

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๕

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีความไวและ  
ความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA

Development of high sensitivity and high accuracy diagnostic kit for  
detection of yellow head virus in *Penaeus monodon* :

Sandwich ELISA

15 ส.ค. 2547

ไพศาล สิทธิกรกุล ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร  
ปริญทร์ ชัยวิสุทธิธำรง และ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

h 237789

## คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งกลางดำที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยต่อเนื่องเรื่อง การตรวจวินิจฉัยและการป้องกันโรคไวรัสในกึ่งกลางดำ ซึ่งโครงการนี้เป็นการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยมาเพื่อประดิษฐ์เป็นชุดตรวจที่มีความไวสูง สามารถใช้โดยห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เพื่อที่จะใช้ทดแทนการตรวจโดยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้อยู่ทั่วไป เนื่องจากคาดว่าจะได้วิธีตรวจที่มีความไวสูงใกล้เคียงกันในราคาที่ไม่แพงนัก ซึ่งแนวทางการพัฒนานี้นอกจากจะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งแล้วยังเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนาชุดตรวจง่าย ๆ ที่เกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้ซึ่งจะพัฒนาในโครงการวิจัยต่อจากโครงการวิจัยนี้ เมื่อการวิจัยสำเร็จก็จะสามารถเผยแพร่และจัดอบรมให้แก่ผู้ต้องการใช้ในโอกาสต่อไป

ในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร-วิโรฒที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2546

## บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus) แบบ indirect immuno-peroxidase sandwich ELISA ทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 และ 22 kD ร่วมกับ rabbit anti mouse IgG H and L horseradish peroxidase conjugate เป็นตัวตรวจสอบ และใช้ rabbit anti YHV antibody เป็นตัวจับไวรัสใน microtiter plate วิธีนี้สามารถให้ความไวในการตรวจสอบใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR โดยมีความไวต่ำกว่าเพียง 5-10 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถใช้พื้นฐานการตรวจสอบนี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจแบบง่าย ๆ ได้แก่ strip test สำหรับบุคคลทั่วไปใช้ได้ต่อไป

## **ABSTRACT**

Yellow head virus (YHV) detection kit using indirect immunoperoxidase sandwich ELISA was developed. Monoclonal antibodies V3-2B and Y19, specific to 135 and 22 kD structural proteins of YHV, respectively and rabbit anti mouse IgG H and L horseradish peroxidase conjugate were used as detector antibodies. Rabbit anti YHV antibody was used as captured antibody on the microtiter plate. The sensitivity of this method is comparable to RT-PCR with 5-10 fold less sensitive. This method provides a basis for further development of simple strip test for shrimp farmers in the upcoming project.

# สารบัญ

|                                                           | หน้า |
|-----------------------------------------------------------|------|
| บทนำ                                                      | 1    |
| โรคหัดเหลือง                                              | 2    |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง                            | 8    |
| วิธีการทดลอง                                              | 11   |
| สัตว์ทดลอง                                                | 12   |
| การเตรียมไวรัสโรคหัดเหลือง (YHV)                          | 12   |
| การเตรียม rabbit anti YHV antiserum                       | 12   |
| การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี Western blot |      |
| และ immunohistochemistry                                  | 13   |
| การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B, Y18 และ Y19           | 14   |
| Indirect sandwich ELISA                                   | 14   |
| Direct sandwich ELISA                                     | 15   |
| การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR                     | 16   |
| ผลการทดลอง                                                | 17   |
| สรุปผลการทดลอง                                            | 29   |
| เอกสารอ้างอิง                                             | 33   |

## สารบัญตาราง

| ตาราง                                                                                                                                    | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 Indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody เจือจางระดับต่าง ๆ                                                             | 24   |
| 2 Indirect sandwich ELISA เพื่อตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-mouse IgG-HRP ทั้ง 3 ชนิด                                             | 25   |
| 3 การทดสอบความสามารถในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV                                  | 26   |
| 4 ความไวของการตรวจหา YHV ใน haemolymph โดย indirect sandwich ELISA                                                                       | 27   |
| 5 การทดสอบความสามารถในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B HRP conjugate ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV (direct sandwich ELISA) | 28   |

# สารบัญรูป

| รูปที่ |                                                                                                            | หน้า |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง                                                                               | 3    |
| 2      | เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง                                                 | 4    |
| 3      | Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลือง                                                            | 6    |
| 4      | SDS-PAGE และ Western blot ของ haemolymph และ<br>YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จากกึ่งกลาดำ                          | 21   |
| 5      | Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำ                                                                | 22   |
| 6      | RT-PCR ของhaemolymph จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ<br>YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของกึ่งก้ามกรามปกติ | 23   |
| 7      | แผนภูมิขั้นตอนการตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA                                                   | 32   |

## บทนำ



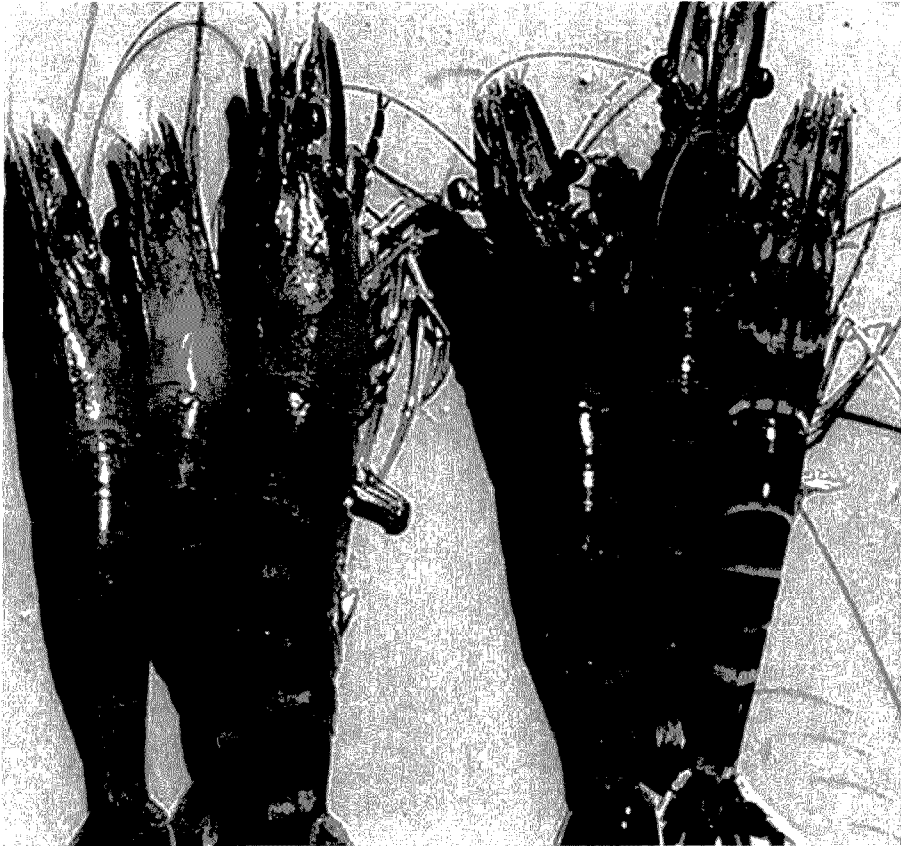
การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามในระยะหลังนี้การติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow-head virus : YHV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) (Boonyaratpalin et al., 1993; Wongteerasupaya et al., 1995) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยพบว่าในปี 2538 การผลิตกุ้งจากประเทศไทยลดลงจากปี 2537 ถึงประมาณ 30,000 ตันโดยคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 9600 ล้านบาท (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV ในกุ้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAB) จำเพาะต่อโรคหัวเหลือง ซึ่งผลิตจากห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย (Sithigorngul et al., 2000) เพื่อนำไปสู่การใช้ในห้องปฏิบัติการและพัฒนารูปแบบอื่น ๆ เพื่อที่จะสามารถใช้โดยเกษตรกรได้ต่อไป

## โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นการค้าไม่เฉพาะประเทศไทยเท่านั้น ยังรวมไปถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก (Lu et al., 1994, 1995) โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำมีรายงานครั้งแรกบริเวณภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ เมื่อปี 2533 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคหัวเหลืองบริเวณภาคใต้ของประเทศพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคหัวเหลืองได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535) การตรวจลักษณะการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในบริเวณเหงือก ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง ในกุ้งที่ปรากฏอาการเป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งทำให้ส่วนหัว ดับ-ดับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน พยาธิสภาพของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ถ้ากุ้งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วยโดยจะส่งผลให้มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3-5 วันหลังจากได้รับเชื้อซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543 ; สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

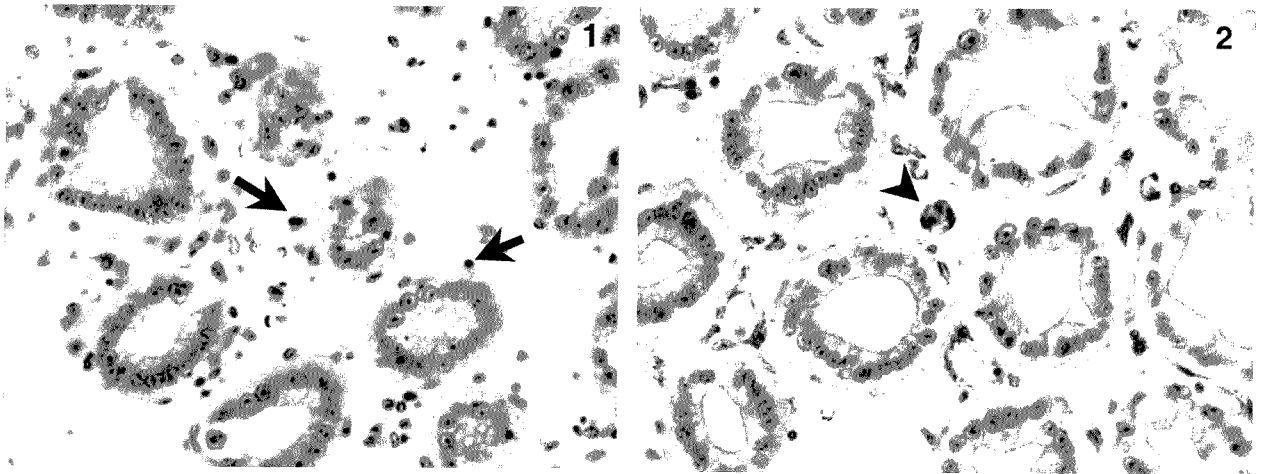
สำหรับกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีลักษณะอาการดังนี้คือ กุ้งมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารจะลดลงจนผิดสังเกต กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงติด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็น

ส่วนตับ ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลือง (รูปที่ 1) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้าหลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)



รูปที่ 1 กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (ซ้าย) สังเกตบริเวณหัวซึ่งเป็นส่วนของตับ-ตับอ่อนและเหงือกมีสีเหลืองและซีดกว่ากุ้งกุลาดำปกติ (ขวา)

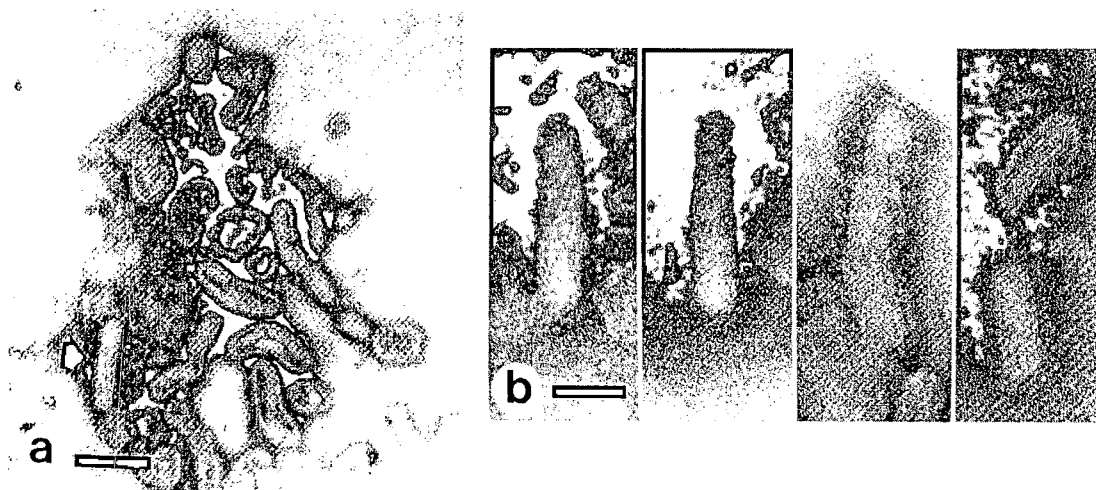
เมื่อตรวจวิเคราะห์กึ่งกลาดำที่เป็นโรคห้วเหลือง พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ เช่น บริเวณเหงือกในกึ่งที่เป็นโรคห้วเหลือง เซลล์ภายในซี่เหงือก (pillar cell) จะบวม เกิดการตายและสลายตัวของเซลล์และออร์กาเนลล์ในส่วนนี้ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดระหว่าง pillar cell มากขึ้น มีการขยายตัวของท่อเลือด (lacuna) ใหญ่กว่าปกติ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกึ่งที่เป็นโรคจะเกิดการตายและเสื่อมสลายของเซลล์ รวมทั้งมีลักษณะของ granuloma เพิ่มมาก มีการคั่งของฮีโมลิมป์ (haemolymph) และการขยายตัวในส่วนของ hemal sinus นอกจากนี้พบว่ามี การบวมพองของนิวเคลียสในเซลล์ของอวัยวะน้ำเหลืองทั่วไป ตรวจพบ dense bodies ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง เมื่อนำมาย้อมด้วย Feulgen reaction พบว่า dense bodies จะติดสีชมพูเข้มอยู่ภายใน cytoplasm (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535 ; Chantanachookin et al. 1993) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคห้วเหลือง (1) การตรวจสอบด้วยวิธีทาง histology เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นลักษณะของนิวเคลียสรวมกัน (pycnotic nuclei) (ลูกศร) (2) การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry เซลล์ที่พบไวรัสจะติดสีน้ำตาลและแสดงความผิดปกติของนิวเคลียส (หัวลูกศร)

นอกจากจะพบโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแล้ว ยังพบการติดเชื้อโรคนี้อีกในกุ้งอีกหลายชนิดในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง blue shrimp *Penaeus stylirostris* และกุ้ง white shrimp *Penaeus vannamei* อีกด้วย (Lu et al., 1994; Lu et al., 1995) จนกระทั่งปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานถึงการต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งสปีชีส์ต่าง ๆ (Lightner and Redman, 1998)

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและย้อมด้วยวิธี negative stain พบว่า ไวรัสหัวเหลืองมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 50–60 x 190–200 nm ภายในเป็น nucleocapsid ล้อมรอบด้วย envelope ปุ่มปมหรือหนาม (Nadala et al., 1997) เมื่อศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าไวรัสนี้มีสารพันธุกรรม (genome) ชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) (Wongteerasupaya et al., 1995) (รูปที่ 3) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS- PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนัก 135 กิโลดาลตันเป็น glycosylated protein ซึ่งมีลักษณะคล้าย Rhabdovirus (Nadala et al., 1997) แต่ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่า genome ของ YHV เป็น positive-sense RNA (Tang and Lightner, 1998) ซึ่งจากการศึกษาลำดับเบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ gill-associated virus (GAV) จากออสเตอร์เลีย (Cowley et al., 1999) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวและการแสดงออกของยีนคล้ายกับ coronaviruses, toroviruses และ arteriviruses จึงได้จัด YHV และ GAV ใน genus Okavirus family Roniviridae รวมอยู่ใน order Nidovirales (Cowley et al., 2000 ; Sittidilokratna et al., 2002) และจากการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของยีนส่วนประกอบของโปรตีนโครงสร้างของ YHV พบว่าประกอบด้วยโปรตีนขนาด 116 64 และ 20 kD (Jitrapakdee et al., 2003) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่รายงานโดย Nadala et al. (1997) เล็กน้อย แต่เพื่อป้องกันการสับสนจึงยังคงใช้ขนาดของโปรตีนตามเดิมไปก่อน



รูปที่ 3 Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลี่ยมเตรียมโดย negative staining  
 a. ภาพกำลังขยายต่ำ scale bar = 150 nm b. ภาพกำลังขยายสูง scale bar = 50 nm  
 (Wongteerasupaya et al., 1995)

ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาโรคหัวเหลี่ยมได้ ดังนั้นวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่นักวิชาการหลายกลุ่มทำการศึกษาเพื่อเสนอแนะวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่ผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดการที่ดีทั้งในเรื่องอาหาร น้ำ และพื้นบ่อจะลดโอกาสการเกิดโรคได้มาก หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง รักษาสภาพพื้นบ่อให้สะอาด รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ระหว่างบ่อเลี้ยงปนกัน การเพาะเลี้ยงระบบปิดและการตรวจคุณภาพน้ำ (ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543; Flegel and Sriurairatana. 1993) นอกจากนี้การกำจัดสัตว์ต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรพอด (arthropod) ที่เชื่อว่าอาจเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลี่ยมก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยง ก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัวเหลี่ยมได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุ้ง อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันเหล่านี้ก็ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุด เนื่องจาก ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมมาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลี่ยม ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกุ้งวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลี่ยม ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัย

สามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย วิธีการนี้จะช่วยลดเวลาในการตรวจได้รวดเร็วมีความไวสูง (Wongteerasupaya et al., 1997) ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ และความชำนาญทางเทคนิค RT-PCR เป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูงในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากค่าตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทาง PCR มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 800 บาทต่อตัวอย่าง) ทั้งไม่สามารถรองรับความแม่นยำตลอดการนำผลมาเทียบเคียงกันระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน และวิธีการสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยก็แตกต่างกันไปด้วย หากมีผลการตรวจที่ขัดแย้งกัน อาจทำให้เกิดความสับสนขึ้นกับผู้ให้บริการได้ และส่งผลให้ผู้ให้บริการเกิดความไม่มั่นใจในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการนี้ และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคนิค RT-PCR มีข้อจำกัดในด้านการใช้

สำหรับวิธีตรวจอื่น ๆ อย่างเช่น การตรวจทางชิ้นเนื้อและพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยการดูอาการของโรค (symptomatic diagnosis) ก็ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและอาการของโรคมักจะมีอาการเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ก็จะไม่ให้ผลที่น่าเชื่อถือในทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส YHV

เมื่อ 3 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส YHV และ WSSV (Loh et al., 1997) โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามการใช้โพลีโคลนอลแอนติซีรัมเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำและวิธี Western blot ก็ไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยสามารถประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kD ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) ของ YHV (Nadala et al., 1997) โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และในสภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของ YHV ขนาด 22, 67 และ 135 kD เพิ่มเติมได้ (Sithigorngul et al., 2002)

โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form และแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry ได้

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยตรงสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ immunohistochemistry, dot blot และ Western blot แต่ในแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันคือ

-Immunohistochemistry เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก สามารถใช้วินิจฉัยเนื้อเยื่อและ haemocyte ของกุ้งที่ติดเชื้อเพียงเล็กน้อยโดยที่กุ้งยังไม่แสดงอาการของโรค (Sithigorngul et al., 2000) แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีนี้ต้องทำในห้องปฏิบัติการ เพราะต้องผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้ paraffin section ซึ่งกินเวลามากถึง 3 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีมาก ไม่สะดวกในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก และการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องตรวจดูจาก section บาง ๆ สามารถตรวจดูได้เพียงบริเวณแคบ ๆ ถ้าการติดเชื้อมีน้อยอาจตรวจไม่พบ

-Dot blot เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วสามารถทำได้ง่ายนอกห้องปฏิบัติการ เพราะไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน สามารถเจาะเลือดมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method ประมาณ 6 ชั่วโมง แต่วิธีนี้มีความไวค่อนข้างต่ำ ได้ดีกรณีที่กุ้งติดเชื้อมาก และนอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาก่อให้เกิด background staining เนื่องจากการจับของแอนติบอดีกับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเลือดแบบไม่จำเพาะ ทำให้เกิดความสับสนกรณีที่ติดเชื้อปริมาณน้อยจึงทำให้ความแม่นยำต่ำ

-Western blot เป็นวิธีคล้ายกับ dot blot แต่ทำการแยกโปรตีนของไวรัสก่อนแล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method จึงต้องเพิ่มเวลาในการแยกโปรตีนและย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสทำให้ใช้เวลาเพิ่มขึ้น ความแม่นยำจะสูง แต่ความไวยังคงต่ำเช่นกันและต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไว ความแม่นยำสูง ทำได้ง่ายและอาจทำนอกห้องปฏิบัติการได้ โดยการใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัส ตรึงและรวบรวมไวรัสในหลุมของ ELISA plate แล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method สำหรับตรวจสอบ ไวรัสทำให้สามารถใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบปริมาณมากได้และทำได้ทั้งการตรวจไวรัสในเลือดหรือเนื้อเยื่อก็ได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อนมากนัก และอีกทั้งยังเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจให้ง่ายขึ้นเช่นกรณีของชุดตรวจการตั้งครรภ์

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wongteerasupaya et al. (1997) ได้พัฒนา RT-PCR สำหรับตรวจการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยใช้ primer ขนาด 135 bp สามารถใช้ตรวจไวรัสปริมาณน้อยมาก

ประมาณ 0.01 pg ของ YHV-RNA และตรวจพบไวรัสในเลือดกึ่งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดจากเหือกกึ่งที่ติดเชื้อตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมง

Loh et al. (1997) และ Nadala et al. (1997) ได้ผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ YHV และใช้ Western blot ในการตรวจการติดเชื้อ YHV ในกึ่ง *Penaeus vanamei* พบว่าแอนติซีรัมสามารถตรวจพบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 170, 135, 67 และ 22 kDa และสามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหลังจากกึ่งได้รับการฉีดไวรัสตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป

Poulos et al. (1999) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Taura syndrome virus (TSV) และสามารถใช่วิธี dot blot และ Western blot ในการตรวจหาไวรัสจาก haemolymph ของกึ่งที่ติดเชื้อรุนแรงได้ แต่ในกรณีของกึ่งที่ติดเชื้อเรื้อรังผลการตรวจยังคงค่อนข้างแปรปรวนต้องพัฒนาให้มีความไวสูงขึ้น

Nadala et al. (2000) ได้ใช้เทคนิค dot blot ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV ในกึ่ง *Penaeus vanamei* โดยใช้ rabbit anti-YHV Ig HRP conjugate พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสในสารสกัดเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสที่เจือจาง 1:10 เท่า ซึ่งมีความไวค่อนข้างต่ำ

Sithigorngul et al. (2000) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ YHV โดยแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kD ซึ่งสามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัสได้ โดยมีความไวและความจำเพาะสูงโดยใช่วิธี dot blot, Western blot และ immunocytochemistry ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกึ่งกุลาดำ โดยเฉพาะวิธี immunocytochemistry สามารถตรวจพบการติดเชื้อ YHV ได้แม้ในกึ่งที่ยังไม่แสดงอาการของโรคก็ตาม

Sithigorngul et al. (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV เพิ่มเติมขนาด 22, 67 และ 135 kD จากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูเมาส์ด้วย YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก haemolymph ของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV โดยการฉีด สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 4 กลุ่ม แอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับ native protein ของ YHV ขณะที่อีก 3 กลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form แอนติบอดีทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนขนาด 22 kD จะให้ผลการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry ดีที่สุดในแง่ของความเข้มและความชัดในการย้อม

สำหรับรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคในกึ่งมีการใช้ในการตรวจโรค WSSV ได้แก่การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VP28 protein ของ WSSV โดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูด้วย WSSV บริสุทธิ์ ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลนที่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (Poulos et al., 2001) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV โดยใช้ recombinant VP28 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 โคลนซึ่งสามารถนำไปพัฒนาติดสลาด้วย biotin สำหรับตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี



antigen capture ELISA พบว่ามีความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไวรัสบริสุทธีได้ 4 โคลนซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี dot blot (Anil et al., 2002)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV ซึ่งสามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยจำนวนมากสามารถที่จะพัฒนาไปสู่การใช้งานในรูปแบบที่มีความไวสูงและสามารถใช้ได้โดยบุคคลทั่ว ๆ ไป การศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มด้วยการพัฒนา sandwich ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงโดยจะทดสอบทั้งในรูป indirect และ direct sandwich ELISA เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจแบบง่าย ๆ สำหรับเกษตรกรต่อไป

## วิธีการทดลอง

## 1. สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซื้อจากฟาร์มใกล้เคียงกรุงเทพ ฯ ขนาด 20-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt กุ้งก้ามกรามซื้อจากจังหวัดอยุธยา ขนาด 15-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำจืดสำหรับเก็บเลือดเพื่อใช้เชื้อจางเลือดกุ้งกุลาดำและเป็น negative control สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

## 2. การเตรียมไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV)

นำกุ้งกุลาดำฉีดด้วย haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV เชื้อจาง 1 : 1000 สังเกตการติดเชื้อประมาณ 2-3 วัน เลือกกุ้งที่แสดงอาการติดเชื้อนำมาเจาะเลือดผสมกับน้ำยาป้องกัน การแข็งตัวของเลือด (Rodriguez et al., 1995) ในอัตราส่วน 1 : 1 ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกที่ 3000 g นำ supernatant มาตกตะกอนที่ 33 % saturated ammonium sulfate ละลายตะกอนด้วยใน 2X PBS นำไปปั่นที่ 3000 g แยกส่วนของตะกอนที่ไม่ละลายออกก่อนนำไปปั่นแยกไวรัสที่ 100,000 g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 2X PBS 2 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 2X PBS หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford et al. (1976) แบ่งเป็นส่วนย่อย ๆ หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวรัสที่ได้โดย SDS-PAGE และ Western blot

## 3. การเตรียม rabbit anti YHV antiserum

3.1 นำไวรัส YHV ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดให้กระต่ายขาวทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) และใต้ผิวหนัง (intradermal injection) อีก 2 แห่งในอัตราประมาณ 5 มิลลิกรัม/ตัว ฉีดซ้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดจากใบหูกระต่ายทิ้งให้แข็งตัว นำมาปั่นแยกซีรัมออกที่ 3000 g เป็นเวลา 30 นาที

3.2 เตรียม haemolymph เชื่อมต่อกับเม็ดเลือดแดงของแกะ (haemolymph-SRBC) นำ haemolymph จากกุ้งก้ามกรามและจากกุ้งกุลาดำปกติ (RT-PCR negative) มาเชื่อมต่อกับเม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cell = SRBC) โดยผสม haemolymph กับ SRBC ในอัตราส่วน 2 : 1 เติมน้ำ PBS 3 เท่าและเติม paraformaldehyde ให้เป็น 4 % ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงล้างด้วย PBS 5 เท่าตัว จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเจือจางด้วย PBS ให้ได้ 2 % SRBC และเติม 0.01 % thimerosal เก็บไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$

3.3 การดูดซับ rabbit anti-YHV antiserum ด้วย haemolymph-SRBC ในอัตราส่วน 1 : 5 ทิ้งไว้ประมาณ 8 ชั่วโมงที่  $4^{\circ}\text{C}$  โดยเขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจาย นำไปปั่นที่ 1500 g แยก supernatant ออก ทดสอบความจำเพาะของ antiserum ที่ได้โดยวิธี Western blot

3.4 การทำให้บริสุทธิ์ rabbit anti-YHV antibody นำ serum มาตกตะกอนด้วย 40 % saturated  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ปั่นที่ 3,000 g แยกตะกอนออกและนำไป dialyzed และละลายใน

PBS จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Protein A column ผสมแอนติซีรั่มกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผ่าน protein A column ล้างด้วย binding buffer และเก็บแอนติบอดีโดยใช้ elution buffer จากนั้นนำไป dialyzed ด้วยน้ำกลั่นและทำให้เข้มข้นด้วย vacuum concentrator (Savant) เติม 5X PBS ในอัตราส่วน 5 : 1 ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford reagent แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ rabbit anti YHV antiserum  
ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ rabbit anti YHV antiserum ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  และ protein A column โดย SDS-PAGE ตรวจสอบความจำเพาะของ rabbit anti YHV antiserum โดย Western blot ของ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและ YHV ที่แยกจาก haemolymph เปรียบเทียบกับ monoclonal antibodies V3-2B, Y18 และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัส YHV และ immunohistochemistry

#### 4. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry

นำ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและกิ้งปกติมาแยกด้วยกระบวนการ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) นำตัวอย่างในเจลส่วนหนึ่งไปย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 ตัวอย่างในเจลอีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ Transblot Cell (BioRad) จากนั้นนำไปบ่มใน rabbit anti-YHV antiserum ที่เจือจางใน 5 % blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่  $37^{\circ}\text{C}$  ล้างใน 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมงใน goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP-Biorad) เจือจาง 1:1,000 (ใน 5 % blotto, 40 % haemolymph ของกิ้งปกติ) หลังจากล้าง 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย 0.03 % diaminobenzidine, 0.006 % hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

สำหรับการประมาณตำแหน่งของแถบโปรตีนของไวรัส ทำโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสนั้นไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ haemocyanin (PMVS-22) (Longyant et al., 2000) และใส่สารละลายสับสเตรทที่ไม่มี cobalt chloride

ส่วนการตรวจทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้โดยวิธี immunohistochemistry ทำโดยนำเนื้อเยื่อที่เตรียมใน paraffin section มาละลายพาราฟินออก หยดด้วย  $\text{P}_1^+$  (10 % calf bovine serum เจือจางใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดด้วย  $\text{P}_1^+$ , rabbit anti-YHV antiserum และย้อมด้วย GAR-HRP ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin แล้วทำเป็นสไลด์ถาวร

## 5. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B, Y18 และ Y19

นำ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีทั้ง 3 clone มาเลี้ยงใน RPMI เสริมด้วย 10 % fetal calf serum จนกระทั่ง culture media เปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำไปปั่นแยก culture media ออกจากเซลล์ ตรวจความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดย Western blot แบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น ส่วน ๆ เก็บที่  $-70^{\circ}\text{C}$

## 6. Indirect sandwich ELISA

### 6.1 การทดสอบหาปริมาณ rabbit anti YHV antibody ที่เหมาะสม

ตริ้ง rabbit anti YHV antibody ความเข้มข้น 5 2 1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งเดิม 0.5 % blotto 150 ไมโครลิตรเพื่อล้างแอนติบอดีส่วนเกินและปิด binding site ที่เหลือ เติม haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย 5 % blotto 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ชนิดเจือจาง 1 : 25 ด้วย 5 % blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เติม rabbit anti mouse IgG H+L minimal cross-reaction to human serum proteins horseradish peroxidase conjugate (RAM-HRP II-Pierce) เจือจาง 1 : 2,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เติม substrate ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 0.006 % hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง (OD.) ที่ 590 nm ด้วย microtiter plate reader ตรวจค่า titer OD. สูงสุดที่ได้และ background ที่เกิดจาก haemolymph ของกิ้งกูดดำปกติ หาปริมาณ rabbit anti YHV antibody ที่เหมาะสม

### 6.2 การทดสอบหาชนิดและความเข้มข้นของ anti-mouse IgG-HRP ที่เหมาะสม

ตริ้ง rabbit anti YHV antibody ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรใส่ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และนำไปผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับข้อ 6.1 ซึ่งหลังจากล้างด้วย 0.5 % blotto เพื่อเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ส่วนเกินออกแล้ว เติม anti-mouse IgG-HRP ชนิดต่าง ๆ คือ goat anti-mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP-Biorad) หรือ rabbit anti-mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (RAM-HRP I-Pierce) หรือ RAM-HRP II เจือจางระดับต่าง ๆ คือ 1 : 1,000 1 : 2,000 หรือ 1 : 3,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ จากนั้นผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 6.1 หลังจากวัดค่าดูดกลืนแสง

แล้ว ตรวจค่า titer OD. สูงสุดที่ได้และ background ที่เกิดจาก haemolymph ของกิ้งก่าดำปกติ หาชนิดและปริมาณของ anti-mouse IgG-HRP ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 6.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละ

#### ชนิด

ทำการทดลอง sandwich ELISA เช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดคือ V3-2B หรือ Y18 หรือ Y19 เจือจางในระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบ OD. ของระดับความเจือจางต่าง ๆ ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 3 ชนิดที่ได้ซึ่งยังคงให้ค่า OD. สูงสุดมากกว่า 3.0

## 7. Direct sandwich ELISA

### 7.1 การเตรียม ascites fluid ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

เลี้ยง hybridoma clone V3-2B นำมา reclone เพื่อคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดีขยายเซลล์จนมีจำนวนประมาณ 50 ล้านเซลล์ บั่นแยกเซลล์นำไปฉีดให้หนูขาวที่ฉีด pristane (0.5 มิลลิลิตร/ตัว) ล่วงหน้าอย่างน้อย 2 สัปดาห์ในปริมาณ 5 ล้านเซลล์/ตัวทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วัน ตรวจเช็คการเจริญของ hybridoma เลือกหนูที่มีการเจริญของ ascites tumor เต็มที่มาจาก ascites fluid จากช่องท้องออกรวม บั่นแยกเซลล์ออกที่ 3,000 g ดูดซับแอนติบอดีที่ได้โดยด้วย haemolymph-SRBC conjugate (เหมือนข้อ 3.3) ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์โดยนำมาตกตะกอนด้วย 40 % saturated  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  ที่ 4 °C และนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยผ่าน Protein G column (เหมือนข้อ 3.4) จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดย Western blot และ immunohistochemistry

### 7.2 การเตรียม V3-2B-HRP conjugate (Javois. 1999)

ละลาย HRP ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติม 0.1 M sodium periodate ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที นำไป dialyzed ใน 1 mM sodium acetate buffer pH 4.4 2 ครั้ง ทิ้งข้ามคืน ผสมแอนติบอดี V3-2B ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรละลายใน PBS pH 8 (10 mM potassium phosphate 50 mM NaCl) ในสารละลาย peroxidase และเติม 0.5 M sodium carbonate buffer pH 9.5 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (ปรับ pH ให้เป็น 9.5 โดยเพิ่ม buffer อีกเล็กน้อย) ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม sodium borohydride (4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้น dialyse ใน PBS 3 ครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งเป็นส่วน ๆ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพเทียบกับวิธี indirect sandwich ELISA

### 7.3 ตรวจสอบความเข้มข้นของ V3-2B-HRP conjugate ที่เหมาะสม

ทำการทดลอง sandwich ELISA เช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยใช้ V3-2B-HRP conjugate แทน V3-2B และ anti-mouse IgG-HRP เปรียบเทียบ OD. ที่ได้กับ indirect sandwich ELISA

### 8. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

นำ haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ YHV มาเจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ haemolymph ของกิ้งกูดดำเป็นตัว diluent นำตัวอย่างปริมาณ 200 ไมโครลิตรมาสกัดกรดนิวคลีอิกของไวรัสโดยใช้ชุดสำเร็จรูป (Roche Molecular Biochemicals) นำกรดนิวคลีอิกที่ได้ไปทำ RT-PCR โดยใช้ SuperScript one step RT-PCR system (GIBCO BRL) โดยใช้ไพรเมอร์ YHV10F (CCGCTAATTTCAAAACTA CG) และไพรเมอร์ YHV144R (AAGGTGTTATGTGG AGGAAG) (Wongteerasupaya et al., 1997) PCR-product ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วย 2 % agarose electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 Volt ประมาณ 1 ชั่วโมงใน Tris-borate-EDTA (TBE) buffer และย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะให้ผลผลิตขนาด 135 bp

## ผลการทดลอง



#### 4.2 ชนิดและความเข้มข้นของ anti-mouse IgG-HRP 3 ชนิด

RAM-HRP II ที่ความเข้มข้น 1 : 2,000 ให้ค่า OD. สูงกว่าที่ความเข้มข้น 1 : 3,000 และไม่แตกต่างจาก 1 : 1,000 แต่ที่ความเข้มข้น 1 : 1,000 ให้ค่า OD. กับ normal haemolymph สูงกว่า ซึ่งทั้ง GAM-HRP และ RAM-HRP I ให้ค่า OD. ที่ความเข้มข้น 1 : 2,000 ต่ำกว่าและเกิด background สูงกว่า (ตารางที่ 2) ซึ่งเมื่อหักความเข้มข้นของ background แล้วจะได้ค่า OD. ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น RAM-HRP II จึงมีคุณภาพดีกว่าแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด การศึกษาครั้งต่อไปจึงใช้ RAM-HRP II

#### 4.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด

จากการเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ที่ระดับต่าง ๆ ใน sandwich ELISA พบว่าที่ระดับเจือจางของ culture fluid 1 : 800 ยังคงให้ค่า OD. สูงสุดมากกว่า 3.0 ดังนั้นค่าระดับความเจือจางที่เหมาะสมใช้ประมาณ 1 : 400 เท่า แต่เมื่อใช้ haemolymph ของกิ้งกุดติดเชื้อ YHV ที่ผสม 1 % triton X-100 พบว่าค่า OD. สูงสุดลดลงเล็กน้อย สำหรับกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ให้ค่า OD. สูงสุดเฉพาะกับตัวอย่าง haemolymph ของกิ้งกุดติดเชื้อ YHV ที่ผสมกับ 1 % triton X-100 เท่านั้น โดยค่าระดับความเจือจางที่เหมาะสมใช้ประมาณ 1 : 50 เท่า สำหรับ haemolymph ปกติให้ค่า OD. ต่ำมาก แต่กรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18 ให้ค่า OD. ต่ำทั้งกรณีของ haemolymph ปกติและผสมกับ triton X-100 (ตารางที่ 3) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถใช้ตรวจสอบ YHV ได้ดีได้แก่ V3-2B แต่กรณีของ Y19 จะใช้ตรวจสอบได้ดีต้องใช้ตัวอย่างผสมกับ triton X-100 เท่านั้น ซึ่งการผสม triton X-100 มีผลต่อการจับของ V3-2B บ้างเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูงแต่ไม่มีผลที่ความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง V3-2B และ Y19 ร่วมกันได้ ในกรณีของ Y18 มีการจับกับ YHV ต่ำไม่ว่าจะผสมกับ Triton X-100 หรือไม่ก็ตาม

#### 4.4 ความไวของการตรวจหา YHV โดย indirect sandwich ELISA

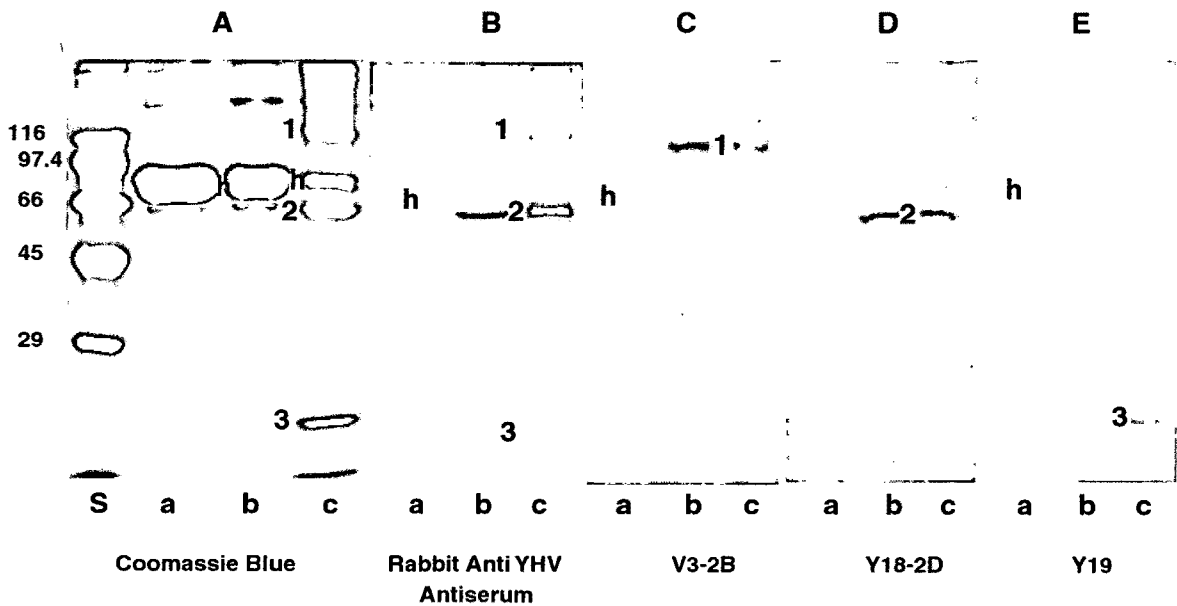
จากการใช้วิธี indirect sandwich ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ตรวจหา YHV ใน haemolymph จากกิ้งกุดดำที่ติดเชื้อในสภาพปกติหรือผสมกับ triton X-100 ที่เจือจางด้วย normal haemolymph ของกิ้งกุดก้ามกรามนั้นพบว่าสามารถเจือจางได้ถึง 1 : 64,000 เท่า โดยยังให้ค่า OD. มากกว่า background 0.2 หน่วย (ตารางที่ 4) แต่กรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 สามารถเจือจางได้ 1 : 100,000 เท่า ซึ่งใช้ได้เฉพาะตัวอย่าง haemolymph ที่ผสม triton X-100 เท่านั้น ซึ่งเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันค่า titer ของ haemolymph จากกิ้งกุดดำที่ติดเชื้อ YHV ในสภาพปกติหรือผสมกับ triton X-100 ค่า OD. เพิ่มขึ้นสามารถเจือจางตัวอย่างได้ 1 : 250,000 เท่า

#### 4.5 ความไวของการตรวจหา YHV โดย direct sandwich ELISA

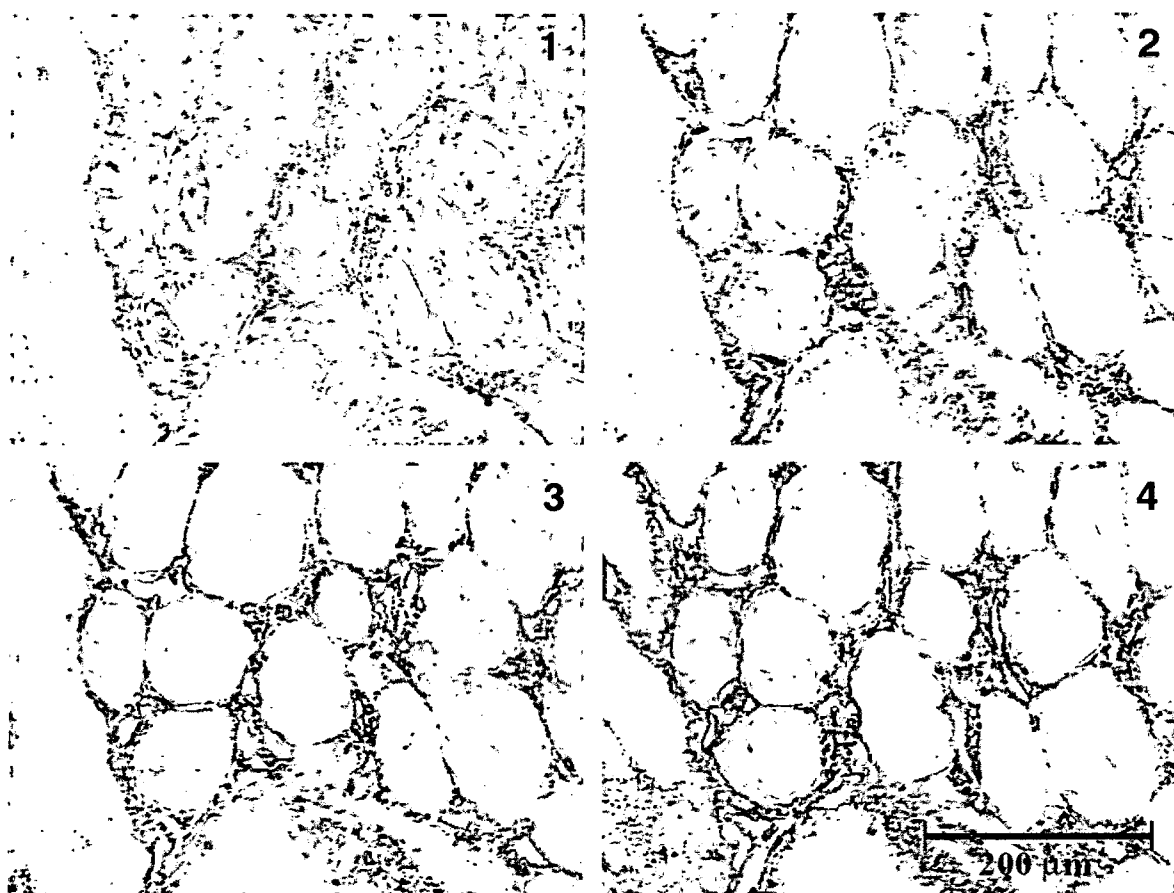
จากการตรวจหา YHV ใน haemolymph จากกึ่งกลางลำตัวที่ติดเชื้อในสภาพปกติด้วยวิธี direct sandwich ELISA โดยเจือจาง V3-2B-HRP conjugate ที่ระดับต่าง ๆ นั้นพบว่าเมื่อเจือจาง V3-2B-HRP conjugate ประมาณ 1 : 200 เท่า ได้ค่า OD. 0.294 ซึ่งต่ำกว่าวิธี indirect sandwich ELISA มาก (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการ conjugate กับ HRP อาจเสียความสามารถในการจับกับเชื้อ YHV ไป ดังนั้นวิธี direct sandwich ELISA มีความไวต่ำกว่า indirect sandwich ELISA มากเนื่องจากไม่มีการขยายสัญญาณโดยแอนติบอดีตัวที่สอง

#### 5. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

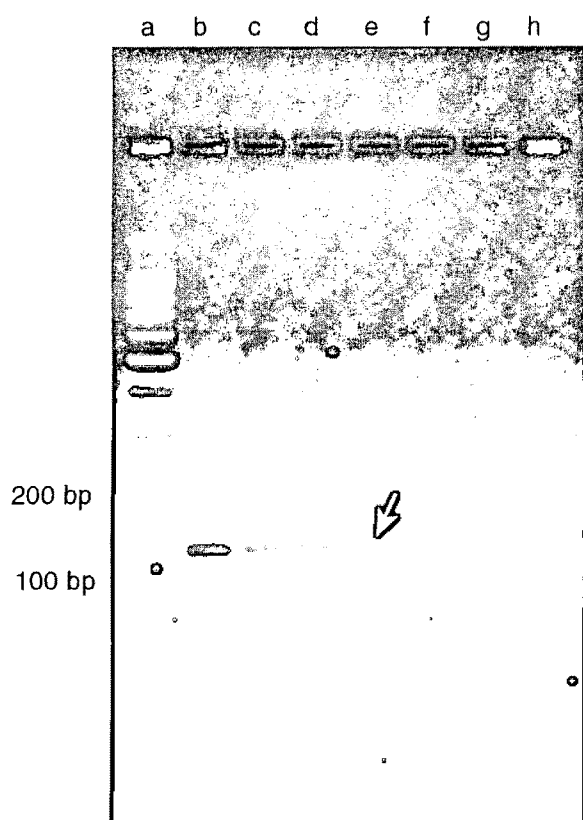
สำหรับการตรวจหา YHV ใน haemolymph ของกึ่งลำตัวที่ติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบ YHV ใน haemolymph ที่เจือจางด้วย haemolymph ของกึ่งประมาณ ~ 1,000,000 เท่า (รูปที่ 6) โดยเห็นเพียงแถบบาง ๆ ของ PCR-product ที่ 135 bp (ลูกศร)



รูปที่ 4 SDS-PAGE (A) และ Western blot (B-E) ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก กุ้งกุลาดำ ตัวเลขด้านซ้ายมือเป็นน้ำหนักโมเลกุล (kD) ของโปรตีนมาตรฐาน (A) เจลที่ย้อมด้วย Coomassie blue Western blot ที่ย้อมด้วย (B) rabbit anti YHV antiserum และโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B (C) Y18-2D (D) และ Y19 (E) s = โปรตีนมาตรฐาน a = haemolymph ของกุ้งกุลาดำปกติ b = haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV c = YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน 1, 2, 3 = โปรตีนหน่วยย่อยของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ตามลำดับ h = haemocyanin Rabbit anti YHV antiserum มีความจำเพาะต่อ YHV สูงดังผลการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยแอนติซีรัมสามารถจับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 67 และ 22 kD ได้โดยมี background staining เล็กน้อย



รูปที่ 5 Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อทุ้งกลาดำโดยใช้ (1) rabbit anti YHV antiserum เทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B (2) Y18 (3) และ Y19 (4) ซึ่ง rabbit anti YHV antiserum สามารถย้อมบริเวณที่ติดเชื้อ YHV (ติดสีน้ำตาล) ได้ดีเช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี



รูปที่ 6 RT-PCR (a) DNA marker (100 bp ladder) haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของ กุ้งก้ามกรามปกติคือ (b)  $1 : 2.5 \times 10^4$  (c)  $1 : 1 \times 10^5$  (d)  $1 : 5 \times 10^5$  (e)  $1 : 1 \times 10^6$  (f)  $1 : 2.5 \times 10^6$  (g)  $1 : 5 \times 10^6$  ตาม ลำดับ และ (h) haemolymph ของกุ้งก้าม กรามปกติ PCR product ที่ 135 bp ลดลง จนเห็นเพียงเล็กน้อยที่ระดับเจือจาง  $1 : 1,000,000$  เท่า (ลูกศร)

ตารางที่ 1 Indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody เจือจางระดับต่าง ๆ ตีรังแต่ละแถวของ microtiter plate และใช้ V3-2B เจือจาง 1 : 25 และ RAM-HRP II เจือจาง 1 : 2,000 เป็น detection antibody (n = 8)

| ระดับความเจือจางของ rabbit anti YHV antibody (µg/ml) | ค่า OD.                                   |               |                                      |                  |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|--------------------------------------|------------------|
|                                                      | Haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง |               | Haemolymph ของกิ้งปกติเจือจาง 1 : 20 | Background stain |
|                                                      | 1 : 20                                    | 1 :10,000     |                                      |                  |
| 5                                                    | >3.000                                    | 0.406 ± 0.078 | 0.063 ± 0.066                        | 0.191 ± 0.074    |
| 2                                                    | >3.000                                    | 0.263 ± 0.019 | 0.044 ± 0.012                        | 0.034 ± 0.023    |
| 1                                                    | >3.000                                    | 0.234 ± 0.009 | 0.045 ± 0.024                        | 0.018 ± 0.015    |
| 0.5                                                  | 2.317 ± 0.267                             | 0.266 ± 0.042 | 0.084 ± 0.061                        | 0.021 ± 0.036    |

ตารางที่ 2 Indirect sandwich ELISA เพื่อตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-mouse IgG-HRP ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีเรียงแต่ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody และใช้ V3-2B เจือจาง 1 : 25 (n = 8)

| ชนิด anti-mouse IgG-HRP | ระดับความเจือจาง | ค่า OD.                                   |               |                                       |                  |
|-------------------------|------------------|-------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|------------------|
|                         |                  | Haemolymph ของกิ้งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง |               | Haemolymph ของกิ้งปกติ เจือจาง 1 : 20 | Background stain |
|                         |                  | 1 : 20                                    | 1 : 10,000    |                                       |                  |
| GAM-HRP                 | 1 : 1000         | >3.000                                    | 0.319 ± 0.062 | 0.196 ± 0.018                         | 0.260 ± 0.042    |
|                         | 1 : 2000         | 2.534 ± 0.044                             | 0.252 ± 0.059 | 0.152 ± 0.031                         | 0.229 ± 0.083    |
|                         | 1 : 3000         | 2.175 ± 0.022                             | 0.218 ± 0.010 | 0.132 ± 0.042                         | 0.107 ± 0.023    |
| RAM-HRP I               | 1 : 1000         | >3.000                                    | 0.526 ± 0.023 | 0.347 ± 0.025                         | 0.328 ± 0.023    |
|                         | 1 : 2000         | 2.907 ± 0.037                             | 0.391 ± 0.006 | 0.211 ± 0.013                         | 0.214 ± 0.012    |
|                         | 1 : 3000         | 2.379 ± 0.028                             | 0.252 ± 0.009 | 0.073 ± 0.009                         | 0.091 ± 0.009    |
| RAM-HRP II              | 1 : 1000         | >3.000                                    | 0.418 ± 0.023 | 0.144 ± 0.019                         | 0.106 ± 0.018    |
|                         | 1 : 2000         | >3.000                                    | 0.283 ± 0.019 | 0.065 ± 0.011                         | 0.056 ± 0.022    |
|                         | 1 : 3000         | 2.778 ± 0.041                             | 0.214 ± 0.009 | 0.017 ± 0.005                         | 0.028 ± 0.007    |

ตารางที่ 3 การทดสอบความสามารถในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีรังแต่ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody Haemolymph ของกิ้งกัที่ติดเชื้อ YHV ตามปกติหรือผสม 1 % Triton X-100 และใช้ RAM-HRP II เจือจาง 1 : 2,000 (K = 1000, ND = ไม่ได้ทดลอง)

| Antibody | Haemolymph of ginkgo that infected YHV dilution 1 : 20 | ค่า OD. ของ MAb เจือจางระดับต่าง ๆ |        |        |         |         |         |         |          |          |          |          |
|----------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
|          |                                                        | 1:10                               | 1 : 25 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 400 | 1 : 800 | 1 : 1.6K | 1 : 3.2K | 1 : 6.4K | 1 : 128K |
| 2B       | Native                                                 | ND                                 | >3.000 | ND     | >3.000  | >3.000  | >3.000  | >3.000  | 2.889    | 2.356    | 1.716    | 1.291    |
|          | +Triton X-100                                          | ND                                 | ND     | ND     | ND      | ND      | ND      | ND      | ND       | ND       | ND       | ND       |
| 8        | Native                                                 | 0.531                              | ND     | ND     | 0.436   | 0.206   | 0.160   | 0.083   | 0.078    | 0.063    | ND       | ND       |
|          | +Triton X-100                                          | 0.511                              | ND     | 0.122  | 0.068   | 0.015   | ND      | ND      | ND       | ND       | ND       | ND       |
| 9        | Native                                                 | 1.225                              | ND     | ND     | 0.636   | 0.409   | 0.310   | 0.255   | 0.192    | 0.054    | ND       | ND       |
|          | +Triton X-100                                          | >3.000                             | ND     | >3.000 | 2.821   | 2.753   | 2.697   | 2.485   | 1.990    | 1.539    | 1.030    | 0.678    |



ตารางที่ 4 ความไวของการตรวจหา YHV ใน haemolymph โดย indirect sandwich ELISA แสดงค่า OD.  
ของ haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตีรังแต่  
ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody และใช้ RAM-HRP II เจือ  
จาง 1 : 2,000 (K = 1000, n = 4)

| ชนิด<br>MAb                       | YHV              | ค่า OD. ของ haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                   |                  | 1 : 20                                                    | 1 : 1K           | 1 : 2K           | 1 : 4K           | 1 : 8K           | 1 : 16K          | 1 : 32K          | 1 : 64K          | 1 : 128K         | 1 : 256K         |
| V3-2B<br>: 400                    | Native           | >3.000                                                    | >3.000           | 2.717<br>± 0.044 | 1.718<br>± 0.045 | 1.090<br>± 0.035 | 0.658<br>± 0.024 | 0.366<br>± 0.027 | 0.211<br>± 0.012 | 0.119<br>± 0.010 | 0.062<br>± 0.002 |
|                                   | +Triton<br>X-100 | >3.000                                                    | 1.941<br>± 0.013 | 1.568<br>± 0.015 | 1.019<br>± 0.023 | 0.688<br>± 0.042 | 0.452<br>± 0.058 | 0.284<br>± 0.044 | 0.183<br>± 0.034 | 0.154<br>± 0.084 | 0.078<br>± 0.041 |
| Y19<br>1 : 50                     | Native           | 0.884<br>± 0.015                                          | 0.488<br>± 0.009 | 0.408<br>± 0.005 | 0.327<br>± 0.024 | 0.255<br>± 0.025 | 0.203<br>± 0.006 | 0.176<br>± 0.003 | 0.155<br>± 0.019 | 0.129<br>± 0.015 | 0.113<br>± 0.014 |
|                                   | +Triton<br>X-100 | >3.000                                                    | 2.587<br>± 0.002 | 2.227<br>± 0.019 | 1.713<br>± 0.022 | 1.280<br>± 0.018 | 0.898<br>± 0.015 | 0.595<br>± 0.017 | 0.392<br>± 0.020 | 0.256<br>± 0.009 | 0.181<br>± 0.013 |
| V3-2B<br>: 400<br>+ Y19<br>1 : 50 | native           | >3.000                                                    | >3.000           | >3.000           | 2.409<br>± 0.099 | 1.667<br>± 0.032 | 1.062<br>± 0.015 | 0.680<br>± 0.032 | 0.443<br>± 0.020 | 0.311<br>± 0.018 | 0.227<br>± 0.008 |
|                                   | +Triton<br>X-100 | >3.000                                                    | >3.000           | >3.000           | 2.381<br>± 0.033 | 1.817<br>± 0.035 | 1.269<br>± 0.039 | 0.807<br>± 0.012 | 0.517<br>± 0.019 | 0.353<br>± 0.011 | 0.255<br>± 0.008 |

ตารางที่ 5 การทดสอบความสามารถในการจับของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี-V3-2B HRP conjugate ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในการจับกับ YHV (direct sandwich ELISA) โดยใช้ rabbit anti-YHV antibody ตี๋ง แต่ละหลุมของ microtiter plate เข้มข้น 1 µg/ml เป็น captured antibody (K= 1000, n = 2)

| ชนิด MAb    | Haemolymph ของกั๋งที่ติดเชื้อ YHV เจือจาง 1 : 20 | ค่า OD. ของ MAb เจือจางระดับต่าง ๆ |        |        |        |        |         |         |
|-------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
|             |                                                  | 1 : 200                            | 1 : 1K | 1 : 2K | 1 : 4K | 1 : 8K | 1 : 16K | 1 : 32K |
| V3-2B - HRP | Native                                           | 0.294                              | 0.273  | 0.276  | 0.253  | 0.188  | 0.101   | 0.036   |

## สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจไวรัส YHV โดยวิธี indirect sandwich ELISA โดยการผลิต rabbit anti YHV antibody ( $r \alpha$  YHV) ใช้เป็น capture antibody สำหรับจับเชื้อ YHV ในตัวอย่างโดยตรง  $r \alpha$  YHV ลงบนภาชนะหลุมชนิด 96 หลุมไว้วางหน้า การตรวจทำโดยใส่ตัวอย่างลงไปในแต่ละหลุม ป่ม 4-6 ชั่วโมง ล้างและใส่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ป่ม 4-6 ชั่วโมง จากนั้นล้างและใส่ RAM-HRP II ป่มอีก 4-6 ชั่วโมง ล้างและเติม substrate เทียบสีกับ control ที่ระดับต่ำ ค่าที่ได้ถ้าสูงกว่าเป็น positive ขั้นตอนในการทำดัง diagram

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองพบว่า V3-2B ที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ขนาด 135 kD ให้ผลที่ดีคือสามารถจับกับ YHV ใน haemolymph ของกึ่งที่ติดเชื้อทั้งในสภาพปกติ และในกรณีที่ผสม haemolymph กับ triton X-100 ได้ดี ส่วนกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18 ที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ขนาด 67 kD ไม่ได้ผลเนื่องจากแอนติบอดีอาจจับส่วนที่เป็น hiding epitope สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ขนาด 22 kD นั้น ได้ผลต้องใช้ haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV ผสมกับ triton X-100 เพื่อเป็นการสลายอนุภาคของไวรัสทำให้ epitope ซึ่งอยู่ภายใน nucleocapsid แดกออกมาทำให้ Y19 สามารถจับได้ ซึ่งเป็นการเพิ่ม sensitivity อีก 1 เท่า (ตารางที่ 4)

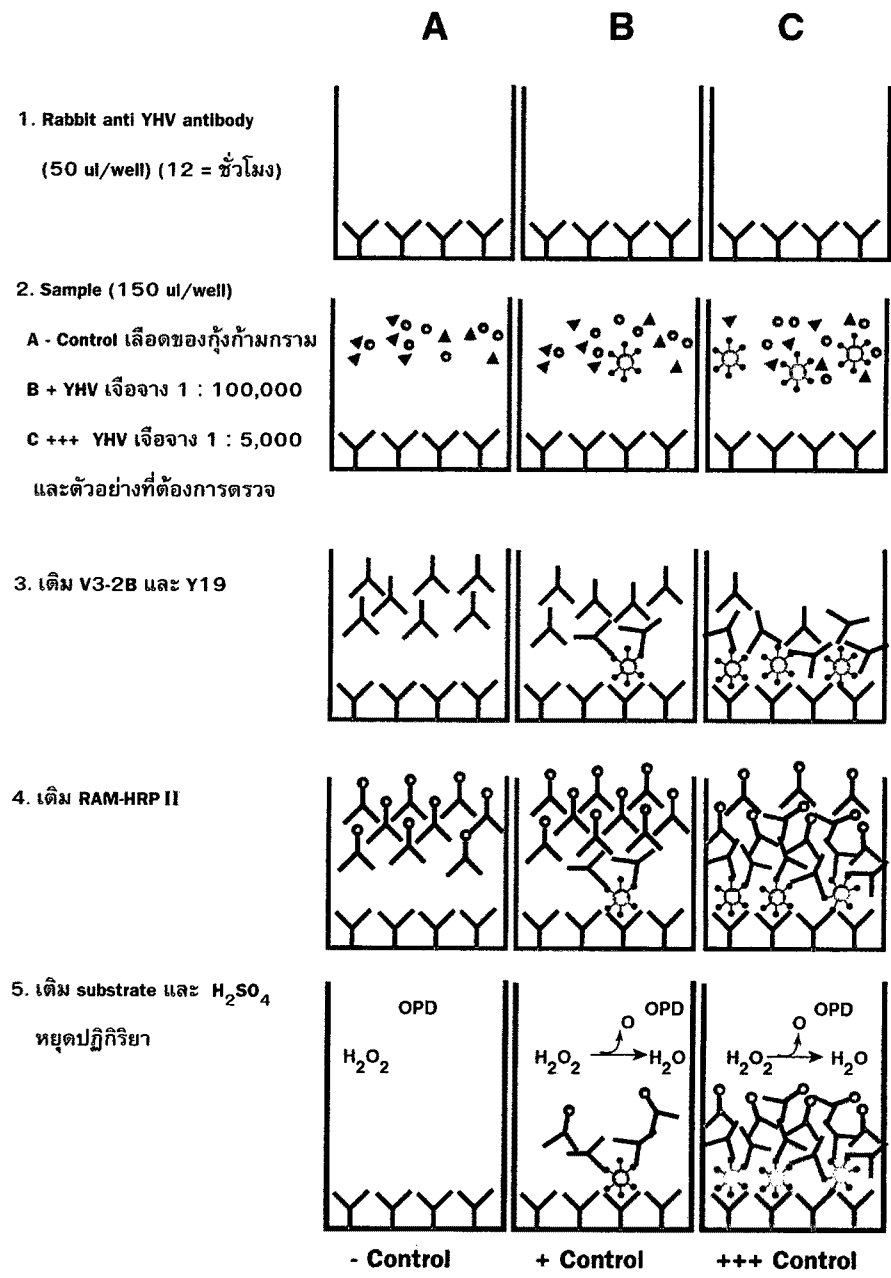
ส่วน HRP conjugate Ab พบว่าทั้ง GAM-HRP และ RAM-HRP I ให้ background stain ที่สูงกว่า RAM-HRP II ดังนั้นการทดลองจึงใช้ HRP conjugate Ab คือ RAM-HRP II ซึ่งให้ผลดีที่สุด

จากการเปรียบเทียบความไวในการตรวจหา YHV ใน haemolymph ของกึ่งที่ติดเชื้อ พบว่าการตรวจโดยวิธี indirect sandwich ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดต่าง ๆ ของ YHV คือ V3-2B และ Y19 สามารถตรวจพบ YHV ในระดับเจือจางประมาณ 1 : 60,000 ถึง 1 : 100,000 เท่า แต่เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดผสมกันจะเพิ่มความไวในการตรวจพบ YHV เจือจาง 1 : 250,000 เท่า เมื่อเทียบกับวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจ YHV ที่เจือจาง ~ 1,000,000 เท่า ดังนั้นวิธี indirect sandwich ELISA มีความไวต่ำกว่า RT-PCR ~10 เท่า เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเดียว แต่ถ้าใช้ V3-2B และ Y19 ร่วมกันจะมีความไวต่ำกว่า RT-PCR เพียง ~ 4 เท่า ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมากคล้ายกับการรายงานในการใช้วิธีคล้าย ๆ กันใน WSSV ซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็น capture และโมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมต่อกับ alkaline phosphatase พบว่าความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002)

การเผยแพร่สู่ผู้ใช้จะดำเนินการฝึกอบรมพร้อมกับชุดตรวจแบบ strip test ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนา องค์ประกอบของชุดตรวจแบบ sandwich ELISA ประกอบด้วยส่วนประกอบดังนี้ (สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้ประมาณ 80-88 ตัวอย่าง) ราคาประมาณ 1,000 บาท



Sandwich ELISA



รูปที่ 7 แผนภูมิขั้นตอนการตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA

เอกสารอ้างอิง

ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543 กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ ฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์.

สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535. Baculovirus สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุม สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ ฯ : 200-205.

Anil, T.M., Shankar, K.M. and Mohan. C.V. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. Dis. Aquat. Org. 51 : 67-68.

Boonyaratpalin, S., Supamataya, K., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U. and Chantanachookin, C. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol. 28 (3) : 103-109.

Bradford, M.M. 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.

Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat. Org. 17 : 145-157.

Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. and Walker, P.J. 2000. Gill-Associated virus of *Penaeus monodon* prawns : An invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen Virol. 81 : 1473-1484.

Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasuoaya, C., Boonsaeng, V. Panyim, S. and Walker, P.J. 1999. Yellow dead virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. Dis. Aquat. Org. 36 : 153-157.

Flegel, T. and Sriurairatana, S. 1993. Black tiger prawn diseases in Thailand. Page 6 in D.M. Akiyama, editor. Technical Bulletin AQ39 1993/3, American Soybean Association, Singapore 0923.

Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), Diseases in Aquaculture III., Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p 285-302.



- Javois, L.C. 1999. Immunocytochemical methods and protocols. Methods in molecular biology. V115 2<sup>nd</sup> ed. 465p.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquacultures. 164 : 201-220.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., LU, Y. and Nadala, E.C.B. Jr. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. Advances in Virus Research .48 : 263-311.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Thampalerd., N., Sithigorngul., W., and Menasveta. P. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. Invert. Reprod. Dev. 37(3) : 211-221.
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, J.A. and Loh, P.C. 1994. Infection of the yellow head baculovirus (YHB) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish. Dis. 17: 649-656
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, Loh, P.C. and Brock, J.A. 1995. Distribution of yellow head virus in selected tissue. Dis. Aquat. Org. 23 : 67-70.
- Lui, W., Wang, Y.T., Tian, D.S. Yin, Z.C. and Kwang, J. 2002. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelop protein (28 kDa). Dis. Aquat. Org. 49 : 11-18.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. J. Virol. Meth. 69 : 39-44.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M. and Loh, P.C. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis.Aquat.Org. 31 : 141-146.
- Nadala Jr., E.C.B. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. J. of Virol. Meth. 175-179.

- Poulos, B.T., Kibler, R., Bradley-Dunlop, D., Mohny, L.L. and Lightner, D.V. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 37 : 99-106.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aquilar, J. and Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 47 : 13-23.
- Rodriguez J., Boulo, V., Mialhe, E. and Bachere E. 1995. Characterisation of shrimp haemocyte and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell. Science.* 108 : 1043-1050.
- Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49 : 71-76.
- Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Panyim, S., Cowley, J.A., Jittrapakdee, S., Boonsaeng, V. and Walker P.J. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow-head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis. Aquat. Org.* 50 : 87-93.
- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1998. A yellow-head virus probe : application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis. Aquat. Org.* 35 : 165-173.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Anutara, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Thongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.