริมาณมาก เพื่อนำไปทดสอบความเป็นวัคซีนต่อไปสำหรับขั้นตอนแรกของโครงการในปีนี้จะเริ่มจากการสกัดโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (envelope) ของ YHV และการหาลำดับของกรดอะมิโนบางส่วนจากโปรตีนนี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบ degenerate primers เพื่อใช้ในการแยกยีนที่สร้างโปรตีนนี้โดยวิธี RT-PCR ต่อไป

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ

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

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

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

นอกจากนี้การหาลำดับ DNA จาก cDNA ที่มีขนาด 1161 bp นั้นพบว่ามีส่วนที่สามารถแปลรหัสได้ยาวที่สุด (largest open reading frame) ที่ตำแหน่ง 484 ถึง 1161 โดยพบว่าโปรตีนนั้นประกอบด้วยกรดอะมิโน 226 ตัว และจากการสืบค้นในฐานข้อมูลของ Genbank เพื่อหาความเหมือน (homology) ของ DNA ที่มีความยาว 1161 bp นั้นโดยใช้โปรแกรม Blast พบว่าไม่มี

ความเหมือนต่อ DNA หรือโปรตีน จากไวรัสหรือจากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) ชนิดใดเลย (Tang & Lightner, 1999)

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

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

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

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

สำหรับรายงานที่สนับสนุนสมมติฐานนี้ มาจากการที่พบว่าการติดเชื้อ YHV ในกึ่งฤดูดำใน
 ระยะแรกจะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก โดยรวมถึงกึ่งในระยะเวลา larva ที่สัมผัส (exposed)
 กับ YHV นี้ด้วย แต่ต่อมาพบว่ากึ่งในระยะเวลา early larva (ซึ่งน่าจะมีการแยกได้ระหว่าง self และ
 nonself) จะดี (refractory) ต่อการติดเชื้อ YHV ในภายหลัง ซึ่งปรากฏการณ์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการ
 จับของไวรัสที่ก่อให้เกิดการจดจำ และได้พัฒนาการติดเชื้อแต่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย
 (innocuous infection) เมื่อได้รับ YHV ในภายหลัง (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการต้านทาน
 (tolerance) ต่อไวรัส น่าจะเกี่ยวข้องกับการปรับตัว (accommodation) เพื่อการเพิ่มจำนวนของไว
 รัสโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกึ่งแต่อย่างใด (Flegel & Pasharawipas, 1998) ถ้าหากสมมติฐาน
 นี้ถูกต้อง การพัฒนาสารที่เรียกว่า tolerines เพื่อใช้ในลักษณะเดียวกันกับการพัฒนาวัคซีน ก็จะมี
 ความเป็นไปได้สูง (Flegel & Pasharawipas, 1998)

จากสมมติฐานดังกล่าวข้างต้น การใช้โปรตีนส่วนเปลือกนอก (envelope) ของไวรัสเพื่อการ
 พัฒนาเป็น tolerines ก็น่าจะนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนได้ โดยโปรตีนส่วนเปลือกนอกนี้เป็นส่วนที่
 ไวรัสใช้จับกับ (binding) แห่รับ (receptor) ที่อยู่บนเนื้อเยื่อ และการใช้โปรตีนส่วนนี้เพื่อเป็น
 tolerines น่าจะก่อให้เกิดการจดจำที่จำเพาะ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาการต้านทานต่อการติดเชื้อ
 YHV ในภายหลังได้

วิธีการทดลอง

แผนการดำเนินการทดลองโดยรวมของการวิจัยนี้มีดังนี้

1. เพิ่มจำนวนไวรัส YHV โดยการฉีดเพิ่มจำนวนในกึ่งกลาดำจากนั้นทำการสกัดไวรัส และทำให้บริสุทธิ์
2. แยกโปรตีนของไวรัส YHV ด้วย SDS-PAGE และถ่ายเทโปรตีนของไวรัส YHV ออกจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน PVDF โดยใช้กระแสไฟฟ้า
3. ตัดแถบโปรตีนของไวรัส YHV ซึ่งอยู่บนเมมเบรน PVDF และนำส่งไปหาลำดับของกรดอะมิโนต่อไป

1. การเพิ่มจำนวนไวรัส YHV การสกัดไวรัสและการทำให้บริสุทธิ์

นำกึ่งกลาดำขนาด 25-30 กรัม มาเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิและช่วงแสงธรรมชาติในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 300 ลิตร โดยปรับความเค็มของน้ำให้มีค่าประมาณ 10 ppt จากนั้นนำกึ่งมาฉีดด้วยสารละลายไวรัส YHV ที่เตรียมจาก haemolymph ของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV (เชื้อ YHV ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Tim Flegel ม. มหิดล) โดยทำการฉีดเข้าที่ arthrodiol membrane ของขาเดินคู่ที่ 2 สังเกตการติดเชื้อของกึ่งประมาณ 2-4 วัน โดยกึ่งที่ติดเชื้อจะเคลื่อนไหวช้าลงและหยุดการกินอาหาร จากนั้นเลือกกึ่งที่ติดเชื้อมาเจาะ haemolymph จาก arthrodiol membrane ของขาเดินคู่ที่ 4 โดยใช้เข็มขนาด 22 G นำ haemolymph ที่ได้มาผสมกับน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (modified Alsever solution; Rodriguez et al., 1995) ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกที่ 3000 g ทำการตรวจสอบไวรัส YHV ใน haemolymph ด้วยวิธี dot-blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ enveloped protein ของ YHV (V 3-2B) เป็นตัวตรวจสอบ จากนั้นนำส่วนใสที่ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกแล้วมาตกตะกอนด้วย 33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และนำไปปั่นที่ 3000 g เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายใน 2XPBS จากนั้นนำไปปั่นแยกไวรัสที่ 100,000 g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 2XPBS 2 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 2XPBS เก็บไว้ที่ -70°C

2. Dot-blotting

นำ haemolymph ของกึ่งที่คาดว่าเกิดการติดเชื้อมาตรวจโดยหยด haemolymph (1 ul ต่อจุด) ลงบนแผ่นเมมเบรน nitrocellulose นำไปอบที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วน envelope ของ YHV (V3-2B) (Sithigorngul et al., 2000) ที่เจือจางใน 5% Blotto (5% nonfat drymilk 0.1% Triton-X-100 ใน PBS) จากนั้นทำการล้างเมมเบรนใน 0.5% Blotto นำเมมเบรนไปบ่มรวมกับ horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG (GAM-HRP; BioRad) ที่เจือจาง 1:1000 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนใน 0.5%

Blotto เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเมมเบรนไปบ่มรวมกับสารละลาย substrate ที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB) 0.006% hydrogen peroxide และ 0.05% cobalt chloride ใน PBS

3. การแยกโปรตีนของไวรัสด้วย SDS-PAGE และการถ่ายเทโปรตีนสู่แผ่นเมมเบรน PVDF

นำไวรัสที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาแยกโปรตีนส่วนต่างๆด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้า 30 โวลท์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเทโปรตีนจากเจล (ไม่ผ่านการย้อมสี) สู่แผ่นเมมเบรน PVDF โดยใช้เครื่อง Transblot (BioRad)

4. การหาลำดับกรดอะมิโน

นำแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ตัดมาเฉพาะแต่ละส่วนของโปรตีน ส่งไปหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ทั้งก่อนและหลังการตัดย่อยด้วย trypsin ที่ Biotechnology Resource Laboratory, Medical University of South Carolina , USA ด้วยเครื่อง Applied Biosystems Procise Sequencers โดยใช้วิธี Edman degradation

ผลการทดลอง

Dot-blotting

ภายหลังการเพิ่มจำนวนไวรัสในกึ่งกลาดำและทำการเก็บ haemolymph จากกึ่งที่คาดว่าติดเชื้อ YHV ได้ทำการตรวจสอบไวรัส YHV ใน haemolymph ด้วยวิธี dot-blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ enveloped protein ของ YHV (V 3-2B) เป็นตัวตรวจสอบ จะพบว่ากึ่งที่ติดเชื้อจะให้ผลบวกโดยพบจุดสีดำเกิดขึ้น ในขณะที่กึ่งปกติจะไม่ให้สี (รูปที่ 1)

SDS-PAGE ของไวรัส YHV

ภายหลังการทำไวรัสให้บริสุทธิ์ ได้นำตะกอนไวรัสที่ได้มาแยกโปรตีนส่วนประกอบต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกโปรตีนของไวรัสได้น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กันคือ 135 kD 67 kD และ 22 kD (รูปที่ 2) จากนั้นได้ทำการแยกโปรตีนของ YHV โดยวิธี SDS-PAGE เป็นจำนวนหลายช่อง (รูปที่ 3) และถ่ายเทสู่แผ่นเมมเบรน PVDF ทำการตัดแถบโปรตีนที่ขนาด 135 kD และ 67 kD และนำส่งไปหาลำดับกรดอะมิโน

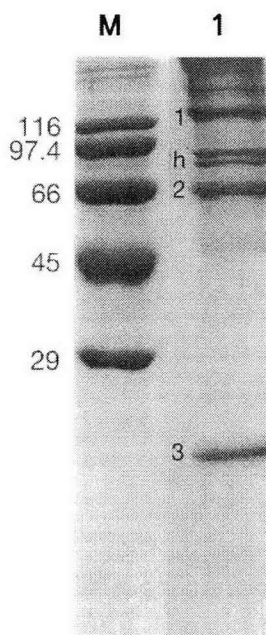
ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน 135 kD และ 67 kD

จากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีน 135 kD พบว่ามีลำดับเป็น T-I-L-S-G-I-P-E-K-D-K-S-V-L-M-A-(H,P)-H ส่วนผลการหาลำดับของโปรตีนนี้ภายหลังการตัดย่อยด้วย trypsin พบว่าไม่สามารถอ่านผลได้

จากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีน 67 kD พบว่ามีลำดับเป็น L-A-P-R-Q-A-R-V-R-G-?-V-?-T-F-K-Q-E ส่วนผลการหาลำดับของโปรตีนนี้ภายหลังการตัดย่อยด้วย trypsin พบว่าได้เปปไทด์เป็น 4 ส่วนแต่สามารถแปลผลจากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ได้จากเปปไทด์เพียง 3 ส่วน โดยเปปไทด์ส่วนที่ 1 มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็น G-A-L-F-T-Q-G-T-?-H-P-K เปปไทด์ส่วนที่ 2 ไม่สามารถแปลผลได้ เปปไทด์ส่วนที่ 3 มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็น Y-D-A-P-P-G-(S,F)-F-F-?-Y-Q-Y? และเปปไทด์ส่วนที่ 4 มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็น Y-L-P-L-G?-A-I-V-Q,K?



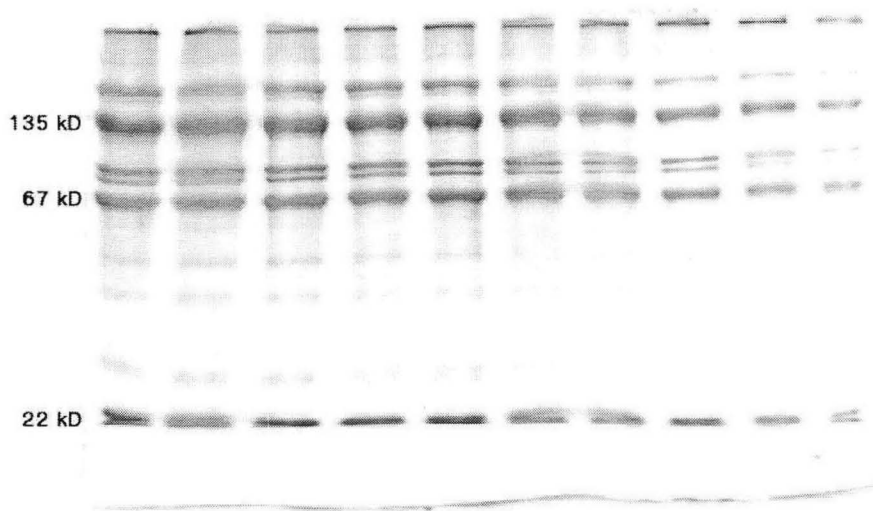
รูปที่ 1 การตรวจสอบ haemolymph ของกุ้งที่ติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot ที่ใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน 135 kD ของ YHV (V 3-2B) เป็นตัวตรวจสอบ



รูปที่ 2 Coomassie blue stained SDS-PAGE ของโปรตีนจากไวรัส YHV

lane M: molecular weight marker

lane 1: โปรตีนจาก YHV ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 kD (1) โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 kD (2) โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 22 kD (3) และ haemolymph (h)



รูปที่ 3 แสดงโปรตีนของ YHV บน Coomassie blue-stained SDS-PAGE ก่อนการถ่ายเทสู่แผ่น
เมมเบรน PVDF

**สรุปและอภิปราย
ผลการทดลอง**

จากการตรวจสอบ haemolymph ของกิ้งกัที่ติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot ที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 135 kD ของ YHV (V 3-2B) เป็นตัวตรวจสอบนั้น พบว่าผลที่ได้มีความจำเพาะสูง เนื่องจากได้ผลบวกเฉพาะในกิ้งกัที่ติดเชื้อ ในขณะที่กิ้งกัปกติจะได้ผลลบ

การทำไวรัสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำไปปั่นแยกด้วยวิธี ultracentrifugation พบว่าได้ผลดีพอสมควร โดยพบว่ามี haemolymph ปนเปื้อนมาเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่มีผลต่อการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากไวรัส

จากผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีน 135 kD ของ YHV พบว่ามีลำดับเป็น T-I-L-S-G-I-P-E-K-D-K-S-V-L-M-A-(H,P)-H ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับรายงานของ ศศิมนัส และ ศราววุฒิ (2000) ซึ่งรายงานว่ามีลำดับเป็น T-I-L-S-G-I-P โดยในรายงานนั้นได้ระบุว่าโปรตีนนี้มีขนาดประมาณ 116 kD ซึ่งเชื่อว่าเป็นโปรตีนที่ยังไม่ผ่านกระบวนการ glycosylation จึงทำให้น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 135 kD

จากผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโปรตีน 67 kD พบว่ามีลำดับเป็น L-A-P-R-Q-A-R-V-R-G-?-V-?-T-F-K-Q-E ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับรายงานของ ศศิมนัส และศราววุฒิ (2000) ซึ่งรายงานว่ามีลำดับเป็น L-A-P-R-Q-A-R ต่อมาได้มีรายงานเกี่ยวกับยีนที่สร้างโปรตีน 65 kD ของ YHV (Jitrapakdee et al., 2001) และพบว่ามีกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส (deduced amino acids) เป็น L-A-P-R-Q-A-R-V-R-G-S-P-G-T-F-K-Q-E ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกับกรดอะมิโนที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ในรายงานนั้นได้กล่าวว่าการดัดแปลงที่ปลาย N ของโปรตีน 65 kD นี้เกิดขึ้นหลังจากมีการตัด leader sequence ออกไปแล้ว

ส่วนผลการหาลำดับของโปรตีน 67 kD ภายหลังจากตัดย่อยด้วย trypsin พบว่าได้เปปไทด์ 4 ส่วนแต่สามารถแปลผลจากการหาลำดับกรดอะมิโนได้จากเปปไทด์เพียง 3 ส่วน โดยเปปไทด์ส่วนที่ 1 มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็น G-A-L-F-T-Q-G-T-?-H-P-K และจากการเปรียบเทียบกับรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (2001) ซึ่งรายงาน deduced amino acids ตำแหน่งที่ 257-268 เป็น G-A-L-F-T-Q-G-T-T-H-P-K จะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกับกรดอะมิโนที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ค่อนข้างสูง สำหรับเปปไทด์ในส่วนที่ 2 ไม่สามารถแปลผลการหาลำดับกรดอะมิโนได้ เปปไทด์ในส่วนที่ 3 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็น Y-D-A-P-P-G-(S,F)-F-F-?-Y-Q-Y? และจากการเปรียบเทียบกับรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (2001) ซึ่งรายงาน deduced amino acids ตำแหน่งที่ 278-289 เป็น Y-D-A-P-P-G-S-F-F-S-Y-Q จะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกับกรดอะมิโนที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สำหรับเปปไทด์ในส่วนที่ 4 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็น Y-L-P-L-G-?-A-I-V-Q,K? และจากการเปรียบเทียบกับรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (2001) ซึ่งรายงาน deduced amino acids ตำแหน่งที่ 338-346 เป็น Y-D-P-L-G-A-I-V-Q จะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกับกรดอะมิโนที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้เช่นกัน

เนื่องจากผลการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน 135 kD นั้นพบว่าได้ผลเพียงช่วงปลาย N ของโปรตีนก่อนการตัดย่อยด้วย trypsin เท่านั้นทำให้ไม่สามารถออกแบบ degenerate primer 2 ส่วนเพื่อนำมาใช้ในการทำ RT-PCR ในการแยกชิ้นบางส่วนได้ อย่างไรก็ตามจากผลการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน 67 kD นั้นพบว่าได้ผลทั้งจากก่อนและหลังการตัดย่อยด้วย trypsin จึงทำให้สามารถออกแบบ degenerate primers เพื่อใช้ในการทำ RT-PCR ได้โดยผู้วิจัยได้ออกแบบ degenerate primer 67F จากลำดับของกรดอะมิโนที่ปลาย N ก่อนการตัดย่อยด้วย trypsin (L-A-P-R-Q-A-P) เป็น CTI GCI CCI CGI CA(A/G) GCI CC และได้ออกแบบ degenerate primer 67R1 จากลำดับของกรดอะมิโนจากเพปไทด์ส่วนที่ 3 (Y-D-A-P-P-G) เป็น A ICC IGG IGG IGC (G/A)TC (G/A)TA และได้ออกแบบ degenerate primer 67R2 จากลำดับของกรดอะมิโนจากเพปไทด์ส่วนที่ 4 (Y-L-P-L-G-A-I) เป็น AT IGC ICC IAG IGG IAG (G/A)TA และได้ใช้ primers เหล่านี้ทำ RT-PCR เพื่อแยกชิ้นบางส่วนของ 67 kD และผู้วิจัยได้ทำการโคลน RT-PCR products ที่ได้เข้าสู่ cloning vector เพื่อนำไปหาลำดับ DNA แต่อย่างไรก็ตามในขณะนั้นได้มีรายงานเกี่ยวกับยีนของโปรตีน 67 kD ของ YHV (Jitrapakdee et al., 2001) ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่ได้ทำการหาลำดับยีน 67 kD นั้นและจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนวิธีการวิจัยโดยอาศัยข้อมูลจากรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (2001) ในการหายีนต่างๆของไวรัส YHV ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ศศิมนัส อุณจักร์ และ ศราวุฒิ จิตรภักดี (2000) การศึกษาโปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลือง การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 วันที่ 18-20 ตุลาคม 2543 หน้า 450

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

- Hunkapillu, M.W., Lujan, E., 1986. Purification of microgram quantities of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. In : Shively, J.(Ed.) Methods of Protein Microcharacterization. Humana Press, Clifton, NJ. p.89-101.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Panyim, S., Boonsaeng, V., 2001. Molecular cloning of p65 structural protein of the yellow head virus. งานวิจัยด้านอนุชีววิทยา ประจำปี 2544 เมธีวิจัยอาวุโส สกว. สกล พันธุ์ยิ้ม 14 กันยายน 2544
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 ; 680-685.
- Lightner, D.V., Redman, R.W., 1998. Shrimp diseases and current diagnosis methods. Aquaculture. 164 ; 201-220.
- Loh, P.C., Cesar, E., Nadala, B., Tapay, L.M., Lu, Y., 1998. Recent development in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogen. Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.255-259.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Follin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193 ; 256-275.
- Nadala, Jr. E.C.B., Tapay, L.M., Loh, P.C., 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 31, 141-146
- Pasharawipas, T., Flegel, T.W. Sriurairatana, S., Morrison, D.J., 1997. Latent yellow-head infections in *Penaeus monodon* and implications regarding disease tolerance or resistance. In Flegel, T.W., Menasaveta, P., Paisarnrat, S. (Eds) Shrimp biotechnology in Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 45-53.
- Rodriguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., Bachere, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell. Sci. 108,1043-1050.
- Sithigorngul, P., Chauyuchuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Menasveta, P., 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 42, 27-34.

- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Menasveta, P., 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49, 71-76.
- Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 35, 165-173.
- Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Tongchuea, W., Sitidilokratana, N., Kanchanapun, P., Klinputsorn, R., Panyim, S., 1998. Multiplex PCR for detection of yellow-head virus and white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand. p.256.
- Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W, Boonsaeng, V., Panyim, S, Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aqua. Org.* 31, 181-186.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organisms.* 21, 69-77.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S , Vickers, J.E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnaarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22, 45-50.