การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)

ปริญญานิพนธ์
ของ
วารุณี หะยีมะสาและ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2552
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)

บทคัดย่อ

ของ

วารุณี หะยีมะสาและ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2552

วารุณี หะยีมะสาและ. (2552). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV).* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร, ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล.

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ในกุ้ง โดยกระตุ้นแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนสายผสมกับ glutathione-S-transferase (GST) เมื่อแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนให้บริสุทธิ์ พบว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 63 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว และเมื่อนำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV ได้ 5 โคลนได้แก่ IH 1-5, IH 1-7, IH 1-13, IH 3-12 และ IH 3-14 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนและเชื้อ IHHNV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ โดยมีความไวเท่ากับ 0.313 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV และสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV และ WSSV เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน สามารถจับกับแคปซิดโปรตีนธรรมชาติของ IHHNV ที่มีน้ำหนัก 37 กิโลดาลตัน ด้วยวิธี Western blotting นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน IHHNV ที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ตรวจหาการติดเชื้อ IHHNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อ เช่น ในเซลล์ของอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ปมประสาท หัวใจ เหงือก และผิวหนังใต้เปลือก (cuticular epidermis) โดยวิธี immunohistochemistry ได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5 จับกับเชื้อ IHHNV ในเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติและในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV ตามธรรมชาติเช่นกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้งหมดเป็น IgG_{2b} และจับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันหรือบริเวณเดียวกัน

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST INFECTIOUS HYPODERMAL AND HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHHNV)

AN ABSTRACT

BY

WARUNEE HAJIMASALAEH

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree of Biotechnology

to Srinakharinwirot University

February 2009

Warunee hajimasalaeh. (2009). *Production of monoclonal antibodies against infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV).* Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Commitee: Assist. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies (MAbs) that can be used to detect infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimp. After induction of recombinant plasmid pGEX-6P-1-IHHNV in *E. coli* strain BL21, the glutathione-S-transferase (GST) tagged capsid protein IHHNV (rIHHNV) with molecular mass of 63 kDa was obtained. Five hybridoma clones (IH 1-5, IH 1-7, IH 1-13, IH 3-12 and IH 3-14) against IHHNV capsid protein were generated using purified recombinant protein for immunization into Swiss mice. The five hybridoma clones produced antibodies specific to IHHNV capsid protein. The sensitivity of MAbs was 0.313 µg/ml against rIHHNV without cross-reactivity to recombinant proteins of WSSV, TSV, MBV, HPV and YHV as well as pleopod homogenates from TSV and WSSV infected shrimps as determined by dot blotting. These MAbs bound to native IHHNV capsid protein with molecular mass of 37 kDa as determined by Western blot assay. In addition, monoclonal antibodies can be used to detect IHHNV infection in lymphoid organ, ganglion, heart, gill and cuticular epidermis by immunohistochemistry without cross-reactivity to WSSV, TSV, MBV, HPV and YHV. MAb IH 1-5 displayed the strongest immunoreactivities. All monoclonal antibodies belong to IgG_{2b}.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)
ของ
วารุณี หะยีมะสาและ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

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

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

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

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิทยาการและจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ อาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณมังกูล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประวัติ อังประภาพรชัย ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิตย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากยิ่งขึ้น และขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อภินันท์ อุดมกิจ สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ คุณชลินันท์ เพ็งสุข คุณชุติมา ศรีสุข และพี่น้องในห้องปฏิบัติการโมโนโคนอลแอนติบอดีและห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอระลึกถึงองค์อัลเลาะห์ที่ดลบันดาลใจให้ข้าพเจ้าใฝ่หาความรู้ต่าง ๆ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน รวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัยและขอนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง และกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวทุกตัวที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

วารุณี หะยีมะสาและ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**.....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
	ขอบเขตของการวิจัย.....	3
	สมมติฐานในการวิจัย.....	4
	ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**.....	5
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**.....	20
	อุปกรณ์และสารเคมี.....	20
	วิธีดำเนินการทดลอง.....	22
4	**ผลการทดลอง**.....	32
5	**สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ**.....	46
บรรณานุกรม.....		49
ภาคผนวก.....		55
ประวัติย่อผู้วิจัย.....		66

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 20

2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 21

3 ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ IHHNV โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ด้วยวิธี PCR..... 24

4 ความจำเพาะและความไวของการตรวจหาแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบโดยวิธี dot blotting Western blotting และ immunohistochemistry (IHC)..... 40

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogen) กับการเกิดโรคในกุ้ง..... 5

2 ลักษณะกุ้งขาวที่มีกรีดงอ ผิดรูปร่าง โดยมีลักษณะคว่ำลง (รูปบน) หรือชี้ขึ้น (รูปล่าง) และมีความยาวของกรีน้อยกว่ากุ้งปกติ ซึ่งเป็นกลุ่มอาการ runt deformity syndrome (RDS) เมื่อมีการติดเชื้อ IHHNV..... 7

3 ลักษณะกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV ที่ไม่มีการแสดงอาการของ RDS..... 8

4 ลักษณะของ Cowdry type A nuclear inclusion body (CAIs) ของเชื้อ IHHNV ในนิวเคลียสของเซลล์ antenal gland ของกุ้งกุลาดำ..... 9

5 การจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอบนสาย complementary (plus) strand ประกอบด้วย Left ORF Mid ORF และ Right ORF (frames 1 2 และ 3)..... 11

6 Phylogenic tree ที่ได้จากการ Alignment ของบริเวณ NTP-binding และ helicase. 12

7 Phylogenic tree ที่ได้จากการ Alignment ลำดับดีเอ็นดีของจีโนมของ parvoviruses ในแมลงและกุ้ง..... 14

8 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีน IHHNV (Genbank accession no: AF218266)..... 15

9 Phylogenic tree ที่ได้จากการ Alignment ลำดับกรดอะมิโนของ parvoviruses ในแมลงและกุ้ง..... 16

10 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA..... 28

11 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA..... 29

12 ลูกศรแสดงการเติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H เพื่อใช้ในการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา..... 30

13 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IHHNV โดยนำมาแยกใน 10% SDS-PAGE..... 33

14 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B)..... 35

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

15 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ โดยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B)..... 36
16 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ IHHNV ด้วยวิธี dot blotting..... 37
17 การตรวจการติดเชื้อ IHHNV ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5..... 38
18 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ..... 39
19 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ..... 41
20 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV ด้วยวิธี dot blotting..... 42
21 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting..... 43
22 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry ของโมโนโคลนอล-แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHNNV..... 45

บทที่ 1
บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้นำในด้านการผลิตและการส่งออกกุ้ง ตั้งแต่ปี 1992 ซึ่งสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละมากกว่าหมื่นล้านบาท โดยกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นกุ้งทะเลเพียงชนิดเดียวที่มีการเลี้ยงแบบพัฒนากันอย่างแพร่หลาย ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นประสบปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ เช่น ปัญหามลพิษและความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม ปัญหาทางการค้าและการตลาด และปัญหาที่เกิดจากการระบาดของโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ (Flegel; Fegan; & Sriurairatana. 1995: 65–79) ทำให้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ทดแทนการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ส่งผลให้สัดส่วนในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำลดลง และยังเป็นทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรนอกเหนือไปจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งขาวมีการปล่อยลูกกุ้งจำนวนมากกว่าและให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในพื้นที่การเลี้ยงที่เท่ากัน โดยผลผลิตของกุ้งขาวส่วนใหญ่จะส่งออกต่างประเทศ ส่วนการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เริ่มมีการส่งเสริมแนวทางการเลี้ยงแบบพัฒนามากขึ้นทดแทนการเลี้ยงแบบดั้งเดิมที่ได้ผลผลิตต่ำ และมักจะมีปัญหายาตกค้าง โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ ปล่อยลูกกุ้งน้อยลง มีเครื่องให้อากาศ ใช้อาหารสำเร็จรูปทดแทนอาหารที่เกษตรกรทำเองและเลี้ยงแบบมีการย้ายบ่อเพื่อให้มีโอกาสได้กุ้งก้ามกรามที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีการเลี้ยงกุ้งขาวเพิ่มมากขึ้นแล้วก็ตาม แต่ก็ประสบปัญหาเรื่องโรคระบาดเช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำเช่นกัน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลกระทบเชิงลบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก ได้แก่ โรคติดเชื้อในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57–112) เชื้อไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) ไวรัสเอชพีวี (hepatopancreatic parvovirus; HPV) ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus; MBV) ไวรัสโรคทอร่า (Taura syndrome virus; TSV) และ ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; IHHNV) (Loh; et al. 1997: 263–312)

โรคระบาดที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงและมีผลกระทบต่อผลผลิตกุ้งคือ โรคแคระแกร็น หรือกุ้งพิการ (runt deformity syndrome; RDS) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ IHHNV กุ้งที่ติดเชื้อนั้นมีอาการป่วยที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตกุ้งของฟาร์ม โดยทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ซึ่งในกุ้งขาววัยรุ่นอายุ 2-3 เดือน จะพบอาการกรีดงอ หนวดงอ เปลือกไม่เรียบและเสียรูปร่าง โดยเป็นอาการเรื้อรัง (Kalagayan; et al.1991: 235-243) พบ inclusion bodies ที่มีลักษณะพิเศษที่เรียกว่า

Cowdry type A (CAIs) สามารถตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (histological examination) ของอวัยวะที่พัฒนามาจาก ectoderm และ mesoderm ซึ่งไม่พบในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Lightner; et al. 1983: 212-225) การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้จะทำให้มีอัตราแลกเนื้อต่ำลง ทำให้เกษตรกรขาดทุน เนื่องจากกุ้งมีน้ำหนักลดลง การกินอาหารลดลง กุ้งกินกันเอง ทยอยตาย ลอยหัว ซึ่งกุ้งที่อ่อนแอมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสนั้นไม่สามารถทำได้ ดังนั้นหากสามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วจะเป็นวิธีทางเดียวในการจัดการกับโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ IHHNV นั้น มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา ซึ่งทำให้พบ Cowdry type A ในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อโดยการย้อมสี haematoxylin และ eosin Y (H & E) (Lightner; et al. 1983: 212-225) การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy) (Lightner. 1996) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูงและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง วิธีตรวจหาเชื้อ IHHNV โดยใช้ serodiagnostic field kit ในกุ้งขาวในบ่อเลี้ยง เป็นการตรวจสอบการติดเชื้อจากเลือดกุ้งขาว โดยการทำ dot blot hybridization (Carr; et al. 1996: 1-8) และเทคนิค *in situ* hybridization (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) ทั้งสองวิธีนี้ต้องใช้ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ IHHNV ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงแต่ต้องใช้ระยะเวลานานในการทราบผลของการติดเชื้อ ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยวิธี polymerase chain reactions (PCR) แบบ real time PCR (Dhar; et al. 2001: 2835-2845, Tang; & Lightner. 2001: 79-85) และ nested PCR (Mott; et al. 2003: 57-70) เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถตรวจพบไวรัส โดยการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับจีโนมของ IHHNV แม้มีปริมาณน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรก และช่วยลดเวลาในการตรวจวินิจฉัยแบบเดิม แต่ไม่เหมาะในการนำไปตรวจเชื้อในฟาร์มกุ้ง เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มีราคาแพง นอกจากนี้วิธี ramification amplification (RAM) ที่มีความไวเทียบเท่า PCR (Teng; et al. 2006: 103-111) และเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่ถูกต้องแม่นยำและมีความไวกว่า PCR และใช้เวลาน้อย (Sun; et al. 2006: 41-46) แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเช่นกัน

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) มาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้านโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนี้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน M (immunoglobulin M; IgM) มาใช้สำหรับตรวจเชื้อ IHHNV (Poulos; Lightner; & Trumper. 1994:149-154) ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจเชื้อ IHHNV ด้วยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) และ immunoblot assay อื่น ๆ แต่ประสิทธิภาพการใช้งานยังไม่ดีนัก เนื่องจากเกิดการจับแบบไม่จำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับสารบางชนิดในสารสกัดกุ้ง

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้พัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย เช่น strip test สำหรับตรวจเชื้อ WSSV (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106) *Vibrio harveyi* (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) และ YHV (Sithigorngul; et al. 2007: 193-199) ดังนั้น เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมากและประหยัดเวลา ทำให้สามารถตรวจเพื่อติดตามการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลาอันเป็นการลดความเสียหายของเกษตรกร สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ไวรัสจากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเป็นแอนติเจนนั้นมีขั้นตอนในการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์หลายขั้นตอนและอาจมีเนื้อเยื่อกุ้งปะปนมาทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้อาจจับกับเนื้อเยื่อของกุ้งปกติด้วย จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของเชื้อ IHHNV (Bonami; et al. 1990: 2657-2664) ทำให้ทราบองค์ประกอบต่างๆ ของสารพันธุกรรมไวรัสและสามารถจำแนกยีนที่ทำหน้าที่ผลิตแคปซิดโปรตีน (capsid protein) ของไวรัสได้ ซึ่งแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการใช้รีคอม-บิแนนท์แคปซิดโปรตีน (recombinant capsid protein) ของเชื้อ IHHNV เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งที่ติดเชื้อ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ IHHNV
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจวิเคราะห์โรคแคระแกร็นในกุ้งด้วยวิธี dot blotting, immunohistochemistry และ Western blotting

ขอบเขตของการวิจัย

1. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)
2. การทำให้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* มีความบริสุทธิ์
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ IHHNV โดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผลิตได้
4. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHHNV โดยวิธี dot blotting, immunohistochemistry และ Western blotting
5. การพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทป ชนิดของแอนติบอดี รวมทั้งการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของเชื้อ IHHNV อาจทำโดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่สร้างจากยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัสเป็นแอนติเจนกระตุ้นหนูขาว

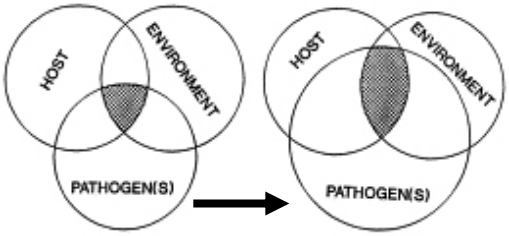
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ได้
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ IHHNV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจวิเคราะห์โรคแคระแกร็นในกุ้งด้วยวิธี dot blotting, immunohistochemistry และ Western blotting

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเกิดโรคในกุ้ง

โรคระบาดในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นปัญหาที่สำคัญมาก เนื่องจากทำให้ผลผลิตกุ้งลดลงอย่างมาก โดยโรคที่เกิดกับกุ้งเป็นผลของความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อโรค เมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิผลเพิ่มมากขึ้น เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค การปรากฏของเชื้อก่อโรคหลาย ๆ ชนิด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง หรือภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสมก็จะส่งผลทำให้การก่อเกิดหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (ภาพประกอบ 1) (Snieszko; 1973: 201-220) ซึ่งโรคส่วนใหญ่ที่เกิดกับกุ้งแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ โรคไม่ติดเชื้อ และโรคติดเชื้อ โดยโรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่นอุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (Bachere; 2000: 3-11)



ภาพประกอบ 1 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogen) กับการเกิดโรคในกุ้ง โดยพื้นที่สีเทาเป็นบริเวณที่เกิดโรคซึ่งมีปัจจัย เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค เมื่อเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลทำให้การก่อเกิดหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ที่มา Snieszko. (1973). The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. p.56.

ส่วนโรคติดเชื้อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญซึ่งส่งผลกระทบเชิงลบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57–112) เชื้อไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสเอชพีวี ไวรัสเอ็มบีวี ไวรัสโรคทอร่า และ ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (Loh; et al. 1997: 263–312)

ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (IHHNV)

ไวรัสชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในเขตมหาสมุทรแปซิฟิก และมหาสมุทรอินเดีย มีรายงานการติดเชื้อครั้งแรกในกุ้ง *Penaeus stylirostris* ที่เลี้ยงในฮาวาย ซึ่งเป็นกุ้งที่นำเข้ามาจากประเทศเอกวาดอร์และคอสตาริกา (Lightner; et al. 1983: 212-225) ที่เลี้ยงแบบหนาแน่น โดยทำให้กุ้ง *P. stylirostris* เป็นโรค infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) ซึ่งกุ้งที่ติดเชื้อจะมีอัตราการตายสูงกว่าร้อยละ 90 หลังจากปล่อยกุ้ง 14 วัน (Lightner; & Redman. 1983: 62-70) ในขณะเดียวกันไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคแคระแกร็นหรือกุ้งพิการ (RDS) ในกุ้งขาว โดยจะพบอาการกรีดงอ หนวดงอ เปลือกไม่เรียบและเสียรูปร่าง และอัตราการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเป็นอาการเรื้อรังในกุ้งขาววัยรุ่นอายุ 2-3 เดือน (Kalagayan; et al. 1991: 235-243) (ภาพประกอบ 2) ในปัจจุบันพบการแพร่กระจายไปทั่วโลก ประเทศที่พบการระบาดแล้ว คือไต้หวัน สิงคโปร์ มาเลเซีย ไทย อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย ฟิลิปปินส์ เอกวาดอร์ เปรู อเมริกากลาง อเมริกา บราซิลและอิสราเอล และพบการระบาดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในเอเชีย ซึ่งกุ้งเต็มวัยที่ติดเชื้ออาจจะไม่แสดงอาการของโรคเลย แต่สามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปยังกุ้งตัวอื่น ๆ ในโรงเพาะฟักได้ (Bell; & Lightner. 1984: 185-194)

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีอัตราแลกเนื้อต่ำลง ทำให้เกษตรกรขาดทุนเนื่องจากกุ้งมีน้ำหนักลดลง การกินอาหารลดลง กุ้งกินกันเอง ทยอยตาย ลอยหัว กุ้งแข็งแรงจะมีขนาดสม่ำเสมอ สามารถจับมาคัดขนาดและขายในตลาดได้ง่าย แต่กุ้งติดเชื้อที่อ่อนแอจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ผิดขนาดและคัดขนาดลำบาก ขายไม่ได้ราคา กระทบต่อผลผลิตของฟาร์มและส่งผลกระทบเชิงลบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก

ภาพประกอบ 2 ลักษณะกุ้งขาวที่มีกรีคดงอ ผิดรูปร่าง โดยมีลักษณะคว่ำลง (รูปบน) หรือชี้ขึ้น (รูปล่าง) และมีความยาวของกรีน้อยกว่ากุ้งปกติ ซึ่งเป็นกลุ่มอาการ runt deformity syndrome (RDS) เมื่อมีการติดเชื้อ IHHNV

ที่มา T.W. Flegel. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. p.20.

การถ่ายทอดเชื้อ IHHNV มี 2 แบบ คือ แบบ horizontal transmission เป็นการถ่ายทอดเชื้อจากการกินกุ้งติดเชื้อที่ตายภายในบ่อเลี้ยง ส่วนการถ่ายทอดเชื้อแบบ vertical transmission เกิดจากการติดเชื้อผ่านทางแม่พันธุ์สู่ลูกกุ้ง เนื่องจากพบเชื้อไวรัสในไข่และรังไข่ (Lotz. 1997: 405-413) และได้ศึกษาความผิดปกติของรูปร่างที่เกี่ยวข้องกับ RDS ในกุ้งกุลาดำอายุ 17-18 เดือนที่ติดเชื้อ IHHNV จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของรูปร่างลักษณะโดยวัดความยาวของกรี เปลือกส่วนหัว ลำตัว ความกว้างของเปลือกส่วนหัว ปล้องที่หนึ่ง และน้ำหนักตัว พบว่ากุ้งกุลาดำแสดงอาการเหมือนกับกุ้งขาวที่ติดเชื้อ ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตลดลง เปลือกไม่เรียบและเสียรูปร่าง ซึ่งจะมีการแสดงออกของโรคขึ้นอยู่กับอายุและขนาด (Primavera; & Quinitio. 2000: 796-802)

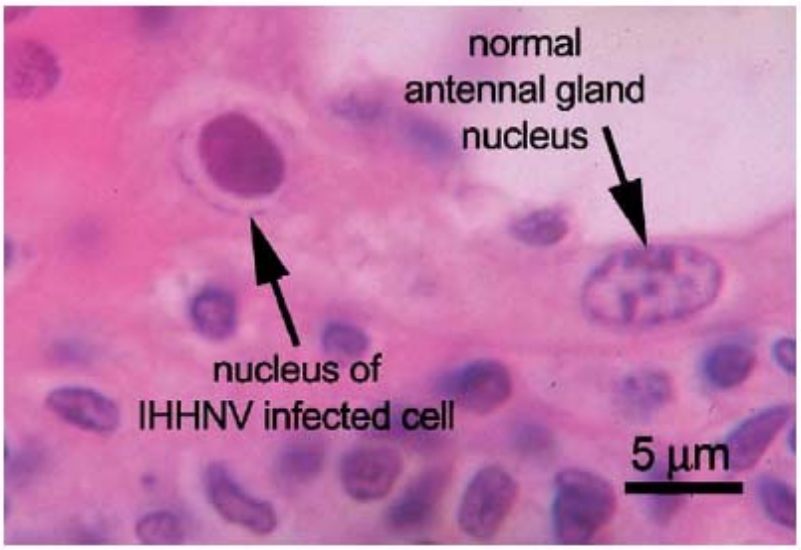
ในปี 2006 มีรายงานการศึกษาถึงผลกระทบที่เกิดจากการติดเชื้อ IHHNV ในกุ้งกุลาดำอายุ 4 และ 12 เดือนที่เลี้ยงในบ่อดิน พบว่ากุ้งในบ่อที่ไม่ติดเชื้อกับบ่อที่ติดเชื้อมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างกันและไม่มีการแสดงอาการของ RDS (ภาพประกอบ 3) ในบ่อที่ติดเชื้อ เมื่อใช้กุ้งในบ่อที่

ติดเชื้อเล็กน้อยเป็นแม่พันธุ์ พบว่าจำนวนไข่และนอเพลียส (nauplius) ที่สร้างไม่แตกต่างกับแม่พันธุ์ที่ไม่ติดเชื้อ ทำให้ทราบว่า IHHNV สามารถถ่ายทอดผ่านทางแม่พันธุ์สู่ลูกกุ้งแต่ไม่ส่งผลกระทบรุนแรงต่อการเจริญเติบโตของกุ้งหรือมีผลน้อยมากต่อลูกพันธุ์กุ้ง (Withyachumnarnkul; et al. 2006: 129-136) ต่อมามีรายงานการติดเชื้อ IHHNV ในลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (postlarva) และลูกกุ้งวัยเจริญพันธุ์ (sub-adult) ที่เลี้ยงในประเทศไต้หวัน มีอัตราการตายสูงประมาณร้อยละ 80-90 เมื่อทดสอบทางพยาธิวิทยาพบ eosinophilic intranuclear inclusion bodies (INIs) ภายใน hepatopancreatic tubular epithelial cell ของลูกกุ้งวัยอ่อน แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงในอวัยวะต้นกำเนิดของ ectoderm และ mesoderm ส่วนในลูกกุ้งวัยเจริญพันธุ์พบความผิดปกติของกล้ามเนื้อของปล้องที่ 4-6 และแพนหาง แต่ไม่ปรากฏ INIs และการตาย เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อ IHHNV ด้วยเทคนิค PCR และ *in situ* hybridization พบว่ามีการติดเชื้อ IHHNV ซึ่งเป็นรายงานแรกที่พบการติดเชื้อตามธรรมชาติในลูกกุ้งวัยอ่อนและลูกกุ้งวัยเจริญพันธุ์ของกุ้งก้ามกราม (Hsieh; et al. 2006: 73-79)

ภาพประกอบ 3 ลักษณะกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV ที่ไม่มีการแสดงอาการของ RDS

พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV

จากการศึกษากุ้งขาวและกุ้ง *P. stylirostris* ที่ติดเชื้อ IHHNV จะพบ inclusion bodies ที่มีลักษณะพิเศษที่เรียกว่า Cowdry type A nuclear inclusion body (CAIs) เมื่อตรวจวินิจฉัยทางพยาธิ-วิทยาของเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจาก ectoderm และ mesoderm ซึ่งไม่พบในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Lightner; et al. 1983: 212-225) โดยพบ inclusion bodies ย้อมติดสีแดงอยู่ภายในนิวเคลียส (eosinophilic intranuclear inclusion bodies) และมีช่องว่างเป็นลักษณะวงแหวนล้อมรอบ inclusion bodies ซึ่งดันนิวเคลียโครมาติน (nuclear chromatin) ไปอยู่ที่ขอบเซลล์ของเนื้อเยื่อเหงือก เนื้อเยื่อใต้เปลือกชั้น epidermis เซลล์ hypodermal epithelium ของทางเดินอาหารส่วนต้นและปลายเนื้อเยื่อรอบเส้นประสาท antennal gland อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haematopoietic organ) และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (Bell; & Lightner. 1984: 185-194) (ภาพประกอบ 4)

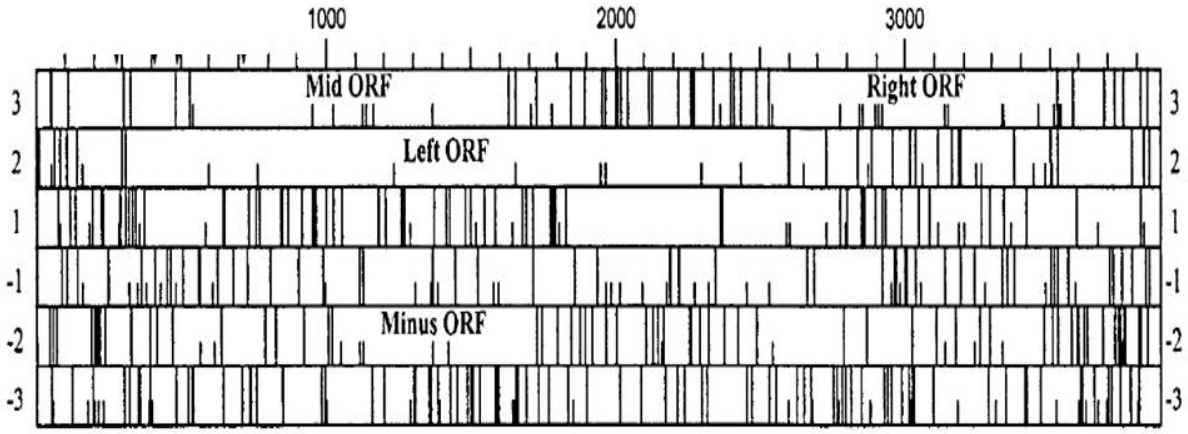


ภาพประกอบ 4 ลักษณะของ Cowdry type A nuclear inclusion body (CAIs) ของเชื้อ IHHNV ในนิวเคลียสของเซลล์ antenal gland ของกุ้งกุลาดำ

ที่มา T.W. Flegel. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. p.21.

ลักษณะการเรียงตัวของจีโนมของ IHHNV

การศึกษาลักษณะอนุภาคไวรัสของ IHHNV พบว่ามีลักษณะเป็น icosahedral ไม่มี envelope เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA; ssDNA) ความยาว 4.1 กิโลเบส (kb) โดยวัดความยาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มี buoyant density เฉลี่ย 1.4 กรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) และวิเคราะห์โปรตีนของอนุภาคไวรัสของ IHHNV ด้วย sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophorasis (SDS-PAGE) พบโปรตีนที่มีมวล 74, 47, 39 และ 37.5 กิโลดาลตัน (kDa) จากขนาดและรูปร่างของไวรัสได้จัดให้ IHHNV อยู่ในตระกูล Parvoviridae (Bonami; et al. 1990: 2657-2664) และผลจากการวิเคราะห์จีโนม IHHNV ความยาว 3,873 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วย 3 open reading frames (ORFs) และมีส่วนที่ไม่เป็นรหัส (noncoding) ที่ปลายทั้งสองของจีโนมของ IHHNV โดยตั้งอยู่บนสาย plus strand ประกอบด้วย Left ORF, Mid ORF และ Right ORF ที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 666, 363 และ 329 หน่วย ตามลำดับ และมีมวลโมเลกุล 75.77, 42.11 และ 37.48 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 5) โดย Left ORF ประกอบด้วยบริเวณที่เป็น replication initiator motif และ NTP-binding และ helicase domain ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ nonstructural protein (NS-1) ของ parvoviruses ชนิดอื่น ๆ โดย NS-1 ของ IHHNV มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ NS-1 ของ Brevidensovirus ในยุง ได้แก่ *Aedes aegypti* (*Aae*DNV) (ร้อยละ 28.2) และ *Aedes albopictus* (*Aal*DNV) (ร้อยละ 27.5) จากการค้นหาตำแหน่งที่คาดว่าจะเกิดกระบวนการ splicing พบว่าบริเวณปลาย N ของ NS-1 ของ IHHNV ตั้งอยู่ใน small ORF upstream ของ Left ORF ส่วน Right ORF ของ IHHNV พบว่าเป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง (structural polypeptdes; VPs) เหมือน parvoviruses ชนิดอื่น ๆ ดังนั้นโปรโมเตอร์ (promoter) ทั้งสองตั้งอยู่บริเวณ upstream ของ Left ORF และ Right ORF ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน NS และ VP ของ IHHNV ตามลำดับ และ Mid ORF เป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (Shike; et al. 2000: 167-177)

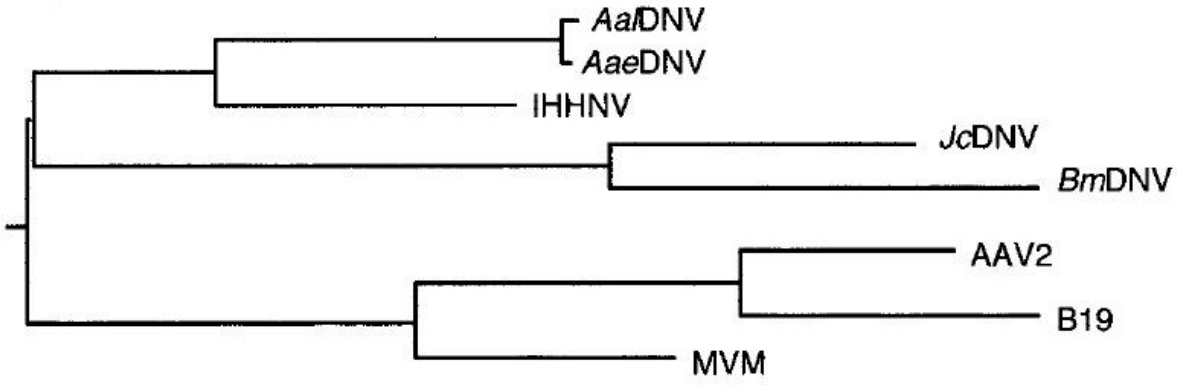


ภาพประกอบ 5 การจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอบนสาย plus strand ประกอบด้วย Left ORF, Mid ORF และ Right ORF (frames 1 2 และ 3) ที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 666, 363 และ 329 หน่วย ตามลำดับ และสาย minus strand (frames -1 -2 และ -3) ของจีโนม IHHNV โดยโคดอนเริ่มต้น (ATG) แสดงด้วยสัญลักษณ์ครึ่งหนึ่งของเส้นตรง และโคดอนหยุดแสดงด้วยสัญลักษณ์เส้นตรงเต็มช่อง

ที่มา Shike, H.; et al. (2000). Infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus of shrimp s related to mosquito Brevidensoviruses. *Virology*. p.171.

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและจีโนมของ IHHNV

ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ IHHNV จากกุ้ง *P. stylirostris* กับ Brevidensovirus ในยุงโดยศึกษาบริเวณ Left ORF ของเชื้อ IHHNV ประกอบด้วยบริเวณที่เป็น replication initiator motif และ NTP-binding และ helicase domain พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ nonstructural protein (NS-1) ของ parvoviruses ชนิดอื่น ๆ โดย NS-1 ของ IHHNV มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ NS-1 ของ Brevidensovirus ในยุง ได้แก่ *Aae*DNV และ *Aal*DNV เมื่อเปรียบเทียบกับ *Junonia coenia* densovirus (*Jc*DNV), *Bombyx mori* densovirus 5 (*Bm*DNV), adeno-associated virus-2 (AAV-2), parvovirus B19 (B19) และ minute virus of mice (MVM) (ภาพประกอบ 6) ดังนั้น IHHNV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ densovirus ในวงศ์ Brevidensovirus ในตระกูล Parvoviridae และอาจเรียก IHHNV ใหม่ว่า *Penaeus stylirostris* densovirus (*Pst*DNV) (Shike; et al. 2000: 167-177)



ภาพประกอบ 6 Phylogenic tree ที่ได้จากการ Alignment ของบริเวณ NTP-binding และ helicase domain ของ parvoviruses ในยุงและสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยพบว่า IHHNV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Brevidensovirus ในยุง

ที่มา Shike, H.; et al. (2000). Infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus of shrimp s related to mosquito Brevidensoviruses. *Virology*. p.171.

ในปี 2002 ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอและโปรตีนของไวรัสใน Densovirinae จากข้อมูลใน GenBank ซึ่งประกอบด้วย parvovirus ในแมลงและในกุ้ง สำหรับไวรัสในแมลงที่นำมาวิเคราะห์ คือ *Aae*DNV, *Aal*DNV, *Jc*DNV, *Galleria mellonella* densovirus (*Gm*DNV), *Bm*DNV, *Diatraea saccharalis* densovirus (*Ds*DNV) และ *Periplaneta fuliginosa* densovirus (*Pf*DNV) ส่วนไวรัสในกุ้งคือ HPV*mon* จากกุ้งกุลาดำ HPV*chin* จากกุ้ง *P. chinensis*, spawner-isolated mortality virus จากกุ้งกุลาดำ (SMV*mon*) และ IHHNV จากกุ้งขาว โดยขนาดของอนุภาคไวรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง 18-30 นาโนเมตร และมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ขนาด 4-6 กิโลเบส จากการใช้โปรแกรม Blast พบว่าไม่มีบริเวณใดบนลำดับดีเอ็นเอของไวรัสที่คล้ายกัน นอกจากดีเอ็นเอของ HPV*mon* และ HPV*chin* ที่มีความคล้ายกันถึงร้อยละ 77 ส่วนการใช้โปรแกรม ClustalW นั้นให้ผลที่เหมือนกับโปรแกรม Blast แต่เมื่อใช้โปรแกรม ClustalW ในการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอแต่ละคู่พบว่า IHHNV มีบางส่วนที่คล้ายกับ *Aae*DNV และ *Aal*DNV เมื่อนำดีเอ็นเอของไวรัสในแมลงและในกุ้งมาสร้าง phylogenetic tree สามารถแบ่งไวรัสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย SMV*mon, Pf*DNV, *Ds*DNV, *Gm*DNV, *Jc*DNV และ *Bm*DNV ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย HPV*mon*, HPV*chin*, IHHNV, *Aae*DNV และ *Aal*DNV (ภาพประกอบ 7) ซึ่งผลจากการจัดกลุ่มนี้พบว่า IHHNV อยู่กลุ่มเดียวกับ *Aae*DNV และ *Aal*DNV ตรงกับรายงานในปี 2000 ของ Shike และคนอื่น ๆ ที่พบความสัมพันธ์ของกรดอะมิโน 199 หน่วยของบริเวณ NTP-binding และ helicase domain ทำหน้าที่สังเคราะห์ nonstructural protein (NS-1) ใน IHHNV และ

parvoviruses ในแมลงได้แก่ *Aae*DNV และ *Aal*DNV และจากผลของการจัดกลุ่มแสดงให้เห็นว่าไวรัสกุ้งทั้ง 4 ชนิด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสในแมลง 2 กลุ่ม อาจเป็นไปได้ว่าไวรัสอาจมีความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์ที่เป็นอาร์โทรพอด (arthropod) มาเป็นเวลายาวนาน (Roekring; et al. 2002: 79-87)

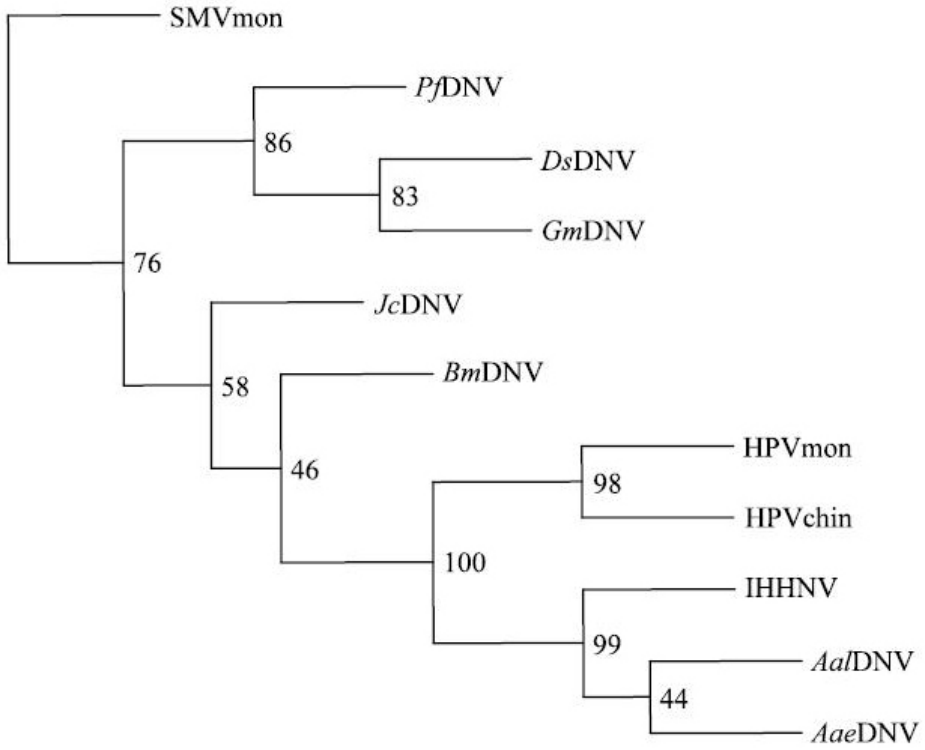
จากการศึกษาชิ้นส่วนของจีโนมของ IHHNV ความยาว 2.9 กิโลเบส ที่ประกอบด้วยรหัสในการสังเคราะห์ non structural protein และแคปซิดโปรตีน ซึ่งแยกได้ 14 isolate จากกุ้งในฮาวายและพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศอเมริกา ในปี 1982-1997 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าจีโนมของ IHHNV มีการเปลี่ยนแปลง โดยมีความหมือนร้อยละ 99.6-100 และพบเพียงการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ โดยร้อยละของการแทนที่ในบริเวณแคปซิดโปรตีน (ร้อยละ 1.3) สูงกว่าบริเวณ non structural protein (ร้อยละ 0.6) ซึ่งการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 25 ตำแหน่ง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 14 หน่วย แต่ไม่มีผลกับการแสดงอาการของโรค และการแทนที่ของกรดอะมิโน จากการศึกษาวิวัฒนาการนี้สามารถแบ่ง IHHNV ตามลักษณะภูมิประเทศที่พบได้ (Tang; & Lightner. 2002: 93-97)

จากข้อมูลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ของจีโนมและสายวิวัฒนาการ (Shike; et al. 2000: 167-177) พบว่า IHHNV จัดอยู่ใน

Family *Parvoviridae*

Subfamily *Densovirinae*

Genus *Brevidensovirus*



ภาพประกอบ 7 Phylogenic tree ที่ได้จากการ Alignment ลำดับดีเอ็นดีของจีโนมของ parvo-viruses ในแมลงและกุ้ง ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอแต่ละคู่พบว่า IHHNV มีบางส่วนที่คล้ายกับ *Aae*DNV และ *Aal*DNV และสามารถแบ่งไวรัสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย SMV*mon,* *Pf*DNV, *Ds*DNV, *Gm*DNV, *Jc*DNV และ *Bm*DNV ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย HPV*mon*, HPV*chin*, IHHNV, *Aae*DNV และ *Aal*DNV

ที่มา Roekring, S.; et al. (2002). Comparison of penaeid shrimp and insect parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. *Virus Research.* p.83.

แคปซิดโปรตีนของ IHHNV

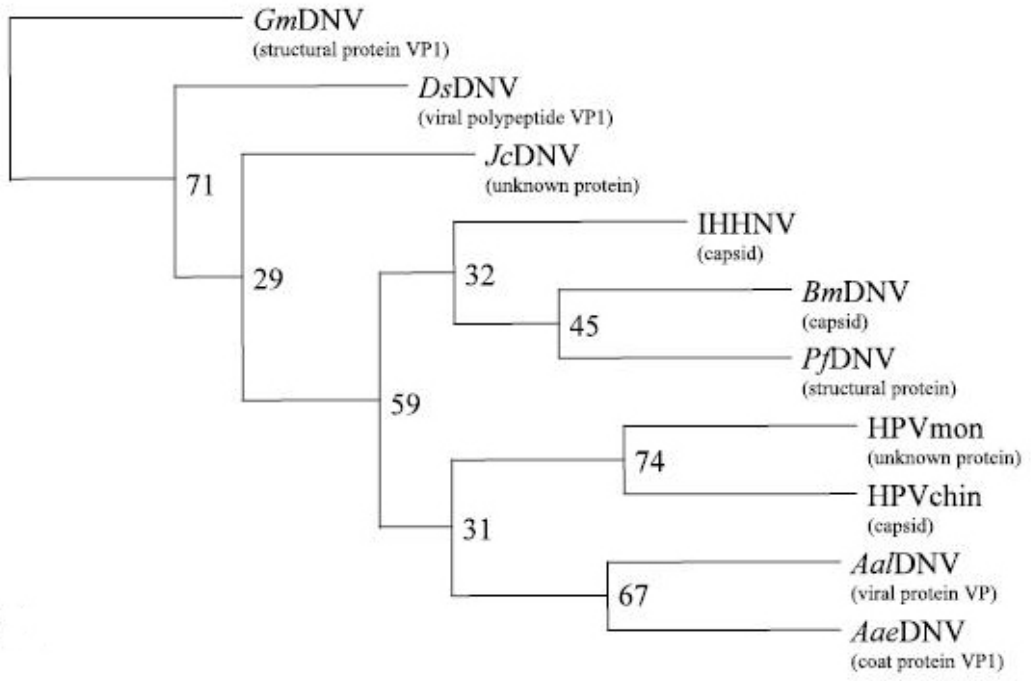
โปรตีนขนาด 37 กิโลดาลตัน เป็นแคปซิดโปรตีนของไวรัส IHHNV โดยยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างแคปซิดโปรตีนของ IHHNV ตั้งอยู่บน Right ORF ตำแหน่ง 2,758 - 3,747 (ภาพประกอบ 8) มีความยาว 990 นิวคลีโอไทด์ ที่สังเคราะห์โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 329 หน่วย โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแคปซิดโปรตีนประกอบด้วย adenine (A) ร้อยละ 20.68 cytosine (C)

ร้อยละ 19.00 guanine (G) ร้อยละ 24.04 และ thymidine (T) ร้อยละ 36.28 ดังนั้นปริมาณ A+T เท่ากับร้อยละ 56.96 และปริมาณ G+C เท่ากับร้อยละ 43.04

```
2758 atgtgcgccgattcaacaagagcaagcccaaggaaaagatccagg
      M  C  A  D  S  T  R  A  S  P  R  K  R  S  R
2803 agggatgcacataatgaagacgaagaacacgccgaaggatcaagt
      R  D  A  H  N  E  D  E  E  H  A  E  G  S  S
2848 ggaccagacccacacagatgtctacaattcaatactggagactca
      G  P  D  P  H  R  C  L  Q  F  N  T  G  D  S
2893 atacatattactttccaaacaagaagatacttcgaattcgacgct
      I  H  I  T  F  Q  T  R  R  Y  F  E  F  D  A
2938 gccaatgatggaaacttcgacggaaaaaatttatactgcctccca
      A  N  D  G  N  F  D  G  K  N  L  Y  C  L  P
2983 ctacattggatgaacttatatctctatggtctaaagagcagcgac
      L  H  W  M  N  L  Y  L  Y  G  L  K  S  S  D
3028 agttcagcaacagaaacacaacgatataagatggtaaaatcaatg
      S  S  A  T  E  T  Q  R  Y  K  M  V  K  S  M
3073 atgaagacctacggatggaaagtacataaagcaggcgtagtgatg
      M  K  T  Y  G  W  K  V  H  K  A  G  V  V  M
3118 cactcgatggtacccctatgaaagacttaaaagtatcaggaggc
      H  S  M  V  P  L  M  K  D  L  K  V  S  G  G
3163 acatcatttgagactctcacatttacagacaccccatatttagaa
      T  S  F  E  T  L  T  F  T  D  T  P  Y  L  E
3208 atatttaaggatactactggactacataatcaactatcaactaag
      I  F  K  D  T  T  G  L  H  N  Q  L  S  T  K
3253 gaagccgacgtaacattggcaaaatggatacaaaatccccaactt
      E  A  D  V  T  L  A  K  W  I  Q  N  P  Q  L
3298 gtgaccgtacaatcaacagcagcaaactatgaagacccaatccaa
      V  T  V  Q  S  T  A  A  N  Y  E  D  P  I  Q
3343 caatttggattcatggaacaaatgcgaaccggtgacagaaaagcc
      Q  F  G  F  M  E  Q  M  R  T  G  D  R  K  A
3388 tatacaatccatggtgacactagaaattggtatggcggagaaata
      Y  T  I  H  G  D  T  R  N  W  Y  G  G  E  I
3433 ccaacaaccggacccaccttcatcccaaaatggggtggtcaatta
      P  T  T  G  P  T  F  I  P  K  W  G  G  Q  L
3478 aaatgggacaaaccatcccttggaaacctagtctacccagcagac
      K  W  D  K  P  S  L  G  N  L  V  Y  P  A  D
3523 caccatacaaacgactggcaacagatcttcatgagaatgtcacca
      H  H  T  N  D  W  Q  Q  I  F  M  R  M  S  P
3568 atcaaaggaccaaatggagacgaacttaaacttggctgcagagta
      I  K  G  P  N  G  D  E  L  K  L  G  C  R  V
3613 caagccgacttcttcctacacctagaagtacgactcccaccacaa
      Q  A  D  F  F  L  H  L  E  V  R  L  P  P  Q
3658 ggatgtgtcgcaagtttggggatgttacaatatcttcacgcacca
      G  C  V  A  S  L  G  M  L  Q  Y  L  H  A  P
3703 tgtactggacaacttaacaaatgttatattatgcatactaactaa 3747
      C  T  G  Q  L  N  K  C  Y  I  M  H  T  N  *
```

ภาพประกอบ 8 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีน IHHNV (Genbank accession no: AF218266)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนของ parvovirus ในแมลงและในกุ้ง โดยใช้โปรแกรม LALIGN ซึ่งเป็น global alignment นำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนของ IHHNV มีความคล้ายกับ *Aae*DNV และ *Aal*DNV น้อย แต่มีความคล้ายกับ *Bm*DNV และ *Pf*DNV (ภาพประกอบ 9) ซึ่งให้ผลแตกต่างกับ phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนของ NS-1 ที่พบว่า IHHNV มีความใกล้ชิดกับ *Aae*DNV และ *Aal*DNV ดังนั้นการสร้าง phylogram จากลำดับกรดอะมิโนของ NS-1 ให้ผลเหมือนกับ phylogram จากลำดับดีเอ็นเอ ดังนั้น NS-1 มีการอนุรักษ์มากกว่าลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีน (Roekring; et al. 2002:79-87)



ภาพประกอบ 9 Phylogenic tree ที่ได้จากการ Alignment ลำดับกรดอะมิโนของ parvoviruses ในแมลงและกุ้ง โดยลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนของ IHHNV มีความคล้ายกับ *Bm*DNV และ *Pf*DNV ซึ่งให้ผลแตกต่างกับ phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนของ NS-1 ที่พบว่า IHHNV มีความใกล้ชิดกับ *Aae*DNV และ *Aal*DNV

ที่มา Roekring, S.; et al. (2002). Comparison of penaeid shrimp and insect parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. *Virus Research.* p.83.

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของ IHHNV นี้เป็นประโยชน์ในการนำลำดับดีเอ็นเอของยีนแคปซิดโปรตีนมาโคลนและแสดงออกเพื่อใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) และพัฒนาเป็นโมโนโคลนอล-แอนติบอดีต่อไป เนื่องจากแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียว จึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะแก่การตรวจวินิจฉัยกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV โดยใช้แอนติบอดี นอกจากนี้การใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งที่ติดเชื้อ โดยออกแบบ primer ที่มีบริเวณตัดจำเพาะ (restriction site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างแคปซิดโปรตีนของ IHHNV ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกนำมาสร้างแคปซิดโปรตีนอย่างแท้จริง โดย primer ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ IHHNV จะได้ผลผลิต PCR ขนาด 1,007 คู่เบส (bp) แปลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 329 หน่วย จากนั้นโคลนยีนแคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I เข้าสู่พลาสมิด pCR® Blunt vector และนำพลาสมิด (transformation) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10 ทำการคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิ-แนนท์พลาสมิด pCR-Blunt-IHHNV โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I จากนั้นโคลนชิ้นส่วนของยีนแคปซิดโปรตีนเข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ทำการคัดเลือกโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (รุ่งทิวา จันทะเกต. 2547)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ลิมโฟซัยท์ชนิด B (B cell) จำนวนมากจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและมีการพัฒนาต่อไปจนกระทั่งทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ลิมโฟซัยท์ชนิด B แต่ละเซลล์จะผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันไป แอนติบอดีผสมเหล่านี้เรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพราะแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมามีความจำเพาะต่ออิพิโทป (epitope) ต่าง ๆ ที่อยู่บนผิวของแอนติเจนได้ในเวลาเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามโมโนโคลนของเซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) ที่ผลิตได้ทั้งหมดนี้จะมีความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนเพียงอิพิโทปเดียวเหมือน ๆ กัน (สุทธิพันธ์; และคนอื่น ๆ. 2537)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีคิดค้นในช่วงกลางปี 1970 ทำได้โดยฉีดแอนติเจนที่สนใจเข้าไปในหนู จากนั้นหนูก็จะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยการที่ม้ามของหนูจะกระตุ้นลิมโฟซัยท์ชนิด B ให้จดจำแอนติเจน จากนั้นนำลิมโฟซัยท์ชนิด B จากม้ามของหนูมาผสมกับ myeloma cell หรือ malignant B cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด เมื่อเซลล์ 2 ชนิด

เชื่อมเกิดการหลอมรวมกันจะได้เซลล์ใหม่เรียกว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519)

ไฮบริโดมามีส่วนหนึ่งของเซลล์ที่มีคุณสมบัติของ myeloma cell ขณะเดียวกันอีกส่วนหนึ่งมีคุณสมบัติของเซลล์ม้าม ทำให้ไฮบริโดมาสามารถหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเพียงชนิดเดียวได้ ซึ่งเรียกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี การหลอมรวม myeloma cell กับลิมโฟซัยท์ชนิด B จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่ การใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ myeloma cell ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่าง myeloma cell กับลิมโฟซัยท์ชนิด B เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากลิมโฟซัยท์ชนิด B ส่วนลิมโฟซัยท์ชนิด B ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig^-) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้ามและ myeloma cell เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันรูปแบบต่าง ๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่น ๆ ตามความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ถูกผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกในปี 1975 และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัย นักวิทยาศาสตร์ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในหลาย ๆ ด้านโดยเฉพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคและการบำบัดโรค การตรวจวินิจฉัยโรคในหลาย ๆ กรณีได้ใช้โมโนโคลนอล-แอนติบอดีมาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างได้ผล โดยทั่ว ๆ ไปวิธีการเหล่านี้มีความไวและมีความแม่นยำมากกว่าวิธีการที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอล

แอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ดังนั้น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHHNV ของงานวิจัยนี้จึงคาดว่าสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในกุ้งที่เพาะเลี้ยงได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มียีนแคปซิดโปรตีนของ IHHNV (pGEX-6P-1-IHHNV)

จากปัญหาพิเศษเรื่องการโคลนและการแสดงออกของยีนแคปซิดโปรตีนของ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ในกุ้งขาวของรุ่งทิวา จันทะเกต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปี 2547

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

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

2.2 กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV ได้รับการอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ อุดมกิจ สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 1

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์	Bio-Rad
2. ชุด mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
3. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
4. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
5. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinets)	NUAIRE
6. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO_2 incubator)	NUAIRE
7. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JENWAY
8. เครื่อง rotary microtome รุ่น RM2135	LEICA
9. เครื่อง thermal cycler	Eppendorf

4. เคมีภัณฑ์

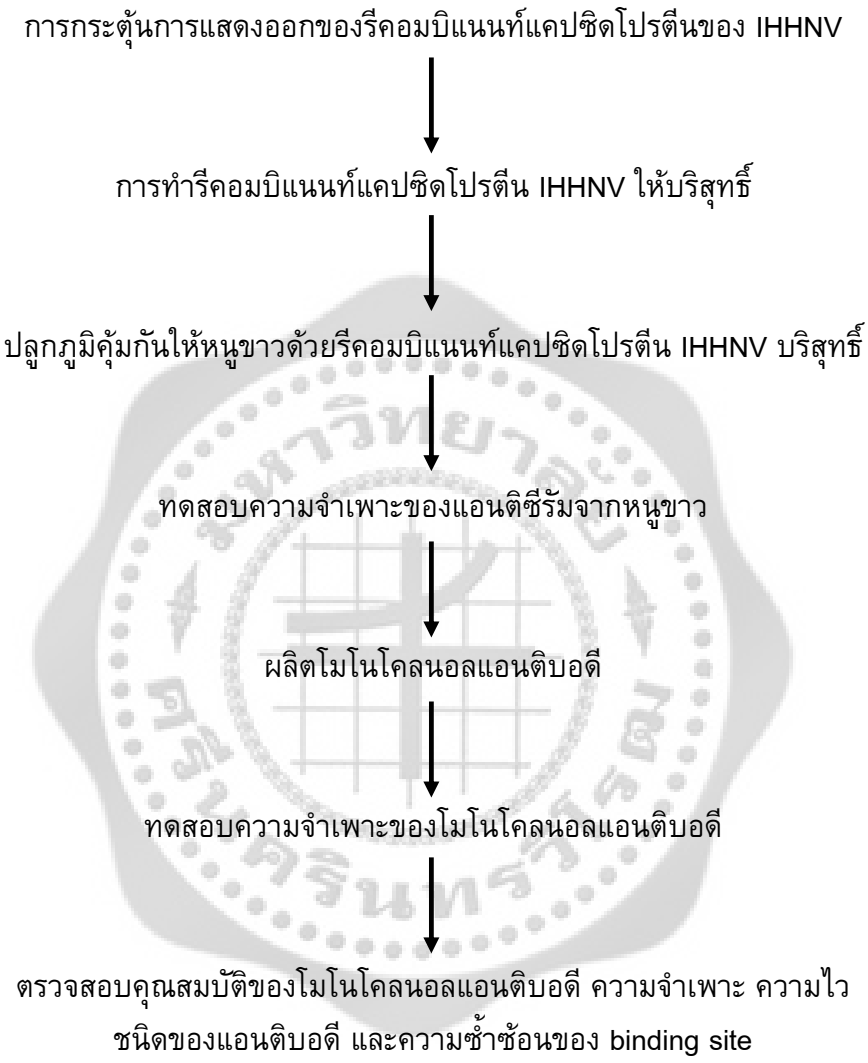
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

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

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้



1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน IHHNV โดยเริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ IHHNV (pGEX-6P-1-IHHNV) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ บ่มข้ามคืนใน shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นแบ่งแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตรใส่ลงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร และมี ampicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้นโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำแบคทีเรียไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติม buffer B (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM จากนั้นนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

2. การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาผสมกับ 2X SDS-treatment buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pGEX-6P-1 (GST) ซึ่งผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 กิโลดาลตัน (kDa) เป็น positive control (เพื่อดูความสำเร็จในการกระตุ้นด้วย IPTG) และแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิดเป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IHHNV เทียบกับโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 (GST)

3. การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ให้บริสุทธิ์

การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาแยกโดยใช้ 10% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 แล้วแช่เจลในสารละลาย 0.3 M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที ตัดแถบที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนนำไปแช่ในสารละลาย 1% SDS ข้ามคืน

เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis แล้วแช่ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator (Speed-Vac.) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอล-แอนติบอดี (ชุติมา ศรีสุข. 2551)

4. การตรวจการติดเชื้อ IHHNV ในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี PCR

การตรวจการติดเชื้อ IHHNV ในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี PCR ทำโดยเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ IHHNV โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และ forward primer (IHHNVF): 5'-CGG GAT CCA TGT GCG CCG ATT CAA CAA G-3' และ reverse primer (IHHNVR): 5'-CCG CTC GAG TTA GTT AGT ATG CAT AAT ATA AC-3' โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด thin wall ขนาด 200 ไมโครลิตร ที่มี 200 µM dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$, 25 pmol IHHNVF primer, 25 pmol IHHNVR primer, 2.5 unit *Taq* DNA Polymerase และปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำหลอด thin wall ที่ผสมสารต่าง ๆ เรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีน (ตาราง 3)

ตาราง 3 ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของ IHHNV โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ด้วยวิธี PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
1. initial denaturation	94	2 นาที	ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 35 รอบ
2. denaturation	94	30 วินาที	
3. annealing	54	30 วินาที	
4. extension	72	1 นาที	
5. final extension	72	10 นาที	

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิต PCR ของ IHHNV มีขนาด 1,007 คู่เบส โดยกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV นี้จะนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ IHHNV ต่อไป

5. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ IHHNV

5.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ได้จากข้อ 3 ผสมในอัตราส่วน 1:1 กับ complete Freund's adjuvant จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว จำนวน 4 ตัว ๆ ละ 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิกรัมของโปรตีน) และฉีดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IHHNV ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์เก็บซีรัมจากหนูแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ IHHNV โดยวิธี immunohistochemistry เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IHHNV ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ IHHNV

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Köhler; & Milstein 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี 1979 (Mosmann; Bauman; & Williamson 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม 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 ตรวจดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่าง ๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมาไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHHNV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immuno-histochemistry

5.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

จากการผลิตไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 wells microculture plate อาจมีจำนวนถึง 20 เพลต ทำให้คาดว่าอาจจะได้ไฮบริโดมาจำนวนมากจึงต้องคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อน จากนั้นจึงนำโคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting จึงนำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry ต่อไป (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector ในการผลิตโปรตีนทำให้ได้โปรตีนลูกผสมของ GST จาก vector กับโปรตีนที่ต้องการ ดังนั้นในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting จึงต้องหยด lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 2 ชนิดคือ lysate ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV และ lysate ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 (GST) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อโปรตีนของ IHHNV เท่านั้น จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำยาเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto = 1% non fat dry milk, 0.1% triton X-100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1:1,500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อโปรตีน IHHNV แต่ไม่จำเพาะต่อ GST นำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และ immunohistochemistry ต่อไป

5.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

นำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV มาแยกบน 10% SDS-PAGE ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของเจลมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:200 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

5.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี immunohistochemistry

นำส่วนหัวกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV และส่วนหัวกุ้งปกติแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้งเพื่อกำจัด fixative ออก นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก และไซลีน (xylene) แล้วนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมครอน ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินแล้วนำไปอบที่ตู้อบ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene (deparaffination) จากนั้นผ่านลง butanol และแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นมากไปน้อย ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 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 ย้อมซ้ำด้วยสี haematoxylin และ eosin Y (H & E) ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายกุ้งที่ติดเชื้อ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ขั้นจะนำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar. 1985: 1-42) จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนและเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไปและทำการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

6. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากโคลนซ้ำไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA จากนั้นตรวจสอบชนิดของ heavy chain และ light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ IHHNV ด้วยวิธี dot blotting ดังต่อไปนี้

6.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

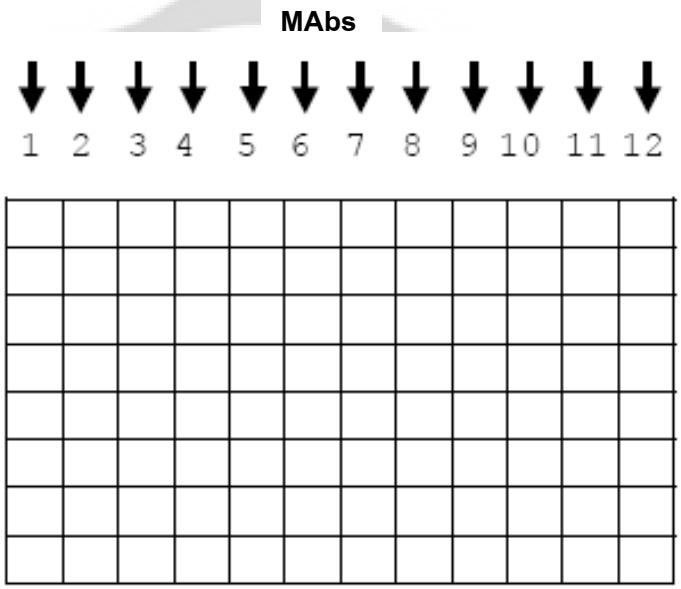
ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย blotto เข้มข้น 5% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย blotto เข้มข้น 5%) ลงในหลุมต่าง ๆ ของถาด 96 หลุม (ภาพประกอบ 10) จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% จากนั้นเติม GAM–HRP เจือจาง 1:1500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006% H_2O_2 ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 M pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N H_2SO_4 ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader (อภิรักต์ ตันศิริสิทธิกุล. 2548)

MAbs IHHNV	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

ภาพประกอบที่ 10 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ)

6.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

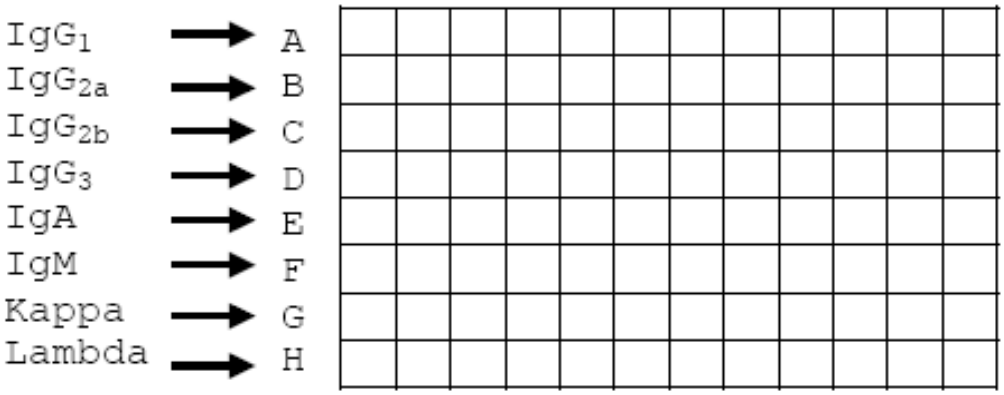
ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ดังนี้ เคลือบถาดหลุม 96 หลุมด้วย goat anti-mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 11)



ภาพประกอบที่ 11 การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA ลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบซึ่งสร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 โดย 1 คอลัมน์ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 โคลน

เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H (ภาพประกอบที่ 12) จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติม HRP-goat anti-rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ 10 นาที และผ่านกระบวนการ immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของการตรวจสอบอิพิโทป



ภาพประกอบที่ 12 ลูกศรแสดงการเติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถว ตั้งแต่แถว A-H เพื่อใช้ในการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา

6.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IHHNV และเชื้อ IHHNV ที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV และเชื้อ IHHNV ที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมาทำเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตร-เซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:200 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูระดับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

6.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV และเชื้อ TSV และ WSSV ในกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), MBV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), HPV (ชุติมา ศรีสุข. 2551) และ YHV

(Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) และเชื้อ TSV และ WSSV ในกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV และสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อ TSV และ WSSV ตามธรรมชาติมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:200 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase จากนั้นตรวจดูปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV โดยสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

6.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาตินั้นทำเช่นเดียวกับวิธี immunohistochemistry ที่ใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHHNV จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาบริเวณที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายของกุ้งที่ติดเชื้อ

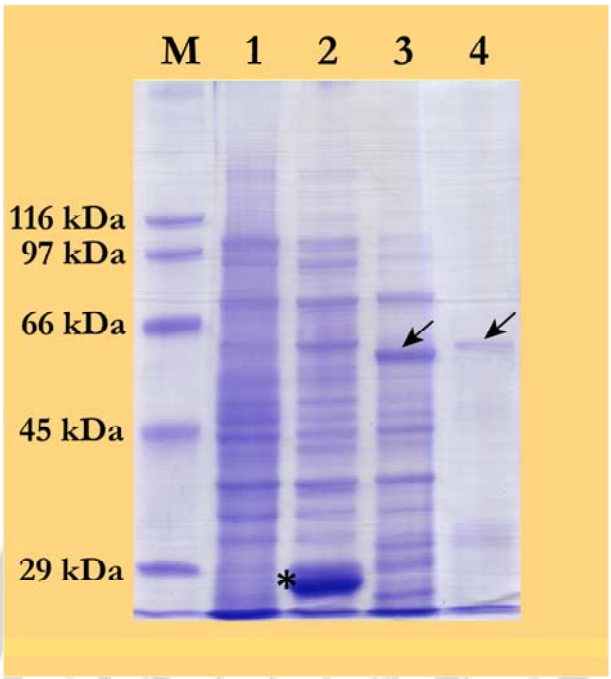
บทที่ 4
ผลการทดลอง

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV

จากการนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV มากระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างแคปซิดโปรตีนของ IHHNV โดยใช้ 1 mM IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ *tac* promoter เก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงและวิเคราะห์การสร้างรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนโดยแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ซึ่งมีขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 3) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ได้จะมีโปรตีน GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N โดยที่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่พบโปรตีนดังกล่าว (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 1) ส่วนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 จะมีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 2)

การแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ให้บริสุทธิ์

จากการแยกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ให้บริสุทธิ์โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV แยกด้วย 10% SDS-PAGE และแช่เจลใน 0.3 M KCl จะพบแถบโปรตีนเป็นสีขาวขุ่น จากนั้นตัดแถบเจลบริเวณที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV แล้วแยกโปรตีนออกจากเจลโดยแช่เจลใน 1% SDS ข้ามคืน และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น และเมื่อนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน IHHNV เท่ากับ 63 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13 แถวที่ 4) และจะพบแถบโปรตีนขนาดเล็ก ซึ่งคาดว่าอาจเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สลายตัว (degrade product)



ภาพประกอบ 13 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ IHHNV โดยนำมาแยกใน 10% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย 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 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-IHHNV

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ทำให้บริสุทธิ์

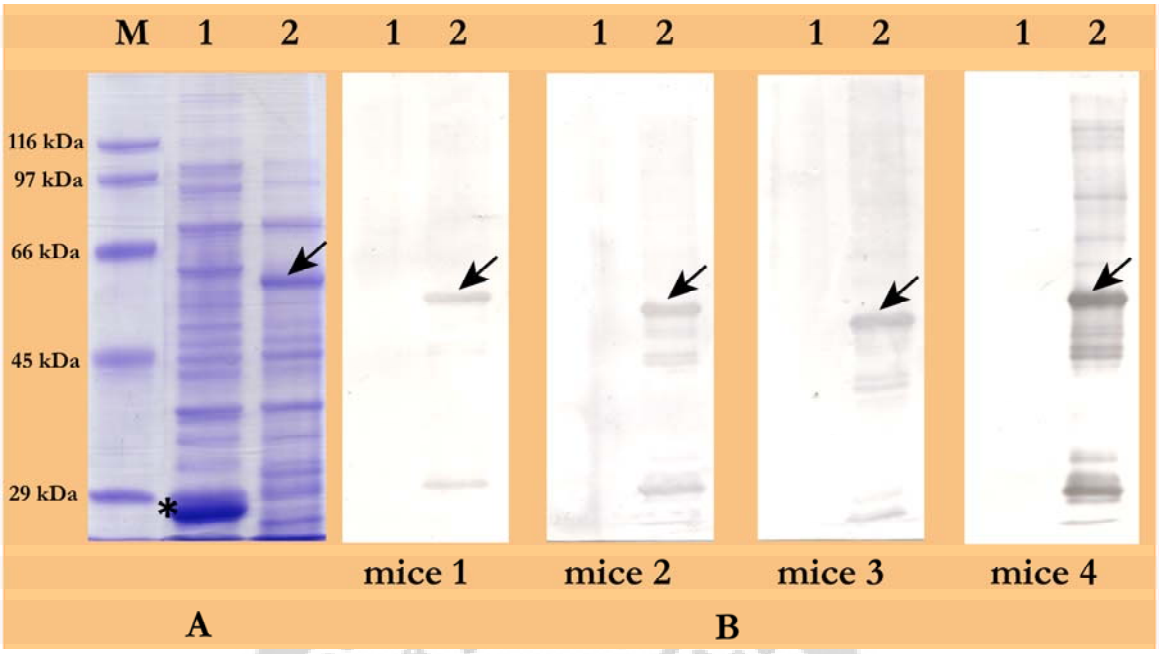
M คือ โปรตีนมาตรฐาน

* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

↙ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHHNV

จากการนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 310 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว โดยฉีดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ที่ทำให้บริสุทธิ์ให้หนูขาว 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร/ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนได้ทุกตัวในระดับที่แตกต่างกัน โดยแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV และสามารถจับกับโปรตีนขนาดเล็กกว่าแถบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนจำนวนมาก คาดว่าอาจเกิดจากการสลายของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในระหว่างการเตรียม โดยหนูตัวที่ 4 สามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนจากวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 14) และต่อเชื้อ IHHNV จากวิธี immunohistochemistry ได้ดีที่สุด จึงเลือกมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากการผลิตและทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV โดยวิธี dot blotting และ Western blotting พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV ได้จำนวน 5 โคลน (ตาราง 4) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับแคปซิดโปรตีนขนาด 37 กิโลดาลตันของ IHHNV ที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 15 แถวที่ 3) และ dot blotting (ภาพประกอบ 16) สำหรับการตรวจเชื้อ IHHNV ในกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV สามารถจับกับ inclusion bodies ภายในนิวเคลียสของเนื้อเยื่ออวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ปมประสาท หัวใจ เหงือก และเยื่อบุผิวหนังใต้เปลือก (cuticular epidermis) ของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อกุ้งปกติ (ภาพประกอบ 17) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5 สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ชัดเจนมากและโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-7, IH 1-13, IH 3-12 และ IH 3-14 สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ชัดเจน (ตาราง 4)



ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B) แอนติซีรัมถูกดูดซับแอนติบอดีที่เจือปนก่อน (preabsorption) ด้วย lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน พบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัว สามารถตอบสนองต่อรีคอม-บิแนนท์แคปซิดโปรตีน IHHNV ได้

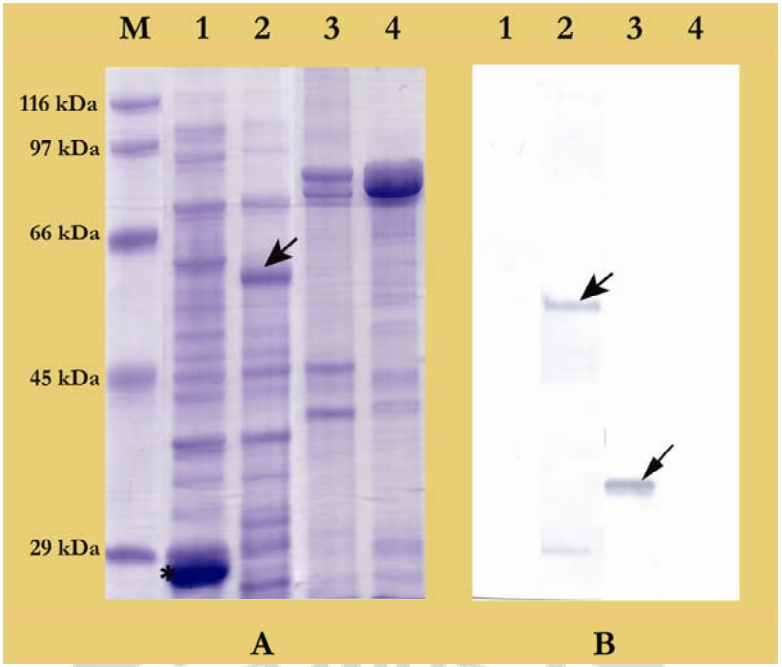
แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

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

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

↙ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IHHNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน



ภาพประกอบ 15 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ โดยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B) โดยแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 เจลอีกส่วนนำมาทำ Western blotting โดยทดสอบกับ (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5

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

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

แถวที่ 3 สารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV ตามธรรมชาติ

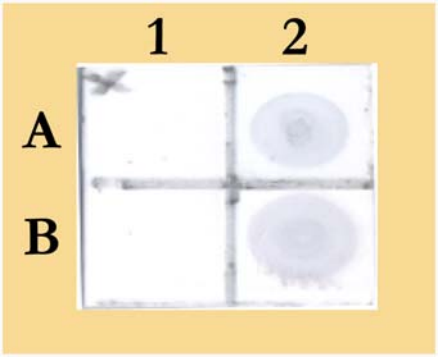
แถวที่ 4 สารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งปกติ

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

↙ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IHHNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน

↙ คือ แคปซิดโปรตีน IHHNV ขนาด 37 กิโลดาลตัน



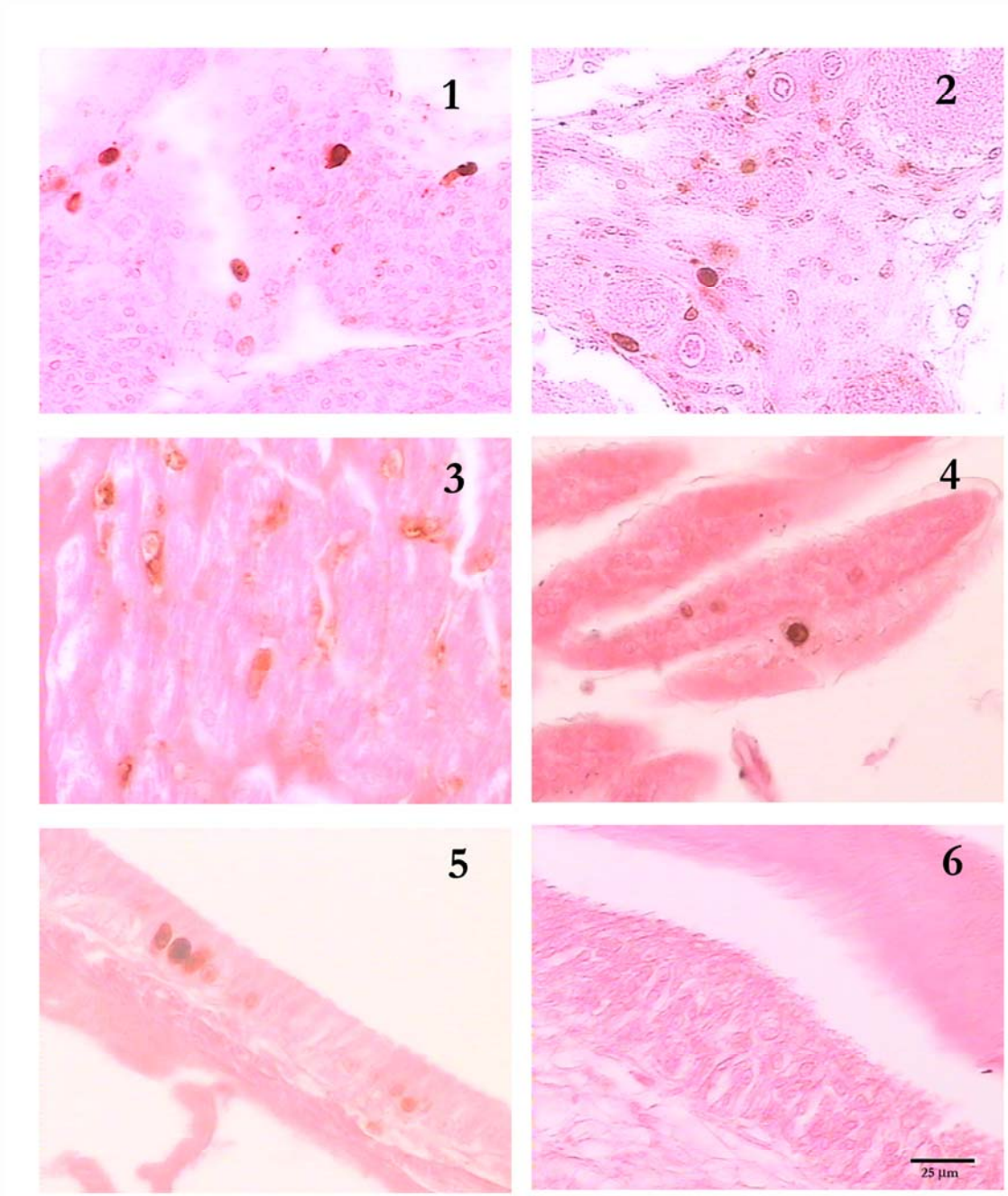
ภาพประกอบ 16 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ IHHNV ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่าง ๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้

แถว A (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

(2) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน IHHNV ที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถว B (1) สารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งปกติ

(2) สารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV ตามธรรมชาติ



ภาพประกอบ 17 การตรวจการติดเชื้อ IHHNV ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5 (1) อวัยวะน้ำเหลือง (2) ปมประสาท (3) หัวใจ (4) เหงือก (5) เยื่อบุผิวหนังใต้เปลือก พบ immunoreactivity บริเวณ inclusion bodies ภายในนิวเคลียสของเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเห็นติดเป็นสีน้ำตาล (6) ผิวหนังใต้เปลือกของกุ้งปกติที่ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5 ซึ่งไม่พบ immunoreactivity

การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ IHHNV แต่ละโคลนมาผสมรวมกัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนมีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวกัน เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดเดียวกันที่ผสมกันเอง แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีจับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-7, IH 1-13, IH 3-12 และ IH 3-14 คาบเกี่ยวกับ IH 1-5 แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-7 และ IH 3-12 ต่างจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-13 และ IH 3-14 (ภาพประกอบ 18)

MAbs IHHNV	IH 1-5	IH 1-7	IH 1-13	IH 3-12	IH 3-14
IH 1-5	0.976[1]	0.852	0.838	0.851	0.848
IH 1-7		0.796[1,2]	0.821	0.797	0.832
IH 1-13			0.785[1,3]	0.814	0.792
IH 3-12				0.811[1,2]	0.830
IH 3-14					0.811[1,3]

ภาพประกอบ 18 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ (ตัวเลขที่เหมือนกันเหนือค่า OD คือโมโนโคลนอล-แอนติบอดีกลุ่มต่าง ๆ ที่จับกับอิพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน)

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa **(K)** (ตาราง 4)

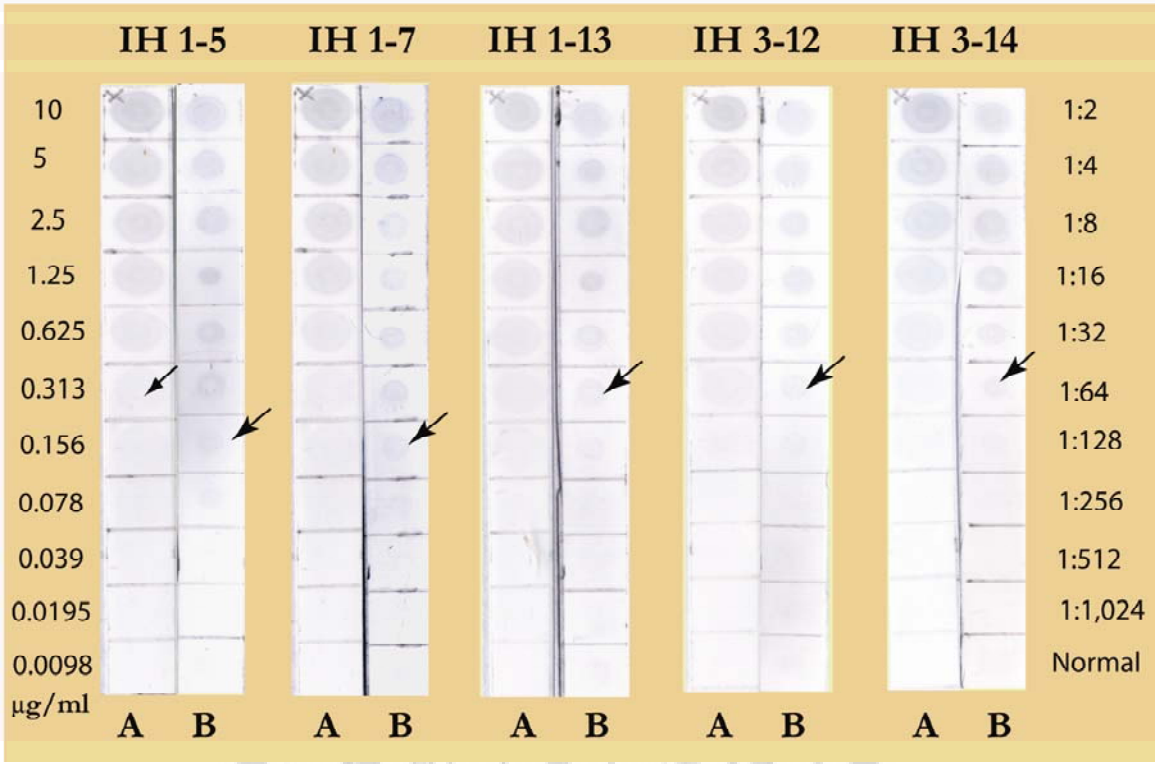
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV โดยวิธี dot blotting พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจหารีคอม-บิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไวในระดับใกล้เคียงกันคือ 0.313 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ

ประมาณ 300 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5, IH 1-7 และ IH 1-13 สามารถตรวจหาเชื้อ IHHNV จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:128 โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 3-12 และ IH 3-14 สามารถตรวจหาเชื้อ IHHNV จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:64 ได้ (ภาพประกอบ 19) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ IHHNV ทั้ง 5 โคลนนี้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), MBV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), HPV (ชุติมา ศรีสุข. 2551) และ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) (ภาพประกอบ 20) และสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV และ WSSV (ภาพประกอบ 21) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ของเชื้อ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี immunohistochemistry (ภาพประกอบ 22)

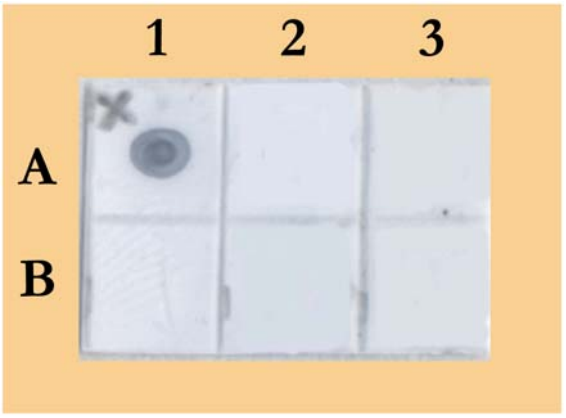
ตาราง 4 ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ IHHNV ที่ผลิต ซึ่งทดสอบโดยวิธี dot blotting Western blotting และ immunohistochemistry (IHC)

MAbs (class)	ความไวของการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี dot blotting (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี Western blotting (สารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV)	IHC	ปฏิกิริยาข้ามกับ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV
IH 1-5 (IgG_{2b})	0.313	+++	+++	-
IH 1-7, 1-13, 3-12, 3-14 (IgG_{2b})	0.313	+++	++	-

หมายเหตุ
- \- โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่สามารถจับกับโปรตีนหรือเชื้อไวรัสได้
- \+ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อไวรัสได้เล็กน้อย
- ++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อไวรัสได้ชัดเจน
- +++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อไวรัสได้ชัดเจนมาก



ภาพประกอบ 19 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ในการจับกับ (A) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ความเข้นข้น 10 ถึง 0.0098 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (B) เชื้อ IHHNV ที่สกัดได้จากขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting ซึ่งเจือจาง 1:2 ถึง 1:1,024 โดยเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส



ภาพประกอบ 20 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363), TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78), MBV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267), HPV (ชุติมา ศรีสุข. 2551) และ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่าง ๆ บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้

แถว A (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV

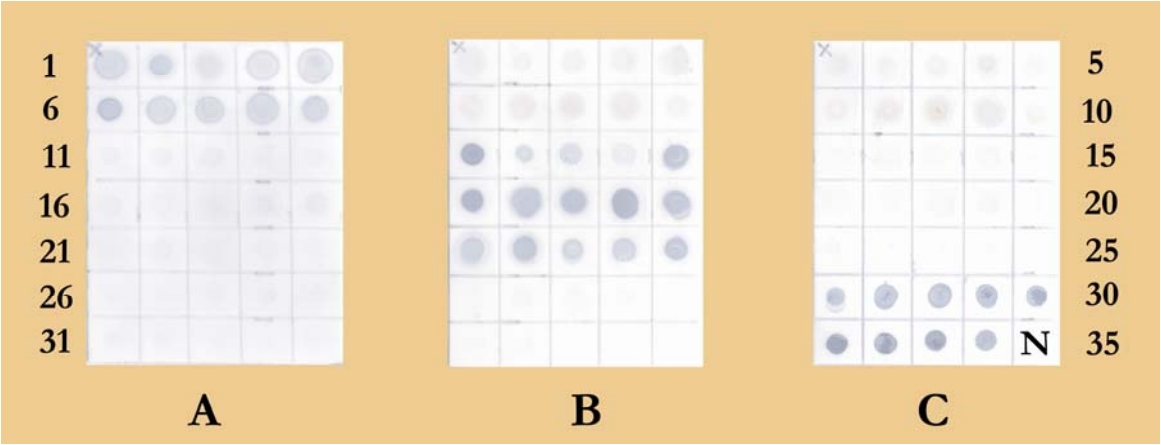
(2) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือก (envelope) ของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363)

(3) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP3 ซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78)

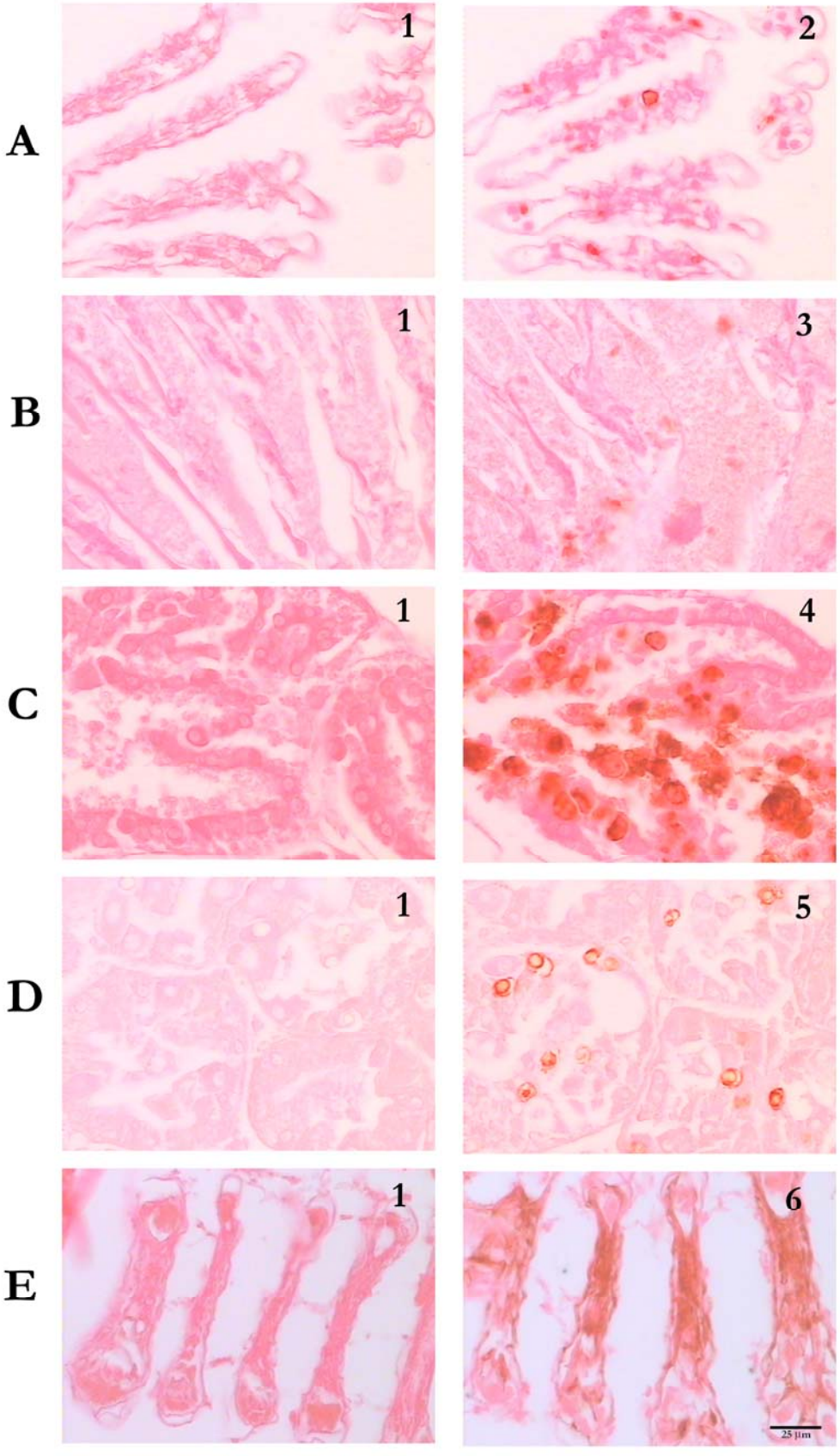
แถว B (1) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน polyhedrin (OBC) ของ MBV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267)

(2) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ HPV (ชุติมา ศรีสุข. 2551)

(3) lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน gp116N ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8)



ภาพประกอบ 21 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting โดยหยดสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ IHHNV (หมายเลข 1-10) และกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV (หมายเลข 11-25) และ WSSV (หมายเลข 25-34) ตามธรรมชาติ และหยดสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งปกติ (หมายเลข 35) บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) IH 1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ IHHNV (B) TSV3-601 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78) และ (C) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363)


A
1
2
B
1
3
C
1
4
D
1
5
E
1
6
25 µm

ภาพประกอบ 22 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี immunohistochemistry ของโมโนโคลนอล-แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHNNV กับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (A) เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (B) เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ TSV (C) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ MBV (D) ตับกุ้งที่ติดเชื้อ HPV และ (E) เหงือกที่ติดเชื้อ YHV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (1) IH 1-5 ที่จำเพาะต่อเชื้อ IHHNV (2) W29 ที่จำเพาะต่อเชื้อ WSSV (3) TSV3-666 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78) (4) MBV5-6F ที่จำเพาะต่อเชื้อ MBV (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371-376) (5) HPV7-3D ที่จำเพาะต่อเชื้อ HPV (ชุติมา ศรีสุข. 2551) และ (6) Y19 ที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76)

บทที่ 5
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการกระตุ้นการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของ IHHNV สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ได้โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 พบโปรตีนที่มีขนาด 63 กิโลดาลตัน และสามารถทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์โดยพบแถบของโปรตีนที่คาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สลายตัวเพียงเล็กน้อย เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 4 ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ IHHNV ได้ทุกตัว เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ IHHNV โดยวิธี immunohistochemistry จึงเลือกหนูที่ตอบสนองดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอล-แอนติบอดี ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV ได้ 5 โคลนได้แก่ IH 1-5, IH 1-7, IH 1-13, IH 3-12 และ IH 3-14 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนที่ผลิตได้เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG_{2b} และ light chain เป็น kappa **(K)** โดยโมโนโคลนอล-แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเชื้อ IHHNV ที่ได้จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ WSSV (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359-363) รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP3 ซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของ TSV (Longyant; et al. 2008: 75-78) รีคอมบิแนนท์โปรตีน polyhedrin ของ MBV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 261-267) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ HPV (ชุติมา ศรีสุข. 2551) และรีคอมบิแนนท์โปรตีน gp116N ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของ YHV (Chaivisuthangkura; et al. 2008: 1-8) และสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV และ WSSV เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจการติดเชื้อ IHHNV ด้วยวิธีดังกล่าวได้อย่างดี สำหรับการตรวจเชื้อ IHHNV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโน-โคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 5 โคลน สามารถจับกับ inclusion bodies ซึ่งพบภายในนิวเคลียสของเนื้อเยื่ออวัยวะน้ำเหลือง ปมประสาท หัวใจ เหงือก และผิวหนังใต้เปลือกของกุ้งที่ติดเชื้อได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5 สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ชัดเจนมาก เมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-7, IH 1-13, IH 3-12 และ IH 3-14 ทั้งนี้การที่โมโนโคลนอล-แอนติบอดี IH 1-5 สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ชัดเจนมากกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดอื่น ๆ นั้น อาจเกิดจากมีความแรง (affinity) ในการจับกับอิพิโทปของแอนติเจนภายในนิวเคลียสของเซลล์กุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ของเชื้อ WSSV, TSV, MBV, HPV และ YHV ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเมื่อทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ดังนั้นโมโน-โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IHHNV ที่ผลิตได้เหล่านี้จึงสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อโดยวิธี

immunohistochemistry ได้ดี ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับวิธี *in situ* hybridization โดยใช้ genomic DNA ของ IHHNV เป็น probe (Yang; et al. 2007: 63-70)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนและเชื้อ IHHNV ที่ได้จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยที่สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 0.313 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5, IH 1-7 และ IH 1-13 สามารถตรวจหาเชื้อ IHHNV จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:128 ขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 3-12 และ IH 3-14 สามารถตรวจหาเชื้อ IHHNV จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจาง 1:64 ได้ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5, IH 1-7 และ IH 1-13 สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ IHHNV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ดี โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามใด ๆ กับเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ และองค์ประกอบต่าง ๆ ของกุ้งปกติที่จะส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมได้ โดยวิธี dot blotting

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส IHHNV เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์จากกุ้งที่ติดเชื้อและช่วยลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อกุ้ง และสามารถใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอล-แอนติบอดีที่ผลิตได้นำมาใช้ตรวจโรคแคระแกร็นในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อ IHHNV ด้วยวิธี dot blotting Western blotting และ immunohistochemistry ได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนนี้ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายเพื่อใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาการติดเชื้อ IHHNV ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immuno-assay) ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการต่อไป สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี IH 1-5 ที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV นั้นอาจสามารถนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย 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) เนื่องจากมีความไวสูงในการตรวจหาเชื้อ IHHNV จากกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry และสามารถจับกับอิพิโทปได้ดีกว่าเมื่อพิจารณาจากค่า OD ที่ได้จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA จากผลของชุดตรวจเชื้อ WSSV ที่ใช้โมโน-โคลนอลแอนติบอดี W29 ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP28 เชื่อมกับ colloidal gold เป็นแอนติบอดีที่สามารถตรวจหาการติดเชื้อ WSSV ได้อย่างจำเพาะ โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อสูงกว่าการใช้วิธี dot blotting 4 เท่า แต่ยังคงมีความไวต่ำกว่าวิธี 1-step PCR อย่างไรก็ตามชุดตรวจนั้นสามารถใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวได้ (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106) ชุดตรวจเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้โมโน-โคลนอลแอนติบอดี VH4 ที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรงเชื่อมกับ colloidal gold เป็นแอนติบอดีสามารถใช้ตรวจหาการติดเชื้อ *V. harveyi* 1526, *V. harveyi* 639 และ *V. harveyi* ที่แยกได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานีได้อย่างจำเพาะ โดยสามารถตรวจหาปริมาณเชื้อตั้งแต่ 10^6 CFU/

มิลลิลิตร ได้ ทำให้สามารถใช้ชุดตรวจเชื้อ *V. harveyi* ในการตรวจหาเชื้อในบ่อกุ้งที่มีการระบาดของเชื้อได้ และชุดตรวจเชื้อ YHV ที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อโปรตีน p20 เชื่อมกับ colloidal gold เป็นแอนติบอดีที่สามารถตรวจหาการติดเชื้อ YHV ซึ่งมีความไวในการตรวจหาเชื้อสูงกว่า 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธี dot blotting แต่มีความไวต่ำกว่าการใช้วิธี 1-step RT-PCR 500 เท่า และสามารถตรวจการติดเชื้อ gill associated virus (GAV) ได้ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยาข้ามกับ GAV ด้วย (Sithigorngul; et al. 2007: 193-199) ดังนั้นชุดตรวจไวรัสแบบง่ายสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียได้เป็นอย่างดีเมื่อเทียบกับการใช้วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันอื่น ๆ เช่น dot blotting หรือ Western blotting เนื่องจากชุดตรวจแบบง่ายมีความจำเพาะ ใช้งานง่ายและรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 15 นาที (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในกุ้งที่เลี้ยงภายในฟาร์มกุ้งได้อย่างทันท่วงที จึงคาดว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IHHNV ที่ผลิตได้นี้จะสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสแบบง่ายเพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ชุติมา ศรีสุข. (2551). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ hepatopancreatic parvovirus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.. ถ่ายเอกสาร.

รุ่งทิวา จันทะเกต. (2547). *การโคลนและการแสดงออกของยีนแคปซิดโปรตีนของ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ในกุ้งขาว.* ปัญหาพิเศษ วท.บ. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ; และคนอื่นๆ. (2537). *อิมมูโนวิทยา.* พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: เค.พี. พริ้นติ้ง จำกัด.

อภิรัก ตันศิริสิทธิกุล. (2548). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย*. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

Bachere, E. (2000). Introduction shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191: 3-11.

Bell, T.A.; & Lightner, D.V.(1984). IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus styliostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 38: 185-194.

Bonami, J. R.; et al. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General. Virology.* 71: 2657-2664.

Boonsanongchokying C.; et al. (2006). Production of monoclonal antibodies to polyhedrin of monodon baculovirus (MBV) from shrimp. *ScienceAsia.* 32: 371-376.

Carr, W. H.; et al. (1996). The use of an infectius hypodermal and hematopoitic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*. 147: 1-8.

Chaivisuthangkura P.; et al. (2004). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections 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.

Dhar, A.; & R.M.K.K. (2001). Detection and quantification of infectius hypodermal and hematopoitic necrosis virus (IHHNV) and white spot virus (WSV) of shrimp by real time quantitative PCR and SYBR chemistry. *Journal of Clinical Microbiology.* 39: 2835-2845.

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.

Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture.* 258: 1-33.

Köhler, G.; & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology*. 6: 511-519.

Hsieh; et al. (2006). Infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.* 258: 73-79.

Kalagayan, H.; et al. (1991). IHHN virus as an etiological factors in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of World Aquaculture Society.* 22: 235-243.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 277**:** 680-685.

Lightner, D. V.; et al. (1983). Detection of IHHN virus in *Penaeus styliostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *Journal of World Mariculture Society* 14: 212-225.

Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1983). Infectious hypodermal and hematopoitic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 42: 62-70.

Lightner, D. V.; et al. (1993). Development and application of a simple and rapid diagnostic method to study hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture.* 116: 15–23.

Lightner, D. V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. *Journal World Aquaculture Society*, Baton Rougge.

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). Specipic monoclonal antibodies raised against Taura syndrome 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.

Lotz, J. M. (1997). Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *Journal World Microbiology Biotechnology.* 13: 405-413.

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.

Motte, E.; et al. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 219: 57-70.

Poulos, B. T.; Lightner, D. V.; & Trumper,B. (1994). Monoclonal antibodies to a Penaeid Shrimp Parvovirus, infectious Hypodermal and Hematopoitic Necrosis Virus (IHHNV). *Journal of Aquatic Animal Health.* 6: 149-154.

Primavera, J. H.; & Quinitio, E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology.* 20: 796-820.

Roekring, S.; et al. (2002). Comparison of penaeid shrimp and insect parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. *Virus Research.* 87: 79–87.

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.

Shike, H.; et al. (2000). Infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus of shrimp related to mosquito Brevidensoviruses. *Virology*. 277: 167-177.

Snieszko, S.F., (1973). Disease of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. Janson, London, 55-66.

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 immunochromatograpic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. *Journal of Microbiological Methods*. 71: 256-264.

Sithigorngul, W.; et al. (2006). A simple and rapid immunochromatograpic 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 immunochromatograpic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in. *Journal of Virological Methods*. 72: 193-199.

Sun, Z. F.; et al. (2006). Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus (IHHNV) in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods.* 131: 41-46.

Tang, K. F.; & Lightner, D. V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus in penaeid shrimp by real time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*. 44: 79-85.

Tang, K. F.; & Lightner, D. V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and Amaricas. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 93-97.

Teng, K. F.; et al. (2006). Detection of infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* by ramification amplification assay. *Diseases of Aquatic Organisms*. 73: 103-111.

Withyachumnarnkul, B.; et al. (2006). Low impact of infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Peneaus monodon. Diseases of Aquatic Organisms*. 69: 129-136.

Yang, B.; et al. (2007). Evidence of existence infectious hypodermal and hematopoitic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Veterinary microbiology*. 120: 63-70.

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.	100mM IPTG		
	IPTG	238.0	มิลลิกรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
2.	Buffer B (100mM NaH_2PO_4, 10mM Tris-HCl, 8M Urea pH 6.3)		
	NaH_2PO_4	1.38	กรัม
	Tris-HCl (ปรับ pH 6.3)	0.12	กรัม
	Urea	48.05	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.00	มิลลิลิตร
3.	100mM PMSF		
	PMSF	17.4	มิลลิกรัม
	Isopropanol	1.0	มิลลิลิตร
4.	0.15M Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2		
	NaCl	8.00	กรัม
	KCl	0.20	กรัม
	KH_2PO_4	0.20	กรัม
	Na_2HPO_4	1.15	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.00	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.	1M KCl		
	KCl	7.46	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.00	มิลลิลิตร

8. 1% SDS

SDS	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1.	RPMI medium		
	RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4000	กรัม
	D-glucose (Sigma)	3.6000	กรัม
	L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
	$C_3H_3O_3Na$ (Sigma)	1.1005	กรัม
	$NaHCO_3$	2.0160	กรัม
	HEPES	5.9525	กรัม
	Penicillin G)	20,000	units
	Streptomycin	200	มิลลิกรัม
	น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000	มิลลิตร
	กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร		
2.	20% Fetal bovine serum		
	RPMI medium	80.0	มิลลิตร
	Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)		
	หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิตร
	100X HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิตร
2.	HAT medium		
	เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%		
	ใน RPMI medium	80.0	มิลลิตร
	FBS	20.0	มิลลิตร
	100 X HT supplement	1.0	มิลลิตร
	50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิตร
3.	40% Polyethylene glycol		
	Polyethylene glycol	2.0	กรัม
	RPMI medium	3.0	มิลลิตร
4.	12% Dimethylsulfoxide		
	Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิตร
	RPMI medium	88.0	มิลลิตร

ภาคผนวก ง
สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE และ Western blotting

1. Stock solution

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

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 10% 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
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 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
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

3. Running buffer

4X Tank buffer

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

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

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

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 Destain 1

Methanol	500.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 Destain 2

Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

5. Towbin transfer buffer pH 8.8

Tris	3.0	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

6. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma) ประกอบด้วย

β-Galactosidase, *Escherichia coli*	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 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ1 chain specific)
2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ2a chain specific)
3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ2b chain specific)
4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ3 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 ฉ

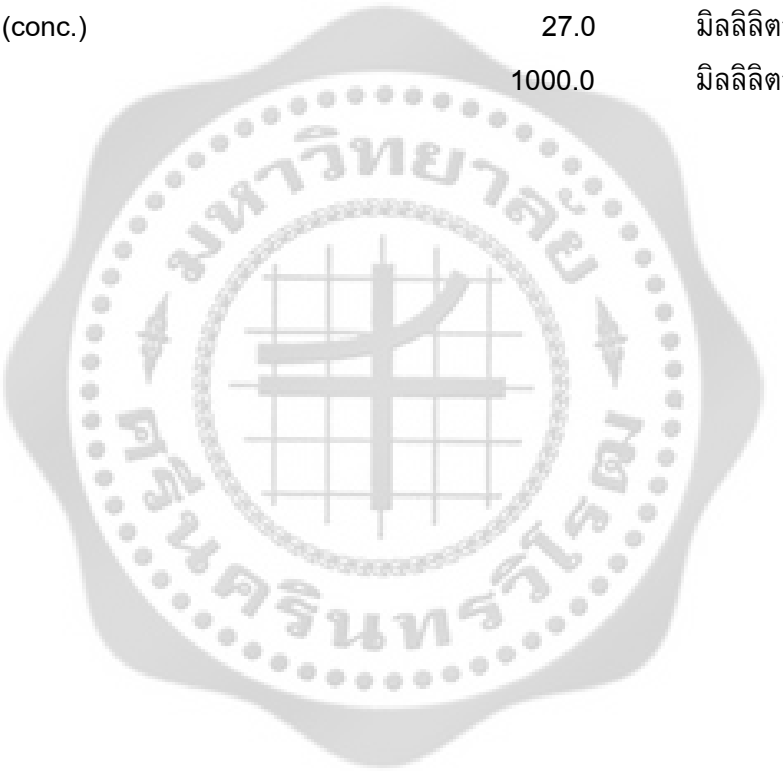
สารเคมีสำหรับ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. 0.1 M Citrate buffer, pH 4.5

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

2. 1 N H_2SO_4

H_2SO_4 (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร



ภาคผนวก ช
สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. coated slide solution		
Gelatin	1.0	กรัม
$CrK(SO_4)_2.12H_2O$	50.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
2. Davidson's fixative		
95% ethanol	30.0	มิลลิลิตร
100% formalin	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร
4. Calf serum 10% (P_1^+)		
Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร
5. สี Enrilich's acid hematoxylin		
Hematoxylin	8.0	กรัม
95% ethanol	400.0	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.0	กรัม
Glycerine	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร
6. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol		
Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาววารุณี หะยีมะสาและ
วันเดือนปีเกิด	18 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2524
สถานที่เกิด	ปัตตานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	139-141 ถ.ท่าเสด็จ ต.ตะลุบัน อ.สายบุรี จ.ปัตตานี 94110
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2542	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนดรุณศาสน์วิทยา
พ.ศ.2547	วท.บ. (เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
พ.ศ.2552	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ