

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ recombinant VP3 protein ของ Taura syndrome virus

ปริญญาานิพนธ์
ของ
เพียงจันทร์ โพธิ์ย้อย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
กุมภาพันธ์ 2550
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ recombinant VP3 protein ของ Taura syndrome virus

บทคัดย่อ
ของ
เพียงจันทร์ โพธิ์น้อย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
กุมภาพันธ์ 2550

เพียงจันทร์ โพธิ์ย้อย. (2550). โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ recombinant VP3 protein ของ Taura syndrome virus. ปรินทิพพานิช วท.ม. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์

การศึกษานี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP3 ของ Taura syndrome virus (TSV) โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 ที่มียีนของ VP3 ใน pGEX-6P-1 plasmid ซึ่งผลิตโปรตีนหลอม GST-VP3 นำโปรตีนหลอม GST-VP3 ที่ทำให้บริสุทธิ์มาปลูกหมักในหนูขาว สำหรับนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้าง VP3 ของ Taura syndrome virus (TSV) การคัดเลือก hybridoma ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี 29 โคลน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความจำเพาะ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีจำนวน 27 โคลน จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP3 ของ Taura syndrome virus (TSV) และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสอื่นๆ ได้แก่ white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus (YHV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), hepatopancreatic parvovirus (HPV) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 โคลน จำเพาะต่อ GST ดังนั้นสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มาใช้ในการตรวจติดตามการติดเชื้อไวรัสโรคทอราด้วยวิธี immunohistochemistry และ dot blotting ได้ และคาดว่าจะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปเตรียมเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปสะดวกใช้ซึ่งมีความไวสูงเพื่อใช้วินิจฉัยไวรัสโรคทอราต่อไปในอนาคต

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT VP3 PROTEIN OF TAURA
SYNDROME VIRUS

AN ABSTRACT
BY
PIANGJUN POYOI

Present in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science degree of Biology
At Srinakharinwirot University
February 2007

Piangjun Poyoi. (2007). *Monoclonal antibodies against recombinant VP3 protein of Taura syndrome virus*. Master thesis, M.Sc. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst.Prof.Dr. Parin Chaivisuthangkura, Dr. Siwaporn Longyant

The objective of this study was to produce monoclonal antibodies (MAbs) against recombinant VP3 protein of Taura syndrome virus (TSV) *E. coli* strain BL21 with VP3-pGEX-6P-1 plasmid. Recombinant proteins, GST-VP3 produced by was used to immunize Swiss mice for antisera production. The hybridoma clones were selected by dot blotting, Western blotting and immunohistochemistry. Twenty-nine monoclonal antibodies (MAbs) against recombinant VP3 protein of Taura syndrome virus (TSV) were obtained. They were divided into 2 groups in which the first group consisted of twenty-seven monoclonal antibodies (MAbs) specific to VP3 protein of Taura syndrome virus (TSV). These MAbs did not cross react with other virus including white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus (YHV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), hepatopancreatic parvovirus (HPV). The second group comprised of two monoclonal antibodies (MAbs) specific to GST. Monoclonal antibodies (MAbs) of first groups could be used to detect Taura syndrome virus (TSV) infection in tissues by immunohistochemistry and dot blotting. The development of highly specific assay and convenient kit using these monoclonal antibodies (MAbs) for detection of Taura syndrome virus (TSV) in progress.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ recombinant VP3 protein ของ Tauro syndrome virus

ของ

เพียงจันทร์ โพธิ์น้อย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศิริ จีระเดชากุล)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2550

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิริทธิกรกุล)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรวิตรกุล)

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในการปฏิบัติงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการการสอบปริญญาโท และรองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรวิตรกุล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการการสอบปริญญาโทและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากขึ้น

ขอขอบคุณ คุณสมบัติ รักประธานพร คุณธนวรรณ เตชะกุล ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณศูนย์พันธุ์ชีวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ได้ให้เงินอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณภิรมย์ศักดิ์ พัฒนไพจิตรกุล คุณฝน ต้นสกุล คุณพิงนภา ไกลชุมพล คุณรัตนจิตรขำ คุณผจงสุข สุทธารัตน์ และทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่าอย่างยิ่งทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดาและน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือสนับสนุนตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอโน้มนำประโยชน์ทั้งหลายอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ ญาติพี่น้อง กุ้งขาวทุกตัวที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

เพียงจันทร์ โพธิ์น้อย

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมติฐานการวิจัย.....	8
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
สัตว์ทดลอง.....	22
วิธีดำเนินการทดลอง.....	24
4. ผลการทดลอง.....	31
5. สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	45
บรรณานุกรม.....	47
ภาคผนวก.....	52
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	69

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ส่วนผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบ	
อิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ.....	30
2 ค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทป	
ของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ.....	43
3 แสดงโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP3 และ	
จำเพาะต่อ GST.....	44
4 ส่วนผสมพอลิอะครีลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel.....	59

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงโครงสร้างจีโนมของไวรัสโรคทอรา.....	2
2 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	5
3 การสังเคราะห์ DNA โดยวิธี de novo และ วิธี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิธี de novo.....	7
4 กุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	10
5 แสดงลักษณะอาการของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะติดเชื้อรุนแรง หรือระยะเฉียบพลัน.....	15
6 แสดงลักษณะอาการของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะติดเชื้อแบบเรื้อรัง.....	16
7 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี 10% SDS-PAGE ที่ผลิตได้จาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1.....	34
8 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี 10% SDS-PAGE แสดงโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์.....	35
9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม ด้วยวิธี Western blotting	36
10 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting.....	37
11 SDS-PAGE (A) และ Western blotting	38
12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting.....	39
13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย วิธี Immunohistochemistry.....	40
14 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการ ตรวจหา VP3 โดยวิธี dot blotting.....	41
15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการ ตรวจการติดไวรัสโรคทอราในกุ้งจากธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting.....	42

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เนื่องจากธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหาอย่างมาก ทั้งในเรื่องอัตราการเจริญเติบโตช้าและการเกิดโรคระบาดซึ่งส่งผลให้ราคากุ้งกุลาดำตกต่ำ กรมประมงจึงอนุมัติการนำเข้าและเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก หรือ Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรนอกเหนือไปจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วยและกุ้งก้ามกราม (Nielsen; et al. 2005: 101-106)

กุ้งขาว (*P. vannamei*) เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น อเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิคารากัว คอสตาริกา ปานามา โคลอมเบีย เอกวาดอร์และเปรู เป็นต้น กุ้งขาวเป็นกุ้งที่มีความแข็งแรงทนทานสูงจึงมีอัตราการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้ไกลในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกถึงเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้มีระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งทะเลลงไปประมาณ 72 เมตรหรือ 235 ฟุต และมีพื้นที่ท้องทะเลเหมือนโคลนที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตจึงเป็นแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ โดยประเทศเอกวาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงลูกกุ้ง พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์กุ้งขาว (Hasson; et al. 1997: 236-237)

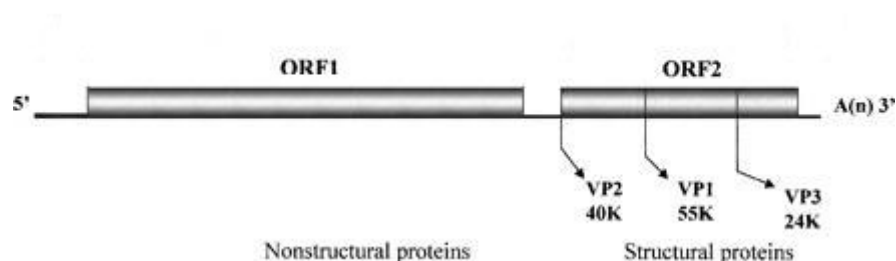
การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบันนี้กำลังประสบปัญหาการเกิดโรคระบาดซึ่งโรคระบาดที่สำคัญของกุ้งขาวได้แก่ โรคทอรา (Taura syndrome) เกิดจากไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) โรคแควระแกร็น (runt deformity syndrome; RDS) เกิดจากเชื้อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) โรคตัวแดงดวงขาวเกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) โรคหัวเหลืองเกิดจากไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) (Lightner; & Redman. 1998: 201-220)

โรคระบาดที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวอย่างมาก คือไวรัสโรคทอราซึ่งเป็นสาเหตุให้กุ้งขาวตายและสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวเป็นอย่างมาก กุ้งขาวที่ติดไวรัสโรคทอราจะอยู่ในช่วงวัยอ่อนที่มีน้ำหนักประมาณ 0.1-0.5 กรัม หรือช่วงอายุ 2-4 สัปดาห์หลังจากปล่อยลงบ่อดิน อาการสำคัญของไวรัสโรคทอราคือ ส่วนหางมีสีแดง เซลล์บริเวณต่างๆ ตาย เช่น เยื่อบริเวณผิวหนัง รยางค์ต่างๆ เหงือก ทางเดินอาหารส่วนท้าย กระเพาะอาหาร รวมทั้งต่อมน้ำเหลือง (Hasson; et al. 1998: 36-38)

การระบาดของไวรัสโรคทอราพบครั้งแรกในทวีปอเมริกาใต้ที่ฟาร์มเลี้ยงกุ้งใกล้กับแม่น้ำทอราในประเทศเอกวาดอร์เมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ.2535 จากนั้นได้แพร่ระบาดไปทั่วทวีปอเมริกาเหนือและใต้รวมถึงฮาวายและบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิก ซึ่งส่งผลกระทบต่อธุรกิจการเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศโคลอมเบีย คอสตาริกา เอลซาวาดอร์ กัวเตมาลา ฮอนดูรัส เม็กซิโก นิคารากัว ปานามา และเปรู นอกจากนี้ไวรัสโรคทอราได้ระบาดไปสู่ฟาร์มเลี้ยงกุ้งชาวในประเทศแถบชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติกหลายประเทศ ได้แก่ บราซิลและเวเนซุเอลา รวมถึงเขตตะวันออกเฉียงใต้ของอเมริกาในซาร์ทแคโรไลน่า และเท็กซัส (Poulos; et al. 1999: 99-106)

สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของไวรัสโรคทอราครั้งแรกในเดือนเมษายน พ.ศ.2546 ที่ฟาร์มเลี้ยงกุ้งชาวในจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี และนครปฐม ซึ่งได้สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งชาวเป็นอย่างมากและส่งผลให้มีการแพร่ระบาดไปยังบ่อเลี้ยงกุ้งชาวที่อยู่ข้างเคียงได้ง่าย (Nielsen; et al. 2005: 101-106)

การศึกษาโครงสร้างจีโนมของไวรัสโรคทอราพบว่ามีความยาว 10,205 เบส โดยมี poly (A) ที่ปลาย 3' และภายในจีโนมของไวรัสประกอบด้วยบริเวณที่มีการถอดรหัสเป็นโปรตีน 2 บริเวณ คือ ORF1 เป็นบริเวณที่ถอดรหัสเป็น non-structural proteins และ ORF2 ซึ่งเป็นบริเวณที่ถอดรหัสเป็น structural proteins ที่เป็นองค์ประกอบของแคปซิดทั้ง 3 ชนิด คือ โปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตัน (VP1) 40 กิโลดาลตัน (VP2) และ 24 กิโลดาลตัน (VP3) (Mari; et al. 2002: 915-926) (ภาพประกอบ 1) การศึกษาครั้งนี้ได้นำแคปซิดโปรตีนขนาด 24 กิโลดาลตันที่สร้างจากยีน VP3 มาใช้ในการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจการติดไวรัสโรคทอราในกุ้งชาวต่อไป



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสโรคทอรา (Mari; et al. 2002: 915-926)

ความมุ่งหมายการวิจัย

เพื่อทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีน VP3 ของไวรัสโรคทอรา

ความสำคัญของงานวิจัย

1. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจไวรัสโรคทอราในกุ้งขาว
2. เพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจไวรัสโรคทอราอย่างรวดเร็ว โดยใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น

ขอบเขตของงานวิจัย

1. การทำให้บริสุทธิ์โปรตีน VP3 ลูกลสมที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli*
2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโรคทอรา โดยใช้โปรตีน VP3 ลูกลสมที่ผลิตได้
3. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสโรคทอรา โดยวิธี dot blotting วิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry
4. การทดสอบประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอรา ด้วยวิธี immunohistochemistry และ dot blotting

นิยามศัพท์เฉพาะ

ศัพท์ที่ 1 ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus : TSV)

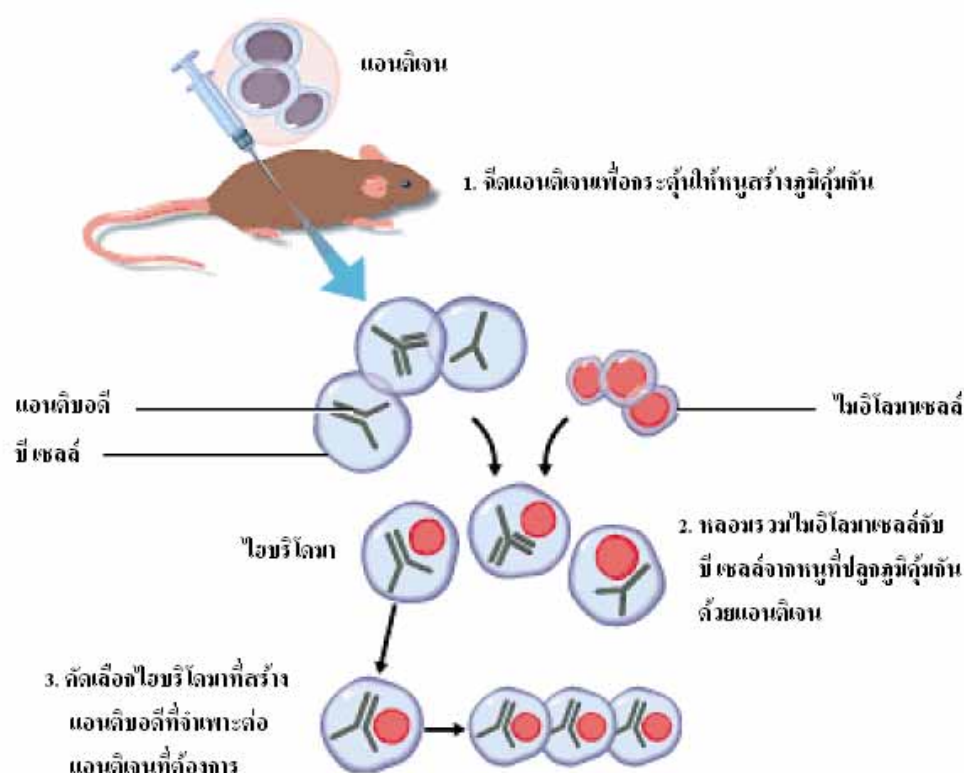
ไวรัสโรคทอรา มีโครงสร้างลักษณะรูปร่างเป็นแบบ icosahedral ขนาดประมาณ 31-32 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสเป็น non-enveloped มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA : single-stranded RNA) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 40 และ 55 กิโลดาลตัน ปัจจุบันจัดอยู่ในวงศ์ Picornaviridae (Bonami; et al. 1997: 313-319)

ศัพท์ที่ 2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์ เซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น (สิริฤกษ์ ทรงศิริวไล. 2537: 365-369)

เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กัน เช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนี้นั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-100)

ในปี ค.ศ. 1975 Kohler และ Milestein สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้เป็นผลสำเร็จ โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือบี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่ไม่สามารถมีชีวิตยาวนานในภาวะ *in vitro* และไมอีโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ตลอดในภาวะ *in vitro* ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตในภาวะ *in vitro* ได้ไม่สิ้นสุด เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-100) (ภาพประกอบ



ภาพประกอบ 2 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

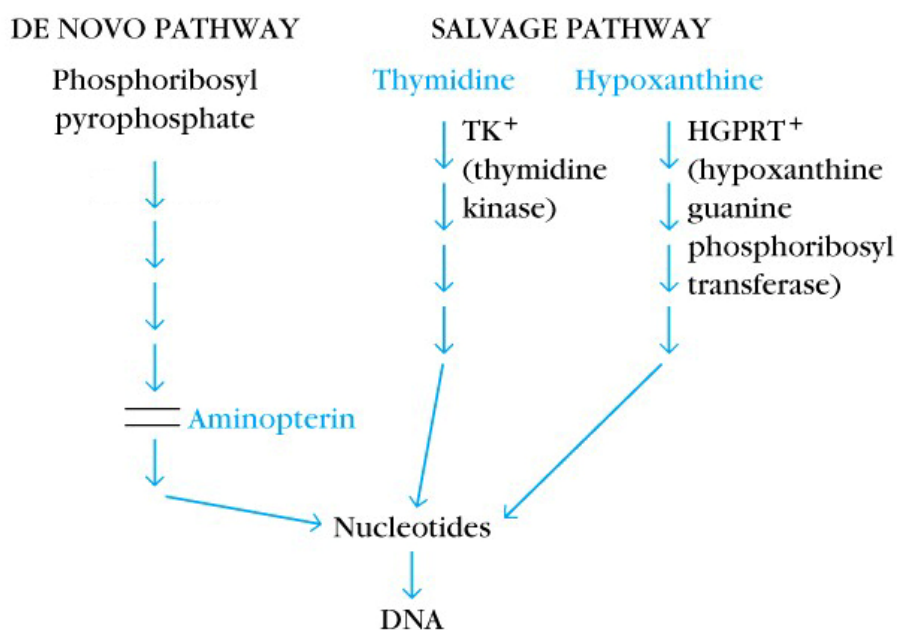
ที่มา : <http://images.encarta.msn.com/xrefmedia/aencmed/targets/illus/ilt/T059309A.gif>

การหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่ การใช้ไมอีโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอีโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-100)

การคัดเลือกของ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 วิธีคือ วิธี de novo และวิธี salvage ในกรณีของวิธี de novo (ภาพประกอบ 3) จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อวิธี de novo ถูกยับยั้ง เซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้วิธี salvage โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA แทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิธี salvage นั้นได้แก่ เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยวิธี salvage ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวางวิธี de novo ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้วิธี salvage ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้วิธี salvage ในการสังเคราะห์ DNA ได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-100)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมอีโดมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้าม และไมอีโดมาเพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น

เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยามันคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-100)



ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์ DNA โดยวิธี de novo และ วิธี salvage และการยับยั้ง
สังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิธี de novo

ที่มา: <http://immuneweb.xxmc.edu.cn/images/figure04-21.jpg>

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านได้แก่ (1) ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (2) ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการรักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัย การตั้งครวรรค์ โรคจากจุลินทรีย์ต่างๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-100)

ศัพท์ที่ 3 Indirect peroxidase immunohistochemistry

เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนซึ่งก็คือ เชื้อไวรัสภายในเนื้อเยื่อของสัตว์อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน โดยเทคนิคนี้ใช้วิธีแบบอ้อม (indirect) คือใช้แอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase มาจับกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง จากนั้นเติมสับสเตรต คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

และสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ได้แก่ 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorine (DAB) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) กลายเป็นผลผลิต (product) ได้แก่ ออกซิเจน (O_2) และน้ำ (H_2O) ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB เปลี่ยนสภาพจากสารละลายเป็นตะกอนจับอยู่บริเวณแอนติบอดีจับกับแอนติเจนทำให้เกิดการติดสีบริเวณที่มีแอนติเจนอยู่ หลังจากนั้นจึงย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีมาทอกไซลินซึ่งจะติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีโอซินจะติดสีแดงบริเวณไซโทพลาซึมทำให้สามารถมองเห็นและระบุชนิดเนื้อเยื่อโดยรอบได้ ซึ่งวิธีนี้ยังช่วยให้เพิ่มความไวในการติดสี เนื่องจากมีแอนติบอดีตัวที่สองจำนวนมากสามารถจับกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งแต่ละตัวจึงเป็นการเพิ่มจำนวนโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ตำแหน่งที่แอนติบอดีจับอยู่และไม่เกิดความยุ่งยากต่อการนำเอนไซม์ไปติดกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ผลิตและมีปริมาณอยู่จำกัดด้วย (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76)

สมมติฐานการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผลิตได้ในการตรวจกึ่งขาวที่ติดไวรัสโรคทอรา อาจทำได้โดยใช้โปรตีนลูกผสมที่สร้างจากยีน VP3 ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์แคปซิดโปรตีนของไวรัสโรคทอราเป็นแอนติเจนสำหรับใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

บทที่ 2

เอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งขาว (Pacific white shrimp)

อนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Superorder	Eucarid Ecarida
Order	Decapoda
Section	Penaeidea
Family	Picornaviridae
Genus	<i>Penaeus Litopenaeus</i>
Species	<i>vannamei</i>

ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวลำตัวมี 8 ปล้องและมีสีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว ส่วนปล้องมีกิริยาอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก หัวสันกรีสอง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมี่ลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวมีสีขาวยอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวยอมชมพูถึงแดง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ โดยที่ปลายมีสีแดงและข้างในมีสีขาว ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้มแพนหางมี 4 ใบและ 1 กรีหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ กุ้งขาวหากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายน้ำล่องน้ำเก่ง ลอกคราบเร็วทุกๆ สัปดาห์ไม่หมกตัว (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124) (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 กุ้งขาว *Penaeus vannamei*

วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

ในธรรมชาติของกุ้งขาวจะมีอายุขัยประมาณเกือบ 36 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 มิลลิเมตร ไข่ที่ฟักแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000 ถึง 250,000 ฟอง ส่วนแม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะวางไข่ประมาณไม่เกิน 100,000 ฟอง โดยจะวางไข่ในตอนกลางคืน แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มออกไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้าๆ เนื่องจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งขาวมีลักษณะเป็นแบบเปิด (opened thelycum) แตกต่างจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบปิด (closed thelycum) ดังนั้นรูปแบบของการสืบพันธุ์และพฤติกรรมในการผสมพันธุ์จึงเป็นไปตามลักษณะกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ระบบสืบพันธุ์และการผสมพันธุ์ในการผสมพันธุ์ปกติแล้วกุ้งขาวจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืนหลังจากมีการลอกคราบของตัวเมียและผสมพันธุ์กันที่ความลึก 10-15 เมตรถึง 30-50 เมตร ในธรรมชาติแม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมที่จะวางไข่นั้นจะสังเกตได้จากรังไข่เป็นลำที่บวมมีสีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัวทั้งสองข้าง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

การคัดเลือกลูกกุ้ง

ลูกกุ้งต้องเป็นลูกกุ้งที่ได้รับการปรับสภาพเพื่อเลี้ยงที่ระดับความเค็มที่ 10 ส่วนในพันส่วนจากโรงเพาะฟักที่เป็นบ่อปูน ลูกกุ้งที่มีขนาดระหว่าง พี 15-พี 16 จะมีลักษณะของพุ่มเหงือกพัฒนาครบสมบูรณ์ มีหนวดสีแดงทั่วทั้งเส้น สีแดงของหนวดต้องไม่แดงเป็นปล้องๆ ปลายกริตรงไม่งอนขึ้นตาโต ลำตัวอ้วนและสั้น หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว และมีชีวิตรอดหลังจากที่ผ่านการทดสอบการ

ลองน้ำจากบ่อดูดซับที่เตรียมไว้มากกว่า 80% ในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนลักษณะของลูกกุ้งที่ไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคือลูกกุ้งที่มีลำตัวยาว ผอม ปลายกิ้งกอนขึ้น ตาเล็ก หนวดมีสีแดงเป็นปล้อง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

ขั้นตอนการพัฒนาของตัวอ่อน

ตัวอ่อนของกุ้งขาวมีการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงการลอกคราบ โดยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีลักษณะกลมมีเมือกห่อหุ้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร ไข่จะจมลงสู่พื้นเพราะหนักกว่าน้ำทะเลเล็กน้อย ปกติไข่กุ้งจะฟักเป็นตัวในบริเวณที่วางไข่จากนั้นลูกกุ้งวัยอ่อนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่งในย่านน้ำกร่อยซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวเองอยู่บริเวณนี้จนโตถึงขั้นพองแม่พันธุ์จึงค่อยอพยพสู่ทะเลลึกเพื่อทำการสืบพันธุ์วางไข่ต่อไป การพัฒนาตัวอ่อนระยะของกุ้งขาวเมื่อไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วภายใน 12-14 ชั่วโมง ก็จะฟักเป็นตัวอ่อน ในระยะนาอพลีซ (nauplius) ลูกกุ้งที่ฟักออกมาเป็นตัวนี้จะมีการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจนกระทั่งเหมือนตัวเต็มวัยซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้

ตัวอ่อนระยะที่ 1 นาอพลีซ (nauplius) รูปร่างคล้ายแมงมุมยังไม่ต้องการอาหารเนื่องจากมีถุงอาหาร (yolk sac) ติดอยู่กับลำตัว ตัวอ่อนระยะนี้จะผ่านการลอกคราบ 5-6 ครั้งภายในเวลา 36-48 ชั่วโมง ก่อนจะเข้าสู่ระยะที่ 2

ตัวอ่อนระยะที่ 2 โปรโตซุเอีย (protozoa) ตัวอ่อนระยะนี้จะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวและลำตัวแยกจากกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 3 ขั้นตอน ใช้ระยะเวลาประมาณ 4-7 วัน

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ไมซิส (mysis) ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลักษณะคล้ายลูกกุ้งวัยรุ่นแต่การว่ายน้ำยังว่ายน้ำแบบหัวทิ่มลงและดีดขึ้นลง พัฒนาการของลูกกุ้งระยะนี้มี 3 ขั้นตอน ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 5-7 วัน

วัยอ่อนระยะที่ 4 โพลลารวา (post larva) ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับลูกกุ้งวัยรุ่นมากขึ้นมีอวัยวะต่างๆ เกือบครบทุกส่วนและพัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่ระยะกุ้งวัยรุ่น (ในการเพาะเลี้ยงในบ่อดินหากอนุบาลลูกกุ้งให้โตไปจนถึงช่วงโพลลารวา PL-15 เป็นต้นไปก็สามารถที่จะใช้เป็นพันธุ์สำหรับปล่อยเลี้ยงได้ ที่ประเทศเม็กซิโกมีการอนุบาลไปจนถึงขนาด PL-45) ลูกกุ้งในระยะโพลลารวานี้จะมีขาเดิน 3 คู่ คู่แรกมองเห็นเป็นก้ามชัดเจน หางแคบเข้าเป็นระยะที่มีรยางค์ครบ มีขากรรไกร (mandible) ที่ชัดเจน ขาวว่ายน้ำเจริญให้เห็นชัดเจนขึ้นกริสนักว่าดวงตา ระยะระหว่างตากางออกมองเห็นได้ชัดเจน ลักษณะลำตัวสั้นป้อมจะมีลักษณะใสมีเส้นสีน้ำตาลพาดยาวจากบริเวณหนวดถึงหางโดยปล้องท้องปล้องที่ 6 จะยาวกว่าปล้องหัวเล็กน้อย กุ้งวัยรุ่น (juvenile) ลูกกุ้งจะมีขนาดตัวโตขึ้นโดยมีการเจริญของเหงือกที่สมบูรณ์ กุ้งในระยะนี้จะมีการพัฒนาของกรืออย่างเต็มที่ มองเห็นกริด้านบนมี 8-9 ฟัน

ความยาวกริจะสั้นกว่า exopodite ของหนวด ปลายกริเรียวตรง การเคลื่อนไหวจะคล้ายกับกุ้งที่โตเต็มที่แล้ว คือ ใช้ขาเดินและขาว่ายน้ำ

ลูกกุ้งชำ (adolescent) ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีอวัยวะครบสมบูรณ์เช่นเดียวกับพ่อแม่ทุกอย่างสามารถแยกเพศได้เนื่องจากการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ในตัวผู้จะมี petasma สมบูรณ์ ในตัวเมียจะมี thelycum สมบูรณ์ ลูกกุ้งวัยเจริญพันธุ์ (subadult) ลูกกุ้งในระยะนี้จะมีคุณสมบัติทางเพศ โดยตัวผู้จะมีการผลิตน้ำเชื้อและเก็บเอาไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อ (terminal ampules) และถ้ามีการผสมพันธุ์ตัวเมียสามารถเก็บน้ำเชื้อใน thelycum การผสมพันธุ์ครั้งแรกมักจะเริ่มเมื่อตัวผู้มีความยาวของปล้องหัวตั้งแต่ประมาณ 30 มิลลิเมตร และตัวเมียมีความยาวปล้องหัวประมาณ 40 มิลลิเมตร ขึ้นไป ถ้าอยู่ในธรรมชาติกุ้งจะผสมพันธุ์ในบริเวณชายฝั่งในย่านน้ำกร่อยก่อนในครั้งแรกแล้วจึงอพยพไปสู่บริเวณทะเลน้ำลึกต่อไป กุ้งโตเต็มวัย (adult) กุ้งระยะนี้จะมีการสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์แบบ ผสมพันธุ์กันที่ความลึก 10-15 เมตร ในธรรมชาติโดยมีการผสมพันธุ์ได้หลายครั้งจะมีการลอกคราบทุก 7-10 วัน ในตัวเมียและตัวผู้จะลอกคราบทุก 14-21 วัน ตัวเมียสามารถจะวางไข่ได้ทั้งในน้ำตื้นและน้ำลึก (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะนิสัยภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ เช่น สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็มที่ 5-35 ส่วนในพันส่วน และระดับความเค็มต่ำ 0-5 ส่วน แต่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ส่วนในพันส่วน ส่วนอุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 26-29 องศาเซลเซียส แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมีค่า 4-9 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับค่าความเป็นกรดและด่างควรอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง หรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ กุ้งชนิดนี้ชอบน้ำกระด้างที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงและตื่นตกใจง่าย (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

โรคในกุ้ง

โรคที่เกิดกับกุ้งเป็นผลของความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรค เมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิพลเพิ่มมากขึ้น เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค การปรากฏของเชื้อก่อ

โรคหลายๆ ชนิด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงหรือภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสมก็จะส่งผลทำให้การก่อเกิดหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Snieszko. 1973: 201-220)

โรคส่วนใหญ่ที่เกิดกับกุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ (1) โรคไม่ติดเชื้อ และ (2) โรคติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (Bachere. 2000: 3-11) ส่วนโรคติดเชืื่อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญซึ่งส่งผลกระทบเชิงลบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัสแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201-220) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112)

ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus)

โบนาโมและคนอื่นๆ (Bonami; et al. 1997: 313-319) ได้ศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโรคทอราพบว่ามียลักษณะสำคัญสรุปได้ดังนี้

ชื่อวงศ์	: Picornaviridae
ชื่อสามัญ	: Taura Syndrome Virus
ชื่ออื่น	: Taura Syndrome(TS), Taura Virus, TSdisease, Red tail disease, La Colita Foja disease
ลักษณะอนุภาค	: Icosahedral และ non-enveloped
ขนาดอนุภาค	: 31-32 นาโนเมตร
จีโนม	: RNA เส้นเดี่ยวสายบวกที่มีการเติม poly(A) ตรงปลาย 3' เป็นจำนวนมากและมีความยาวประมาณ 10 กิโลเบส
แคปซิด	: ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายหลัก 3 สาย คือ 24, 40 และ 55 กิโลดาลตัน
บริเวณเพิ่มจำนวน	: เพิ่มจำนวนในไซโทพลาซึมของเซลล์บุผิวผนังของกุ้งที่ติดเชื้อ
โฮสต์หลัก	: <i>Penaeus vannamei</i>
โฮสต์อื่นๆ	: <i>Penaeus stylirostris</i> , <i>Penaeus setiferus</i> , <i>Penaeus chinensis</i> , <i>Penaeus aztecus</i> และ <i>Penaeus duorarum</i>

โบนาไมและคณะ (Bonami; et al. 1997: 313-319) พบการระบาดของไวรัสโรคทอราซึ่งพบครั้งแรกในทวีปอเมริกาใต้ที่ฟาร์มเลี้ยงกุ้งชาวใกล้กับแม่น้ำทอราในประเทศเอกวาดอร์เมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 จากนั้นได้แพร่ระบาดไปทั่วทวีปอเมริกาเหนือและได้รวมถึงฮาวายและบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิก ซึ่งส่งผลกระทบต่อธุรกิจการเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศโคลอมเบีย คอสตาริกา เอลซาวาดอร์ กัวเตมาลา ฮอนดูรัส เม็กซิโก นิคารากัว ปานามา และเปรู นอกจากนี้ไวรัสโรคทอราได้ระบาดไปสู่ฟาร์มเลี้ยงกุ้งชาวที่ประเทศชายฝั่งแอตแลนติกหลายประเทศ ได้แก่ บราซิล เบลีซ และเวเนซุเอลา รวมถึงเขตตะวันออกเฉียงใต้ของอเมริกาในรัฐฟลอริดา แครโรไลน่า และเท็กซัส โดยในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2538 พบการแพร่ระบาดของไวรัสโรคทอราในบ่ออนุบาลลูกกุ้งในเมืองริโอ แกรนด์ควาลเลย์ในรัฐเท็กซัส และในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2539 พบในฟาร์ม 4 แห่งในรัฐเซาท์ แครโรไลน่า

ฮาซสันและคณะ (Hasson; et al. 1995: 115-126) พบการติดไวรัสโรคทอราในกุ้งขาวระยะวัยอ่อนซึ่งอยู่ในช่วงน้ำหนัก 0.1-0.5 กรัม หรือช่วง 2-4 สัปดาห์หลังจากปล่อยลงบ่อดิน กุ้งขาวที่ติดไวรัสโรคทอราจะมีลักษณะอาการดังนี้ คือ ส่วนหางมีสีแดงเข้ม เซลล์เยื่อบริเวณผิวหนัง รยางค์ต่างๆ เหงือก ทางเดินอาหารส่วนท้าย กระเพาะอาหาร รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองตาย

ทูและคณะ (Tu; et al. 1999: 159-161) ได้รายงานการระบาดของไวรัสโรคทอราในเอเชีย พบการระบาดในไต้หวันและบางจังหวัดของประเทศจีนซึ่งมีรายงานการติดเชื้อและการระบาดของไวรัสโรคทอราจากกุ้งขาวที่นำเข้าจากอเมริกากลาง

มาไรและคณะ (Mari; et al. 2002: 915-926) ได้ศึกษาโครงสร้างจีโนมของไวรัสโรคทอราพบว่ามีความยาว 10,205 เบส โดยมี poly (A) ที่ปลาย 3' ภายในจีโนมประกอบด้วยบริเวณที่มีการถอดรหัสเป็นโปรตีน 2 บริเวณ คือ ORF1 เป็นบริเวณที่ถอดรหัสเป็น non-structural proteins และ ORF2 ซึ่งเป็นบริเวณที่ถอดรหัสเป็น structural proteins ที่เป็นองค์ประกอบของแคปซิดทั้ง 3 ชนิด คือ โปรตีนขนาด 55, 40 และ 24 กิโลดาลตัน

ลักษณะอาการของไวรัสโรคทอรา

1) ระยะติดเชื้อรุนแรง หรือระยะเฉียบพลัน (acute)

เป็นระยะที่มีการติดเชื้อในเนื้อเยื่อชั้นนอกอย่างรุนแรงและทำให้เกิดอัตราการตายสูงสุด คือ 40-90 % อาการของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะนี้ คือ ลำตัวมีสีชมพูแดง หรือพบปื้นสีแดงซีดที่เกิดจากการอักเสบของเซลล์สีแดงในชั้นผิวหนัง โดยเฉพาะบริเวณแพนหางและรยางค์ขาทั้งหมดซึ่งเป็นที่มาของชื่อโรคหางแดง (red tail disease) เมื่อนำรยางค์กุ้งที่ติดเชื้อไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

จะพบว่าปลายรยางค์เริ่มกร่อนและเน่า นอกจากนี้กุ้งที่ติดเชื้อในระยะนี้จะมีเปลือกนึ่ม ลำไส้ใสไม่มีอาหาร และจะตายเมื่อกุ้งลอกคราบ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124) (ภาพประกอบ 5)

2) ระยะการรับเชื้อผ่าน หรือระยะคาบเกี่ยว (transition)

เป็นระยะที่ไวรัสผ่านเข้าสู่อวัยวะน้ำเหลืองซึ่งจะใช้เวลา 2-3 วัน กุ้งที่รอดตายจากระยะที่ 1 จะพบจุดแผลสีน้ำตาลดำขนาดเล็กอยู่ประปรายที่เปลือกกุ้งอาจมีเปลือกนึ่มหรือปกติ และอาจไม่แสดงลักษณะลำตัวสีแดงหรือหางแดง นอกจากนี้ยังอาจกินอาหารได้ตามปกติซึ่งอาจรอดไปจนถึงระยะที่ 3 อย่างไรก็ตามการสะสมของเชื้อที่อวัยวะน้ำเหลืองในปริมาณสูงอาจทำให้กุ้งตายได้ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124)

3) ระยะติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic หรือ recovery)

กุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อระยะที่ 1 และผ่านระยะที่ 2 มาถึงในระยะนี้จะเป็นพาหะนำไวรัสโรคทอราไปสู่กุ้งตัวอื่นๆ เป็นสาเหตุการแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็ว กุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะที่ 3 บางตัวอาจมีแผลจุดดำตามเปลือกซึ่งจะหายไปเมื่อกุ้งลอกคราบ อย่างไรก็ตามกุ้งระยะนี้จะมีเชื้อไวรัสโรคทอราอยู่ในตัวและจะกลายเป็นพาหะนำโรคต่อไป (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545: 121-124) (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 5 แสดงลักษณะอาการของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะติดเชื้อรุนแรงหรือระยะเฉียบพลัน (acute)



ภาพประกอบ 6 แสดงลักษณะอาการของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic หรือ recovery)

การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโรคทอรา

โบนาไมและคณะ (Bonami; et al. 1994: 187-193) พบว่ากุ้งทะเลได้รับผลกระทบจากไวรัสประมาณ 20 ชนิด ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอเมริกา ซึ่งไวรัส infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHNV) และไวรัสโรคทอราได้สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยไวรัส IHHNV สร้างความเสียหายให้กับกุ้ง *Penaeus stylirostris* ส่วนกุ้ง *Penaeus vannamei* ต้านทานต่อไวรัส IHHNV แต่การติดเชื้อก็มีผล อย่างไรก็ตามไวรัสโรคทอราก็เป็นเสมือนกระจกของไวรัส IHHNV ที่มีผลต่อกุ้ง *P. stylirostris* และ *P. vannamei* ไวรัสโรคทอราเป็นสาเหตุให้กุ้ง *P. vannamei* ตายเป็นจำนวนมาก ตรงกันข้ามกับกุ้ง *P. stylirostris* มีความต้านทานสูงต่อไวรัสโรคทอรา ตั้งแต่มีการค้นพบการแพร่ระบาดของไวรัสโรคทอราในประเทศเอกวาดอร์ในปี ค.ศ. 1992 ไวรัสโรคทอราก็ได้แพร่ระบาดอย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุสำคัญที่สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในอเมริกาเป็นอย่างมาก

ไลน์เนอร์และคณะ (Lightner; et al. 1995: 53-59) พบว่าไวรัสโรคทอราเป็นไวรัสที่มีความสำคัญต่อกุ้ง *P. vanamei* และพบว่ามี การแพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งใกล้กับแม่น้ำทอรา ประเทศเอกวาดอร์ในปี ค.ศ. 1992 ได้แพร่ระบาดไปยังฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศเปรู โคลัมเบีย ฮอนดูรัส โอไฮโอและฮาวาย ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุของการติดไวรัสโรคทอราในช่วงที่กุ้งติดเชื้อในระยะก่อนระยะเฉียบพลันส่วนใหญ่จะพบในลูกกุ้งช่วงน้ำหนัก 0.1 ถึง 5.0 กรัม ในช่วงอายุ 14 ถึง 40 วัน

โดยกุ้งที่ตายจะแสดงอาการให้เห็นคือ บริเวณแพนหางมีสีแดงเข้มและกุ้งจะตายในช่วงลอกคราบ ส่วน กุ้งที่รอดตายจากระยะเฉียบพลันจะเข้าสู่ระยะเรื้อรังหรือหายเป็นปกติจะมีรอยโรคปรากฏให้เห็นตาม บริเวณเปลือก

บูนและคณะ (Boone; et al. 1997: 4-51) ได้ศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโรคทอราพบว่า เป็นโรคที่สำคัญที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากให้กับเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งขาว *P. vannamei* ในซีกโลก ตะวันตก วิธีหนึ่งที่จะลดอัตราการตายของการติดเชื้อไวรัสโรคทอราโดยใช้กุ้งที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ใน การศึกษาแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง ซึ่งใช้ทดสอบความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคทอรา ของกุ้งขาว *P. vannamei* โดยทดลองเลี้ยงกุ้งขาวในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร หรือในถังทรงกระบอก ขนาด 4000 ลิตร กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองเป็นกุ้งที่ไม่ติดเชื้อได้มาจาก United States Marine Shrimp Farming Program Population ไวรัสโรคทอราที่ใช้ในการทดลองได้มาจากกุ้งที่คัดทิ้งมาจาก ฟาร์มที่ติดเชื้อในช่วงปี ค.ศ.1995 ที่ระบาดในรัฐเท็กซัส ประเทศอเมริกา การทดลองฉีดไวรัสโรคทอรา ให้กับกุ้งขาวและให้อาหารบดด้วยเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อหรือโดยการฉีดเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อเข้าช่องท้องกุ้ง จากการทดลองพบว่าในช่วง 9 ถึง 14 วัน กุ้งขาวที่รอดตายมีอัตราส่วน 0 ถึง 60 % แสดงให้เห็นว่ากุ้ง ขาวที่มีขนาดใหญ่จะมีแนวโน้มที่จะไม่ได้รับการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้เป็นค่าจาก การทดลองเพียง 2 การทดลองเท่านั้นจึงยังไม่เพียงพอที่จะสรุปว่ากุ้งขาว *P. vannamei* ที่เพิ่มขึ้นตาม ขนาดจาก 1 ถึง 30 กรัม มีความทนทานต่อไวรัสโรคทอรา

ไลท์เนอร์และคณะ (Lightner; et al. 1997: 165-176) พบว่าในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เชื้อไวรัสได้สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งไปทั่วโลก โดยแถบซีกโลกตะวันตก ไวรัสโรคทอราและไวรัส IHNV เป็นสาเหตุของการระบาดในฟาร์มกุ้งในอเมริกาและฮาวาย แต่ในแถบ เอเชียไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลืองได้สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง ส่วน การขนส่งกุ้งเป็นๆ ระหว่างประเทศสำหรับใช้เพาะเลี้ยงนั้นเป็นกลไกที่เห็นได้ชัดเจนของการแพร่ระบาดของ ไวรัสซึ่งสามารถที่จะแพร่กระจายภายในประเทศและระหว่างภูมิภาคก็อาจเกิดจากนกทะเลต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยในการแพร่กระจายของไวรัสที่เกิดกับกุ้ง และอีกอย่างหนึ่งที่เป็นไปได้และเป็นกลไกสำคัญ ในการแพร่ระบาดระหว่างประเทศคือสินค้ากุ้งแช่แข็งซึ่งอาจมีไวรัสปนเปื้อนแล้วส่งไปจำหน่ายยัง ประเทศต่างๆ และมีการตรวจพบการปนเปื้อนของไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลืองและไวรัสโรคทอราในกุ้งแช่แข็งที่เป็นสินค้านำเข้าในประเทศอเมริกา สินค้ากุ้งแช่แข็งนำเข้าอาจติดเชื้อมาจากฟาร์ม เลี้ยงหรืออาจติดมาจากแหล่งธรรมชาติซึ่งรวมถึงการปล่อยน้ำเสียหรือสิ่งปฏิกูลต่างๆ จากฟาร์มเลี้ยง กุ้งโดยไม่ได้มีการบำบัดก่อนที่จะปล่อยออกสู่ทะเล

โอเวอร์สตรีตและคณะ (Overstreet; et al. 1997: 313-319) ได้ทดลองกับกุ้ง *P. setiferus* แต่ไม่ได้ทดลองกับกุ้ง *P. aztecus* หรือกุ้ง *P. duorarum* ซึ่งกุ้งทั้งสองชนิดนี้สามารถติดไวรัสโรคทอรา

และทำให้กุ้งตายได้ อย่างไรก็ตามกุ้ง *P. setiferus* *P. aztecus* และ *P. duorarum* หลังจากติดเชื้อไวรัสโรคทอรา 79 วัน จะไม่แสดงอาการที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในกุ้ง *P. vannamei* ซึ่งเป็นโฮสต์ที่มีความไวสูงต่อไวรัสโรคทอรา ซึ่งกุ้ง *P. setiferus* *P. aztecus* และ *P. duorarum* เป็นกุ้งท้องถิ่นในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอเมริกาสามารถที่จะเป็นพาหะนำไวรัสโรคทอราโดยไม่แสดงอาการ กุ้ง *P. setiferus* ที่ติดไวรัสโรคทอราจะตายช้ากว่ากุ้ง *P. vannamei* และเปอร์เซ็นต์ในการเป็นโฮสต์ต่ำกว่า การวิเคราะห์การติดไวรัสโรคทอราของกุ้ง *P. setiferus* ด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่ายังไม่พบลักษณะทางเนื้อเยื่อที่ปรากฏเด่นชัดซึ่งโดยทั่วไปจะพบลักษณะเด่นชัดของเนื้อเยื่อในช่วงวันที่ 4-7 หลังการติดเชื้อโดยเปรียบเทียบกับรอยโรคที่ปรากฏกับกุ้ง *P. vannamei*

นูนานและคณะ (Nunan; et al. 1998: 87-91) ได้ศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโรคทอราพบว่าไวรัสโรคทอรามีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศอเมริกา ได้มีการบันทึกในปี ค.ศ. 1992 ว่าไวรัสโรคทอราได้แพร่ระบาดไปทั่วอเมริกากลางและอเมริกาใต้ จากหลักฐานพิสูจน์ได้ว่าไวรัสโรคทอรามาจากอเมริกาเหนือในช่วงระยะเวลา 5 ปี การตรวจสอบเกี่ยวกับไวรัสโรคทอราด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา การวิเคราะห์ทางชีววิทยาที่ใช้ความไวเป็นตัวชี้บ่งสายพันธุ์ของกุ้ง *P. vannamei* และวิธี *in situ* hybridization กับ TSV specific complementary DNA (cDNA) gene probe นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆ ในการตรวจหาไวรัสโรคทอราคือ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เลือกใช้ primer oligonucleotide 2 ตัว จากโคลน cDNA ของยีนไวรัสโรคทอราและใช้ primer 9195 และ 9992 ในการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งตรวจพบไวรัสทอราใน haemolymph ของกุ้ง *P. stylirostris* และ *P. vannamei*

พอลอสและคณะ (Poulos; et al. 1999: 99-106) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี มีความจำเพาะต่อไวรัสโรคทอราที่ได้จากกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อในธรรมชาติจากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งในเอกวาดอร์ ฮาวาย และเท็กซัส พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากไก่และหนูสามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคทอราใน hemolymph ของกุ้งในระยะติดเชื้อรุนแรงโดยวิธี immunoblotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้ถูกนำมาทดสอบความจำเพาะกับ hemolymph ที่ได้จากกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราในระยะรุนแรงและเรื้อรังรวมทั้งทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสในกุ้งชนิดอื่นๆ และได้นำวิธี Western blotting มาใช้ในการเปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัสทั้ง 3 ชนิดโดยใช้ไวรัสโรคทอราที่ทำให้บริสุทธิ์ในการทดลอง เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาตรวจการติดเชื้อในกุ้ง *P. vannamei* ในระยะวัยรุ่นที่มีการติดไวรัสโรคทอราพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจพบไวรัสโรคทอราใน hemolymph ของตัวอย่างทั้งในการติดเชื้อระยะรุนแรงและเรื้อรังได้

ทูและคณะ (Tu; et al. 1999: 159-161) พบว่ากุ้งขาวมีอัตราการตายสูงมากทางตอนใต้ของประเทศไทยได้วันที่พบการระบาดของไวรัสโรคทอราอย่างรุนแรงในปลายปี ค.ศ.1998 ซึ่งจากการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อพบการตายของเนื้อเยื่อของผิวหนังส่วนติดเปลือกเป็นรอยโรคหลักของการติดเชื้อและในส่วนที่พบเนื้อตายเมื่อส่องดูด้วยกล้อง transmission electron microscopy (TEM) พบว่าไวรัสมีขนาดเล็กรูปร่างเป็น icosahedral อนุภาคไวรัสคล้ายกับไวรัส Picornavirus มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร ซึ่งไวรัสโรคทอรามีความเกี่ยวข้องในการปนเปื้อนมากับกุ้งขาวและกุ้งตัวอ่อนจากพื้นที่ที่ระบาด

มาโรและคณะ (Mari; et al. 2002: 915-926) พบว่าไวรัสโรคทอราจีโนมเป็น RNA เส้นเดี่ยวที่มีความยาว 10,205 นิวคลีโอไทด์ โดยไม่รวม 3' poly (A) tail และประกอบด้วย open reading frame (ORFs) หลัก 2 open reading frame ซึ่งแยกจากกันโดย intragenic region ที่มีขนาด 207 นิวคลีโอไทด์ ORFs ถูกขนาบข้างด้วย 5' untranslated region (UTR) ขนาด 377 นิวคลีโอไทด์ และ 3' UTR ขนาด 226 นิวคลีโอไทด์และตามด้วย poly (A) tail ลำดับกรดอะมิโนของ ORF1 ที่ได้เป็น helicase, pretease และ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งคล้ายกับ non-structural protein ของ RNA ในไวรัสพืชและสัตว์โดยทั่วไป นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนสายสั้นๆ ที่มีตำแหน่งอยู่ที่ N-terminal region ของ ORF1 ของ double-stranded DNA ที่เป็นไวรัสในสัตว์ ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีรายงานการปรากฏของลำดับอะมิโนที่คล้าย single-stranded RNA virus แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของแคปซิดโปรตีน 3 ชนิดของไวรัสโรคทอรา 55, 40 และ 24 กิโลดาลตันใน ORF2 ซึ่งไม่อยู่ใน reading frame เดียวกับ ORF1 และมี AUG codon อยู่ทางตอนต้นของยีน โครงสร้าง intergenic region มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับใน genus *Cricket paralysis-like viruses* โครงสร้าง genome ของ TSV [5' UTR-non-structural proteins-intergenic UTR-structural protein-3' UTR-poly(A) tail] คล้ายกับ genome ของ RNA ไวรัสขนาดเล็กที่ก่อโรคในแมลง ซึ่งล่าสุดนี้ได้มีการจัดกลุ่มใหม่เข้าเป็นไวรัส genus ใหม่ คือ *Cricket paralysis-like virus*

อีริกสันและคณะ (Erickson; et al. 2005: 91-98) ได้ทดลองแยกสายพันธุ์ไวรัสโรคทอราจากกุ้ง *P. vannamei* จากเบลิสในอเมริกากลางพบว่าลักษณะที่แยกได้นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากฮาวายในปี ค.ศ. 1994 (HI94TSV GenBank: AF277675) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการอ้างอิงในการทดลอง และจากการทดลองได้จัดไวรัสโรคทอราสายพันธุ์ BLZ02TSV ที่แยกได้จากเบลิสให้กับกุ้ง *P. vannamei* พบว่าอัตราการตายของกุ้งสูงกว่ากุ้งที่ฉีดด้วยไวรัสโรคทอราสายพันธุ์ HI94TSV

เคซีและไลน์เนอร์ (Kathy; & Lightner. 2005: 69-76) ได้อธิบายเกี่ยวกับไวรัสโรคทอราว่ามีประสิทธิภาพการก่อโรคสูงต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vanamei* และก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ

อย่างมากในธุรกิจเพาะเลี้ยงกุ้งขาวซึ่งไวรัสโรคทอรัามีรายงานครั้งแรกในเอกวาดอร์ในปี ค.ศ. 1992 และได้แพร่กระจายไปทั่วอเมริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากกันโดยสภาพภูมิศาสตร์ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเปลือก CP2 ของไวรัสโรคทอรัามีขนาด 1.3 กิโลเบส จากทั้งหมด 34 สายพันธุ์และจากแหล่งเก็บพันธุ์กุ้งในเอกวาดอร์ กัมพูชา ฮอนดูรัส อเมริกา เม็กซิโก เบลีส์ ไทย จีน และอินโดนีเซีย และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP2 อีก 6 ลำดับที่ได้จาก GENBANK ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (0-5.6 % จากลำดับนิวคลีโอไทด์และ 0-0.7 % สำหรับลำดับกรดอะมิโน) ระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 40 สายพันธุ์นี้ การวิเคราะห์ทาง phylogenetic ของลำดับกรดอะมิโนของ CP2 พบว่าแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ อเมริกา เบลีส์ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยกลุ่มเบลีส์และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความแตกต่างทางลำดับกรดอะมิโนสมมติ 4.7 % กลุ่มเบลีส์และอเมริกาต่างกัน 4.4 % กลุ่มอเมริกาและ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความใกล้เคียงกันที่สุด โดยความแตกต่างเพียง 3.3 % การเปรียบเทียบ ไวรัสโรคทอรัาระหว่างเบลีส์และฮาวาย (สายพันธุ์อ้างอิงสำหรับกลุ่มอเมริกา) แสดงว่าไวรัสโรคทอรัากจากเบลีส์ก่อโรครุนแรงกว่าไวรัสจากฮาวายมีอัตราการตาย 50 % ในระยะเวลามากกว่า 4-5 วัน โดยวิเคราะห์ทาง phylogenetics และการเปรียบเทียบความรุนแรงสายพันธุ์เบลีส์ควรจะได้รับพิจารณาเป็นสายพันธุ์ใหม่

นีลเซนและคณะ (Nielsen; et al. 2005: 101-106) พบว่าประเทศไทยมีการขยายพื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งขาว *P. vanamei* ออกไปเรื่อย ๆ เพราะรัฐบาลได้สั่งห้ามให้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในน้ำจืดจึงมีการนำกุ้งขาว *P. vannamei* เข้ามาเลี้ยง กุ้งที่นำเข้าส่วนใหญ่มาจากประเทศจีนและไต้หวัน และพบการระบาดของไวรัสโรคทอรั่าตั้งแต่ในช่วงต้นปี ค.ศ. 2003 แต่การระบาดของไวรัสโรคทอรั่าในปัจจุบันก็ยังพบว่ายังมีการระบาดอยู่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเกี่ยวกับยีน VP1 ของไวรัสโรคทอรั่าและได้นำตัวอย่างกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอรั่าในประเทศไทยและจีนมาเปรียบเทียบพบว่าลำดับกรดอะมิโน VP1 ของไวรัสโรคทอรั่ามีลักษณะที่คล้ายกัน 97.7%

ศรีสุวรรณและคณะ (Srisuvan; et al. 2005: 1-8) ตรวจพบอาการและรอยโรคของกุ้ง *Penaeus monodon* ที่ติดไวรัสโรคทอรั่าแต่ยังไม่ปรากฏอาการให้เห็นแม้ว่าจะมีการตรวจพบไวรัสโรคทอรั่าด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ใช้กุ้ง *P. monodon* ที่ติดไวรัสโรคทอรั่าซึ่งตรวจด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยาและ *in situ* hybridization และจากการทดลองเลือกกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอรั่าจากประเทศไทยในปี ค.ศ. 2004 คือ กุ้ง *P. monodon* (Th04PmTSV) และกุ้ง *L. vannamei* (Th04LvTSV) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี PCR ที่ให้ผลบวก จากนั้นสกัดไวรัสที่มาจากกุ้งทั้งสองแล้วนำมาฉีดให้กับกุ้ง *P. monodon* ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เก็บตัวอย่างกุ้งในวันที่ 2, 14 และ 28 หลังจากกุ้งติดเชื้อและศึกษาด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยาและวิธี *in situ* hybridization พบอาการ

กล้ามเนื้อตายของกุ้ง *P. monodon* ที่บริเวณ cuticular epithelial cell และ lymphoid organ บ่งชี้กับ ระยะเวลาแรงและระยะเรื้อรังของการติดเชื้อไวรัสโรคทอราและจากการวิเคราะห์ลำดับยีนของโปรตีนส่วน เปลือกของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคทอราในกุ้ง *P. monodon* (Th04PmTSV) และกุ้ง *L. vannamei* (Th04LvTSV) พบว่ามีวิวัฒนาการมาจากสายพันธุ์ไวรัสโรคทอราในแถบเอเชีย

ชัยวิสุทธิธำรงและคณะ (Chaivisuthangkura; et al. 2006) ได้นำยีน VP1 และ VP3 ของ ไวรัสโรคทอรา มาโคลนใส่พลาสมิด pGEX-6P-1 และนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 หลังจากนั้นชัก นำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม VP1 และ โปรตีนลูกผสม VP3 เมื่อได้โปรตีนลูกผสมแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE และนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับหนูสายพันธุ์ Swiss mice เพื่อสร้างพอลิ โคลนอลแอนติบอดีและนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากหนูไปตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากหนูที่จำเพาะต่อโปรตีนลูกผสมทั้งสองสามารถนำไปใช้ ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคทอราในเนื้อเยื่อกุ้งที่นำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

กึ่งขาวแปซิฟิกที่ติดไวรัสโรคทอราที่ได้จากเกษตรกรที่เลี้ยงกึ่งในจังหวัดพังงา ตราดและ จันทบุรี

กึ่งขาวแปซิฟิกมีชีวิตจากคลอง 8 อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี อายุ 50 วัน น้ำหนัก ประมาณ 170 กรัมต่อตัว

หนูสายพันธุ์ Swiss mice จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

E. coli ที่มียีน VP3 ใน พลาสมิด pGEX-6P-1 ดำเนินการผลิตโดย ผศ.ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (Chaivisuthangkura; et al. 2006)

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งสาร บริษัท Denver instrument company
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) บริษัท Spectrafuge
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) บริษัท Huxley
4. เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ บริษัท New Brunswick science
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Sorvall
6. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (laminar flow) บริษัท NUAIRE
7. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO₂ Incubator) บริษัท NUAIRE
8. ชุด transblot apparatus บริษัท Bio-Rad
9. เครื่อง vacuum concentrator บริษัท Savant
10. ตู้อบ (hot air oven) บริษัท Sanyo
11. เตาไฟฟ้า (hot plate) บริษัท Sybron
12. แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer) บริษัท Medax
13. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo
14. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo
15. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) บริษัท Olympus
16. ตู้ดูดควัน (chemical fume hood) บริษัท New lab

17. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump) บริษัท New lab

สารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2 (ภาคผนวก ก)
2. Merthiolate เข้มข้น 1% (ภาคผนวก ก)
3. สารละลายย้อมสีโปรตีนและล้างสีย้อมส่วนเกิน (ภาคผนวก ค)
4. Towbin transfer buffer pH 8.8 (ภาคผนวก ค)
5. สารละลาย blotto เข้มข้น 5% (ภาคผนวก จ)
6. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5 (ภาคผนวก จ)
7. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (ภาคผนวก จ)
8. น้ำยาคงสภาพ Davidson's fixative (ภาคผนวก จ)
9. สี Eosin Y 0.2% ใน 95% ethanol (ภาคผนวก ฉ)
10. โปรตีนลูกผสมและไวรัสชนิดต่างๆ
 - สารสกัดจากเหงือกของกุ้งที่ติด white spot syndrome virus (WSSV)
 - โปรตีนลูกผสม GST-VP3
 - โปรตีนลูกผสม GST-YHV (yellow head virus)
 - โปรตีนลูกผสม GST-IHHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)
 - โปรตีนลูกผสม GST-HPV (hepatopancreatic parvovirus)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างกึ่งขาวแปซิฟิกที่ติดไวรัสโรคทอรา

นำกึ่งขาวมาซักนำให้ติดไวรัสโรคทอราโดยการฉีดสารสกัดจากเหงือกกึ่งขาวที่ติดไวรัสโรคทอราที่กรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร และนำมาเจือจาง 1:50 ด้วย 2X PBS จากนั้นนำไปฉีดให้กึ่งขาวขนาด 15-20 กรัมปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อตัว และเก็บ haemolymph จากกึ่งแต่ละตัวอย่างแยกจากกัน ส่วนหัวนำไปแช่ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการเตรียม paraffin section สำหรับใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคทอราโดยวิธี immunohistochemistry ส่วน haemolymph จากกึ่งแต่ละตัวนำมาตรวจหาไวรัสโรคทอราโดยวิธี dot blotting

2. การผลิตโปรตีนลูกผสม VP3

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มียีนของ VP3 ใน pGEX-6P-1 plasmid (Chaivisuthangkura; et al. 2006) ซึ่งผลิตโปรตีนลูกผสม GST-VP3 มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LB-Amp) แล้วนำไปเขย่าใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิด culture 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี LB-Amp broth 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นต่อและวัดความขุ่น (optical density, OD) ของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนมีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.5-0.7 แล้วเติม IPTG (isopropylthio- β -D-galacto-pyranoside) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ นำไปปั่นต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3. การสกัดโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ออกจากเซลล์แบคทีเรีย

นำเซลล์แบคทีเรียที่กระตุ้นให้สร้างโปรตีนลูกผสม GST-VP3 แล้วไปปั่นแยกที่ความเร็ว 6,000 x g เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl และ 8 M Urea pH 8) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) จน lysate ของแบคทีเรียได้

4. การทำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ให้บริสุทธิ์

นำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่สกัดได้จากแบคทีเรียมาผสมกับ 2 X treatment buffer จากนั้นนำไปแยกตามน้ำหนักโมเลกุลใน 10% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าสี

เคลื่อนที่มาถึงขอบเจล นำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมสี Coomassie brilliant blue ประมาณ 30 นาที ตัดเจลตรงตำแหน่งโปรตีนขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน (VP3 protein 24 kDa + GST protein 26 KDa) นำเจลที่ตัดแล้วมาแช่ใน destain solution 1 จนกระทั่งเจลอจาง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงนำไปแช่ใน 1 % SDS ที่อุณหภูมิห้อง ตัดเจลที่อยู่ใน 1 % SDS ให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วย้ายใส่ถุง dialysis และสกัดโปรตีนออกจากเจลโดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในสารละลาย Towbin buffer จากนั้นย้ายทั้งส่วนใสและเจลลงในหลอดทดลองและทำความสะอาดถุง dialysis ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงนำส่วนใสใส่กลับเข้าไปในถุง dialysis ดังเดิมและนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำกลั่น 2 ครั้งเข้า-เย็น ส่วนเจลที่อยู่ในหลอดทดลองให้เติม 1% SDS แล้วบ่มไว้ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาใส่ในถุง dialysis และทำเหมือนดังข้างต้น

จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการทำ dialysis แล้วใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง vacuum concentrator (Speed-Vac) เพื่อระเหยน้ำและให้มีความเข้มข้นมากขึ้น จากนั้นนำมาแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเพื่อสร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดี โดยแบ่งโปรตีนส่วนหนึ่งนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบความเข้มข้นโปรตีนโดยวิธี Bradford (Bradford, 1976)

5. การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน VP3 (Anti-VP3 antiserum)

นำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณโปรตีน 0.65 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มาปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวโดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว หลังจากนั้นอีก 2 สัปดาห์นำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว โดยทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ จากนั้นเก็บซีรัมจากหนูแต่ละตัวหลังจากฉีดเข็มที่ 4 ไปแล้ว 1 สัปดาห์มาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม (anti-VP3 antiserum) ที่ได้โดยวิธี Western blotting

6. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม (anti-VP3 antiserum) โดยวิธี Western blotting

นำตัวอย่างโปรตีนซึ่งประกอบด้วยโปรตีนจาก lysate ของ BL21 โปรตีน GST และโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาแยกโปรตีนแต่ละชนิดตามขนาดด้วย 10 % SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยเครื่อง transblot ใน 1X Towbin buffer

โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน 5 % blotto ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 10 นาทีแล้วย้ายลงในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม VP3 ที่ผลิตได้จากหนู บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 7 นาที แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1:1,500 ด้วย 5% blotto นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างออกด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงในสารละลาย สับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS จนกระทั่งเห็นแถบสีเกิดขึ้นแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง

7.การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสโรคทอรา

7.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโรคทอรา

การทำ cell fusion ได้พัฒนามาจากวิธีการของ Köhler และ Milstein (1976) ซึ่งดัดแปลงโดย Mosmann และคณะ (1979) โดยฉีดโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ให้กับหนูที่ให้ผลของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ดีที่สุดก่อนทำการ fusion 3 วัน และใช้ P3X myeloma cell เป็น fusion partner จากนั้นผ่าตัดม้ามจากหนูและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวและนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ 40 % polyethylene glycol หลังจากนั้นนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (selective medium-HAT medium) ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine และ 20 % fetal calf serum ใน RPMI medium ซึ่งมี 1 % mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน 96 wells culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาและคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อไวรัสโรคทอราโดยวิธี dot-blotting, immuno-histochemistry และ Western blotting โคลนของ hybridoma ที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสโรคทอรา จะนำมา reclone ด้วยวิธี limited dilution จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนและเก็บเซลล์แช่ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป และตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)

7.2 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

7.2.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

นำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ความเข้มข้น 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด อบที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำมาบ่มในน้ำยาเลียงเซลล์จากเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (เจือจาง 1:20 ใน 5 % blotto) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto นำมาบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างใน 0.5 % blotto และบ่มในสารละลายสับสเตรตประกอบด้วย 0.03 % DAB, 0.006 % H_2O_2 , 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม GST-VP3 นำมาคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2

7.2.2 การคัดเลือกระดับที่ 2 โดยวิธี Western blotting

นำ GST โปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ทำให้บริสุทธิ์และสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราตามธรรมชาติมาแยกบน 10 % SDS-PAGE ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดแยกเจลเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของ gel นำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยใช้ transblot apparatus (Biorad) จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนจุ่มใน 5 % blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำยาเลียงเซลล์แต่ละหลุมเจือจาง 1:200 ใน 5 % blotto เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อหาดำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

7.2.3 การคัดเลือกระดับที่ 2 โดยเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

นำโปรตีนลูกผสม GST-VP3, สารสกัดจากเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และโปรตีนลูกผสมของไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น YHV, IHNV, HPV มาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลียงเซลล์จากเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีน VP3 แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาต่อไวรัสชนิดอื่นๆ

7.2.4 การคัดเลือกระดับที่ 2 โดยวิธี immunohistochemistry

นำส่วนหัวของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราและกุ้งปกติที่สลับในน้ำเย็นแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านลง butanol และ แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตั้งแต่ 95%, 90%, 70% และน้ำ บ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด 6 ชั่วโมง ล้างและบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและบ่มในสารละลายสับสเตรตประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน

PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin Y (H&E) ดึงน้ำด้วยแอลกอฮอล์ เปรอร์เซนต์ต่างๆ ตั้งแต่ 70%, 90%, 95% และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล

นำเซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 มา reclone โดยวิธี limiting dilution (Eshhar, 1985) ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์และนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

8. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการ reclone เซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกและยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยการตรวจสอบขนาดของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting ตามวิธีการในข้อ 7.2.2 และตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดต่างๆ ตามวิธีการในข้อ 7.2.3 เรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA ตรวจสอบชนิดของ heavy chain และ light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหาไวรัสโรคทอราด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีการดังต่อไปนี้

8.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึงโปรตีนลูกผสม GST-VP3 เข้มข้น 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ลงที่ก้นหลุมของถาด 96 หลุม (ELISA microtiter plate) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วย สารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เสร็จแล้วเติมสารละลาย 5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่างๆ ของถาด 96 หลุม (ตารางที่ 1) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลายสับสเตรตซึ่งประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร 0.006% H_2O_2 ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มัลลงในทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร

บันทึกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

8.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่างๆ ของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) (ภาคผนวก ง)

8.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสโรคทอราโดยวิธี dot blotting

นำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 เข้มข้น 0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราเจือจางแบบ serial dilution ด้วย PBS แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto นำไปป้อนกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละไฮบริโดมาโคลนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปป้อนใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1:1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปป้อนในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 , 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (Phianphak และคณะ, 2005) ตรวจดูระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การผลิตโปรตีนโครงสร้าง VP3 ของ Taura syndrome virus (TSV)

นำ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด VP3-pGEX-6P-1 มากระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีนลูกผสม GST-VP3 โดยใช้ 1 mM IPTG จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตก (cell lysate) และวิเคราะห์โดยแยกบน 10% SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 50 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ได้จะมี GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N (ภาพประกอบ 7)

การทำโปรตีน GST-VP3 ให้บริสุทธิ์

จากการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยนำ lysate ของแบคทีเรียมาแยกบน 10% SDS-PAGE และตัดแถบโปรตีนลูกผสม GST-VP3 มาสกัดโปรตีนออกจากเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า สามารถแยกได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งมีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 8)

ความจำเพาะของแอนติซีรัม

หลังจากทำการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 และทำการเก็บแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวแล้วนำมาทดสอบความจำเพาะกับโปรตีนลูกผสม GST-VP3 โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูขาวตัวที่ 3 ให้การตอบสนองที่ดีที่สุด โดยจับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน ดังนั้นจึงใช้หนูขาวตัวที่ 3 มาทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (ภาพประกอบ 9)

การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกพบว่ามี microculture well ประมาณ 80 หลุมให้ผลบวกในการคัดเลือกในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting จากประมาณ 800 หลุมและในแต่ละหลุมมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting, immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับไวรัส WSSV YHV IHNV และ HPV ที่ใช้ในการทดสอบ พบว่ามีไฮบริโดมาโคลนจำนวน 29 โคลนซึ่งสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง โดยสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 2 กลุ่มตามความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ (ตาราง 3)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดลองจะสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน VP3 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มย่อยที่ 1 มีจำนวน 5 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มย่อยที่ 2 มีจำนวน 20 โคลน และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มย่อยที่ 3 มีจำนวน 1 โคลน (ตาราง 3) โดยแอนติบอดีเหล่านี้มีความจำเพาะกับโปรตีน VP3 และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน GST สารสกัดจากเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และโปรตีนลูกผสมของไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น YHV, IHNV, HPV ที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 12) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 นี้สามารถจับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตันของโปรตีนลูกผสม GST-VP3 และจับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตันของสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อโรคทอรา (TSV-VP3) (ภาพประกอบ 11C) นอกจากนี้ยังสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 นี้ตรวจการติดเชื้อโรคทอราในเนื้อเยื่อของกุ้งด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 โคลน (ตาราง 3) เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ GST โดยแสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ของไวรัสโรคทอราและโปรตีนลูกผสมของไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น YHV, IHNV, HPV ที่ใช้ในการทดสอบด้วย (ภาพประกอบ 12) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตันของโปรตีนลูกผสม GST-VP3 และจับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 กิโลดาลตัน (GST) (ภาพประกอบ 11B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อโรคทอราในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี

indirect ELISA

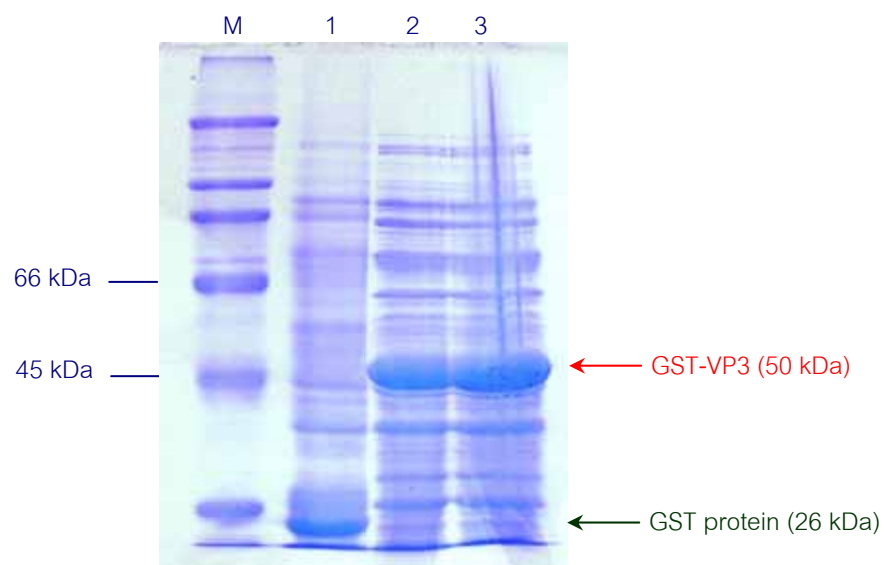
จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถแยกความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิพิโทปของแอนติเจนออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ แอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 (TSV3-44 และ 404) กลุ่มที่ 2 (TSV3-200 และ 368) และกลุ่มที่ 3 (TSV3-61, 128, 541, 601, 630, 666 และ 708) ซึ่งเมื่อนำแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงเมื่อเทียบกับเมื่อนำแอนติบอดีที่อยู่ต่างกลุ่มกันมาผสมรวมกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันนี้นั้นจับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกัน (ตาราง 2)

การจัดจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

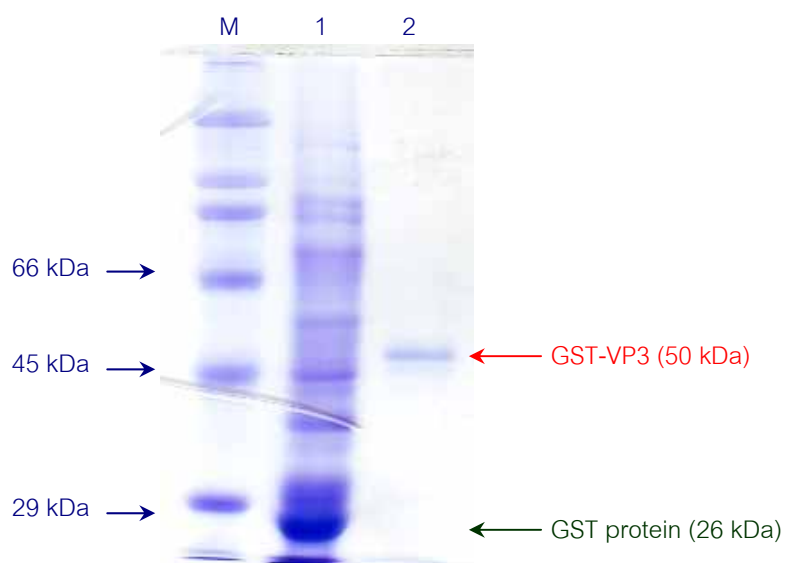
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี subclass เป็น IgG1 และ IgG2b (ตาราง 3)

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา recombinant VP3 protein ของ Taura syndrome virus (TSV) โดยวิธี dot blotting

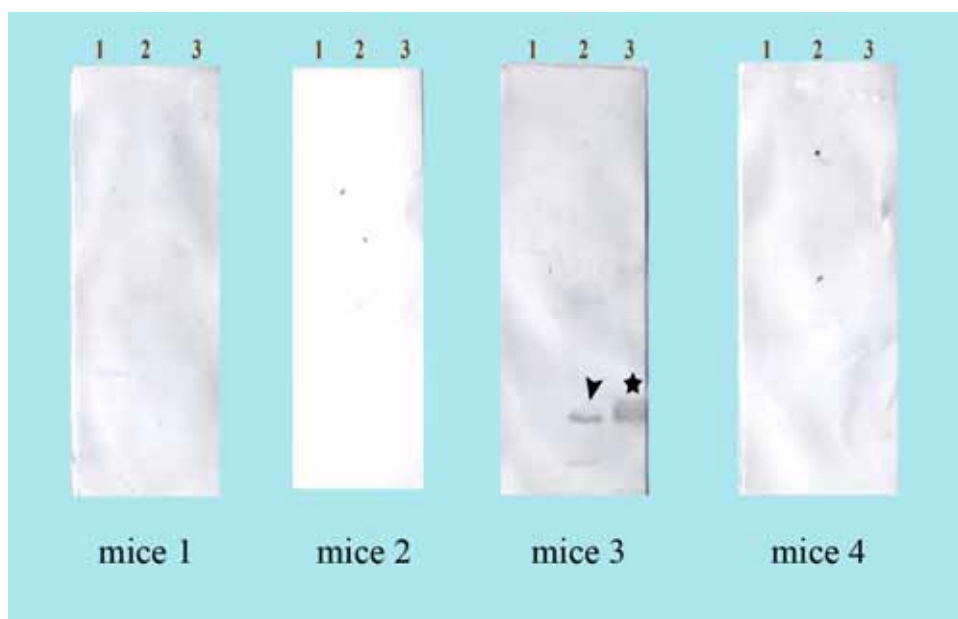
โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย โดยโมโนโคลนอลกลุ่มย่อยที่ 1, 2 และ 3 สามารถใช้ในการตรวจหาโปรตีนลูกผสม GST-VP3 โดยวิธี dot blotting ได้ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 6.5×10^{-3} ถึง 1.01×10^{-5} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV3-70 มีความไวในการตรวจหาโปรตีนลูกผสม GST-VP3 สูงที่สุด (ภาพประกอบ 14) ส่วนความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคทอราจากสารสกัดจากขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ โดยวิธี dot blotting พบว่ามีความไวในระดับที่แตกต่างกันโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV3-404 มีความไวในการตรวจหาไวรัสโรคทอราสูงที่สุด (ภาพประกอบ 15)



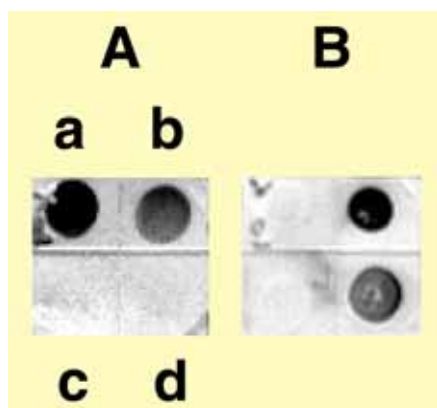
ภาพประกอบ 7 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี 10% SDS-PAGE ที่ผลิตได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ ที่มี พลาสมิด pGEX-6P-1 M = โปรตีนมาตรฐาน (น้ำหนักโมเลกุลสูง) 1 = โปรตีน GST ที่สร้างจาก ยีนในพลาสมิด pGEX-6P-1 2 และ 3) = โปรตีนหลอมผสม GST-VP3



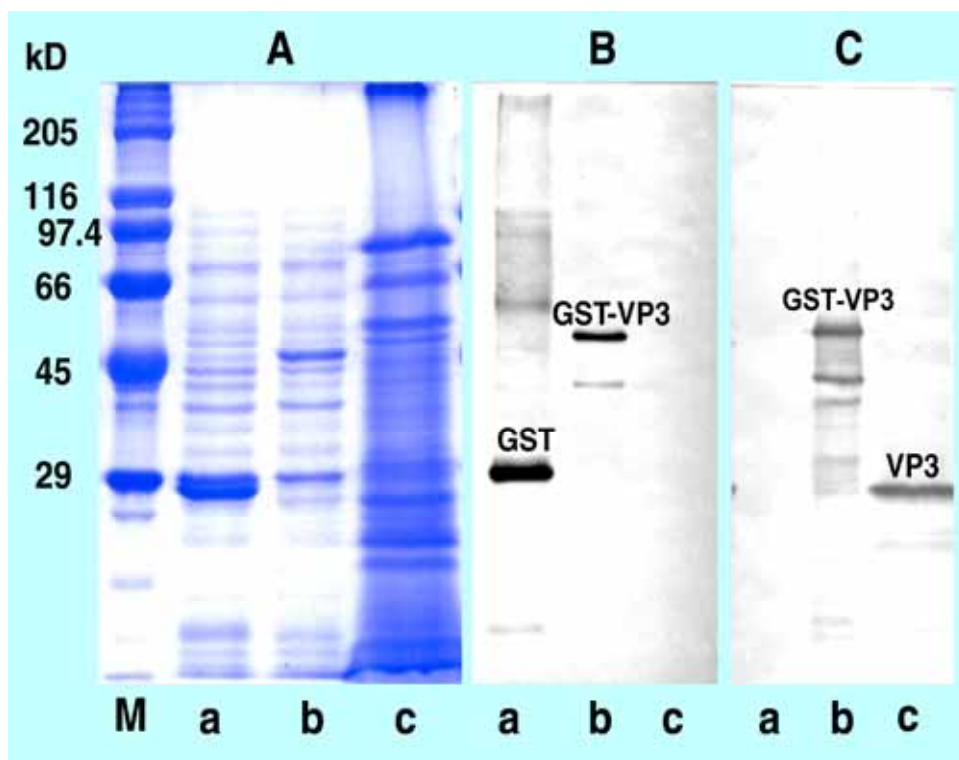
ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี 10% SDS-PAGE แสดงโปรตีนหลอมผสม GST-VP3 ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ M = โปรตีนมาตรฐาน (น้ำหนักโมเลกุลสูง) 1 = โปรตีน GST ที่สร้างจากยีนในพลาสมิด pGEX-6P-1 และ 2 = โปรตีนหลอมผสม GST-VP3



ภาพประกอบ 9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blotting โดยแยกโปรตีน GST ที่สร้างจากยีนในพลาสมิด pGEX-6P-1 (1) โปรตีนลูกผสม GST-VP3 (2) และโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ (3) ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนนำไปปฏิกิริยากับ mouse-anti recombinant VP3 antiserum จากหนูขาว 4 ตัว

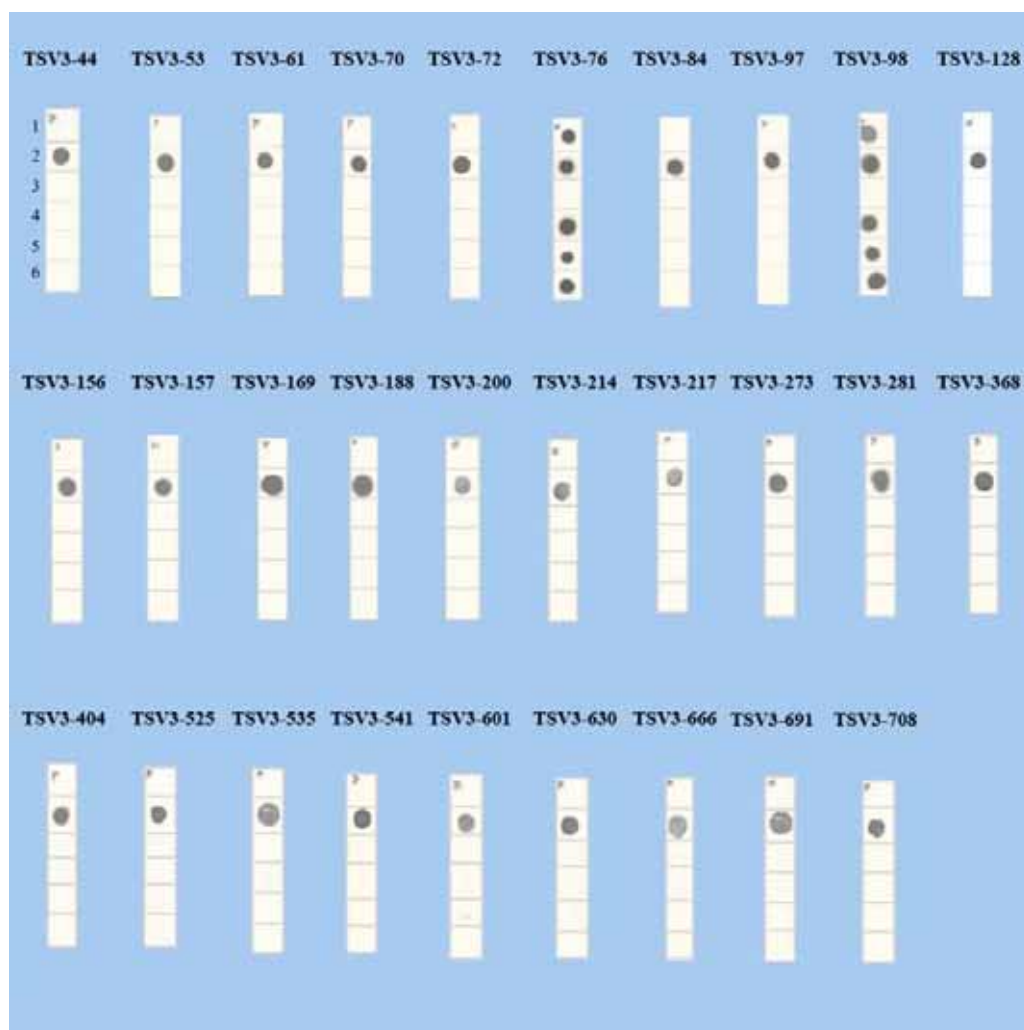


ภาพประกอบ 10 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting (a) lysate ของ *E. coli* BL21 with pGEX-6P-1 plasmid (b) *E. coli* ที่มี VP3-pGEX-6P-1 plasmid (c) ขาวำยน้ำของกึ่งที่ไม่ติดไวรัสโรคทอรา และ (d) ขาวำยน้ำของกึ่งที่ติดไวรัสโรคทอราตามธรรมชาติ หยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน 1 ไมโครลิตร/จุด และนำไปปัมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี A = GST-98 (TSV3-98) และ B = TSV3-97



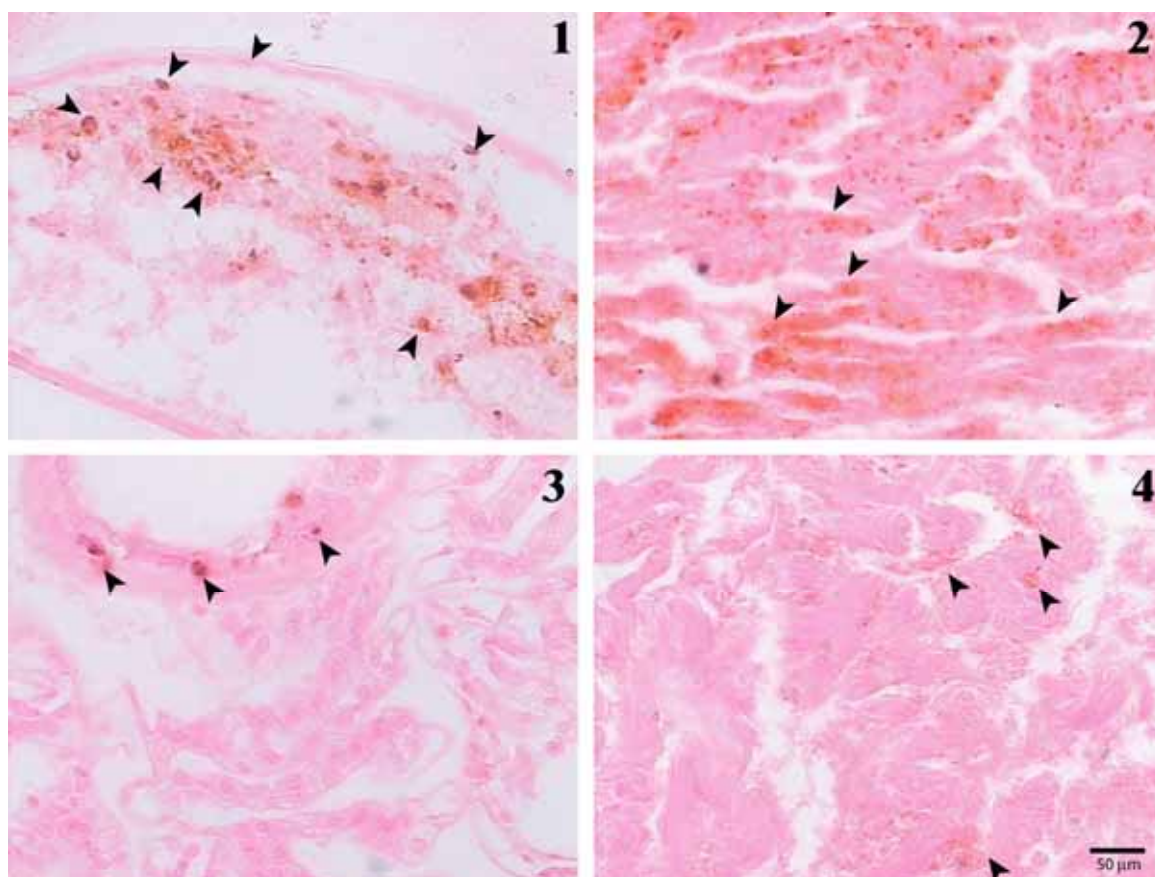
ภาพประกอบ 11 SDS-PAGE (A) และ Western blotting ของ lysate ของ *E. coli* BL21 ที่มี pGEX-6P-1 plasmid (a) *E. coli* ที่มี VP3-pGEX-6P-1 plasmid (b) สารสกัดจากข่าว่ายน้ําของกุ้งที่ติดไวรัสโรคทอราตามธรรมชาติ (c) โดยย้อมด้วย (B) ไมโนโคลนอลแอนติบอดี GST-98 ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีน GST และ (C) ไมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV3-97 ซึ่งจำเพาะต่อ VP3 ของไวรัสโรคทอรา

M = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง

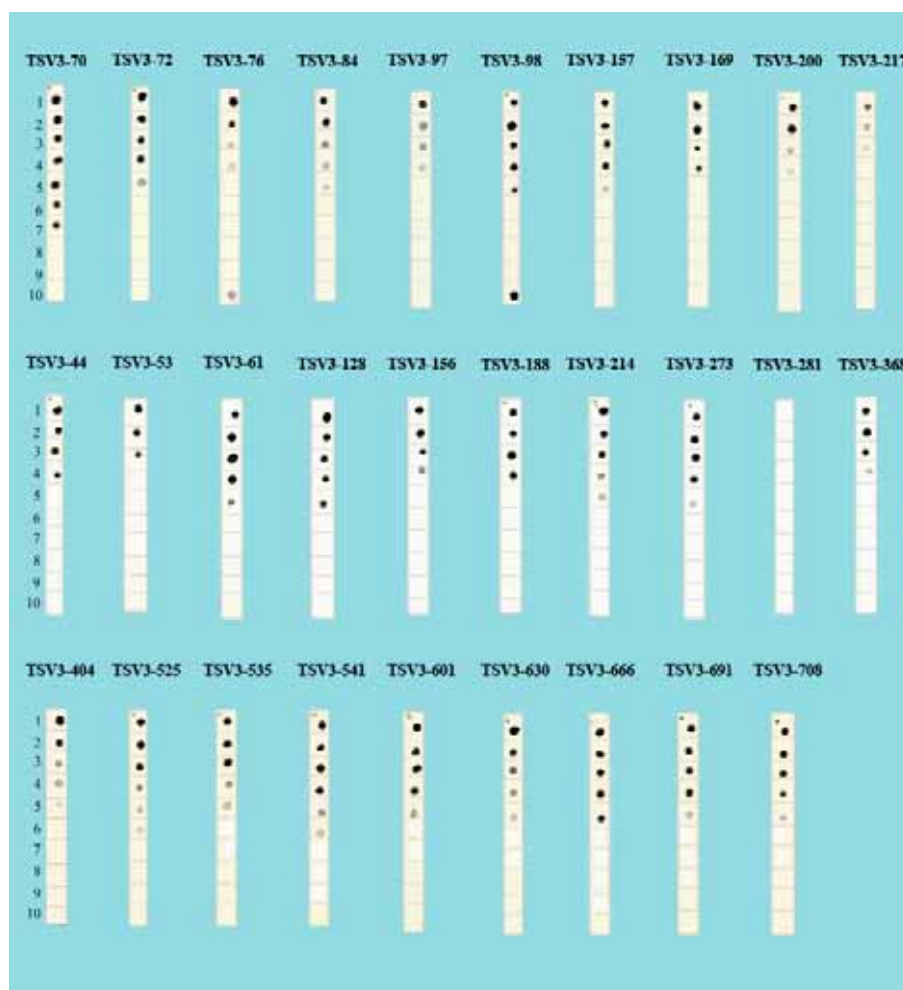


ภาพประกอบ 12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดสารสกัดจากเหงือกและโปรตีนลูกผสมของไวรัสชนิดต่างๆ ลงบนไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน 1 ไมโครลิตร/จุด และนำไปป่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ซึ่งสารสกัดจากเหงือกและโปรตีนลูกผสมของไวรัสชนิดต่างๆ ที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

1. โปรตีน GST ที่สร้างจากยีนในพลาสมิด pGEX-6P-1
2. โปรตีนลูกผสม GST-VP3
3. สารสกัดจากเหงือกของกุ้งที่ติด white spot syndrome virus (WSSV)
4. โปรตีนลูกผสม GST-YHV (yellow head virus)
5. โปรตีนลูกผสม GST-IHHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)
6. โปรตีนลูกผสม GST-HPV (hepatopancreatic parvovirus)

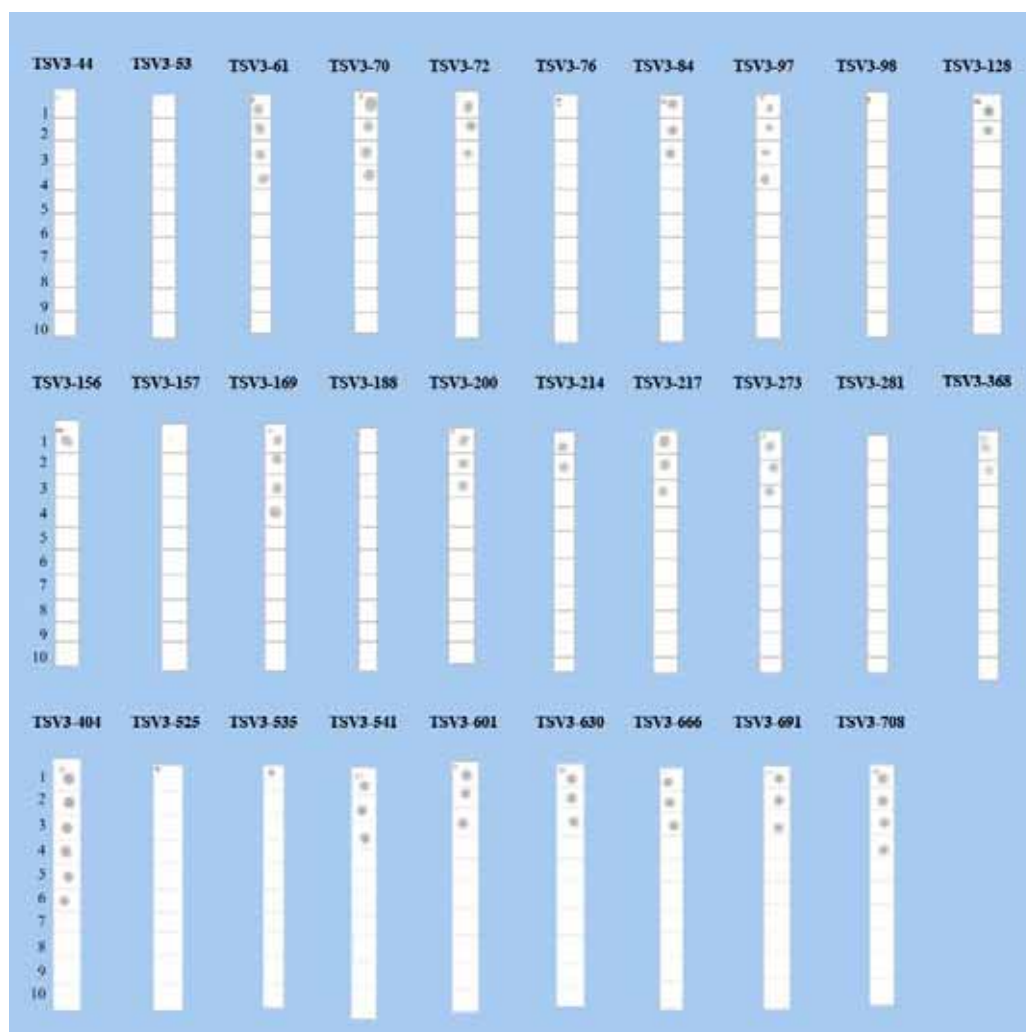


ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohisto-chemistry โดยใช้กุ้งขาวที่ติดไวรัสโรคทอรา (1) ทรายังค์ (2) ลิมฟอยด์ (3) เหยือก และ (4) กล้ามเนื้อ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV3-70 และย้อมด้วยสีอีโอซิน สีน้ำตาลและหัวลูกศรแสดงบริเวณและตำแหน่งของเซลล์ที่ติดไวรัสโรคทอรา



ภาพประกอบ 14 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการตรวจหา VP3 ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 6.5×10^{-3} ถึง 2.53×10^{-5} มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน 1 ไมโครลิตรต่อจุด และนำไปป้อนด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว 1 : 6.50×10^{-3} มิลลิกรัมต่อจุด	แถว 2 : 3.25×10^{-3} มิลลิกรัมต่อจุด
แถว 3 : 1.62×10^{-3} มิลลิกรัมต่อจุด	แถว 4 : 8.12×10^{-4} มิลลิกรัมต่อจุด
แถว 5 : 4.06×10^{-4} มิลลิกรัมต่อจุด	แถว 6 : 2.03×10^{-4} มิลลิกรัมต่อจุด
แถว 7 : 1.01×10^{-4} มิลลิกรัมต่อจุด	แถว 8 : 5.07×10^{-5} มิลลิกรัมต่อจุด
แถว 9 : 2.53×10^{-5} มิลลิกรัมต่อจุด	แถว 10 : GST 1 ไมโครลิตรต่อจุด



ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการตรวจการติดไวรัสโรคทอราในกึ่งจากธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting โดยหยดสารสกัดจากข่าวย่น้ำของกึ่งที่ติดไวรัสโรคทอราเจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน 1 ไมโครลิตรต่อจุด และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ความเข้มข้นของข่าวย่น้ำของกึ่งที่ติดไวรัสโรคทอราที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว 1 1:2

แถว 2 1:4

แถว 3 1:8

แถว 4 1:16

แถว 5 1:32

แถว 6 1:64

แถว 7 1:128

แถว 8 1:256

แถว 9 1:512

แถว 10 1:1024

ตาราง 3 แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ซึ่งมีความจำเพาะต่อ VP3 และจำเพาะต่อ GST

MAbs (subclass)	วิธีทดสอบ		การตรวจสอบความไว โดยวิธี dot blotting (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ความจำเพาะ
	Western blotting	Immunohisto-chemistry		
I. MAb จำเพาะต่อ VP3				
1. TSV3-53, 156, 200, 217, 369 (IgG1)	+	+	$6.5 \times 10^{-3} - 1.62 \times 10^{-3}$	VP3
2. TSV3-44, 61, 72, 84, 97, 128, 157, 169, 188, 214, 273, 404, 525, 535, 541, 601, 630, 666, 691, 708 (IgG1)	+	+	$6.5 \times 10^{-3} - 2.03 \times 10^{-4}$	VP3
3. TSV3-70 (IgG1)	+	+	$6.5 \times 10^{-3} - 1.01 \times 10^{-4}$	VP3
II. MAb จำเพาะต่อ GST				
GST76(TSV-76), 98(TSV-98) (IgG2b)	+	-	$6.5 \times 10^{-3} - 4.06 \times 10^{-4}$	GST

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ได้ผลิตโปรตีนลูกผสม GST-VP3 จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ได้โปรตีนที่มีขนาด 50 กิโลดาลตัน (VP3 24 กิโลดาลตัน + GST 26 กิโลดาลตัน) และนำโปรตีนลูกผสม GST-VP3 มาทำการสกัดโปรตีนออกจากเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าสามารถแยกได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง (ภาพประกอบ 8) และนำมาปลุกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเพื่อใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่เก็บได้จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวพบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวนั้นให้การตอบสนองต่อแอนติเจนที่แตกต่างกันออกไป เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนั้นมีอิพิโทปเป็นจำนวนมาก จึงทำให้ปี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจนและเป็นผลให้มีการกระตุ้นการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรั่ม ซึ่งซีรั่มที่ได้จากหนูแต่ละตัวนั้นสามารถจับกับอิพิโทปของแอนติเจนได้หลากหลาย อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติซีรั่มด้วยวิธี Western blotting นี้สามารถสังเกตเห็นได้ว่าแอนติซีรั่มสามารถทำปฏิกิริยาได้กับแถบโปรตีนลูกผสม GST-VP3 จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวพบว่า หนูขาวตัวที่ 3 นั้นให้การตอบสนองดีที่สุดเนื่องจากจำเพาะกับโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 9)

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำนวนโคลน 29 โคลน ทั้ง 29 โคลน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามความจำเพาะ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มแรกมี 3 กลุ่มย่อยคือ 1, 2 และ 3 มีความจำเพาะกับโปรตีน VP3 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตัน ซึ่งได้จากการสกัดจากขาวายน้ำของกึ่งที่ติดไวรัสโรคทอรา (ภาพประกอบ 8) และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดจากเห็บอกและโปรตีนลูกผสมของไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 12) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 มีความจำเพาะกับ GST (GST 26 kDa) (ภาพประกอบ 12) นอกจากนี้ยังสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มแรกไปใช้ในการตรวจหาตำแหน่งของการติดไวรัสโรคทอราในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13) โดยพบว่าโคลน TSV3-70 ให้ผลการตรวจดีที่สุด ส่วนการตรวจสอบความไวด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV3-70 ที่ใช้ในการตรวจหา VP3 จากโปรตีนลูกผสม GST-VP3 ให้ผลดีที่สุด และโมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV3-404 ที่ใช้ในการตรวจหา กึ่งที่ติดไวรัสโรคทอราตามธรรมชาติให้ผลดีที่สุด

สำหรับการใช้แอนติบอดีตรวจสอบการติดไวรัสโรคทอราในกึ่งนั้น พบว่ามีรายงานการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีในไก่และโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการใช้เชื้อไวรัสทอราที่ทำให้บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการปลุกภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ทดลอง ซึ่งสามารถผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีในไก่และโม

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน VP1 ได้ ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสทอราโดยการตรวจ haemolymph ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting ได้ แต่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวมีปฏิกิริยาข้ามกับ YHV IHNV HPV และ WSSV และความแม่นยำในการตรวจการติดเชื้อในระยะเฉียบพลันและในระยะติดเชื้อแบบเรื้อรังยังให้ผลไม่แน่นอน (Poulos; et al. 1999: 99-106) และจากรายงานต่อมาได้มีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1A1 (MAb1A1) ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคทอรา พบว่าให้ผลบวกเฉพาะกับไวรัสโรคทอราสายพันธุ์จากอเมริกาและไต้หวันเท่านั้น โดยจะให้ผลลบกับไวรัสโรคทอราจากเม็กซิโกและนิการากัว (Overstreet; et al. 1997: 313-319) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ก็ตรงกับในรายงานต่อมา โดยพบว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี A1A ตรวจสอบเชื้อไวรัสทอราสายพันธุ์จากฮาวายให้ผลบวก แต่ให้ผลลบกับเชื้อไวรัสทอราสายพันธุ์จากเบลิส (Erickson; et al. 2005) ซึ่งจะเห็นได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1A1 สามารถใช้ตรวจไวรัสทอราได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น ดังนั้นในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP3 ที่ผลิตได้ในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคทอราในกุ้งที่มีการติดเชื้อทั้งในระยะรุนแรงและในระยะติดเชื้อแบบเรื้อรัง และอาจจะสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสทอราจากทุกสายพันธุ์ทั่วโลกได้ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีน GTS-VP3 ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันนั้นได้จากยีน VP3 ซึ่งมีความแปรปรวนต่ำในแต่ละสายพันธุ์ต่างๆ ของไวรัสทอราทั่วโลก (Erickson; et al. 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของชัยวิสุทธางกูรและคณะ ที่ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน VP1 และ VP3 และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP3 สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสโรคทอราจากกุ้งขาวได้ทุกตัวจากแหล่งต่างๆ ที่มีการระบาดของโรคได้ แต่พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน VP1 นั้น สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสโรคทอราได้เพียงบางตัวอย่างเท่านั้น (Chaivisuthangkura pers communication)

นอกจากนี้การใช้โปรตีน rVP3 ที่ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองนั้นได้จากการโคลนยีนของ VP3 และทำให้แสดงออกใน *E. coli* แทนการใช้ไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์ทำให้สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีกว่า เพราะไม่มีการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อกุ้ง ดังนั้นจึงคาดว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน VP3 ที่ผลิตได้ในครั้งนี้จะสามารถนำมาใช้พัฒนา immunoassay รูปแบบต่างๆ เช่น dot blotting และ immunohistochemistry เพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสทอราสำหรับใช้ในห้วงปฏิบัติการต่างๆ ได้ หรืออาจจะใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจแบบ strip test ซึ่งเป็นชุดตรวจคล้ายกับการตรวจการตั้งครรภ์ ที่สามารถใช้งานง่ายและมีความไวสูง โดยที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งสามารถทำได้ด้วยตนเองโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษใดๆ และสามารถทำได้ทันทีที่บ่อเลี้ยงได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2545). ศาสตร์ของกุ้งขาวลิทอพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 2) *วารสารสัตว์น้ำ*. ปีที่ 14 ฉบับที่ 160 หน้า 1.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). แอนติบอดี. ใน *วิทยายุทธคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย*, หน้า 90-100. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- สิริฤกษ์ ทรงศิริไธ; และคนอื่นๆ. (2537). โมโนโคลนอลแอนติบอดี. *อิมมูโนวิทยา*, หน้า 365-369. กรุงเทพมหานคร: เค.พี. พรินติ้ง จำกัด.
- Bachere, E. (2000). Introduction shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191: 3-11.
- Bonami, J.B.; et al. (1994). Epizootology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp virus in the Americans. *Journal Virological Method*. 49(2): 187-193.
- Bonami, J.B.; et al. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *Journal of General Virology*. 78: 313-319.
- Boone, T.; et al. (1997). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp, *Penaeus vannamei* (crustacea: Pemeidae). *Diseases of Aquatic Oranganism*. 30 : 4 - 51.
- Boonyaratpalin, S.; et al. (1992). Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, HI, pp. 57–112.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2006). Polyclonal antibodies specific for VP1 and VP3 capsid proteins of Taura syndrome virus (TSV) produced via gene cloning and expression. *Diseases of Aquatic Organisms*. 69: 249-253.
- Erickson, H.S.; et al. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic method: diagnostic implication in Penaeid shrimp. *Disease of Aquatic Organism*. 52: 1–10.

- Erickson, H. S.; et al. (2005). Taura syndrome virus from Belize represents a unique variant. *Disease of Aquatic Organism*. 64: 91-98.
- Eshhar, z. (1985). Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer(ed), *Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine*, 1-42. New York: Plenum Press.
- Flegel, T.W.; et al. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*. 5: 171-176.
- Hasson, K.W.; et al. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23: 115-126.
- Hasson, K. W.; et al. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *Journal of Virological Methods*. 66: 227-236.
- Hasson, K. W. (1998). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: discovery of the viral agent and disease characterization studies. Final dissertation from the completion of the PhD in the Pathobiology Program, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, AZ. P: 36-38.
- Kohler, G. & Mislstein, C.; (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology*. 6: 511-519.
- Lightner, D.V.; et al. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 53-59.
- Lightner, D.V.; et al. (1997). Risk of spread of penaeid shrimp virus in Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Journal Invertebrate Pathology*. 69(2): 165-176.
- Lightner, D.V. & Redman, R.M.; (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.
- Meri, J.; et al. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *Journal of General Virology*. 83: 915-926.

- Mosmann, T.R. Bauman, R. and Williamson, A.R. (1979). Mutation affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells 1. Functional analysis by fusion. *European Journal of Immunology*. 9: 511-516.
- Nielsen, L.; et al. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Diseases of Aquatic Organism*. 63 : 101-106.
- Nunan, L.M.; et al. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus(TSV) in experimentally infected shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34(2): 87-91.
- Overstreet, R.M.; et al. (1997). Susceptibility to Taura Syndrome Virus of some Penaeid Shrimp Species Native to the Gulf of Mexico and the Southeastern United States. *Journal of General Virology*. 78: 313-319.
- Phianphak, W.; et al. (2005). Production of monoclonal antibodies against *Vibrio harveyi* 639. *Diseases of Aquatic organisms*. 63: 161-168.
- Poulos, B.T.; et al. (1999). Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organism*. 37: 99-106.
- Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 71-76.
- Snieszko, S.F. (1973). Diseases of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifty Fishery Management Training Course Report, pp. 55-56, London: Jansen edited in Lightner, D.V. & Redman, R.M. 1988. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.
- Song, Y.I.; et al. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 14: 317 - 331.
- Srisuvan, T.; et al. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Diseases of aquatic organisms*. 67:1-8.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. & Soderhall, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 179.

- Tang, K.F.J.; & Lightner, D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Research*. 112: 69-76.
- Tu, C.; et al. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* culture in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*. 38: 159-161.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. สารละลาย blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โรซอล (Thimerosal) (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6	กรัม
แอล-กลูตามีน (L-glutamine) (Sigma)	0.2923	กรัม
โซเดียมไพรูเวท ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)		
เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000	มิลลิกรัม
กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมครอนเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย fetal bovine serum เข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum (FBS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
หรือ bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)		
100 x HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%		
ใน RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100 X HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายสำหรับหลอมรวมเซลล์ (polyethylene glycol เข้มข้น 40%)

พอลิเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol)	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มิลลิลิตร
เติม RPMI (1) ลงในพอลิเอธิลีนไกลคอลที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้		

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium (1)	88.0	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้		

ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 สารละลายโมโนเมอร์ (30% T, 2.7% C_{Bis})

อะคริลาไมด์ Acrylamide	58.4	กรัม
บิส-อะคริลาไมด์ (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 4 X Running gel buffer (tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N

1.3 4 X Stacking gel buffer (tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8)

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 N

1.4 SDS เข้มข้น 10 %

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 % (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

Tris เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	1.0	มิลลิลิตร.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100.0	มิลลิลิตร

1.7 2 X Treatment buffer

Tris เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 การเตรียม separating gel สำหรับ SDS-PAGE 15% gel (15 % T 2.7 % C_{BIS})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15.0	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 % (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	20.0	ไมโครลิตร

2.2 การเตรียม Stacking gel สำหรับ SDS-PAGE 4% gel (4% T 2.7% C_{BIS})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 % (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

ตาราง 4 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15 % T 2.7% C _{BIS}	4% T 2.7 % C _{BIS}
30 % T 2.7 % C _{BIS}	15.0 มิลลิลิตร	2.66 มิลลิลิตร
Tris-Cl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8(1.2)	7.5 มิลลิลิตร	-
Tris-Cl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5.0 มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10	0.3 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75 มิลลิลิตร	12.2 มิลลิลิตร
ผสมและใช้ปั๊มสุญญากาศดึงอากาศออกจากสารละลาย		
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
TEMED	20 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
ผสมและเทอย่างรวดเร็วลงในช่องระหว่างกระจก		

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

Tris	12.0	กรัม
ไกลซีน	57.6	กรัม
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Staining stock solution (สี Coomassie blue R-250 เข้มข้น 1 %)

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Staining solution

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
เมทานอล	250.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	50.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) I

เมทานอล	500.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) II

เมทานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	70.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อมและล้างเจล

ถอดเจลจากกระจกแซ่ในสี Coomassie blue (4.1.2) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ล้างเจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา ½-1 ชั่วโมง จนเห็นแถบโปรตีน จากนั้นแช่เจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 2 (4.2.2) จนกระทั่งสีพื้นใสปราศจากสี

5. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma)

Myosin, rabbit muscle	205	กิโลดาลตัน
β -Galactosidase, <i>Escherichia coli</i>	116	กิโลดาลตัน
Phosphorylase b, rabbit muscle	97	กิโลดาลตัน
Albumin, bovine serum	66	กิโลดาลตัน
Ovalbumin, chicken egg	45	กิโลดาลตัน
Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29	กิโลดาลตัน

6. Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blot

Tris	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมทานอล	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1000.0	มิลลิลิตร
ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด		

ภาคผนวก ง

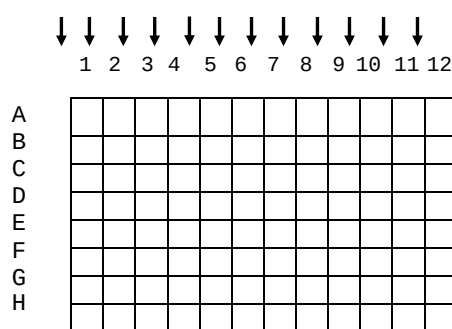
สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ Isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

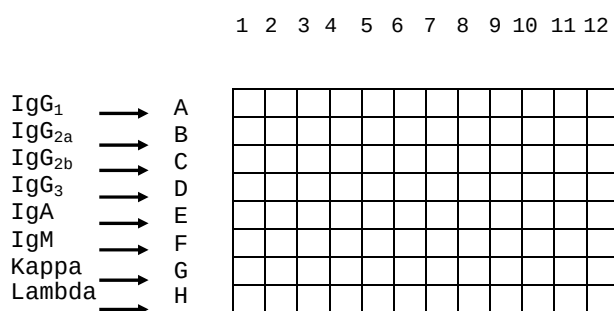
- 1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ 3 chain specific)
- 5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
- 6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
- 7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
- 8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
- 9) Normal Rabbit Serum, (Negative Control)
- 10) Positive Control, Monoclonal Mouse IgG1
(Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10 % FBS)
- 11) HPR-Goat anti-Rabbit (IgG) (H+L), Concentrated (50X)
- 12) Goat anti-Mouse Ig(GAM), Concentrated (50X)
(0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล ลิทธิกรกุล, 2548)

- เคลือบภาชนะ 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง
- สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง



- ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- เติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด (1-8) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ A-H



- ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- เติม HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

9. เตรียมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย O-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.006% ใน citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม
10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก จ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. สารละลาย blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

2. สารละลาย 0.5% blotto

สารละลาย blotto เข้มข้น 5 % (1)	50.0	มิลลิลิตร
PBS 0.15 M pH 7.2	950.0	มิลลิลิตร

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

โซเดียมซิเตรท	29.41	กรัม
Merthiolate เข้มข้น 1%	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N		

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ immunohistochemistry (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. น้ำยาคงสภาพ (davidson's fixative)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มอลินเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

3. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลาย calf serum 10% (P_1^+)

calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

สี hematoxylin	8.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	400.0	มิลลิลิตร
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร
กลีเซอริน (glycerine)	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร

6. สีย Eosin Y 0.2% ใน 95% ethanol

สีย Eosin Y	0.2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	100.0	มิลลิลิตร

การตรวจการติดเชื้อมีในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี indirect immunoperoxidase (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76)

1. วิธี immunohistochemistry (IHC)

1.1 ตัดส่วนหัว (cephalothoraxes) ของกุ้งขาวที่เกิดการติดเชื้อไวรัสโรคทอราแล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับดังนี้

1.3.1 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.2 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง

1.3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.5 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.6 แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราฟลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1: 1 เก็บในตู้อบที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.8 แช่ในพาราฟลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที

1.4 นำเนื้อเยื่อของกุ้งที่อินฟิเลตด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราฟลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซกชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิ้น (ribbon)

1.6 นำเซกชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซกชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยัดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกขับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparafinization) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันดังนี้

- 1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 1.7.2 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.4 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.5 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 80% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.6 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.7 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.8 แช่ในสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที
- 1.7.9 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 1.7.10 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 1.7.11 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

2. วิธี indirect immunoperoxidase

2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking)

- 2.1.1 หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละเซกชันด้วยไมโครปิเปต
- 2.1.2 บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

- 2.2.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก
- 2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละเซกชัน
- 2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- 2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- 2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

- 2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละเซกชันออก
- 2.3.2 หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุกเซกชัน

2.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเซคชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.4 นำเซคชันมาทำปฏิกิริยากับ 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

2.5 ล้างเซคชันด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอิโอซิน

3.1 ตี้งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

3.2 ย้อมทับด้วยสีอิโอซิน 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% และล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

3.3 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 5 นาที

3.5 แช่ในไซลีนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการฟีนิกส์ไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางพีนิก (permount)

3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นางสาวเพ็ญจันทร์ โพธิ์น้อย
วันเดือนปีเกิด	26 สิงหาคม 2521
สถานที่เกิด	ชัยนาท
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 2 หมู่ 5 ตำบลบ้านกล้วย อำเภอเมือง จังหวัดชัยนาท 17000
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียน ชัยนาทพิทยาคม
พ.ศ. 2545	วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) จากมหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา
พ.ศ. 2549	วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทร วิโรฒ