



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬชีวินวิทยา)
ปริญญญา

จุฬชีวินวิทยา สาขา ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ
โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Development of Immunoassay for the Detection of White Spot Syndrome Virus
in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Using Monoclonal Antibody

นามผู้วิจัย นางสาวศิริลักษณ์ พุ่มเกล้า

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)
กรรมการ (ผศ. ดร. กุลณัฐ เลิศไสง)
กรรมการ (อาจารย์สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส, Ph.D.)
หัวหน้าภาควิชา (รองศาสตราจารย์ อมรา ทองปาน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 31 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว
ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Development of Immunoassay for the Detection of White Spot Syndrome Virus
in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Using Monoclonal Antibody

โดย

นางสาวศิริลักษณ์ พุ่มห่อ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
พ.ศ.2549

ISBN 974-16-1351-2

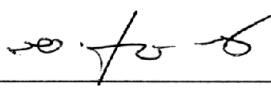
ศิริลักษณ์ พุ่มห่อ 2549: การพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว
ในกึ่งกลาคาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
สาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก
ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม. 131 หน้า
ISBN 974-16-1351-2

ทำการเตรียมไวรัสตัวแดงดวงขาวให้บริสุทธิ์จากเลือดและเหงือกกึ่งกลาคาติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
เมื่อนำไวรัสที่บริสุทธิ์ มาตรวจดูแถบโปรตีนของไวรัสโดยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนทั้งหมด 6 แถบ ได้แก่
โปรตีน ขนาด 24, 28, 40, 43, 120 และ 180 kDa โปรตีนที่ตรงกับงานวิจัยอื่นมี 2 แถบ ได้แก่โปรตีนขนาด 24
และ 28 kDa

ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ใช้เทคนิคไฮบริโดมาโดยการเชื่อมเซลล์
ม้ามหนู Balb/c ที่ผ่านการฉีดกระตุ้นด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์ กับ myeloma cell (P3-X63-Ag.8.653) ผล
การทดลองพบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมา 1 โคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับไวรัสตัวแดงดวงขาว
คือโคลน 5G5 เมื่อตรวจหาชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotype) พบว่าเป็นชนิด IgG2a ซึ่งมี light
chain เป็นชนิด kappa และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 มีความ
จำเพาะกับแถบโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 180 kDa และไม่พบ cross reaction กับไวรัสหัวเหลือง

ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาคา โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก
ไฮบริโดมาโคลน 5G5 ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (indirect ELISA, BA-DAS ELISA, dot ELISA และ BS dot
ELISA) เพื่อตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวจากเลือดกึ่ง พบว่าวิธี BS dot ELISA ให้ผลในการตรวจพบไวรัสตัว
แดงดวงขาวได้ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจตัวอย่างกึ่งกลาคาที่ติดเชื้อไวรัส 40 ตัวอย่างและกึ่งปกติ
10 ตัวอย่าง ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 4.20 ชั่วโมง มีความไวสูง (high sensitivity) ในการตรวจหาไวรัสตัว
แดงดวงขาว ความเข้มข้นน้อยสุดของโปรตีนไวรัสที่สามารถตรวจพบคือ 0.390 µg/ml การอ่านผลการตรวจ
สามารถดูได้ด้วยตาเปล่า การตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในเลือดกึ่งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี
BS-dot ELISA เป็นวิธีการตรวจที่ง่ายและสะดวก เหมาะนำไปใช้ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในฟาร์มกึ่ง
กลาคา

ศิริลักษณ์ พุ่มห่อ
ลายมือชื่อนิติ


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

27, ๕๓, 49

Siriluck Prunglar 2006: Development of Immunoassay for the Detection of White Spot Syndrome Virus in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Using Monoclonal Antibody. Master of science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Captain Chaivat Kittigul, M.Sc. 131 pages.
ISBN 974-16-1351-2

White spot syndrome virus (WSSV) was purified from gill and haemolymph of WSSV-infected shrimp (*Penaeus monodon*). Analysis of purified WSSV by SDS-PAGE showed 6 bands of virus protein molecular weight (M.W.) of 24, 28, 40, 43, 120 and 180 kDa. Two of protein bands M.W. of 24 and 28 kDa were reported by other investigators.

Production of monoclonal antibodies specific to WSSV was performed by cell fusion between spleen cells of Balb/c mouse immunized with purified WSSV and myeloma cells (P3-X63-Ag8.653). One hybridoma clone named 5G5 which produced specific monoclonal antibody to WSSV was selected for mass production of monoclonal antibody *in vitro* and *in vivo*. Monoclonal antibody 5G5 was IgG2a with kappa light chain. Western blot analysis showed that monoclonal antibody 5G5 reacted with single WSSV protein which has M.W. 180 kDa and non reacted with yellow head virus (YHV).

Development of immunoassay (indirect ELISA, BS-DAS-ELISA, dot ELISA and BS dot ELISA) for detection of WSSV in *Penaeus monodon* by using monoclonal antibody 5G5 were performed. Detection of WSSV in 40 WSSV-infected shrimp samples and 10 normal shrimp samples by using BS dot ELISA showed 100% accuracy. The BS dot ELISA tests use 4.20 hours for assay and has sensitivity for detection of WSSV less than 0.390 µg/ml. This test for detection of WSSV in shrimp sample is easy to perform and convenient for using in the shrimp farm.

Siriluck Prunglar

Student's signature

Chaivat Kittigul

Thesis Advisor's signature

27, 3, 2006

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล ประธานกรรมการที่
ปรึกษา อาจารย์สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน
กรรมการวิชาการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ อมรรัตน์ พรหมบุญ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้
คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ และเพื่อน ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยช่วยเหลือ แนะนำ
และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนการทำ
วิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอมอบความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แก่บิดา มารดา ผู้มี
พระคุณสูงสุด และคณาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ทุกทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ศิริลักษณ์ พุ่มห่อ

กุมภาพันธ์ 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลองและวิจารณ์	31
สรุปผลการทดลอง	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	83
ภาคผนวก ก	84
ภาคผนวก ข	95
ภาคผนวก ค	109
ภาคผนวก ง	116
ภาคผนวก จ	129

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนครั้งที่ทำการเลี้ยงกึ่งกลาดำเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวและปริมาณโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในแต่ละครั้ง	33
2	แสดงน้ำหนักโมเลกุลแถบโปรตีนของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เตรียมได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ	33
3	แสดงผลการเชื่อมเซลล์ (cell fusion)	39
4	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 2	40
5	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากการทำ indirect ELISA ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3	41
6	แสดงค่า OD ที่ 405 nm ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมารหัส 3G3 และ 5G5 ในการหา isotype โดยใช้ Mouse MonoAb ID/SP Kit	46
7	แสดงค่า OD ที่ 280 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (IgG) ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ HiTrap TM Protein A (Amersham Pharmacia Biotech)	50
8	แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ	75
ตารางผนวกที่		
ก1	แสดงน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการรายงาน	85
ก2	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดย วิธี indirect ELISA	86
ก3	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกึ่งกลาดำปกติและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก4	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา titer ที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ความเข้มข้นของแอนติเจน 5 µg/ml และ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate เจือจางที่ 1: 10,000	88
ก5	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จาก ascitic fluid ของการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3	89
ก6	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา titer ของแอนติเจนและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว ในตัวอย่างกึ่งโดยวิธี indirect ELISA	90
ก7	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี indirect ELISA	91
ก8	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration ระหว่างแอนติเจนกับ conjugated biotin monoclonal antibody ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว	92
ก9	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา titer ของแอนติเจนและ purified immunoglobulin ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว ในตัวอย่างกึ่งโดยวิธี indirect ELISA	93
ก10	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-DAS ELISA	94
ข1	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 2 นำมาทำการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี indirect ELISA	97
ข2	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 นำมาทำการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี indirect ELISA	100
ค1	การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี indirect ELISA	110
ค2	การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-DAS ELISA	113

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
จ1	แสดงค่า OD ที่ 750 nm ของปริมาณโปรตีนมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น 130

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแถบโปรตีนของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์และไม่ได้ทำบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนที่ได้จากเลือดกึ่งกลาดำปกติ ด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R250	34
2	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA	36
3	แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกึ่งปกติ และ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA	37
4	กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration เพื่อหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเลือดติดเชื้อไวรัสกับเลือดกึ่งปกติ	38
5	กราฟแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ indirect ELISA เพื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ผลิตได้จากไฮบริโดมารหัส 1B5, 3G3, 4D11, 5G5 หลังการทำ limiting dilution	43
6	กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ indirect ELISA เพื่อหา titer ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จาก ascitic fluid ของหนูที่ฉีดเซลล์ไฮบริโดมา	44
7	แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Western blot	48
8	กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 280 nm ที่ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ HiTrap TM Protein A	51
9	แสดงแถบโปรตีน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ทำบริสุทธิ์เทียบกับ ascitic fluid ที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 10 µg) ด้วยวิธี SDS-PAGE	52
10	กราฟแสดงผล chequerboard titration เลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสและเลือดกึ่งปกติ กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ที่ได้จาก culture fluid	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	กราฟแสดงผล chequerboard titration เลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสและเลือดกึ่งปกติ (แอนติเจน) กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ที่ได้จาก ascitic fluid	55
12	การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างกึ่งโดยวิธี indirect ELISA	56
13	กราฟแสดงผล sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ โดยวิธี indirect ELISA	57
14	กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration ระหว่างแอนติเจน กับ biotin conjugated monoclonal antibody ต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	59
15	กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration ระหว่างแอนติเจนกับ purified immunoglobulin 5G5 โดยวิธี BS - DAS ELISA	60
16	การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างกึ่งโดยวิธี BS-DAS ELISA	61
17	กราฟแสดงผล sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ โดยวิธี BS-DAS ELISA	62
18	แสดงผลการหา dilution ของแอนติเจน (เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวกับเลือดกึ่งปกติ) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 (culture fluid) โดยวิธี dot ELISA	64
19	แสดงผลตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ จากตัวอย่างกึ่ง 40 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี dot ELISA	65
20	แสดงผลการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี dot ELISA	66
21	แสดงผลการหา titer ของแอนติเจน ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถตรวจเจอโดยวิธี dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:1,600	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	แสดงผลการหา titer ของแอนติเจน ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถตรวจเจอโดยวิธี dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200	69
23	แสดงผลการหา titer ของแอนติเจน ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถตรวจเจอโดยวิธี dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:6,400	70
24	แสดงผลตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ จากตัวอย่างกึ่ง 40 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ 10 ตัวอย่างของแอนติเจน 1:400 โดยวิธี BS-dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200	71
25	แสดงผลตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ จากตัวอย่างกึ่ง 40 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ 10 ตัวอย่างของแอนติเจน 1:800 โดยวิธี BS-dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200	72
26	แสดงผลการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหา ไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-dot ELISA	73
 ภาพผนวกที่		
จ1	แสดงค่า OD ที่ 750 nm เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในการสร้างกราฟ มาตรฐาน	130

การพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Development of Immunoassay for the Detection of White Spot Syndrome Virus in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Using Monoclonal Antibody

คำนำ

กุ้งกุลาดำมีความสำคัญทางการค้าโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากรสชาติดี เป็นกุ้งขนาดใหญ่ ทนทานต่อการขนส่ง เลี้ยงง่าย โตเร็ว อัตรารอดสูงและเพาะพันธุ์ได้ไม่ยาก ในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำที่โดดเด่นในเชิงพาณิชย์มากกว่าสัตว์น้ำอื่นๆหลายชนิด สำหรับเอเชียแรกเริ่มเดิมทีกุ้งกุลาดำเป็นเพียงผลพลอยได้จากการเลี้ยงปลานวลจันทร์ทะเลแบบธรรมชาติแล้วถูกนำมาเลี้ยงอย่างจริงจังและค่อยๆเปลี่ยนเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา

ประมาณปี พ.ศ.2516 บุคคลหลายฝ่ายที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้ให้ความสนใจกับกุ้งกุลาดำมากขึ้น มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง เกิดผลผลิตจำนวนมาก และให้ผล ตอบแทนทางเศรษฐกิจสูง ประมาณปี พ.ศ. 2544 ประเทศไทยมีพื้นที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำ 600,000 ไร่ ผลผลิตรวม 300,000 ตัน ทำเป็นสินค้าส่งออก 255,500 ตัน มูลค่า 98,680 ล้านบาท สำหรับปี 2547 สถานการณ์การผลิตกุ้งกุลาดำของไทยซบเซาลง เนื่องจากเกษตรกรชะลอการเลี้ยง เพราะไม่มั่นใจในเรื่องของราคากุ้งซึ่งมีแนวโน้มลดลง ความผันผวนของการทำธุรกิจกุ้งเกิดขึ้นหลายปีก่อนหน้าผลผลิตกุ้งลดลง เนื่องจากปัญหาผลกระทบของมลภาวะที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้ง โรคระบาด การใช้ยา และเคมีภัณฑ์ด้วยความเข้าใจที่ไม่ถูกต้อง

สำหรับการเกิดโรคระบาดเป็นปัญหาที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคไวรัส โดยเฉพาะโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส white spot syndrome virus (WSSV) เป็นไวรัสชนิด DNA ที่มีความรุนแรงมาก สามารถแพร่ระบาดในแหล่งเลี้ยงกุ้งทั่วประเทศได้อย่างรวดเร็ว เชื้อไวรัสดังกล่าวได้สร้างความเสียหายให้แก่ผู้เลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศและอีกหลายประเทศทั่วโลก ทั้งในทวีปเอเชีย สหรัฐอเมริกา และประเทศในกลุ่มอเมริกาใต้

เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถฆ่ากึ่งในบ่อเลี้ยงได้สูงถึง 90% ภายในเวลา 3 ถึง 10 วัน และเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของเอเชียในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา

เพื่อให้การพัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นไปได้อย่างต่อเนื่องหลายฝ่ายได้ตระหนักและเล็งเห็นความสำคัญและความจำเป็นในการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำซึ่งจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง นำไปสู่การจัดการและควบคุมโรคได้อย่างเหมาะสม ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวนิยมการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) วิธีนี้เป็นวิธีการวินิจฉัยโรคที่มีความจำเพาะ (specificity) และมีความไว (sensitivity) แต่การตรวจด้วยวิธี PCR ต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้และความชำนาญในการทำ รวมทั้งต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาแพง ทำให้ค่าตรวจสูงตามไปด้วย มีอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือวิธีการตรวจทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ผลอย่างรวดเร็วและแม่นยำวิธีหนึ่ง และเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR วิธีนี้ไม่ต้องใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญมาก อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจก็น้อยกว่า ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาอาศัยคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้ควรเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ได้จากเทคนิคไฮบริโดมา และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะนำไปใช้พัฒนาการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูดดำ
2. นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มาทำการทดลองใช้ในการตรวจหาไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (indirect ELISA, dot-ELISA, BS-DAS ELISA, BS-dot ELISA)
3. ทดสอบหาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาที่เหมาะสม และปรับปรุงวิธีการที่เลือกใช้ให้มีประสิทธิภาพในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดียิ่งขึ้น

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ เรียกชื่อตามภาษาไทย มีชื่อสามัญที่รู้จักกันทั่วไปว่า black tiger shrimp, black tiger prawn และ giant tiger prawn มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius อยู่ใน Phylum Arthropoda , Class Crustacea, Family Penaeus (เบณจมินทร์, 2547) กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่มีขนาดใหญ่ มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวาง มีเปลือกหุ้มเกลี้ยงไม่มีขน ฟันกรีด้านบน 7-8 ซี่ ด้านล่าง 3 ซี่ ช่องข้างกรีดทั้งสองด้านแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีดสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีรอยก้านนอก (วัลลภ, 2532) กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเค็มที่มีรสชาติดี มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นสินค้าส่งออกนารายได้เข้าประเทศมาเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาสินค้าสัตว์น้ำ

1.1 ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำ

ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ น่านน้ำแถบใต้ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และที่พบมาก ได้แก่ ออสเตรเลีย อินเดีย และไทย ซึ่งในไทยพบแพร่กระจายทั่วไปในอ่าวไทย และพบมากบริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงจังหวัดนครศรีธรรมราช ทางฝั่งมหาสมุทรอินเดีย (ทะเลอันดามัน) บริเวณนอกฝั่งของจังหวัดภูเก็ตและระนอง (ปกรณ, 2531) กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน สามารถทนอยู่ได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ ชอบอยู่ในที่ซึ่งเป็นดินทรายปนโคลน และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำกร่อยหรือน้ำจืดได้ (สนั่น, 2518)

1.2 ระยะเวลาเจริญของกุ้งกุลาดำ

ในด้านชีววิทยาหรือการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำนั้น หลังจากแม่กุ้งวางไข่ตามสภาพธรรมชาติ ไข่ที่ฟักออกเป็นตัวจะอยู่รอดได้เพียงไม่กี่เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนลูกกุ้งที่ออกจากไข่นั้นจะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปตามการเจริญเติบโต ซึ่งการเจริญเติบโตของลูกกุ้งนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะด้วยกันคือ

ระยะที่หนึ่ง หรือระยะนาอเพลียส (Nauplius stage) เป็นระยะที่กุ้งออกจากไข่ซึ่งมองด้วยตาเปล่าจะเห็นได้ยาก มีรูปร่างค่อนข้างกลม กินอาหารจากถุงที่ติดตัวมา มีการลอกคราบรวมทั้งหมด 6 ครั้ง

ระยะที่สอง หรือระยะโปรโตซัว (Protozoa stage) นับจากลูกกุ้งฟักตัวออกมาเป็นเวลาประมาณ 3-6 วัน แต่ยังว่ายน้ำได้ไม่แข็งแรง ลูกกุ้งในระยะนี้จะเริ่มกินอาหารและเป็นระยะที่สำคัญมากที่สุด หากลูกกุ้งผ่านระยะนี้ไปได้มักมีอัตราการรอดสูง อาหารลูกกุ้งในระยะนี้ ได้แก่ แพลงตอนพืช แพลงตอนสัตว์ มีการลอกคราบ 3 ครั้ง

ระยะที่สาม หรือระยะไมซิส (Mysis stage) เป็นระยะที่กินอาหารพวกแพลงตอนสัตว์เล็กๆ ลูกกุ้งวัยนี้แข็งแรงขึ้นมาก ลักษณะเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเหมือนของพ่อแม่กุ้ง แบ่งการเจริญเติบโตออกเป็นสามขั้น เมื่อถึงขั้นที่สามหรือเรียก ขั้นโพสท์ลาร์วา (Postlarva stage) นั้น ลูกกุ้งจะกินอาหารได้มากขึ้น เช่น เนื้อหอย เนื้อปลา เป็นต้น

นับจากระยะออกไข่จนถึงขั้นโพสท์ลาร์วาใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ระยะหลังสุดนี้ถึงแม้ว่ากุ้งจะมีรูปร่างคล้ายกุ้งขนาดใหญ่มากขึ้น แต่อวัยวะต่างๆ ก็ยังไม่สมบูรณ์ดีและมีความยาวไม่เกินครึ่งนิ้วหรือประมาณ 10 มิลลิเมตร ต่อเมื่อได้เจริญเติบโตด้วยการลอกคราบหลายๆ ครั้งจึงมีลักษณะเหมือนกุ้งใหญ่โดยสมบูรณ์ จากกุ้งวัยอ่อนจนถึงโตเต็มวัยจนกระทั่งถึงระยะที่จะสืบพันธุ์กินเวลาประมาณ 3 เดือน และก็จะวางไข่ในทะเลลึกก้นเวียจนอยู่เช่นนี้ตลอดไป (พรรณิภา, 2531)

1.3 ลักษณะที่สำคัญของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีกระดูกหุ้มเนื้อหรือมีเปลือกหุ้มหัวและตัวมีลักษณะเป็นแผ่นบางและค่อนข้างแข็งมี 2 ชั้น ซ้อนกันอยู่ประกอบด้วย สารไคติน (chitin) โปรตีน และเกลือแคลเซียมคาร์บอเนตอยู่กับไคตินค่อนข้างสูง เปลือกกุ้งกุลาดำจะแบ่งออกเป็นปล้องๆ แต่ละปล้องจะเชื่อมติดกัน เพื่อให้สะดวกในการเคลื่อนไหวของลำตัวและรยางค์ เปลือกกุ้งกุลาดำมีส่วนที่ยึดติดกับโครงร่างภายในด้วย กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์และขนาดเซลล์ของกล้ามเนื้อกับการลอกคราบอย่างสัมพันธ์กันและต่อเนื่องกัน ก่อนลอกคราบกุ้งจะกินอาหารเต็มที่เพื่อเตรียมสะสมอาหารและแร่ธาตุในจำนวนมาก เมื่อมีการลอกคราบเปลือกเก่าจะถูกสลัดทิ้งเมื่อเปลือกใหม่ภายในถูกสร้างเสร็จ โดยเปลือกใหม่จะมีขนาดใหญ่กว่าเดิมเพื่อให้กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตขึ้นหรือมีขนาดใหญ่ขึ้น เปลือกใหม่จะมีการแข็งตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการสะสมแคลเซียมไว้ หลังจากตัว

กุ้งกุลาดำมีเปลือกใหม่ที่ขนาดใหญ่กว่าเดิม เป็นช่วงที่กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตสร้างเนื้อจนเต็ม เริ่มสะสมอาหารและแร่ธาตุเพื่อลอกคราบใหม่

กุ้งกุลาดำ หายใจทางเหงือกและผิวหนัง เนื่องจากออกซิเจนสามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าไปเพื่อใช้ในการหายใจได้ แต่หลักๆ แล้วกุ้งกุลาดำต้องใช้เหงือกในการหายใจ เหงือกของกุ้งกุลาดำนั้นบอบบางถ้ากระทบแรงกับมัน เช่น ใส่สารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อนทั้งหลายในปริมาณมากเกินไปสามารถทำให้เหงือกบอบช้ำและเปื่อยยุ่ยได้ นอกจากนี้เหงือกกุ้งกุลาดำมีลักษณะเป็นซี่ๆ ง่ายต่อการเกาะติดของตะกอนต่างๆ หรือโปรโตซัวที่เป็นโทษต่อตัวกุ้งกุลาดำ เช่น ซูโอแทมเนียม (Zoothamnium) ที่ผู้เลี้ยงกุ้งเรียกติดปากว่า “ซู” ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการหายใจลดลง และส่งผลให้เกิดการอ่อนแอได้ ดังนั้นต้องคอยสังเกตและดูแลสภาพเหงือกของกุ้งกุลาดำ

การกินอาหารของกุ้งกุลาดำจะใช้หนวดคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 คอยจับอาหารเม็ดหรือเหยื่อที่มีขนาดพอที่จะจับได้ส่งเข้าปาก การให้อาหารเม็ดที่มีขนาดพอเหมาะกับบรยางค์ดังกล่าวจะช่วยให้กุ้งกินอาหารได้ดีส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งกุลาดำด้วย สำหรับการหาอาหารของกุ้งกุลาดำจะมีเส้นประสาทรับความรู้สึกทางกลิ่นที่หนวด บริเวณปากขาเดิน หัว เหงือก ลำตัว และแพนหาง

ระบบการย่อยอาหารภายในของกุ้งกุลาดำ มีปากทำหน้าที่บดหรือฉีกอาหารให้มีขนาดเล็กลง แล้วส่งลงสู่การย่อยอีกครั้ง แต่เนื่องจากมันมีลำไส้ตรงและสั้น อาหารที่ดีจึงควรจะย่อยง่าย และสารอาหารที่ย่อยเป็นสารละลายแล้วอยู่ในรูปที่สามารถดูดซึมเข้าไปเลี้ยงร่างกายได้ดีด้วย (เบญจมินทร์, 2547)

1.4 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่อยู่ในกลุ่มสัตว์เปลือกแข็ง (crustacean) อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีไวรัส แบคทีเรีย ปรสิตและจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นกุ้งกุลาดำจึงต้องมีความสามารถเพียงพอต่อการป้องกันตนเองจากสิ่งแวดล้อมที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้นอกจากส่วนเปลือกที่ค่อนข้างแข็งแรงสามารถใช้ป้องกันการบุกรุกเข้าสู่ร่างกายของสิ่งแปลกปลอมและเชื้อก่อโรคต่างๆ ยังคงต้องมีระบบภูมิคุ้มกันภายในที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำลายสิ่งที่ผ่านเข้าสู่ภายในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันแบ่งออกเป็น 2 ระบบหลักๆ คือ adaptive immune system

และ innate immune system สัตว์จำพวก crustacean จะไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune system ซึ่งก็คือไม่มี memory cell ในระบบภูมิคุ้มกันนั่นเอง กุ้งกุลาดำจะมีผนังของระบบการย่อยอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ และยังมีกรดหลายชนิด อีกทั้งมีเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยไวรัสและแบคทีเรียหลายชนิด โดยส่วนใหญ่แล้วผิวหนังชั้นนอกก็สามารถป้องกันเชื้อโรคได้เกือบทั้งหมดแล้วแต่พบได้บ่อยว่าจะเกิดโรคต่อเมื่อผิวหนังชั้นนอกเกิดการฉีกขาดและเมื่อเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายไปยังกระแสเลือดพบว่าจะมีกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ซับซ้อนขึ้น ซึ่งจะเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางเซลล์ภูมิคุ้มกัน (cellular responses) มักจะใช้เซลล์เม็ดเลือดเป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีวิธีการหลายวิธีได้แก่ ความสามารถเกาะจับทำให้สิ่งแปลกปลอมและเชื้อก่อโรคตกตะกอนจากนั้นจะทำลายโดยการกลืนเซลล์โดยวิธี phagocytosis, การเกิด nodule (nodule formation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) ถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยจะถูกกำจัดโดยขบวนการ phagocytosis ขบวนการนี้นับเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีพาราไซต์หรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย วิธีการกลืนเซลล์สิ่งแปลกปลอมจะมีการยื่น cytoplasm ไปล้อมสิ่งแปลกปลอมแล้ว lysosome จะหลั่งสารช่วยย่อยซึ่งมีทั้งสารต่อต้านแบคทีเรียและ hydrolytic enzyme หลังจากทำการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์สำหรับการเกิด nodule จะใช้เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่ ในส่วนการตอบสนองทางน้ำเลือด (humoral responses) ได้แก่ เลคติน (lectins) หรือ agglutinins หน้าที่สำคัญของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันน่าจะมี 2 หน้าที่ คือ หน้าที่การกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการทิ้งไปในระหว่างขบวนการเจริญเติบโต (metamorphosis) และหน้าที่การมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการป้องกันการติดเชื้อ (อภิชัย, 2549) เอนไซม์ lysozyme ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกแยกออกสำหรับแบคทีเรียแกรมลบ lysozyme มีฤทธิ์เล็กน้อยไม่สามารถทำให้เกิดการแยกของผนังเซลล์แต่ช่วยให้แบคทีเรียมีความไวมากขึ้นต่อการกระทำของสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น เอนไซม์ phenoloxidase เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบ prophenoloxidase ของครัสเตเชียโดย lipopolysaccharide, peptidoglycan และ β -1, 3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย phenoloxidase จะไป oxidize สารกลุ่ม phenol ให้เป็น quinone แล้วเปลี่ยนไปเป็น melanin ต่อไป หน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบ prophenoloxidase เช่นเดียวกับเอนไซม์ phenoloxidase รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและฟังไจ (Jiravanichpaisal, 2005)

2. ไวรัสตัวแดงดวงขาว

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นชื่อเรียก ภาษาไทย ส่วนในภาษาอังกฤษ จะมีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกัน ได้แก่ prawn white spot bacilliform virus ,white spot syndrome virus of shrimp, white spot bacilliform virus , white spot syndrome virus, white spot syndrome virus of penaeid shrimp , white spot syndrome baculovirus และในปัจจุบัน คณะกรรมการจัดจำแนกไวรัสนานาชาติ (International Committee on Taxonomy of Viruses) ได้จัดให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, wssv) เป็น species ที่อยู่ใน genus *Whispovirus* , family *Nimaviridae* (Vlak *et al.*, 2002) ไวรัสนี้พบครั้งแรกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เมื่อปี ค.ศ. 1992 จากนั้นก็ได้แพร่กระจายไปยัง อเมริกากลาง และ ละตินอเมริกา ไวรัสนี้เป็นเชื้อสาเหตุหลักที่ก่อความเสียหายให้กับธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบครั้งแรกเมื่อ ปลายปี พ.ศ.2537 พบมีการระบาดที่จังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา นครศรีธรรมราช และปัตตานี ส่วนภาคใต้ฝั่งตะวันตกพบที่จังหวัดตรัง และมีการระบาดตลอดจนถึงปัจจุบัน (ชโล, 2543)

2.1 อนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาว

เมื่อศึกษากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าอนุภาคของไวรัสจะมี envelope หุ้มอยู่ รูปร่างของเชื้อเป็นแท่งหรือรูปไข่ มีขนาดความยาวประมาณ 350 nm ความกว้างประมาณ 150 nm อนุภาคไวรัสจะมีส่วนที่เหมือนหางหนึ่งเส้นอยู่ตรงปลายอนุภาคไวรัส ส่วนของ nucleocapsid เป็นท่อนทรงกระบอก ขนาด 325 x 120 nm ขนาดอนุภาคโดยสมบูรณ์ จะมีขนาดประมาณ 395 x 157 nm (Zhan *et al.*, 1998) จากการรวบรวมรายงานจีโนมที่สมบูรณ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปัจจุบันมีทั้งหมด 3 isolate ที่แตกต่างกัน โดยมีข้อมูลลำดับเบสอยู่ที่ GenBank Accession No. AF332093, AF369029 และ AF440570 จีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้ง 3 isolate ได้มาจาก ประเทศจีน ประเทศไทย และประเทศไต้หวัน ตามลำดับ Accession No. AF332093 ศึกษาจากไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากกุลาดำที่ติดเชื้อจากบ่อเพาะเลี้ยงในประเทศจีนพบว่าไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็น ดีเอ็นเอ รูปแบบเป็นวงกลมสายคู่ (double-stranded circular DNA) มีขนาด 305,107 bp มีปริมาณ GC (G+C content) 41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำ sequence analysis พบว่ามี 531 putative open reading frame (ORF) และมียีนที่มีหน้าที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนเพียง 181 ORFs เท่านั้น (Chen *et al.*, 2002) ในส่วน Accession No. AF369029 พบจีโนม ดีเอ็นเอ ขนาด 292,967 bp มี ORFหลักอยู่ 184 ORFs จากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่ามียีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าเป็นเอนไซม์ในเมตาบอลิซึม การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอและ protein modification คาดว่ามีเพียง 5 ORFs ที่เป็นยีนสำหรับถอดรหัส

สำหรับเป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาว (van Hulten *et al.*, 2001) และ Accession No.AF440570 เป็นจีโนมไวรัสที่แยกได้จากประเทศไต้หวันมี 307,287 bp ประกอบด้วย 181 ORFs ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่ทราบถึงหน้าที่ของยีนเหล่านี้ (Yang *et al.*, 2001)

2.2 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาค

ในช่วงแรกการศึกษาจำแนกโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาว (viral protein, VP) พบโปรตีนขนาดประมาณ 19, 28 kDa (VP19 และ VP28) เป็นองค์ประกอบส่วน envelope และ 15, 24, 26 kDa (VP15, VP24 และ VP26) เป็นองค์ประกอบส่วน nucleocapsids โปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนหลักที่พบอยู่ในไวรัส VP28 และ VP26 มีขนาดยีนประมาณ 615 nucleotide ถอดรหัสได้ 204 amino acid และ VP28 ยังเกี่ยวข้องกับกลไกการติดเชื้อของไวรัส (Marielle *et al.*, 2000a; Marielle *et al.*, 2001) ในบางครั้งพบว่า VP 24, VP26 และ VP28 มีขนาดยีนใกล้เคียงกัน ถอดรหัสได้ประมาณ 206 amino acid อาจมีความแตกต่างกันที่ electrophoresis mobility , isoelectric point, conformation และ post-translational modification (Marielle *et al.*, 2000b) VP19 มีขนาดยีนประมาณ 182 nucleotide ส่วน VP15 เป็นโปรตีนพื้นฐานมีหน้าที่คล้าย DNA-binding protein เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการประกอบจีโนมไวรัส มีขนาดยีนประมาณ 109 nucleotide (Marielle *et al.*, 2002; Witteveldt *et al.*, 2005) ในเวลาต่อมาสนใจศึกษาจำแนกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ด้วยวิธี liquid chromatography-nano-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-nano-ESI-MS/MS) พบ VP664 มีขนาดยีนใหญ่ 18,234 nucleotide ถอดรหัสได้ 6,077 amino acid เมื่อศึกษาต่อโดยวิธี immunoelectron microscopy analysis พบโปรตีนชนิดนี้อยู่ในอนุภาคไวรัส มีรูปร่างเป็นวงแหวนกระจายอยู่เป็นช่วงๆ ครอบ nucleocapsid ซึ่งในการศึกษานี้ยังมีการถกเถียงกันอยู่ว่าเป็นโปรตีนโครงสร้าง ของ nucleocapsid หรือไม่ (Tasi *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2005) การศึกษาโปรตีนในระยะหลังส่วนมากเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในส่วน envelope ได้แก่ VP39 มีขนาดยีน 849 nucleotide ถอดรหัสได้ 283 amino acid และ VP124 ยีนมีขนาด 3,582 nucleotide ถอดรหัสได้ 1,194 amino acid ส่วน VP187 ยีนมีขนาด 4,818 nucleotide ถอดรหัสได้ 1,606 amino acid ทั้งสามเป็น late gene (Zhu *et al.*, 2005a; Zhu *et al.*, 2005b; Li *et al.*, 2006) การนำโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบส่วน envelope ชนิด VP22/26, VP 28, VP31, VP68, VP281, VP292 และ VP466 มาศึกษาความเกี่ยวข้องกับกลไกการติดเชื้อของไวรัส โดยสร้างแอนติบอดีจากโปรตีนไวรัส ทดสอบ neutralization พบโปรตีนไวรัส VP31, VP68, VP281 และ VP466 มีความเกี่ยวข้องในกลไกการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วนรายละเอียดของกลไกต้องมีการศึกษาต่อไป (Li *et al.*, 2005;

Wu *et al.*, 2005) มีรายงานเกี่ยวกับโปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยได้ศึกษาจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกุ้งกุลาดำ 50 ตัวโดย SDS-PAGE พบโปรตีนที่คาดว่าเป็นโปรตีนของไวรัสมากมายหลายขนาด รูปแบบของโปรตีนที่พบในแต่ละเนื้อเยื่อของกุ้งแต่ละตัวไม่เหมือนกันเกิดจากระดับการติดเชื้อและความจำเพาะภายในของกุ้งแตกต่างกัน แต่มีเพียงโปรตีนขนาด 53 kDa ที่พบในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของกุ้งทุกตัว และเมื่อผลิตโมโนโคลนอลต่อ VP53 ใช้ตรวจหาไวรัสตัวแดงขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพจาก (Rameshthangam and Ramasamy, 2005)

3. โรคตัวแดงดวงขาว

การศึกษาทางคุณสมบัติทางชีววิทยาของไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าไวรัสชนิดนี้สามารถก่อโรคในสัตว์น้ำพวก กุ้ง ปู (crustaceans) และพวก invertebrate ที่อยู่ในทั้งน้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำจืด เนื้อเยื่อที่เป็นเป้าหมายหลักในการติดเชื้อ คือ ectodermal และ mesodermal เช่น เหงือก อวัยวะน้ำเหลือง และเยื่อบุผิวชั้นนอก การเพิ่มจำนวนเริ่มต้นในนิวเคลียสและเป็นที่เกิดการประกอบตัวของอนุภาคไวรัส เมื่อออกจากเซลล์โดยทำให้เซลล์แตกออก (Vlak *et al.*, 2002) กุ้งที่เป็นโรคจะมีลักษณะมีดวงสีขาวบริเวณเปลือก ลักษณะดวงที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากความผิดปกติของการสะสมของแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ ดวงสีขาวจะมีขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร พบมากคือบริเวณส่วนหัวอาจมีอาการร่วม เช่น ลำตัวจะมีสีแดง กุ้งจะว่ายน้ำลอยเข้าหาฝั่ง ไม่มีแรงขีดตัว กินอาหารลดลง บางครั้งพบกุ้งลอกคราบไม่ออก หรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัวและจะทยอยตายไปเรื่อยๆ อาจตายหมดบ่อภายใน 3 ถึง 10 วัน ในปัจจุบันการรักษาโรคในกุ้งกุลาดำที่เกิดจากเชื้อไวรัสทุกชนิดยังไม่มียาและสารเคมีชนิดใดรักษาได้ (สุปราณี, 2546)

4. การตรวจวินิจฉัยโรคตัวแดงดวงขาว

4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นการศึกษาทางพยาธิวิทยา โดยการนำเหงือกและผิวได้เปลือกของกุ้งที่ป่วยมาข้อมด้วยสีมาทอซูลินและอีโอซิน(H&E) ไวรัสชนิดนี้จะทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ เหงือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ท่อทางเดินอาหาร โดยพบนิวเคลียสสวมโต และเกิด inclusion body ในนิวเคลียสที่ข้อมติดสีแดงถึงสีน้ำเงินด้วยสีมาทอซูลินและอีโอซิน (สุปราณี, 2546) กรณีที่เกิดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จะพบ inclusion body ในนิวเคลียสติดสีแดงถึงสีน้ำเงิน โดยถ้ากุ้งเริ่มจะติดเชื้อระยะ

แรกจะพบ Cowdry A-type inclusion ถ้าเป็นการติดเชื้อระยะสุดท้ายพบลักษณะนิวเคลียสขยายใหญ่
 คั่น Chromatin ไปติดที่ขอบเซลล์ (ชโล, 2002) การศึกษาพยาธิสภาพอวัยวะส่วนต่างๆ ของกุ้งพบว่า
 อวัยวะส่วน eyestalk เป็นอวัยวะที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาพยาธิสภาพเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสตัว
 แดงดวงขาวเนื่องจากสามารถตรวจพบเซลล์ในส่วนนิวเคลียส (hypertrophied nuclei) แสดงการบวม
 โตอย่างชัดเจนในเวลา 36 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ เมื่อเทียบกับการศึกษาในอวัยวะอื่นๆ ที่ต้องใช้
 เวลานานกว่าและอีกประการหนึ่งการศึกษาพยาธิสภาพของ eyestalk จะไม่ทำให้กุ้งตาย
 (Yoganandhan *et al.*, 2003)

4.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

ได้ทำการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนโดยใช้การตรวจแบบ
 one-step PCR ส่วนในพ่อแม่พันธุ์และพาหะใช้ตรวจแบบ two-step PCR พบว่ากุ้งวัยอ่อน 3,478
 ตัวอย่าง ติดเชื้อ 168 ตัวอย่าง (4.83%) พ่อแม่พันธุ์กุ้ง 864 ตัวอย่าง ติดเชื้อ 73 ตัวอย่าง (8.45%)
 (สุดา และ ฉันทนา, 2543) มีการพัฒนาวิธี PCR ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดย
 วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีที่มี sensitivity สูง และรวดเร็วสามารถ
 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่มีอยู่น้อย เพียง 1 พิโคโมล เมื่อเทียบกับวิธี
 nested-PCR ซึ่งต้องใช้ดีเอ็นเอใช้ถึง 10 พิโคโมล จึงจะสามารถตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวง
 ขาวได้ (Kono *et al.*, 2004) อวัยวะส่วนต่างๆ ของกุ้งที่ได้ทำการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวง
 ขาวโดยวิธี PCR พบว่าอวัยวะส่วน eyestalk เป็นอวัยวะที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ตรวจสอบเชื้อ
 ไวรัสตัวแดงดวงขาวเนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเวลา 12 ชั่วโมง หลังการ
 ติดเชื้อ (Yoganandhan *et al.*, 2003)

4.3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

ในการตรวจวิธีทาง immunohistochemical โดยใช้ fluorescent antibody technique แยก
 ส่วนของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อโดยใช้การจับของ probes ที่เป็นยีนที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวง
 ขาวและติดฉลากด้วย digoxigenin สามารถตรวจเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อได้ (Poulos *et al.*, 2001) มีรายงาน
 ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส
 โปรตีนขนาด 28 kDa และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโปรตีนขนาด 18 kDa ศึกษาโดยวิธี

immunodot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถใช้ตรวจสอบหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง *Penaeus monodon* ได้ แต่มีข้อจำกัดว่าสามารถตรวจโปรตีนไวรัส ตั้งแต่ 500 pg ขึ้นไป (Anil *et al.*, 2002) มีการผลิต 18 kDa antiserum ต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี Western blot และ ELISA เมื่อตรวจอวัยวะต่างๆของกุ้ง *Penaeus indicus* ที่ติดเชื้อไวรัสเนื้อเยื่อส่วนหาง ส่วนหัว และ ก้านตา (eyestalk) เป็นอวัยวะที่ตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสในปริมาณที่สูงกว่าเนื้อส่วนอื่น จากนั้นได้พัฒนาวิธี agglutination โดยการใช้ 18- kDa antiserum เคลือบ latex beads เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสหลังกุ้งได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง (Sathish *et al.*, 2004) การตรวจได้พัฒนาวิธี reversed passive latex agglutination (RPLA) ตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของกุ้ง kuruma (*Penaeus japonicus*) โดยใช้อนุภาค high-density latex เคลือบด้วย specific polyclonal antibody สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้หลังจากที่ incubate 4 ชั่วโมง และพบว่าวิธีนี้จะตรวจหาเชื้อไวรัสได้จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างวิธี RPLA กับวิธี PCR วิธี RPLAไม่ต้องการความชำนาญทางด้านชีวเคมี นอกจากนี้สารละลายและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดสอบก็สามารถที่จะเตรียมเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปได้ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในการตรวจหาเชื้อไวรัสในบ่อกุ้งหรือนากุ้ง (Okumura *et al.*, 2004)

5. การป้องกันโรคตัวแดงดวงขาว

ศึกษาในระดับยีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว เริ่มจากค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อตัวแดงดวงขาวโดยทำ cDNA library จากเลือดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสและใช้เทคนิค phage display พบ recombinant protein จากยีน (pC9 clone) ขนาด 171 bp ทำปฏิกิริยากับโปรตีนเชื้อไวรัสโดยวิธี Western blot จุดประสงค์เพื่อนำยีนที่ได้มาผลิตโปรตีนป้องกันเชื้อไวรัสเข้าทำลายเซลล์กุ้ง (เอี่ยมนัสและคณะ, 2545) การป้องกันเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยให้วัคซีนทางปากโดยสร้าง subunit vaccine ที่มีองค์ประกอบของ envelope protein ของอนุภาคไวรัสแล้วให้กุ้งกินอาหารที่เคลือบ recombinant protein VP19 (r-VP19) เปรียบเทียบกับ r- VP28 พบว่ากุ้งที่กินอาหารเคลือบ r- VP28 รอดชีวิต 61 เปอร์เซ็นต์ ส่วน r-VP19 ไม่พบว่ากุ้งรอดชีวิต (Witteveldt *et al.*, 2004) ในด้านการพัฒนาใช้เทคนิคทางโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการป้องกันโรค เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจมาก ในปัจจุบันได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนไวรัสในส่วน VP28 และ VP 19 ซึ่งโปรตีนทั้งสองเป็นองค์ประกอบในส่วน envelop โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ใช้ทดสอบการ neutralizeไวรัสโดยทดลองใน in vitro ใช้เซลล์จาก lymphoid Oka organ และทดสอบใน in vivo โดยการฉีดกุ้ง พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองมีประสิทธิภาพในการ neutralizeไวรัสและลด

อัตราการตายของกึ่งติดเชื้อ (Shih, 2004) อีกงานวิจัยเป็นการป้องกันโดยเน้นการศึกษาส่วนโปรตีนหลักของไวรัส คือ VP28 กับ VP19 เป็นโปรตีนส่วน envelope และ VP26 กับ VP24 เป็นโปรตีนส่วน nucleocapsid ทำ recombinant proteins ของโปรตีนทั้ง 4 ชนิด รูปแบบ TrVP28:19, TrVP28, TrVP24 และ TrVP26 ผลิตแอนติบอดีทดสอบด้วยวิธี immunoblot แอนติบอดีจาก TrVP28:19 สามารถ neutralized เชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถประยุกต์ใช้เป็น immunotherapeutic รักษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาค่าต่อไป (Kim *et al.*, 2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ

1.1 การเลี้ยงกึ่งกลาดำ

กึ่งกลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ปลอดโรคจากฟาร์มเกษตรสมบูรณ์ จ.สุพรรณบุรี กุ้งที่ใช้มีน้ำหนักประมาณ 15-20 กรัม หรือ จำนวน 80-100 ตัว ต่อ กิโลกรัม เลี้ยงในบ่อพลาสติกขนาด 250 ลิตร ความเค็ม 20 ppm ให้อากาศตลอดเวลาและให้อาหารเม็ดวันละ 2 มื้อ เปลี่ยนน้ำวันละ 1-2 ครั้ง เมื่อนำกึ่งกลาดำจากฟาร์มมาเลี้ยงในบ่อพลาสติก ต้องให้กึ่งกลาดำได้พักหลังจากขนส่ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่จะทำการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว อีกทั้งต้องทำการแยกกึ่งกลาดำไว้เป็น negative control ประมาณ 10 ตัว โดยเลี้ยงแยกจากกึ่งกลาดำที่จะทำการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

1.2 การฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและการทำเชื้อไวรัสตัวแดงให้บริสุทธิ์

นำสารละลายเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากบริษัทซีพี 10 ml มาเจือจางประมาณ 20 เท่า ด้วย TN buffer (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4) แล้วกรองด้วย filter ขนาด 0.45 μ m จากนั้นฉีดกุ้งด้วยไวรัส ปริมาตร 200 μ l เข้าบริเวณ intramuscular สังเกตอาการของกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสจากนั้นทำการเก็บเลือดกุ้งจากหัวใจ โดยใช้เข็มเบอร์ 24 พร้อม syringe ขนาด 1 ml แทะเข้าบริเวณขาที่สามเพื่อดูดเลือดจากแอ่งหัวใจนำเลือดกุ้งปั่น 8,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นแยกเอาส่วนใสไปปั่น 100,000 g โดยใช้ ultracentrifuge เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแยกตะกอนมาละลายใน 1 ml ของ TN buffer ถ้ายังไม่นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ให้เก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -70 °C

2. การแยกเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้บริสุทธิ์

การนำสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวมาปั่นแยกให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน sucrose gradient

นำสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวใส่ลงบนสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ง) จากนั้นนำไปปั่น 100,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าปริมาณไวรัสมีมากจะพบแถบไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นสีขุ่นๆ ถ้าไวรัสตัวแดงดวงขาวมีปริมาณน้อย จะมองไม่เห็นแถบไวรัสตัว

แดงดวงขาวจึงต้องเก็บส่วนใสที่อยู่ด้านล่างของแถบ hemocyanin เป็นแต่ละ fraction ย้ายแถบไวรัสตัวแดงดวงขาว หรือ fraction นั้นมาเจือจางใน TN buffer โดยใช้เข็มเบอร์ 21 และ syringe ขนาด 10 ml ในการดูด จากนั้นปั่น 100,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายใน TN buffer เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -70 °C นำสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวมาตรวจ สอบด้วย SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วย Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

3. การแยกโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ผสมสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวกับ sample buffer (SDS reducing buffer) ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้สารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว 10 µl ผสมกับ sample buffer 10 µl นำไปใส่ใน heat block อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 นาที และโปรตีนมาตรฐาน นำไปหยอดช่องเจล (ใช้ 12 % resolving gel buffer และ 4 % stacking gel buffer) ปริมาตร 15 µl ต่อชุดเจลเข้ากับ electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V 50 mA ทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250

4. การหาปริมาณโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว

เป็นการหาปริมาณโปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์ และปริมาณโปรตีนเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว คัดแปลงจากวิธีของ Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) ทำกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin ความเข้มข้น 8,000 µg/ml, 4,000 µg/ml, 2,000 µg/ml, 1,000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml และ 31.25 µg/ml เปรียบเทียบหาโปรตีนที่ต้องการ

5. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

5.1 การฉีดกระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลคัดแปลงจากวิธีของ Kohler and Milstein (1975)

นำหนูเพศเมียสายพันธุ์ Balb/C อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล อ.สาธิต จ.นครปฐม จำนวน 3 ตัว มาเลี้ยงในกรงปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C แล้วฉีดกระตุ้นด้วย สารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น 20 µg ต่อครั้ง ก่อนฉีดกระตุ้นต้องทำการกรองไวรัส ด้วย filter ขนาด 0.45 µm ปริมาณที่ใช้ฉีด 200 µl ร่วมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้กันจนเป็น water in oil emulsion เพื่อให้หนูสร้างแอนติบอดีได้ดีขึ้น แล้วฉีดเข้าใต้ ผิวหนัง (subcutaneous injection) ใน ปริมาณ 0.2 ml ก่อนฉีดครั้งแรกต้องทำการเจาะเลือดหนูเพื่อ เป็น negative control การฉีดกระตุ้นจะทำการฉีดทั้งหมด 4 ครั้ง ใน 3 ครั้ง จะทำการฉีดห่างกันครั้ง ละ 2 อาทิตย์ และเมื่อฉีดครั้งที่ 3 แล้ว ต่อมาอีก 2 สัปดาห์ทำการเจาะเลือดแล้วนำมาตรวจหา แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อได้ titer ที่ดีแล้วทำการฉีดครั้งสุดท้าย (booster dose) โดย ใช้สารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวผสมกับ normal saline ความเข้มข้นของ สารละลายไวรัสตัวแดง ดวงขาว ในครั้งนี้สูงกว่าครั้งแรก 4 เท่า คือ 80 µg แล้วฉีดเข้าช่องท้อง

5.2 การหาความเข้มข้นของเลือดกึ่งติดเชื้อ เลือดกึ่งปกติ และconjugate ที่เหมาะสมในการ ทำ indirect ELISA

5.2.1 นำเลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจางด้วย coating buffer จนมี ความเข้มข้น 5 µg /ml และ 2.5 µg /ml ใส่ลงใน ELISA plate ปริมาณหลุมละ 100 µl จากนั้นนำ plate ใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ชำมคืน เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

5.2.2 เติม blocking solution ลงในทุกหลุม ปริมาณหลุมละ 100 µl นำ plate ไปใส่ใน กล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

5.2.3 เจือจาง แอนติบอดีซีรั่มต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ได้จากการเจาะเลือดหนูครั้ง สุดท้ายและหนูก่อนฉีดไวรัส เป็น 1:4,000, 1: 8,000, 1:16,000, 1: 32,000, 1:64,000 และ 1:128,000 ใน blocking solution จากนั้นเติมแอนติบอดีที่เจือจางลงในหลุม ปริมาณ 100 µl หลุมที่เป็น blank เติม blocking solution 100 µl จากนั้นนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลา นำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

5.2.4 เติม goat anti-mouse IgG- HRP โดยเจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1:5,000 และ 1: 10,000 ลงในทุกหลุมปริมาณหลุมละ 100 μ l จากนั้นนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

5.2.5 นำสับสเตรท o-phenylenediamine (sigma) มาละลายด้วย citrate-phosphate buffer ที่มี 30 % H_2O_2 ลงในทุกหลุมปริมาณหลุมละ 50 μ l จากนั้นนำ plate ไปตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องรอจนกระทั่งเกิดสี ใช้เวลาประมาณ 30 นาที

5.2.6 หยดปฏิกิริยาการเกิดสีโดยเติม 2N H_2SO_4 ลงในทุกหลุมปริมาณหลุมละ 50 μ l จากนั้นนำ plate ไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA plate reader

5.3 การหา titer ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีอยู่ในซีรัมหนู ด้วยวิธี indirect ELISA ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งติดเชื้อและเลือดกึ่งปกติ ความเข้มข้น 5 μ g /ml เจือจางแอนติบอดีซีรัมต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากการเจาะเลือดหนูครั้งสุดท้ายและหนูก่อนฉีดไวรัส แบบ two fold dilution ตั้งแต่ 1: 2,000 – 1: 2,048,000 ใน blocking solution จากนั้นเติมและ goat anti-mouse IgG- HRP ความเข้มข้น 1: 10,000

5.4 การเชื่อมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโลมาสายพันธุ์ P3-X63Ag8.653 ซึ่งเป็น HGPRT⁻ จากหนูสายพันธุ์ Balb/C มาเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI- 1640 (GIBCO) ที่มี fetal bovine serum (FBS) อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะ exponential phase ประมาณ 2-3 วัน และควรเลี้ยงเซลล์ให้ปริมาณ 10×10^7 เซลล์ ต่อการเชื่อมเซลล์ 1 ครั้ง ก่อนการเชื่อมเซลล์ล้างเซลล์มัยอีโลมา 2 ครั้ง ปั่น 300 g นาน 5 นาที นำม้ามหนูออกมาโดยวิธี aseptic technique และบดม้าม นำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างใน RPMI-1640 ปริมาณ 10 ml ปั่น 300 g นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น ละลายตะกอนเซลล์ด้วย RPMI-1640 ให้มีปริมาณ 5 ml นับเซลล์ ผสมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมาอัตราส่วน 1:1 ในหลอดแก้วฝาเกลียว (screw cap tube) ขนาดปริมาตร 15 ml เขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน ปั่น 300 g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วค่อยๆ หยคน้ำยาเชื่อมเซลล์คือสารละลาย PGE ความเข้มข้น 50% อุณหภูมิ

37 °C ปริมาตร 1 ml ลงในตะกอนเซลล์พร้อมกับใช้ปลายปิเปตขนาด 1 ml กวนเบาๆและซ้ำ โดยควบคุมให้สารละลาย RPMI-1640 ไหลให้หมดภายใน 5 นาที นำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที จึงนำไปปั่น 300 g นาน 5 นาที เพื่อล้างสารละลาย PGE เมื่อได้ตะกอนเซลล์ เดิม HAT medium (ภาคผนวก ง) นำเซลล์ไปหยอดลงใน plate ที่ได้เลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่มี feeder cell (ภาคผนวก ง) อยู่แล้ว ปริมาตรหลุมละ 100 μ l โดยหลุมที่อยู่รอบนอกของ plate จะไม่ใช่เลี้ยงแต่จะเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปจากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5% CO₂

6. การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาภายหลังการเชื่อมเซลล์

ภายหลังทำการเชื่อมเซลล์วันรุ่งขึ้นให้สังเกตดูเซลล์ว่าเกิดการปนเปื้อนหรือไม่แล้วให้เติม HAT medium ทุก 2-3 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 5 วัน ต้องคอยสังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลอนของไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสง และต้องสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยโดยถ้าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ น้ำยาเลี้ยงเซลล์จะมีสีเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าปกติ หรือเมื่อยก plate ดูที่ก้นหลุมจะเห็นหลุมที่เกิดการปนเปื้อนมีลักษณะ ชุ่มฉ่ำมาก ต้องทำการกำจัดหลุมนั้นทิ้งโดยเร็ว โดยใช้ 2N NaOH หรือ 10% NaN₃ หยอดลงในหลุมที่เกิดการปนเปื้อน ทำการตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาเป็นระยะๆ เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 1/3 ของพื้นที่ก้นหลุมให้ทำการดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ ส่วนบนของหลุมปริมาตร 100 μ l นำมาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาก็ทำการเลี้ยงด้วย HAT medium ต่ออีก 2-3 วัน ก่อนจะเปลี่ยนมาเลี้ยงโดย HT medium (ภาคผนวก ง)

7. การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี

indirect ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งติดเชื้อและเลือดกึ่งปกติความเข้มข้น 5 μ g/ml เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่เจือจาง หลุมที่ใช้เป็น positive control ให้เติมโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนูในการเจาะเลือดครั้งสุดท้าย เจือจางด้วย blocking solution ในอัตรา 1: 8,000 หลุมที่ใช้เป็น negative control เติมน้ำเลี้ยงเซลล์มัยไฮโลมาไม่เจือจาง หลุม blank เติม blocking solution

8. การโคลนเซลล์โดยวิธี limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวมา นับเซลล์และทำให้เจือจางใน HT medium ที่มี FBS อยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ และ feeder cell รวมอยู่ด้วย โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 cells/ml ก่อนนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 cell/ml จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละ ความเข้มข้นไปหยดลงใน plate เลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวนความเข้มข้นละ 2 แถว (24 หลุม) ปริมาตรหลุมละ 0.2 ml จะได้เซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 8 เซลล์ 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ ต่อหลุม ตามลำดับนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5 %CO₂ ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 1/3 ของพื้นที่ก้น หลุม ให้นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำเป็นครั้งที่ 2 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาเพียง 1 โคลนเท่านั้น

9. การแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI -1640 ที่มี FBS อยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี จำนวนเซลล์ประมาณ 10×10^6 เซลล์ ปั่น 300 g นาน 5 นาที จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนออก และเติมน้ำยาแช่แข็งที่มีอุณหภูมิ 4 °C ลงไป 1ml ใส่ใน freeze box และนำไป แช่ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -70 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 °C

10. การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่แช่แข็งแล้วกลับมาเลี้ยงใหม่

นำหลอดแช่แข็งที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว นำมาละลายที่ อุณหภูมิ 37 °C ทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีน้ำยา RPMI-1640 อุณหภูมิ 37 °C ปริมาตร 10 ml ล้าง 2 ครั้ง ปั่น 300 g นาน 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อที่มี HT medium ที่มี FBS อยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ml วันรุ่งขึ้นให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกครึ่งหนึ่งแล้ว เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่กลับคืนเท่าเดิมและเมื่อเซลล์เจริญเพิ่มมากขึ้นให้เพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยง เซลล์เป็น 10 ml จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และถ่ายเซลล์ทุก 2-3 วันเมื่อเซลล์เจริญเต็ม ขวด

11. การขยายการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

11.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลอดทดลอง

เมื่อเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม จนได้เซลล์จำนวนมากแล้ว จึงนำไปเลี้ยงขยายในขวดขนาดพื้นที่ 25 cm^2 โดยเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี FBS อยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7 ml เมื่อเลี้ยงได้ 24 วัน อาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง ให้ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ และปั่น 300 g นาน 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ที่ตกตะกอนออก จากนั้น แบ่งส่วนหนึ่งของตะกอนเซลล์ไปทำการเลี้ยงขยายต่อไปอีกโดยส่วนหนึ่งนำไปเก็บโดยการแช่แข็ง ในไนโตรเจนเหลว สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอยู่ให้นำมาเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°C หรือ 20°C ก่อนนำไปตรวจหา antibody titer และศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีต่อไป

11.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนู

นำหนูเพศเมียสายพันธุ์ Balb/C อายุประมาณ 8-9 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลอง แห่งชาติ ม.มหิดล อ.สาธิต จ.นครปฐม จำนวน 4 ตัว มาฉีดกระตุ้นด้วย Freund's incomplete adjuvant ปริมาตร 200 μl เข้าทางช่องท้อง หลังจากนั้น 1 วัน ให้นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เลี้ยงขยายไว้ในขวดเลี้ยงเซลล์ปั่น 300g นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไป ปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $5 \times 10^6 / 0.2 \mu\text{l}$ ใน normal saline แล้วนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนู และทิ้งระยะเวลาหลังฉีดประมาณ 12-14 วัน จะเห็นท้องหนูโตขึ้นอย่างชัดเจน จึงใช้เข็มเบอร์ 18 ทำการเจาะช่องท้องและนำ ascitic fluid ที่ได้ปั่น 300 g นาน 5 นาที ascitic fluid ที่ได้แช่ที่อุณหภูมิ -70°C ก่อนนำไปตรวจหา antibody titer และศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีต่อไป ส่วนตะกอนเซลล์ที่ปั่น แยกให้แช่แข็งที่ อุณหภูมิ -196°C ในไนโตรเจนเหลว

12. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

12.1 การศึกษาชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ใช้ชุดทดสอบ Mouse MonoAb ID/SD Kit (Zymed) โดยมีขั้นตอนดังนี้

12.1.1 ทำการเคลือบ plate (96 well plate MaxiSorp, Nunc) ด้วยสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 µg/ml ปริมาตรหลุมละ 100 µl จำนวน 10 หลุม จากนั้นนำ plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

12.1.2 เติม blocking solution ลงในทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 µl นำ plate ไปใส่ในกล่องความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

12.1.3 เติมน้ำยาล้างเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตรหลุมละ 100 µl จากนั้นนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

12.1.4 เติม biotinylate anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, kappa และ lambda หลุมละ 1 หยด (เติม PBS ในหลุมที่เป็น blank และเติม biotinylate normal immunoglobulin ในหลุมที่ใช้เป็น negative control และ positive control ตามลำดับ) จากนั้นนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

12.1.5 เติม HRP streptavidin (horseradish peroxidase-streptavidin conjugate) ความเข้มข้น 1 เท่าลงในทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 µl (เตรียมจาก HRP-streptavidin ความเข้มข้น 50 เท่า 1 หยด + PBS-T 2.5 ml) จากนั้นนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

12.1.6 เติม ABTS [2,2' -azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid-6) ammonium salt] ความเข้มข้น 1 เท่า ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับ (horseradish peroxidase) ปริมาตร 50 µl (เตรียมจาก ABTS ความเข้มข้น 50 เท่า 1 หยด + substrate buffer ความเข้มข้น 10 เท่า 5 หยด + น้ำกลั่น 2.5 ml) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หรือรอจนเกิดสี

12.1.7 หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M citric acid +0.1 %NaN₃ 35 µl/well จากนั้นนำไปวัด ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วย เครื่อง ELISA plate reader

13. การทำ Western blot

Western blot เป็นการทดสอบปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดี กับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ภายหลังจากการแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนต่างๆ ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแล้ว จึงทดสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เพื่อดูความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (ภาคผนวก ง)

14. การทดสอบหา antibody titer ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ได้จาก ascitic fluid โดยวิธี indirect ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้จาก ascitic fluid แบบ two fold dilution ตั้งแต่ 1: 2,500- 1: 5,120,000

15. การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (purification of monoclonal antibody)

เพื่อทำการกำจัดโปรตีนอื่นๆ ที่อาจปนเปื้อนมากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ เช่น ส่วนประกอบอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ วิธีการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยผ่าน affinity chromatography column HiTrapTM Protein A (Amersham pharmacia biotech) มีขั้นตอนดังนี้

15.1 ประกอบชุด HiTrapTM Protein A โดยนำจุลที่ปิดบริเวณด้านปลายบน และด้านล่าง affinity chromatography column ออก และนำตัวเชื่อมมาใส่ที่ปลายด้านบนเพื่อให้ต่อกับเข็มฉีดยาได้พอดี

15.2 ล้าง column โดยใช้เข็มฉีดยาค่อยๆ หยด binding buffer (20 mM sodium-phosphate pH 7.0) ปริมาตร 5 ml ลงใน column และควบคุมอัตราการไหลของละลายภายใน column ให้ได้ 1 ml ต่อ 1 นาที เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาในหลอดฝาเกลียว

15.3 ล้าง column ด้วย binding buffer ปริมาตร 5-10 เท่าของปริมาตรของ column และเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาในหลอดฝาเกลียว

15.4 ทำการชะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ใน column ด้วย elution buffer (0.1 M citric acid pH 3.0) และเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาในหลอดฝาเกลียวที่เติม 1 M Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 60-200 μ l ไว้เพื่อปรับ pH ให้เป็นกลาง

15.5 ล้าง column ด้วย binding buffer ปริมาตร 5-10 เท่าของปริมาตรของ column และเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาในหลอดฝาเกลียว

15.6 เติม 20 % ethanol ลงใน column เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และเชื้อรา และเก็บรักษา column ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

15.7 นำสารละลายแต่ละหลอดที่เก็บไว้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm และนำมาสร้างกราฟเลือกส่วนที่ให้ค่า OD สูงที่สุด เก็บไว้สำหรับการทดลองต่อไป

15.8 เก็บโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไว้ที่ -20 °C สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

16. การวัดปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

โดยการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งทำการเจือจาง ตัวอย่างของโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับการวัดด้วย spectrophotometer จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

Protein concentration = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ x 0.69 x dilution factor หน่วยเป็น mg/ml

โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm = 1 mg/ml มีค่าเท่ากับค่าดูดกลืนแสง 0.69 of mouse immunoglobulin

เมื่อทราบปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้แล้วจะสามารถทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

17. การเชื่อมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ กับ biotin

เพื่อเพิ่มความไวของการทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยอาศัยหลักการที่ว่า biotin และ streptavidin มีคุณสมบัติที่สามารถเกาะเกี่ยวกันได้สูงมาก และใช้ streptavidin เป็นตัวกลางเชื่อมโยงระหว่าง biotin และ enzyme แทน anti-mouse immunoglobulin ในการตรวจวิเคราะห์ ด้วยวิธี ELISA การ conjugate โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์กับ biotin มีวิธีการดังนี้

17.1 เจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ด้วย PBS pH 7.2 ให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 mg/ml

17.2 นำไป dialyse ในสารละลาย 0.1 M NaHCO₃ buffer pH 8.2 ค้างคืน แล้วเปลี่ยน buffer ใหม่ dialyse ต่ออีก 1-2 ชั่วโมง

17.3 ผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้กับสารละลาย biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS, Sigma) 1 mg/ml ใน DMSO ในอัตราส่วน 8:2 แล้วนำไปแช่เย็นเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

17.4 นำส่วนผสมที่ได้ dialyse ในสารละลาย PBS pH 7.2 ค้างคืน แล้วเปลี่ยน buffer ใหม่ dialysis ต่ออีก 1-2 ชั่วโมง

17.5 ผสม biotin conjugated monoclonal antibody ที่ได้จาก glycerol ในอัตราส่วน 1 : 1 แบ่งใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เก็บไว้ที่ -20 °C

18. การทดลองใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำโดยวิธี indirect ELISA

18.1 ทำ checkerboard titration หาค่าเจือจางของเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสและกึ่งปกติโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี จาก culture fluid (โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา) และ ascitic fluid โดยวิธี indirect ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติที่เจือจาง five fold จาก 1:5-1:15,625 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก culture fluid เจือจาง แบบ two

fold 1:8-1:64 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก ascitic fluid เจือจางแบบ five fold จาก 1:6,400-1:800,000

18.2 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างกึ่งคิดเชื้อ 40 ตัวอย่าง และกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี indirect ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งคิดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติที่เจือจางจาก 1:25 และ culture fluid เจือจาง 1:32

19. การทดสอบหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำโดยวิธี indirect ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งคิดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติที่เจือจาง two fold จากความเข้มข้น 12.5-0.012 µg/ml ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก culture fluid ไม่เจือจาง

20. การทดสอบใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำโดยวิธี biotin-sterptavidin double antibody sandwich ELISA (BS-DAS ELISA)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำ biotin conjugate monoclonal antibody ไปใช้ในการทดสอบด้วยวิธี BS-DAS ELISA

หลังจากทำการเตรียม biotin conjugated monoclonal antibody แล้วก่อนที่จะนำไปใช้งานจริงในการทดสอบหาไวรัสตัวแดงดวงขาว ต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสม (condition) ในการทดสอบด้วยวิธี BS-DAS ELISA

20.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ แอนติเจนเลือดคิตเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ biotin conjugated monoclonal antibody ที่จะนำไปใช้ในการทดสอบ BS-DAS ELISA

ทำ chequerboard titration ระหว่าง แอนติเจนที่ใช้เคลือบ plate และ biotin conjugate monoclonal antibody ที่จะนำไปใช้เป็น secondary antibody โดยมีวิธีการดังนี้

20.1.1 เคลือบ plate ด้วย แอนติเจนที่เจือจางด้วย coating buffer ความเข้มข้น 20 µg/ml, 10 µg/ml และ 5 µg/ml ปริมาณหลุมละ 100 µl จากนั้นนำ plate ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำคืน เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นาน ครั้งละ 3 นาที

20.1.2 เติม blocking solution ลงในหลุม ปริมาณหลุมละ 100 µl ก่อนนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.1.3 เติม biotin conjugate monoclonal antibody ที่เจือจางแบบ two fold ด้วย blocking solution ที่ความเจือตั้งแต่ 1:100 – 1: 12,800 หลุมละ 100 µl แล้วนำไปปั่นตู้เย็นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.1.4 เติม streptavidin HRP เจือจาง 1:100 ด้วย blocking solution จากนั้นหยอด หลุมละ 100 µl แล้วนำไปปั่นตู้เย็นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.1.5 นำสับสเตรท o-phenylenediamine (sigma) มาละลายด้วย citrate-phosphate buffer ที่มี 30% H₂O₂ เติมลงในหลุม ปริมาณหลุมละ 100 µl จากนั้นนำ plate ไปตั้งไว้ในที่มืดที่ อุณหภูมิห้องและรอจนกระทั่งเกิดสีซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที

20.1.6 หยุดปฏิกิริยาการเกิดสี โดยเติมสารละลาย 2 N H₂SO₄ หลุมละ 50 µl แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm

20.2 ทำ chequerboard titration ระหว่าง purified immunoglobulin ที่ใช้เคลือบ plate กับ แอนติเจน โดยมีวิธี BS-DAS ELISA

20.2.1 เคลือบ plate ด้วย purified immunoglobulin แอนติเจนที่เจือจางแบบ two fold 1:1,000 -1:2,048,000 ด้วย coating buffer ปริมาณหลุมละ 100 µl จากนั้นนำ plate ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำคืน เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นาน ครั้งละ 3 นาที

20.2.2 เติม blocking solution ลงในทุกหลุม ปริมาณหลุมละ 100 μ l ก่อนนำ plate ไปใส่ในกล่องให้ความชื้น และตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.2.3 แอนติเจนที่เจือจางแบบ 1:10 ด้วย blocking solution ปริมาณหลุมละ 100 μ l จากนั้นนำ plate ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำมคืน นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.2.4 เติม biotin conjugated monoclonal antibody ที่เจือจาง 1:100 ด้วย blocking solution หลุมละ 100 μ l แล้วนำไปบ่มตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.2.5 เติม streptavidin HRP เจือจาง 1:100 ด้วย blocking solution จากนั้นหยอดหลุมละ 100 μ l แล้วนำไปบ่มตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

20.2.6 นำสับสเตรท o-phenylenediamine (sigma) มาละลายด้วย citrate-phosphate buffer ที่มี 30% H_2O_2 เติมลงในหลุม ปริมาณหลุมละ 100 μ l จากนั้นนำ plate ไปตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องและรอจนกระทั่งเกิดสีซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที

20.2.7 หยุดปฏิกิริยาการเกิดสี โดยเติมสารละลาย 2 N H_2SO_4 หลุมละ 50 μ l แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 492

20.3 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างกุ้งติดเชื้อ 40 ตัวอย่าง และกุ้งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี BS-DAS ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้ purified immunoglobulin เจือจาง 1:12,800 เลือดของตัวอย่างกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและกุ้งปกติ เจือจาง 1:10

21. การทดสอบหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวใน

กึ่งภูธาดำโดยวิธี BS-DAS ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและกึ่งปกติที่เจือจาง two fold จากความเข้มข้น 200-0.195 $\mu\text{g/ml}$

22. การทดสอบใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวใน

กึ่งภูธาดำโดยวิธี dot ELISA

22.1 หาความค่าความเจือจางและค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน (เลือดติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ)

22.1.1 ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Whatman ; 0.45 μm) พื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ต่อหนึ่งตัวอย่าง

22.1.2 หยดเลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ เจือจางแบบ two fold 1:25-1:51,200 จากนั้นหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 2 μl ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นาน ครั้งละ 5 นาที

22.1.3 เติม blocking solution แล้วนำไป rotate เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที

22.1.4 เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่เจือจางแบบ 1:2 ด้วย blocking solution จากนั้น rotate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

22.1.5 เติม goat anti-mouse IgG- HRP ที่เจือจางแบบ 1:10,000 ด้วย blocking solution จากนั้น rotate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

22.1.6 เติมสารละลายสับสเตรท TMB Membrane Peroxidase Substrate (1-C) (KPL) แล้ว rotate เป็น เวลา 5 นาที หรือจนกระทั่งปรากฏแถบสีน้ำตาลเกิดขึ้น จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

22.2 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างกึ่งติดเชื้อ 40 ตัวอย่าง และกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี dot ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ เจือจาง 1:400

23. การทดสอบหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำโดยวิธี dot ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ เจือจางแบบ two fold ตั้งแต่ 50- 0.390 µg/ml และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก culture fluid เจือจาง 1:2

24. การนำ biotin conjugate monoclonal antibody ไปใช้ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำโดยวิธี BS-dot ELISA

24.1 หาค่าความเจือจางของ biotin conjugated monoclonal antibody ที่เหมาะสม

24.1.1 ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Whatman ; 0.45 µm) พื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรต่อหนึ่งตัวอย่าง

24.1.2 หยดตัวอย่างเลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และเลือดกึ่งปกติ ที่เจือจาง 1:400 – 1:25,600 จากนั้นหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 2 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นาน ครั้งละ 5 นาที

24.1.3 เติม blocking solution แล้วนำไป rotate เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

24.1.4 เติม biotin conjugated monoclonal antibody ที่เจือจางแบบ 1:1,600, 1:3,200 และ 1:6,400 ด้วย blocking solution จากนั้น rotate ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

24.1.5 เติม streptavidin HRP เจือจาง 1:100 ด้วย blocking solution จากนั้น rotate ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

24.1.6 เติมสารละลายสับสเตรท TMB Membrane Peroxidase Substrate (1-C) (KPL) แล้ว rotate เป็น เวลา 5 นาที หรือจนกระทั่งปรากฏแถบสีน้ำตาลเกิดขึ้น จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

24.2 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างกึ่งติดเชื้อ 40 ตัวอย่าง และกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี BS-dot ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ เจือจาง 1:400 และ 1:800 ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200

25. การทดสอบหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งปกติโดยวิธี BS-dot ELISA

ขั้นตอนเหมือนที่ได้กล่าวมาแล้วแต่จะใช้เลือดกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ เจือจางแบบ two fold ตั้งแต่ความเข้มข้น 200-0.098 $\mu\text{g/ml}$ ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อฉีดเชื้อเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวเตรียมไว้เป็นแอนติเจน ได้ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งหมด 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะทำการเก็บเลือดและเหงือกกุ้ง เพราะในเลือดกุ้งจะมีไวรัสในปริมาณมากรองลงมาคือเหงือกกุ้ง การเลี้ยงกุ้งเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสครั้งแรก ขั้นตอนการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์จากเลือดกุ้งและเหงือกกุ้งได้ไวรัสปริมาณน้อยมาก สังเกตได้จากขนาดของตะกอนไวรัสปีก่อนนำมาผ่าน sucrose gradient มีขนาดเล็กมาก เมื่อผ่านขั้นตอนการทำ sucrose gradient ทำการปั่นตกตะกอน พบว่าตะกอนของไวรัสยังมีขนาดเล็กมาก หลังจากเทส่วนใสทิ้งทำให้ตะกอนไวรัสหลุดออกบางส่วน อาจเป็นเพราะขั้นตอนในการปั่นตกตะกอนไวรัสใช้เวลาน้อยเพียง 1 ชั่วโมง ปริมาณตะกอนน้อยและตกอยู่กันหลวมไม่แน่นพอ ดังนั้นจึงเพิ่มเวลาในการปั่นตก ตะกอนไวรัสเป็น 2 ชั่วโมง จากการเพิ่มเวลาในการปั่นตกตะกอนไวรัสในการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 2 ได้ปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ถึง 770 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่เพียงพอในการทดลอง จึงเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3 ได้ปริมาณไวรัส 885 $\mu\text{g/ml}$ เพียงพอสำหรับการทดลอง (ตารางที่ 1) วิธีที่ใช้ถือว่าเตรียมไวรัสได้น้อย ในการเพิ่มจำนวนไวรัสในกุ้ง crayfish จะได้ปริมาณไวรัสมากกว่าในกุ้งกุลาดำ (Xie *et al.*, 2005) เพราะตัวกุ้งมีขนาดใหญ่กว่าถึง 1-2 เท่า และแข็งแรงกว่าไม่ตายง่ายจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น แต่ในปัจจุบันในประเทศไทยยังมีการเพาะเลี้ยงน้อยและมีราคาสูง มีอีกวิธีหนึ่งที่แยกไวรัสได้ปริมาณมากคือการใช้ CsCl_2 gradient แต่วิธีนี้ต้องใช้เวลาปั่นนานถึง 48 ชั่วโมง (Huang *et al.*, 2002) ซึ่งในการทดลองนี้ไม่สามารถทำได้เนื่องจากเครื่อง centrifuge เป็นเครื่องรุ่นเก่าใช้ปั่นได้นานสุดครั้งละ 2 ชั่วโมงเท่านั้น

2. อาการของกุ้งกุลาดำหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เมื่อทำการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้ากล้ามเนื้อส่วนหางของกุ้งกุลาดำพบว่า มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ตายภายใน 48 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อไวรัส กุ้งอาจตายเนื่องจากการบาดเจ็บในระหว่างการฉีดเชื้อไม่ได้ตายจากการติดเชื้อไวรัส จึงไม่ได้เก็บเลือดกุ้งพวกนี้ไว้ เก็บเลือดกุ้งที่รับเชื้อไวรัสเมื่อกุ้งมีอาการของโรคตัวแดงดวงขาวตรงกับที่มีการรายงานไว้ (สุปราณี, 2546) คือ มีอาการอ่อนแรง ตัวกุ้งเริ่มเอียง ไม่ว่ายน้ำไปมา อยู่นิ่งๆบริเวณก้นบ่อ

ไม่กินอาหาร ตัวเริ่มแดงและบริเวณเปลือกมีจุดขาวทั่วเปลือก ในเวลาใกล้เคียงกันคือประมาณ 48-72 ชั่วโมง ระยะเวลาตั้งแต่ฉีดไวรัสจนเริ่มมีอาการโรคคือมากกว่า 48 ชั่วโมง กุ้งจะตายหมด ทำการเก็บเลือดกุ้งโดยใช้เข็มเบอร์ 24 แทงตรงช่องขาว่ายน้ำคู่ที่สามและดูดเลือดบริเวณแอ่ง หัวใจกุ้งกุลาดำ 1 ตัวสามารถเจาะเลือดได้ ประมาณ 0.7 ml โดยเลือดที่เจาะได้จากกุ้งเป็นโรคจะ ไม่มีการแข็งตัวของเลือด (clot) เก็บเลือดกุ้งไว้ที่ตู้ - 70 C° กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงไว้เป็น negative control คือกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้ฉีดเชื้อไวรัส ทำการเก็บเลือดกุ้งปกติ เมื่อเก็บเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหมดทุกตัว เลือดกุ้งกุลาดำที่ใช้เป็น negative control เป็นกุ้งปกติที่สุขภาพดีไม่เป็นโรค เมื่อเจาะเลือดจะเกิดการแข็งตัวของเลือดอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงต้องใส่ NTE buffer ลงไปผสมใน อัตราส่วน NTE buffer 1 ส่วน ต่อเลือด 10 ส่วน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ตู้ - 70 C°

3. การทำ SDS-PAGE วิเคราะห์โปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาว

การทำ SDS-PAGE โดยใช้ 12 % polyacrylamide gel วิเคราะห์โปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาว พบโปรตีนทั้งหมด 6 แถบโปรตีน ได้แก่โปรตีนขนาดประมาณ 24, 28, 40, 43, 120 และ 180 kDa ขั้นตอนในการแยกไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ไวรัสปริมาณน้อย พบแถบโปรตีนไวรัส 2 แถบโปรตีนซึ่งตรงกับงานวิจัยอื่น คือ 24 และ 28 kDa โปรตีนขนาด 180 kDa น่าจะเป็นโปรตีนของไวรัสเพราะเป็นโปรตีนที่ไม่พบในกุ้งปกติ และมีงานวิจัยพบโปรตีนไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 187 kDa (Li *et al*, 2006) ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกัน ส่วนโปรตีนขนาด 40, 43 และ 120 kDa เป็นโปรตีนที่ไม่พบในกุ้งปกติและยังไม่มีกรายงานว่าเป็นโปรตีนของไวรัส หรือมีโปรตีนไวรัสขนาดที่ใกล้เคียง (ตารางผนวกที่ ก1, ตารางที่2, ภาพที่1)

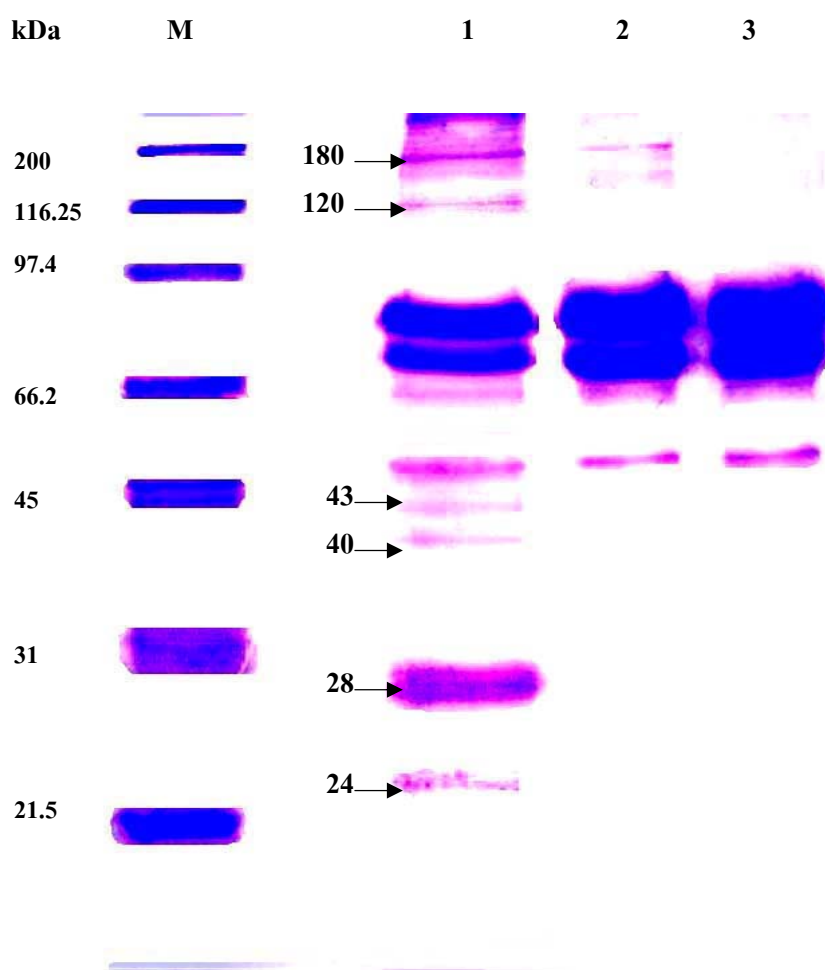
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนครั้งที่ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวและปริมาณโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในแต่ละครั้ง

จำนวนครั้ง ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ	จำนวนกุ้งกุลาดำ	ปริมาณโปรตีน WSSV (μg)		
		เลือดกุ้ง	เหงือกกุ้ง	รวม
1	120	ND	ND	0
2	70	535	235	770
3	180	885	ND	885
				1,655

หมายเหตุ ND; Not Determined

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลแถบโปรตีนของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เตรียมได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ

รายงานโดย	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
ผลงานวิจัยต่างๆ (อ้างอิงตารางผนวกที่ ก1)	15, 19, 22, 24, 26, 28, 31, 39, 53, 124, 187, 281, 292, 466, 664
ผลจากการทดลอง	24, 28, 40, 43, 120, 180
แถบโปรตีนที่ตรงกับงานวิจัย	24, 28



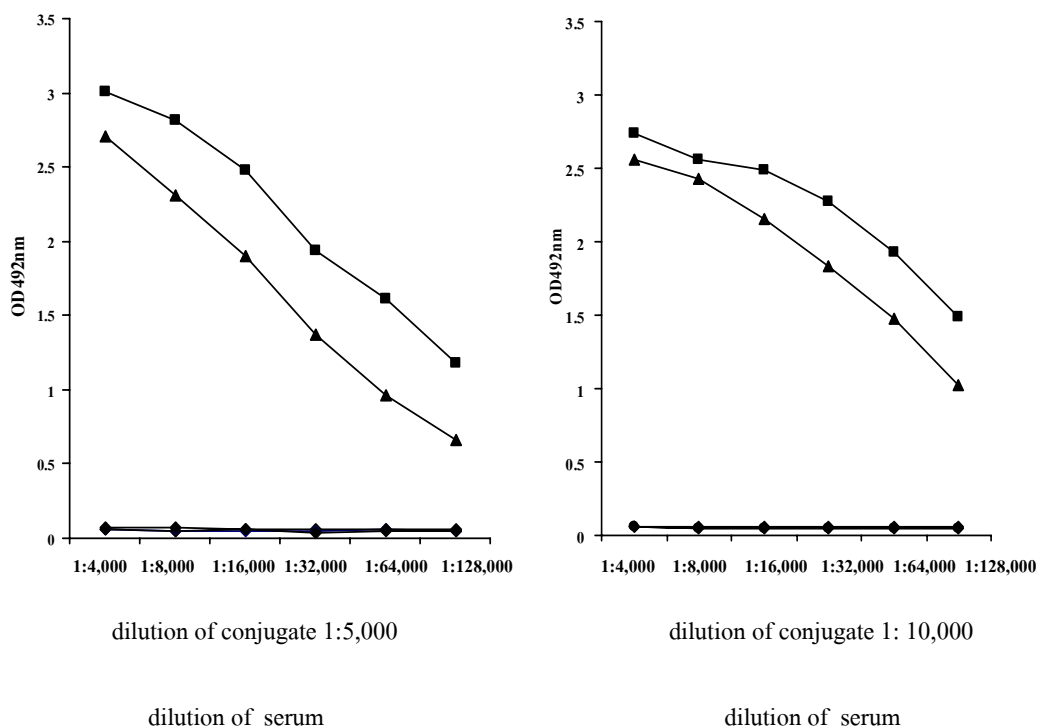
ภาพที่ 1 แสดงแถบโปรตีนของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์และไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์
เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนที่ได้จากเลือดกุ้งกุลาดำปกติ ด้วยวิธี SDS-
PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R250, lane M; protein molecular
weight marker (kDa), lane 1; purified WSSV (10 μ g), lane 2; haemolymph from
WSSV infected shrimp (10 μ g), lane 3; haemolymph from normal shrimp (10 μ g).

4. การหาความเข้มข้นของแอนติเจน (เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเลือดกึ่งปกติ) และ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate ที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA

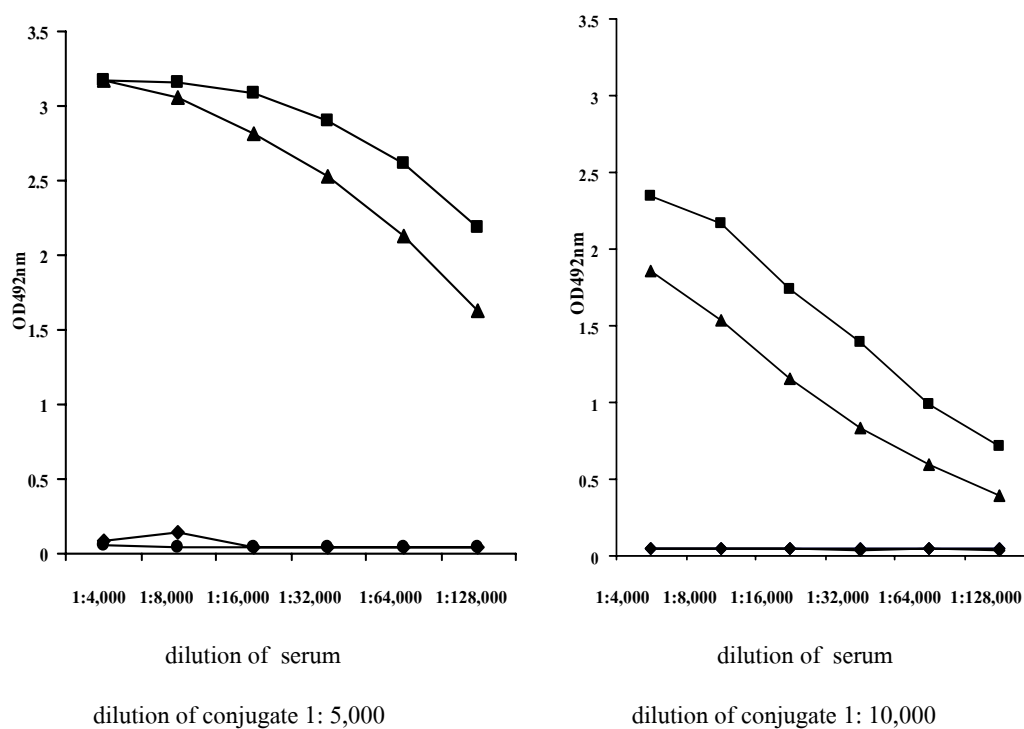
เมื่อหลังจากติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์ในครั้งที่สามแล้วได้ทำการเจาะเลือดหนูเพื่อตรวจดู titer ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect ELISA โดยการหา titer ได้ทดลองหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA พบว่าได้ค่า OD จะสูงเกิน 2 เมื่อมีความเข้มข้นของแอนติบอดีสูง 1:4,000 แต่เมื่อเจือจางลงค่า OD ก็จะลดต่ำลง ความเข้มข้นของแอนติเจนทั้งสองที่ใช้เคลือบ plate ทั้งความเข้มข้น 5 µg/ml และ 2.5 µg/ml ให้ OD ต่างกันประมาณ 0.5 และมีแนวโน้มเลือดกึ่งติดเชื้อกับเลือดกึ่งปกติแยกออกจากกันได้แต่ไม่ชัดเจน ส่วนความเข้มข้นของ conjugate ใช้ได้ทั้ง 1:5,000 และ 1:10,000 เลือกค่าความเจือจางที่ 1:10,000 เป็นค่าที่เหมาะสมเพื่อความประหยัด ส่วนความเข้มข้นของเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสและเลือดกึ่งปกติเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 5 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงไว้ก่อน เพราะในการทดลองต่อไปจะใช้ทดสอบกับแอนติบอดีที่ได้จาก culture fluid ซึ่งความเข้มข้นน้อยกว่าแอนติบอดีจาก serum หนู (ตารางผนวกที่ ก2, ก3 และภาพที่ 2,3)

5. การหา titer ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีอยู่ในซีรัมหนู

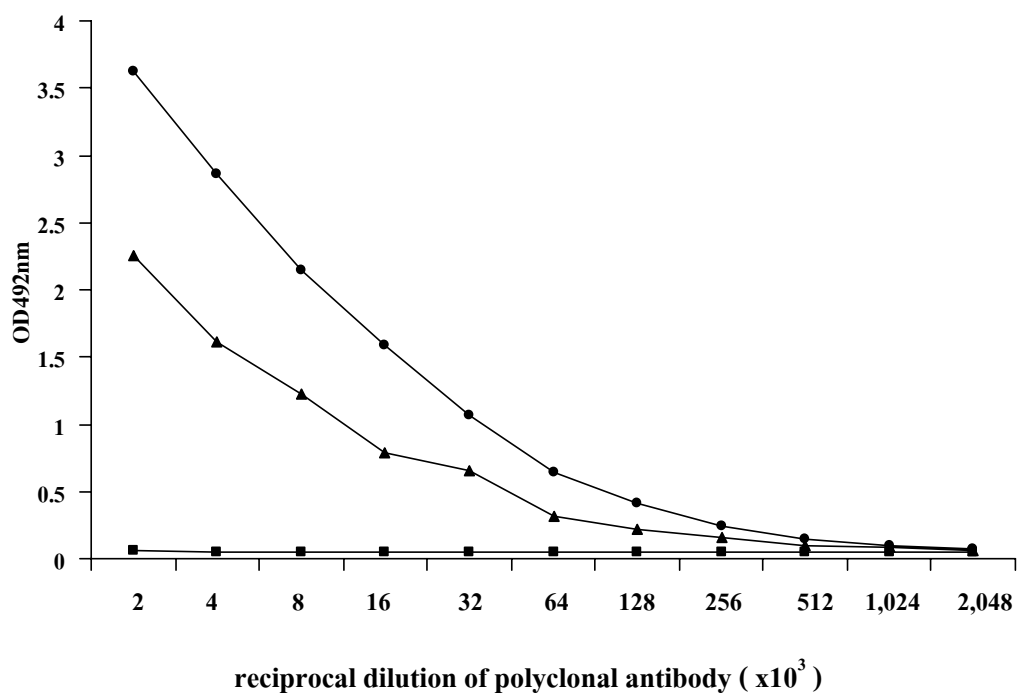
การหา titer แอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีอยู่ในซีรัมหนู เพื่อต้องการทราบความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจแยกเลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสกับเลือดกึ่งกลาดำปกติออกจากกันโดยชัดเจน และเพื่อดูแนวโน้มการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสและใช้เตรียมเป็น positive control แอนติเจนได้แก่เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสและเลือดกึ่งปกติโดยใช้ความเข้มข้น 5 µg/ml และความเข้มข้น goat anti-mouse IgG- HRP conjugate เป็น 1: 10,000 ส่วนแอนติบอดีจะเริ่มเจือจางตั้งแต่ 1:2,000 แบบ two fold จนถึง 1: 2,048,000 พบว่าค่าความเจือจางที่แยกความแตกต่างระหว่างเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสกับเลือดกึ่งปกติ อยู่ในช่วง 1:2,000-1:12,800 (ตารางผนวกที่ ก4, ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA, —■— ; polyclonal antibody (immunized) react with haemolymph from WSSV infected shrimp antigen (5 µg/ml), —▲— ; polyclonal antibody (immunized) react with haemolymph from WSSV infected shrimp antigen (2.5 µg/ml), —◆— ; polyclonal antibody (preimmunized) react with haemolymph from WSSV infected shrimp antigen (5 µg/ml), —◆— ; polyclonal antibody (preimmunized) react with haemolymph from WSSV infected shrimp antigen (2.5 µg/ml), —◇—; blank.



ภาพที่ 3 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกุ้งปกติและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA, —■—; polyclonal antibody (immunized) react with haemolymph from normal shrimp antigen (5 µg/ml), —▲—; polyclonal antibody (immunized) react with haemolymph from normal shrimp antigen (2.5 µg/ml), —●—; polyclonal antibody (preimmunized) react with haemolymph from normal shrimp antigen (5 µg/ml), —◆—; polyclonal antibody (preimmunized) react with haemolymph from normal shrimp antigen (2.5 µg/ml), —◇—; blank.



ภาพที่ 4 กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration เพื่อหาค่าความ
 เจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถแยกความแตกต่าง
 ระหว่าง เลือดติดเชื้อไวรัสกับเลือดกุ้งปกติ, —●— ; polyclonal antibody (immunized)
 react with haemolymph from WSSV infected shrimp antigen ($5 \mu\text{g/ml}$), —▲— ;
 polyclonal antibody (immunized) react with haemolymph from normal shrimp
 antigen ($5 \mu\text{g/ml}$) , —■— ; blank.

6. การเชื่อมเซลล์

การทดลองเชื่อมเซลล์ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งแรกการเชื่อมเซลล์ไม่พบการเกิดเซลล์ไฮบริโดมา ส่วนการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 2 ได้เซลล์ไฮบริโดมา 57 หลุม จาก 420 หลุม และเซลล์ไฮบริโดมา 57 หลุม ตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี indirect ELISA และวัด OD ที่ 492 nm พบมีเซลล์ไฮบริโดมา 4 หลุม ที่สร้างแอนติบอดีต่อไวรัส คิดเป็น 7 เปอร์เซ็นต์ จากหลุมไฮบริโดมาทั้งหมด ได้แก่ หลุมไฮบริโดมารหัส 1B2, 4F9, 5E7, 6G11 เมื่อเลี้ยงเพื่อขยายจำนวนเซลล์ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ สังเกตว่าเซลล์ไฮบริโดมา 4 ชนิด ไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวน ไม่สร้างแอนติบอดีและเซลล์เริ่มตายไป เป็นผลจากเซลล์ได้รับปริมาณ CO₂ สูงเกินไป เกิดจากความผิดปกติของตู้ incubator เมื่อเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 ได้เซลล์ไฮบริโดมา 183 หลุม จากทั้งหมด 300 หลุมและทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA และวัด OD ที่ 492 nm พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาหลุมที่ผลิตแอนติบอดี 32 หลุม คิดเป็น 17 เปอร์เซ็นต์ จากไฮบริโดมาทั้งหมด และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีค่า OD ระหว่างเลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสกับเลือดกึ่งกลาดำปกติต่างกันมากที่สุด คัดเลือกได้เซลล์ไฮบริโดมา 4 หลุม ได้แก่ไฮบริโดมารหัส 1B5, 3G3, 4D11, 5G5 นำไปทำ limiting dilution พบว่าโคลน 5G5 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสได้จำเพาะกว่า 3 โคลน ต่อมาโคลน 1B5 และ 4D11ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีน้อยลงจึงศึกษาเฉพาะโคลน 5G5 และ 3G3 (ตารางที่ 3,4 และ 5 , ภาพที่ 5, ตารางผนวกที่ ข1 และ ข2)

ตารางที่ 3 แสดงผลการเชื่อมเซลล์ (cell fusion)

การเชื่อมเซลล์ ครั้งที่	อัตราส่วน hybridoma: spleen cell	จำนวนหลุมที่เกิดเซลล์ไฮบริโดมา ต่อจำนวนหลุมทั้งหมด	จำนวนหลุมที่มีการสร้าง แอนติบอดีต่อ WSSV	เปอร์เซ็นต์การสร้าง แอนติบอดี ต่อ WSSV ในหนึ่งการเชื่อมเซลล์
1	1:2	0 / 0	0	0
2	1:1	57/420	4	7
3	1:1	183/300	32	17

ตารางที่ 4 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากการเชื่อม
เซลล์ครั้งที่ 2

Code of hybridoma	1 st screening			2 nd screening		
	HAE-WSSV	HAE-N	OD difference	HAE-WSSV	HAE-N	OD difference
1B2	0.741	0.402	0.339	0.044	0.042	0.002
4F9	1.333	0.694	0.639	0.041	0.040	0.001
5E7	1.181	0.532	0.649	0.044	0.042	0.002
6G11	0.481	0.290	0.191	0.045	0.042	0.003
PC	2.920	2.799	0.121	2.428	2.207	0.221
NC	0.058	0.058	0	0.052	0.054	- 0.002
Blank	0.054	0.049	0.005	0.032	0.030	0.002

หมายเหตุ HAE-WSSV ; haemolymph from WSSV infected shrimp, HAE-N ; haemolymph from normal shrimp, PC ; positive control (polyclonal antibody), NC ; negative control (myeloma culture fluid), cutoff = $\bar{X} + 2SD = 0.055 + 0.003 = 0.058$

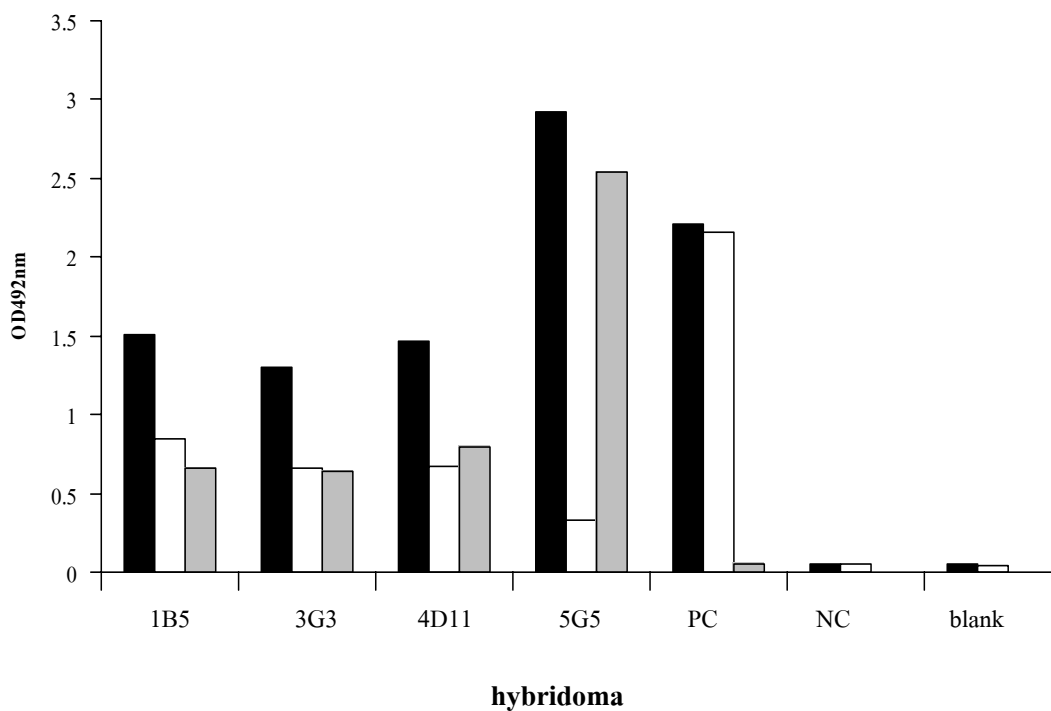
ตารางที่ 5 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากการ ทำ indirect ELISA ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3

No.	Code of hybridoma	HAE- WSSV	HAE – N	OD difference
1	1B5*	1.505	0.847	0.658
2	1B9	0.574	0.314	0.260
3	1G3	0.828	0.409	0.419
4	1G9	0.692	0.326	0.366
5	2B3	0.737	0.429	0.308
6	2B9	0.617	0.283	0.334
7	2E 6	0.616	0.498	0.118
8	2F5	0.951	0.702	0.249
9	2F7	0.692	0.315	0.377
10	2F8	0.629	0.308	0.321
11	3C8	1.181	0.873	0.308
12	3C11	0.853	0.340	0.513
13	3D2	0.334	0.193	0.141
14	3E7	0.764	0.327	0.437
15	3F3	0.810	0.298	0.512
16	3G3*	1.301	0.656	0.645
17	3G6	0.814	0.333	0.481
18	4B5	0.988	0.458	0.530
19	4B8	0.979	0.425	0.554
20	4C4	0.988	0.458	0.530
21	4C5	0.982	0.470	0.512
22	4C10	0.718	0.353	0.365
23	4D2	0.251	0.082	0.169
24	4D11*	1.469	0.671	0.798

ตารางที่ 5 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	HAE- WSSV	HAE – N	OD difference
25	4F6	0.251	0.082	0.169
26	4F9	0.610	0.140	0.470
27	4G3	0.612	0.259	0.353
28	4G5	0.643	0.310	0.333
29	5C11	0.410	0.189	0.221
30	5D3	0.544	0.389	0.155
31	5D9	1.128	0.699	0.429
32	5G5*	2.924	0.328	2.535
	PC	2.207	2.153	0.054
	NC	0.053	0.051	0.002
	Blank	0.047	0.042	0.005

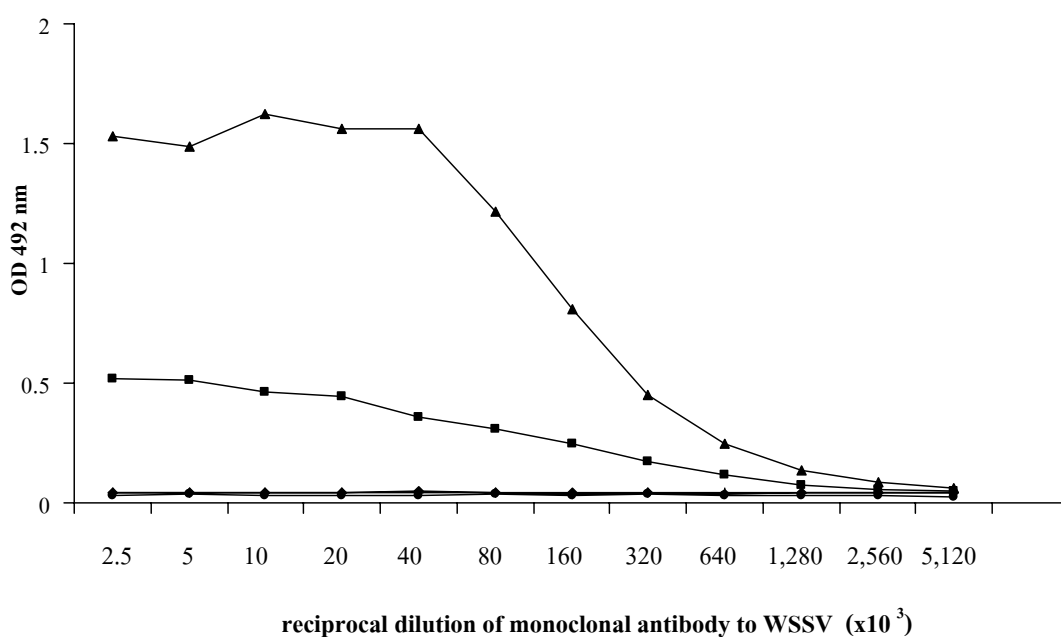
หมายเหตุ * เป็นไฮบริโดมาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 ให้ค่า OD ที่ 492 nm สูงกว่าไฮบริโดมาเซลล์รหัสอื่นและเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไป, HAE-WSSV ; haemolymph from WSSV infected shrimp, HAE-N; haemolymph from normal shrimp, PC; positive control (polyclonal antibody), NC; negative control (myeloma culture fluid), cutoff = $\bar{X} + 2SD = 0.052 + 0.001 = 0.053$



ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ indirect ELISA เพื่อทดสอบความจำเพาะของ แอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ผลิตได้จากไฮบริโดมารหัส 1B5, 3G3, 4D11, 5G5 หลังการทำ limiting dilution, ■ ; haemolymph from WSSV infected shrimp, □ ; haemolymph from normal shrimp, ▨ ; OD difference, positive control (polyclonal antibody), negative control (myeloma culture fluid).

7. การผลิตเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีในช่องท้องหนู

การทดลองนี้ได้ฉีดเซลล์ไฮบริโดมารหัส 1B5, 3G3, 4D11, 5G5 เข้าช่องท้องหนูเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของแต่ละโคลน จากการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งผลที่ได้สามารถเพิ่มความเข้มข้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 2 โคลน คือรหัส 5G5 ที่มีความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณที่สูงมากได้ระดับไตเตอร์ 1:1,280,000 และอีกโคลนคือ รหัส 3G3 แต่มีความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณที่ไม่สูงมากเท่ากับโคลนที่ 5G5 โดยมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1: 640,000 ส่วนไฮบริโดมารหัส 1B5 และ 4D11 ไม่พบการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี ใน ascitic fluid ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี รหัส 5G5 ไปทำการศึกษาต่อไป (ภาพที่ 6, ตารางผนวกที่ ก5)



ภาพที่ 6 กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ indirect ELISA เพื่อหา titer ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จาก ascitic fluid ของหนูที่ฉีดเซลล์ไฮบริโดมา, —▲—; hybridoma code 1B5, —■—; hybridoma code 3G3, —◆—; hybridoma code 4D11, —▲—; hybridoma code 5G5, —●—; negative control (myeloma culture fluid).

8. การตรวจหาชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotype) โดยใช้ **Mouse MonoAb ID/SP Kit** และวิธี **indirect ELISA**

การตรวจหา isotype เป็นการตรวจดูชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยผลตรวจโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนรหัส 3G3 พบว่าเป็น IgM โดยมี light chain เป็นชนิด kappa ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาโคลนรหัส 5G5 พบว่าเป็น IgG2a โดยมี light chain เป็นชนิด kappa (ตารางที่ 6) การทดลองนี้ได้เลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่เป็น IgG ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิได้ง่ายกว่า IgM เพราะมีโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าและมี affinity ในการจับกับ staphylococcus protein A ได้ดีกว่า IgM ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ (อรวดี, 2539)

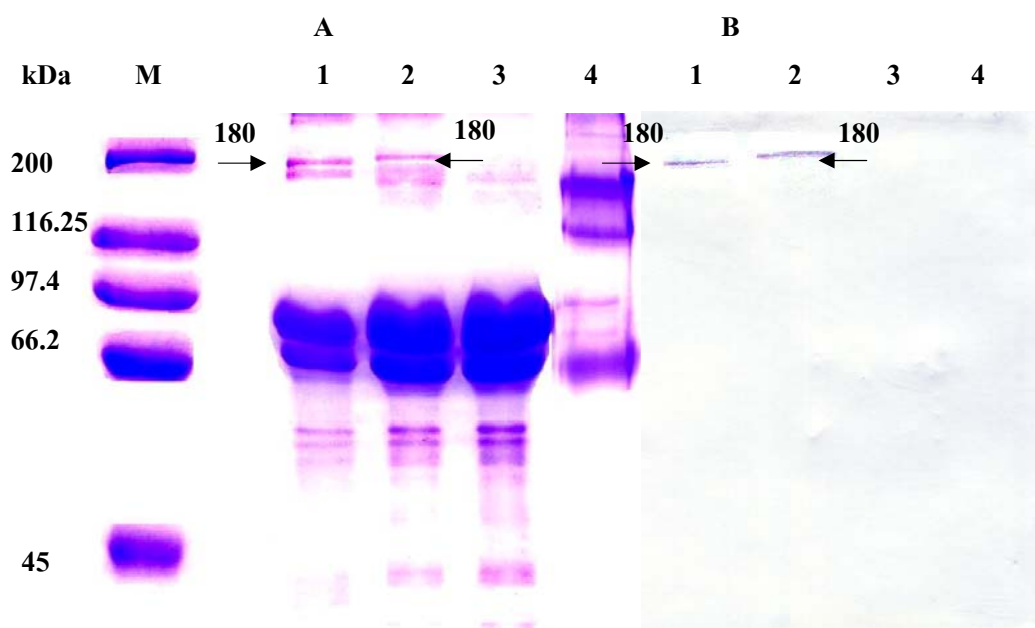
ตารางที่ 6 แสดงค่า OD ที่ 405 nm ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมารหัส 3G3 และ 5G5 ในการหา isotype โดยใช้ Mouse MonoAb ID/SP Kit

code of hybridoma cell	OD 405 nm									
	immunoglobulin isotype									
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	kappa	lamda	normal Ig	blank
3G3	0.073	0.069	0.064	0.068	0.067	0.326	0.711	0.069	0.071	0.065
5G5	0.066	0.282	0.065	0.064	0.068	0.066	0.786	0.067	0.066	0.064

9. การศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี

Western blot

จากการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จากเซลล์โคลน 5G5 ซึ่งในการศึกษาจะทำการเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ของสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์ เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เลือดกึ่งปกติและสารละลายไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์ กับแถบโปรตีนที่ได้จากการทำ Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลขนาด 180 kDa ที่พบทั้งในสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์และเลือดกึ่งกุดาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพียงแถบเดียว (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 มีความจำเพาะกับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาด 180 kDa โปรตีนไวรัสที่ได้ขนาดใกล้เคียงกับรายงานวิจัยที่มีการศึกษาโปรตีนไวรัสขนาด 187 kDa ซึ่งพบเป็นส่วน envelope (Li, 2006)



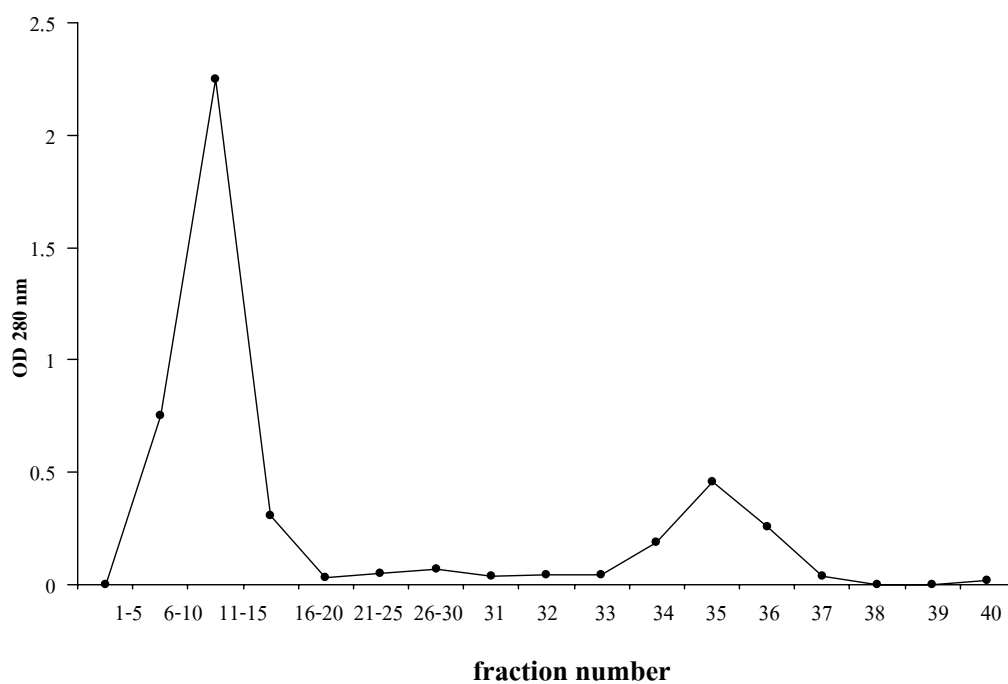
ภาพที่ 7 แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Western blot (A) SDS-PAGE. Lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; purified WSSV, lane 2; haemolymph from WSSV infected shrimp, lane 3; haemolymph from normal shrimp, lane 4; purified Yellow head virus. (B) Western blot. Lane 1; purified WSSV, lane 2; haemolymph from WSSV infected shrimp, lane 3; haemolymph from normal shrimp, lane 4; purified Yellow head virus.

10. การทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ HiTrapTM Protein A

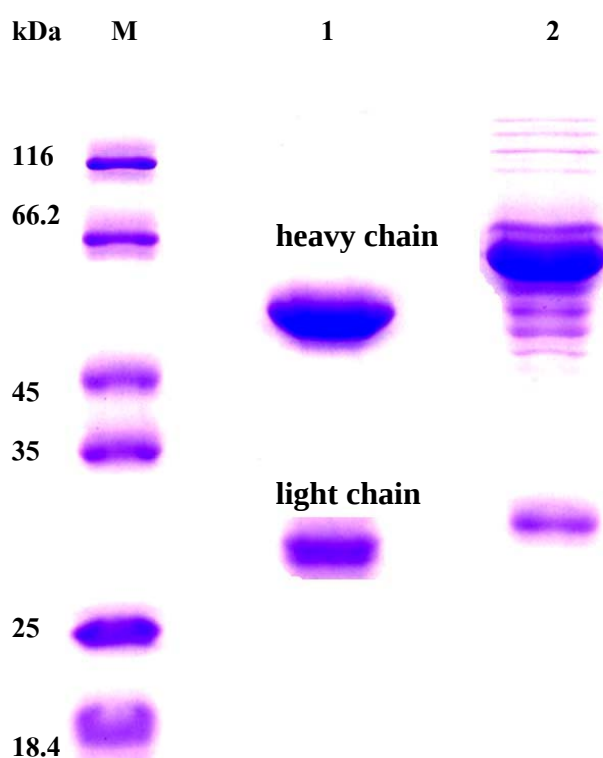
เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี รหัส 5G5 ที่อยู่ในรูป ascitic fluid มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ HiTrapTM Protein A ทำการชะสารละลายด้วย elution buffer ออกจาก column แล้วพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกชะอยู่ในหลอดที่ 34, 35 และ 36 ซึ่งคำนวณค่าความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 0.129 $\mu\text{g/ml}$, 0.316 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.179 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ หลังจากที่น่าทั้ง 3 หลอดมารวมกัน แล้วตรวจดูด้วยการทำ SDS-PAGE พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์ สังเกตได้จากการเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่ได้จาก ascitic fluid แถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แยกได้ จะต้องม 2 แถบด้วยกัน คือส่วน heavy chain กับ light chain (ตารางที่ 7, ภาพที่ 8, ภาพที่ 9)

ตารางที่ 7 แสดงค่า OD ที่ 280 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (IgG) ใน
ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ HiTrapTM
Protein A (Amersham Pharmacia Biotech)

fraction of protein	OD 280 nm	concentration of protein solution (IgG) (mg/ml)
1-5	0.750	-
6-10	2.249	-
11-15	0.308	-
16-20	0.029	-
21-25	0.053	-
26-30	0.067	-
31	0.035	-
32	0.045	-
33	0.046	-
34*	0.187	0.129
35 *	0.458	0.316
36*	0.260	0.179
37	0.036	-
38	0.003	-
39	0.003	-
40	0.016	-



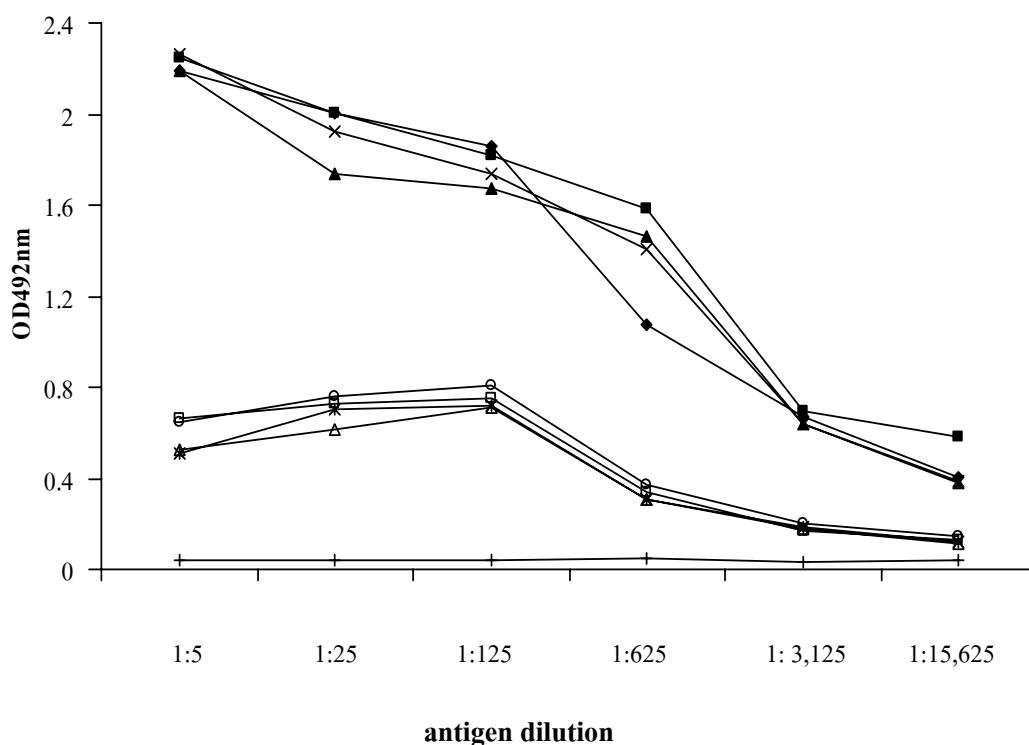
ภาพที่ 8 กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 280 nm ที่ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ HiTrapTM Protein A



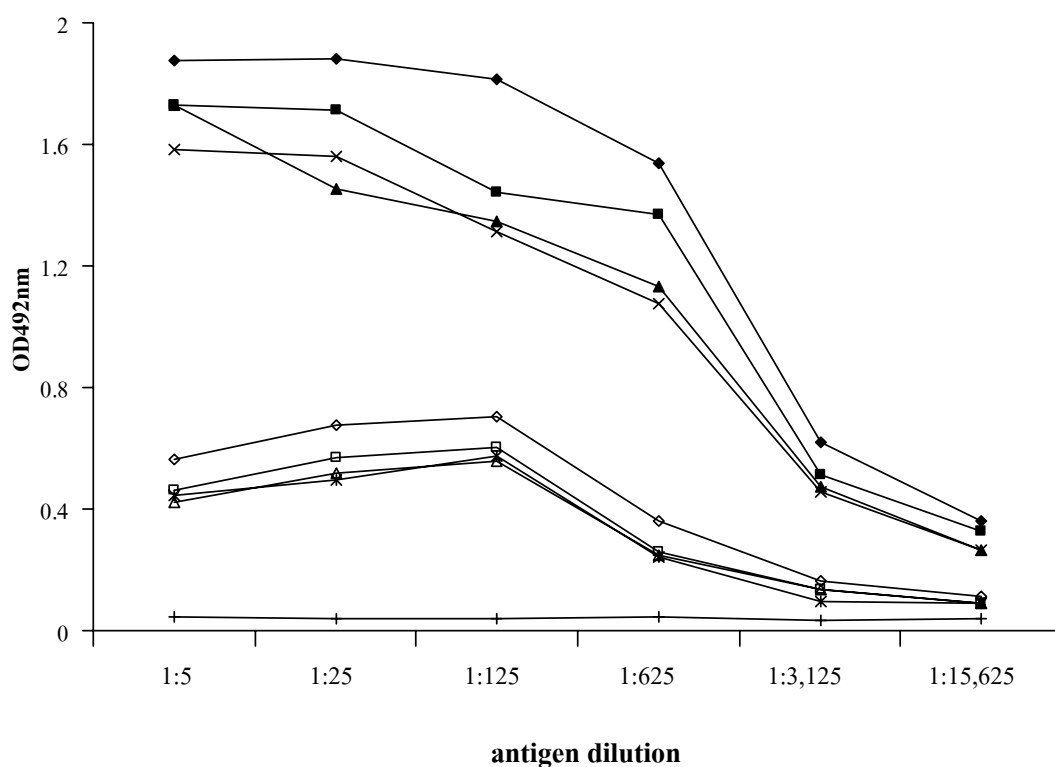
ภาพที่ 9 แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ทำปฏิกิริยาเทียบกับ ascitic fluid ที่ยังไม่ผ่านการทำปฏิกิริยา (ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 10 μg) ด้วยวิธี SDS-PAGE, Lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; purified IgG (clone 5G5), lane 2; ascitic fluid.

11. การทดลองใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี indirect ELISA

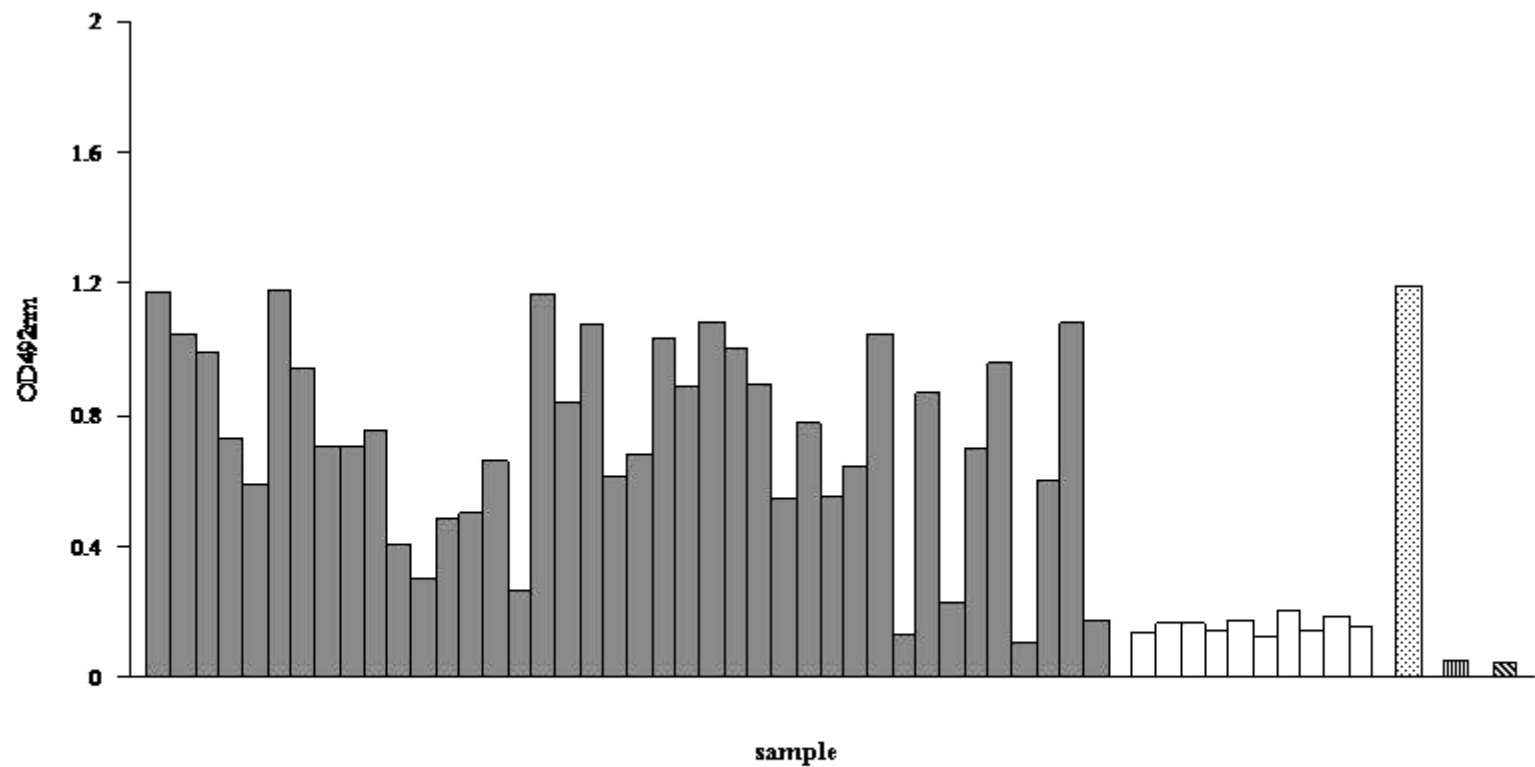
ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวจากตัวอย่างกึ่งต้องทำ chequerboard titration เลือดกึ่งกลาคำที่ติดเชื้อไวรัสและเลือดกึ่งปกติ (แอนติเจน) กับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ที่ได้จาก culture fluid และ ascitic fluid โดยวิธี indirect ELISA ก่อน ซึ่งจากผลที่ได้ถ้าใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี จาก culture fluid ค่า dilution ที่เหมาะสม คือ 1: 32 และแอนติเจนที่ใช้ dilution 1:25 ได้ OD ต่อเลือดติดเชื้อ 1.734 และ OD 0.616 ต่อเลือดกึ่งปกติ ผลต่างเป็น 1.118 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ที่ได้จาก ascitic fluid ค่า dilution ที่เหมาะสม คือ 1: 6,400 และแอนติเจนที่ใช้ dilution 1:5 ได้ OD 1.874 ต่อเลือดติดเชื้อและ OD 0.564 ต่อเลือดกึ่งปกติ ผลต่างเป็น 1.310 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้งสองแหล่งสามารถนำมาใช้ตรวจหาไวรัสได้เป็นอย่างดี (ตารางผนวกที่ ก6, ภาพที่ 10, ภาพที่ 11) เมื่อทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างกึ่งโดยวิธี indirect ELISA ตรวจพบไวรัสทั้งหมด 37 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 40 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.5 เปอร์เซ็นต์ เห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจไวรัสได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 12, ตารางที่ 8 และตารางผนวกที่ ค1) และในการทดลองหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 พบว่าเลือดกึ่งติดเชื้อที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 สามารถตรวจพบคือ 0.195 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 13)



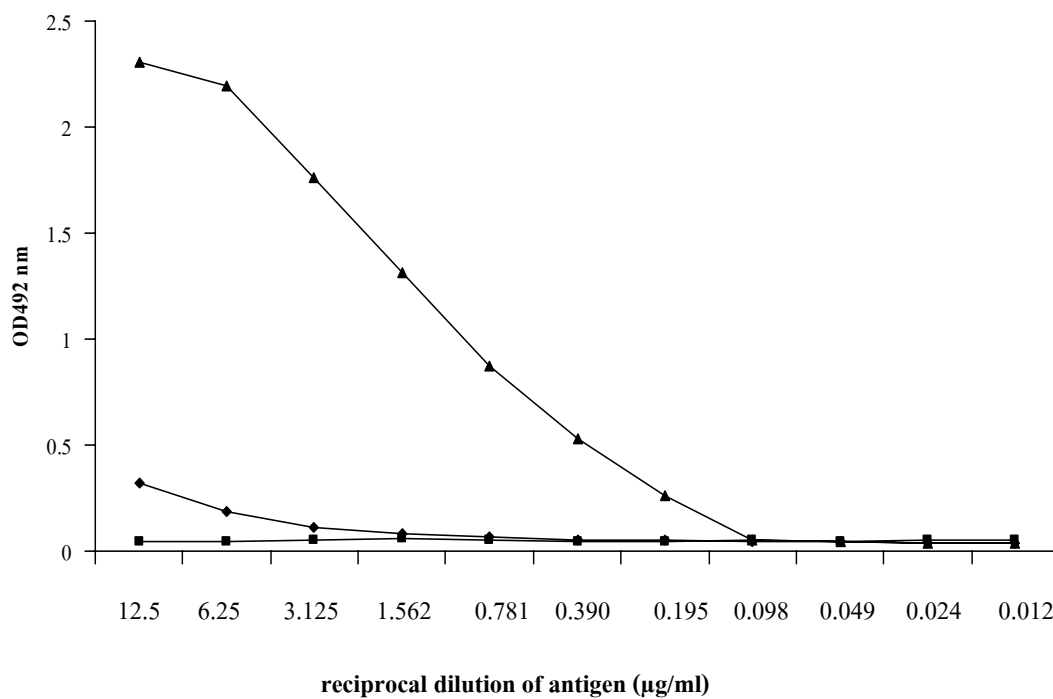
ภาพที่ 10 กราฟแสดงผล chequerboard titration เลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสและเลือด
 กุ้งปกติกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ที่ได้จาก culture fluid, ◆—; monoclonal
 antibody (culture fluid 1:8) react with haemolymph form WSSV infected shrimp
 antigen, ■—; monoclonal antibody (culture fluid 1:16) react with haemolymph
 form WSSV infected shrimp antigen, ▲—; monoclonal antibody (culture fluid
 1:32) react with haemolymph form WSSV infected shrimp antigen, ✕—;
 monoclonal antibody (culture fluid 1:64) react with haemolymph form WSSV
 infected shrimp antigen, ◇—; monoclonal antibody (culture fluid 1:8) react
 with haemolymph form normal shrimp antigen, □—; monoclonal antibody
 (culture fluid 1:16) react with haemolymph form normal shrimp antigen, △—;
 monoclonal antibody (culture fluid 1:32) react with haemolymph form normal
 shrimp antigen, ✱—; monoclonal antibody (culture fluid 1:64) react with
 haemolymph form normal shrimp antigen, +—; blank.



ภาพที่ 11 กราฟแสดงผล chequerboard titration เลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสและเลือด
 กุ้งปกติกับโมโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ที่ได้จาก ascitic fluid, —◆—; monoclonal
 antibody (ascitic fluid 1:6,400) react with haemolymph form WSSV infected
 shrimp antigen, —■—; monoclonal antibody (ascitic fluid 1:32,000) react with
 haemolymph form WSSV infected shrimp antigen, —▲—; monoclonal antibody
 (ascitic fluid 1:160,000) react with haemolymph form WSSV infected shrimp
 antigen, —×—; monoclonal antibody (ascitic fluid 1:800,000) react with
 haemolymph form WSSV infected shrimp antigen, —◇—; monoclonal antibody
 (ascitic fluid 1:6,400) react with haemolymph form normal shrimp antigen, —□—;
 monoclonal antibody (ascitic fluid 1:32,000) react with haemolymph form normal
 shrimp antigen, —△—; monoclonal antibody (ascitic fluid 1:160,000) react with
 haemolymph form normal shrimp antigen, —✱—; monoclonal antibody (ascitic
 fluid 1:800,000) react with haemolymph form normal shrimp antigen, —+—;
 blank.



ภาพที่ 12 การทดสอบตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างกุ้งโดยวิธี indirect ELISA, ■; WSSV infected shrimp (40 sample)
□ ; normal shrimp (10 sample), ▨ ; positive control (polyclonal antibody), ▤ ; negative control (myeloma culture fluid),
▧ ; blank, cutoff = $\bar{X} + 2SD = 0.159 + 0.046 = 0.205$



ภาพที่ 13 กราฟแสดงผล sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจ
 ไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยวิธี indirect ELISA, —▲— ; haemolymph
 from WSSV infected shrimp, —◆— ; haemolymph from normal shrimp, —■— ;
 blank.

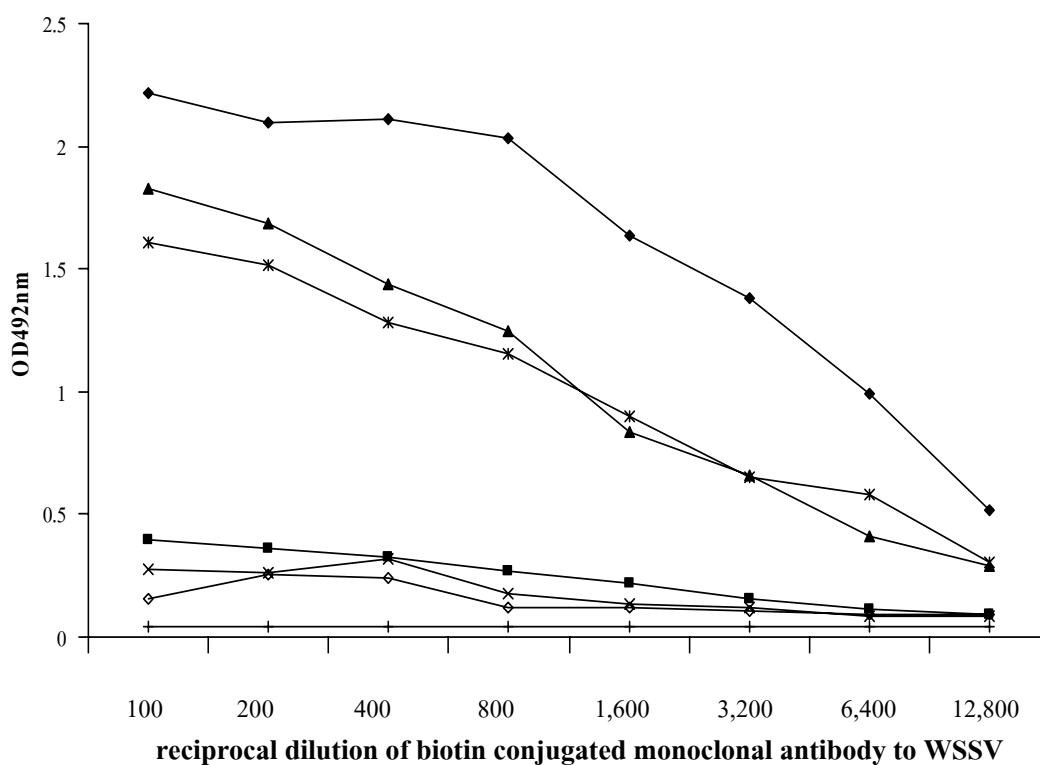
12. การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-DAS ELISA (biotin streptavidin double sandwich antibody ELISA) โดยใช้ biotin conjugated monoclonal antibody

ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวจากตัวอย่างกึ่งต้องรู้ความเข้มข้นของ biotin conjugated monoclonal antibody ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว dilution ของแอนติเจนที่จะใช้ และ dilution ของ purified immunoglobulin 5G5 สำหรับ coat plate โดยวิธี indirect ELISA

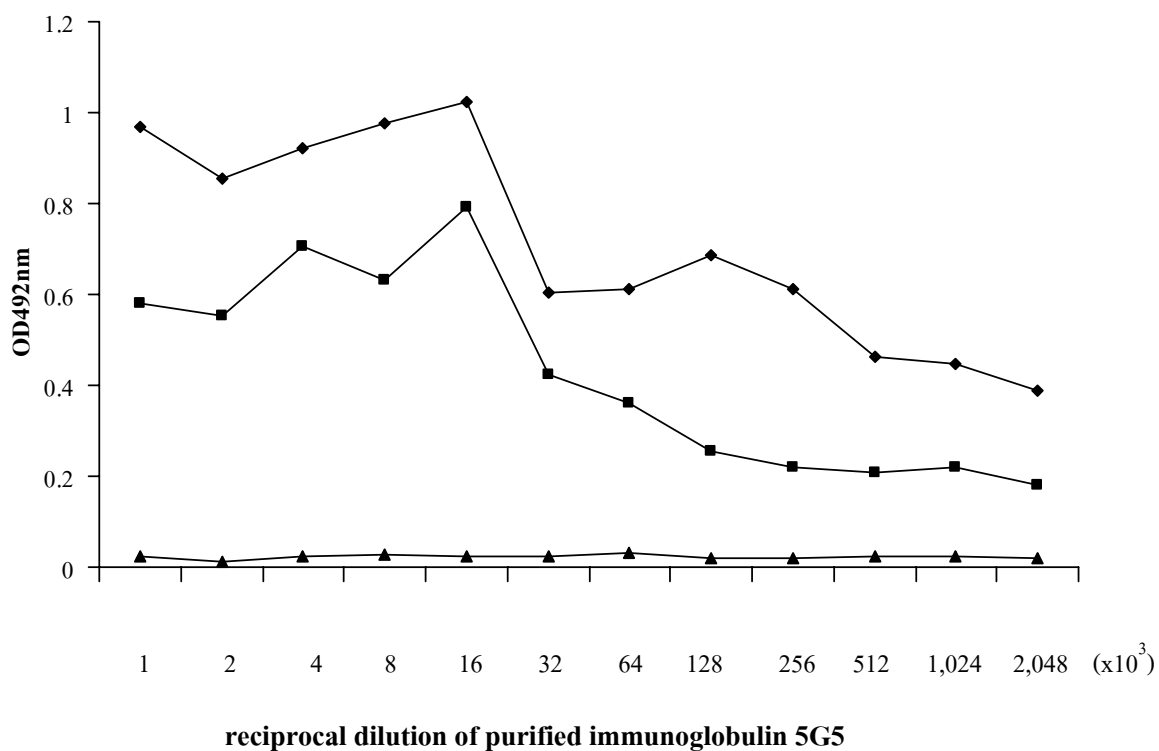
ค่า dilution ของ biotin conjugate monoclonal antibody ที่เหมาะสม คือ 1:100 ดูจากค่า OD ที่ 492 nm ของการ coat ด้วยแอนติเจนเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามความเข้มข้น คือ 20 µg/ml, 10 µg/ml และ 5 µg/ml ค่า OD ที่ได้จะมีค่าสูงอยู่ในช่วง 2.215-1.605 แอนติเจนที่เป็นเลือดกึ่งปกติ จะมีค่า OD ที่ต่ำ อยู่ในช่วง 0.398-0.155 (ภาพที่ 14, ตารางผนวกที่ ก8)

ค่า dilution ของ purified immunoglobulin 5G5 ที่เหมาะสม คืออยู่ในช่วง 1: 12,800 ถึง 1: 256,000 ค่า OD ที่ 492nm ต่อเลือดติดเชื้อไวรัสได้ OD 0.685-0.610 และต่อเลือดกึ่งปกติ ได้ OD 0.256-0.220 ค่า OD ที่ได้จากการทดลองไม่สูงมากนักแต่สามารถที่จะใช้ตรวจแยกกึ่งที่ติดเชื่อกับกึ่งปกติได้ ส่วน dilution ของแอนติเจนในครั้งแรกได้ทดลองที่ 1: 10 พบว่าได้ผลดีจึงได้นำมาใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 15 และตารางผนวกที่ ก9)

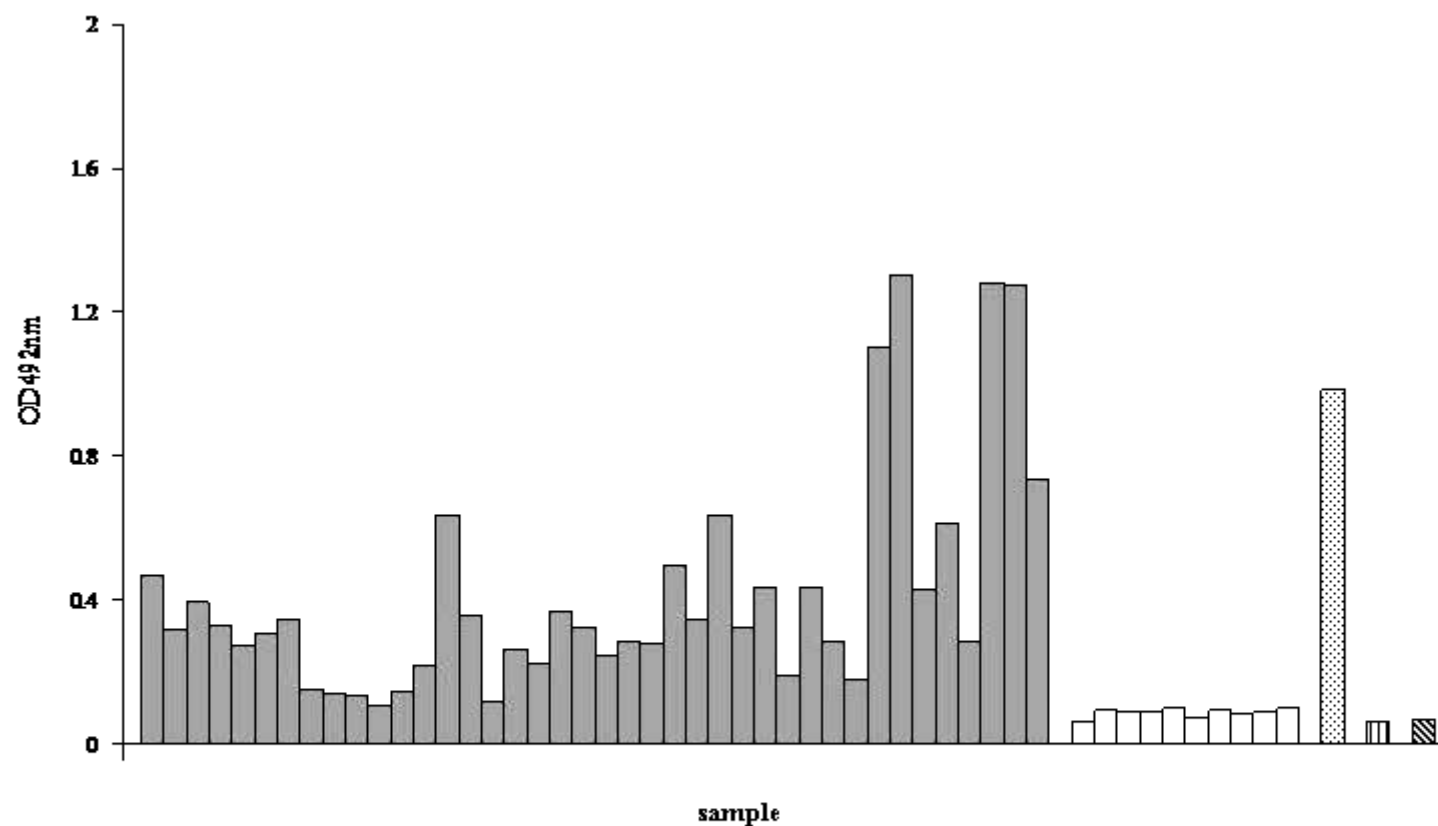
ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-DAS ELISA โดยใช้ biotin conjugated monoclonal antibody เจือจาง 1:100, purified immunoglobulin 5G5 เจือจาง 1: 12,800 และแอนติเจนเจือจาง 1: 10 สามารถตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวจากตัวอย่างกึ่งได้ทั้งหมด 35 ตัวอย่างจาก 40 ตัวอย่าง คิดเป็น 87.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตรวจได้พบน้อยกว่าวิธี indirect ELISA (ภาพที่ 16, ตารางที่ 8 และตารางผนวกที่ ก2) ในการทดลองหา sensitivity ของโมโคลนอลแอนติบอดี 5G5 พบว่าเลือดกึ่งติดเชื้อที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่โมโคลนอลแอนติบอดี 5G5 สามารถตรวจพบคือ 1.562 µg/ml (ภาพที่ 17)



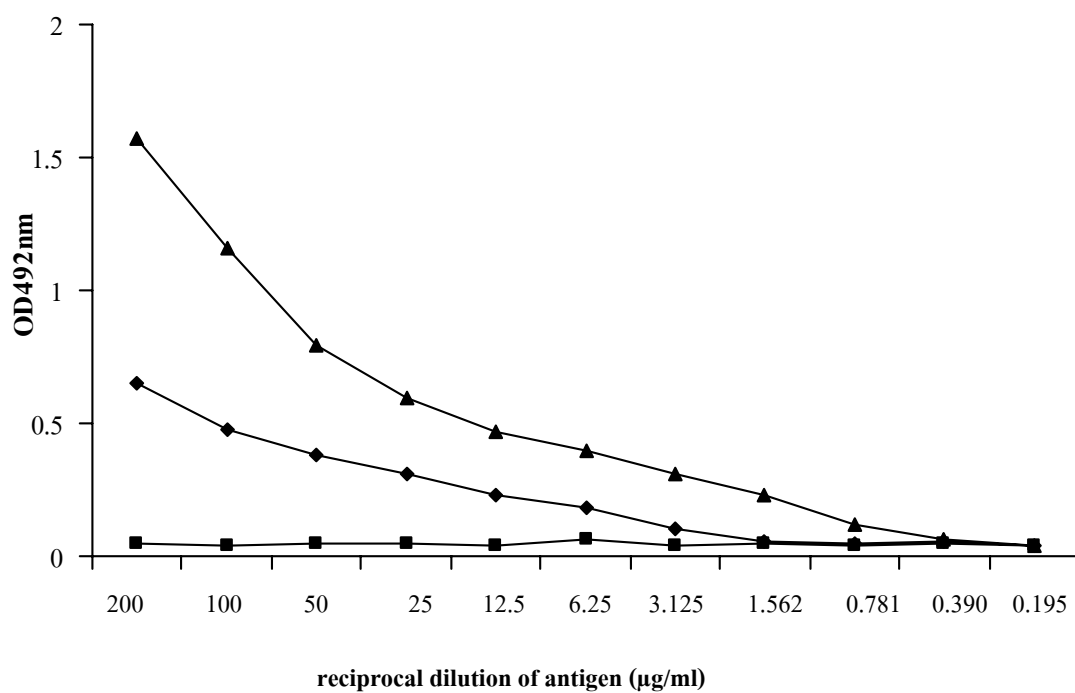
ภาพที่ 14 กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration ระหว่าง แอนติเจนกับ biotin conjugated monoclonal antibody ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว , ◆—; haemolymph from WSSV infected shrimp concentration 20 µg/ml, ▲—; haemolymph from WSSV infected shrimp concentration 10 µg/ml, ✕—; haemolymph from WSSV infected shrimp concentration 5 µg/ml, ■—; haemolymph from normal shrimp concentration 20 µg/ml, ✕— = haemolymph from normal shrimp concentration 10 µg/ml, ◇— = haemolymph from normal shrimp concentration 5 µg/ml +— = blank.



ภาพที่ 15 กราฟเส้นแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration ระหว่าง
 แอนติเจนกับ purified immunoglobulin 5G5 โดยวิธี BS - DAS ELISA, —◆— ;
 haemolymph from WSSV infected shrimp, —■— ; haemolymph from normal
 shrimp, —▲— ; blank.



ภาพที่16 การทดสอบตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอย่างกุ้งโดยวิธี BS-DAS ELISA, ■; WSSV infected shrimp (40 sample), □; normal shrimp (10 sample), ▨ ; positive control (polyclonal antibody), ▤ ; negative control (myeloma culture fluid), ▩; blank, cutoff = $\bar{X} + 2SD = 0.087 + 0.066 = 0.153$



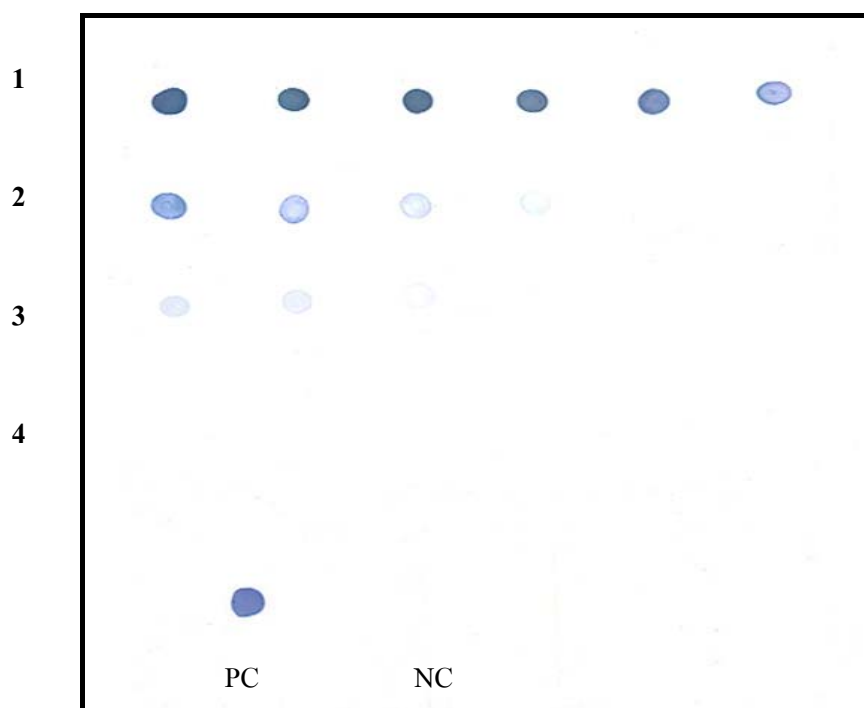
ภาพที่ 17 กราฟแสดงผล sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจ

ไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยวิธี BS-DAS ELISA, ▲ ; haemolymph from WSSV infected shrimp, ◆ ; haemolymph from normal shrimp, ■ ; blank

13. การทดลองใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี dot ELISA

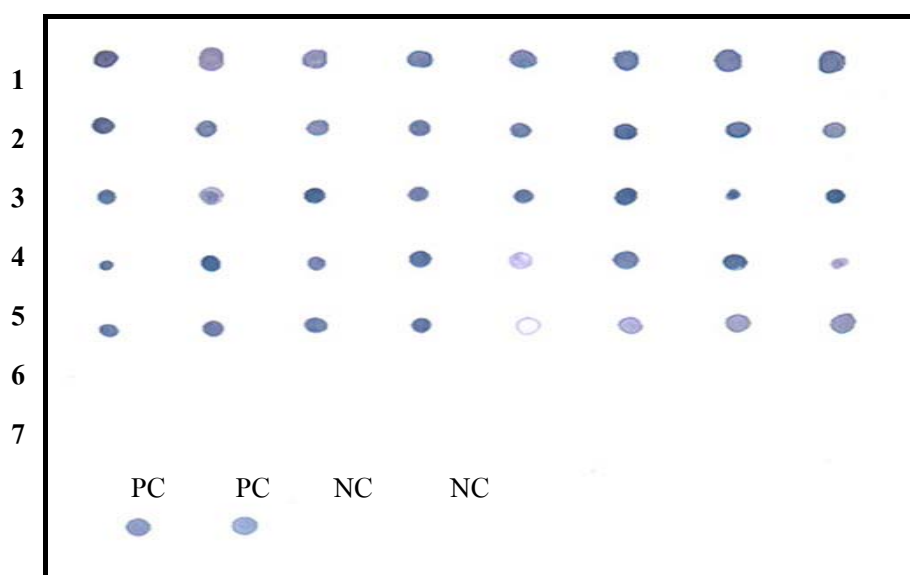
เมื่อทำการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวต้องทราบ dilution ของเลือดติดเชื้อไวรัสกับเลือดปกติที่เหมาะสม ซึ่ง dilution ที่ต่ำกว่านั้น จะเกิด non specific ขึ้นที่เลือดกึ่งปกติเล็กน้อย ตั้งแต่ dilution 1:25-1:100 อาจเป็นผลรบกวนในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อป้องกันการรบกวนของ non specific เมื่อทำการตรวจตัวอย่างกึ่ง dilution ที่เหมาะสมควรเป็น 1: 400 (ภาพที่ 18)

จากการทดลองตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกึ่งที่ติดเชื้อทั้งหมด 40 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบไวรัสได้ทั้ง 40 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผลของเลือดกึ่งปกติ ตัวอย่างที่ตรวจพบแล้วมีการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ในปริมาณน้อย มี 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 29, 32 และ 37 ซึ่งคาดว่าแอนติเจนของทั้ง 3 ตัวอย่าง มีอยู่ในปริมาณที่น้อย (ภาพที่ 19) การทดสอบดู sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 สามารถตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในเลือดกึ่งที่ติดเชื้อ ความเข้มข้นของไวรัสที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 50 µg/ml (ภาพที่ 20)



แอนติเจนเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (dilution)					
1. 1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
2. 1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:12,800	1:25,000	1:51,200
แอนติเจนเลือดกึ่งปกติ (dilution)					
3. 1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
4. 1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:12,800	1:25,000	1:51,200
positive control		negative control			

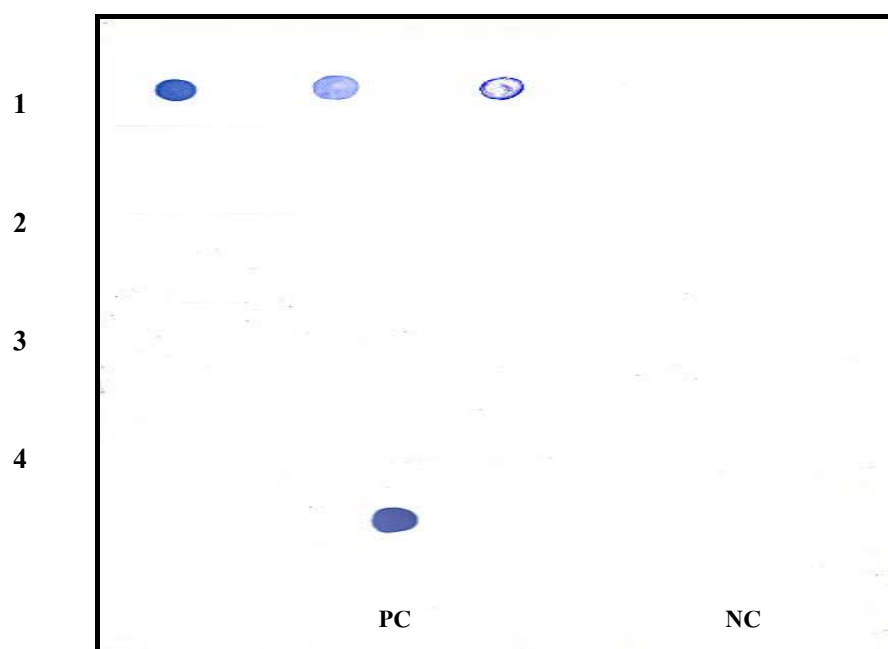
ภาพที่ 18 แสดงผลการหา dilution ของแอนติเจน (เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวกับเลือดกึ่งปกติ) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 (culture fluid) โดยวิธี dot ELISA, positive control ; polyclonal antibody, negative control ; myeloma culture fluid.



1. เลือดกึ่งกลูตาต้าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 1-8
2. เลือดกึ่งกลูตาต้าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 9-16
3. เลือดกึ่งกลูตาต้าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 17-24
4. เลือดกึ่งกลูตาต้าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 25-32
- 5.. เลือดกึ่งกลูตาต้าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 33-40
6. เลือดกึ่งกลูตาต้าปกติ ตัวอย่าง 1-8
7. เลือดกึ่งกลูตาต้าปกติ ตัวอย่าง 9-10

positive control positive control negative control negative control

ภาพที่ 19 แสดงผลตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลูตาต้า จากตัวอย่างกึ่ง 40 ตัวอย่าง
เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี dot ELISA, positive control ;
polyclonal antibody, negative control ; myeloma culture fluid.



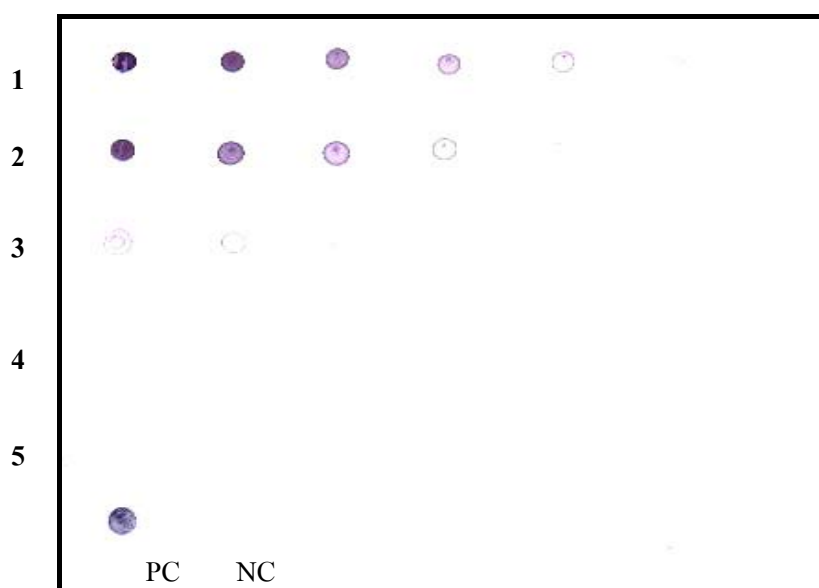
ก. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น (μg/ml)					
1.	200	100	50	25	12.5
2.	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390
ข. เลือดกึ่งกลาดำปกติ ความเข้มข้น (μg/ml)					
1.	200	100	50	25	12.5
2.	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390
				positive control	negative control

ภาพที่ 20 แสดงผลการหา sensitivity ของโมโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี dot ELISA, positive control ; polyclonal antibody, negative control ; myeloma culture fluid.

14. การทดลองใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี biotin streptavidin (BS dot ELISA)

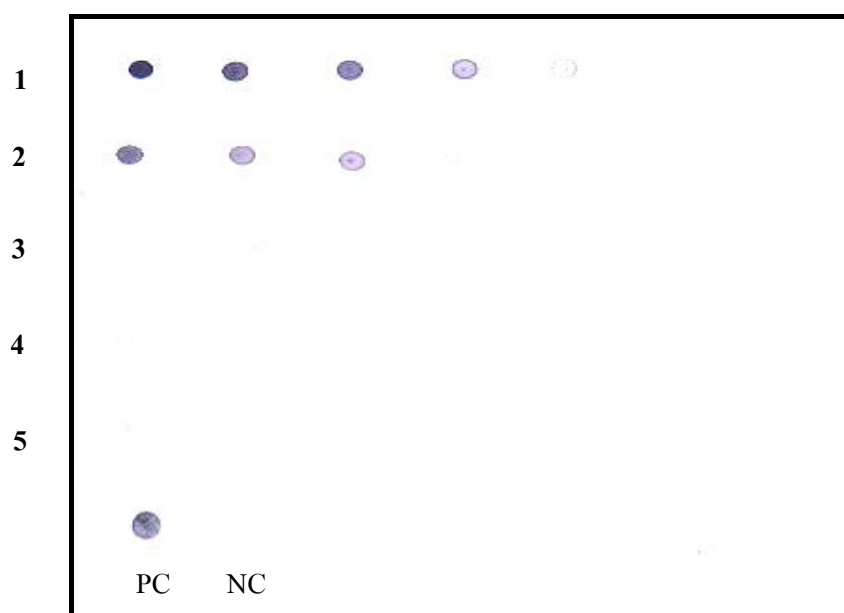
ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี biotin streptavidin dot ELISA ต้องหา dilution ของ biotin conjugated monoclonal antibody 5G5 (stock, 0.5 mg/ml) ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ สังเกตผลจากแอนติเจน 1: 400 ให้สีที่ชัดเจนในการทำปฏิกิริยาดีที่สุดระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน โดย dilution ของ biotin conjugated monoclonal antibody 5G5 ที่เหมาะสม คือ 1: 3,200 (0.156 µg/ml) ในส่วน dilution 1:1,600 (0.312 µg/ml) จะเกิด non specific ที่เลือดปกติ และในส่วน dilution 1:6,400 (0.078 µg/ml) ผลการเกิดปฏิกิริยาน้อยเกินไปแต่ไม่พบ non specific (ภาพที่ 21, 22, 23)

เมื่อใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 5G5 ที่ dilution 1:3,200 (0.156 µg/ml) และเจือจางแอนติเจนเป็น 1:400 และ 1: 800 ในการตรวจตัวอย่างกึ่งติดเชื้อทั้งหมด 40 ตัวอย่าง สามารถตรวจและให้ผลอย่างชัดเจน ทั้ง 40 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ ส่วนการใช้แอนติเจน 1:800 ผลที่ได้ไม่มีความชัดเจน ได้แก่ตัวอย่างกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่างที่ 2, 18, 20, 29, 32, 37, และตัวอย่างที่ 38 ให้สีของปฏิกิริยาจางมากจนเกือบไม่เห็นสี ดังนั้นพบว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-dot ELISA ใช้ความเข้มข้นของ biotin conjugated monoclonal antibody 5G5 เป็น 0.156 µg/ml และแอนติเจนเจือจาง 1:400 มีประสิทธิภาพที่สุดในการใช้ตรวจไวรัส (ภาพที่ 24, 25) และผลการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวง พบว่าความเข้มข้นของเลือดกึ่งติดเชื้อที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ คือ 0.390 µg/ml (ภาพที่ 26)



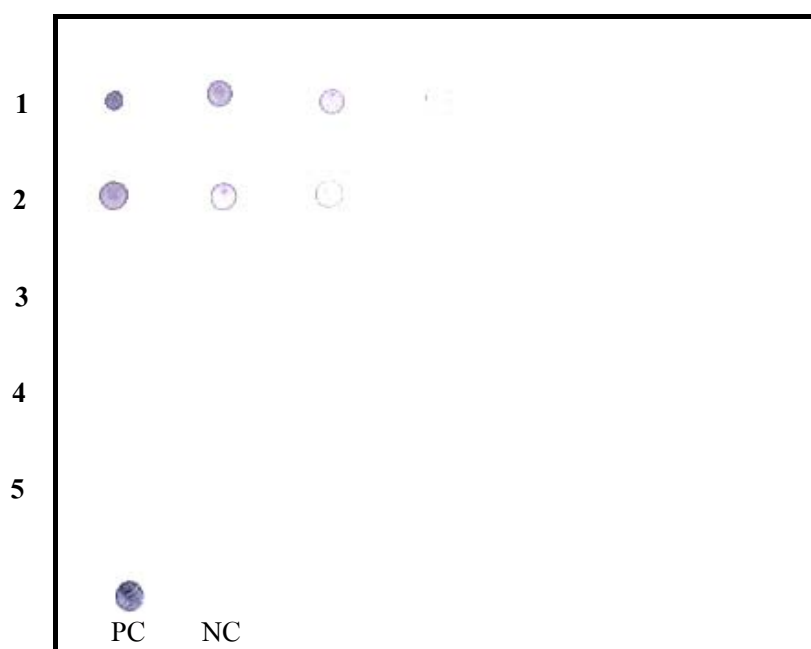
1. เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่างที่ 1 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 2. เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง ที่ 2 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 3. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 1 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 4. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 2 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 5. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 3 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
- positive control negative control

ภาพที่ 21 แสดงผลการหา titer ของแอนติเจน ที่โมโน โคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดง ดวงขาวสามารถตรวจเจอโดยวิธี dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:1,600, positive control ; polyclonal antibody, negative control ; myeloma culture fluid.



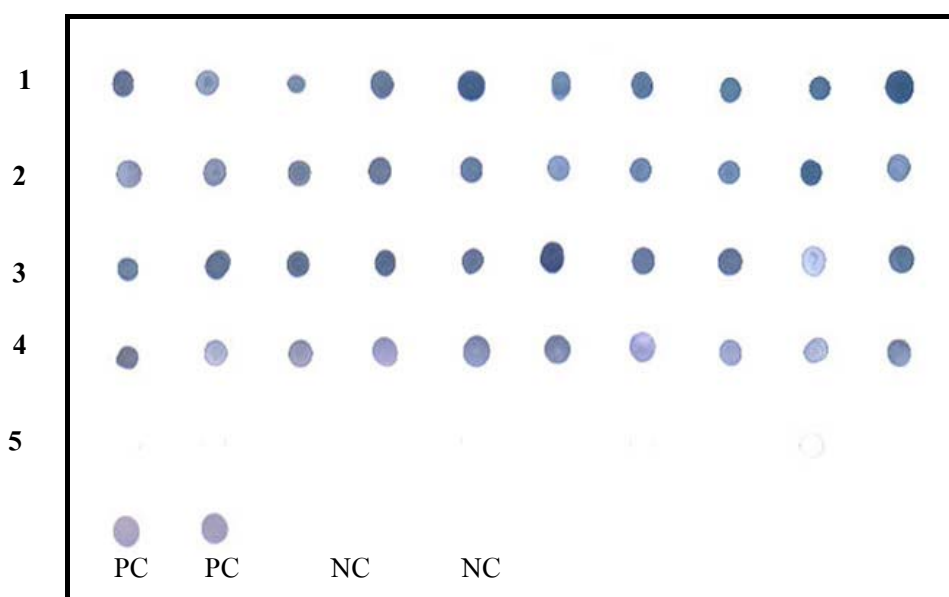
1. เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่างที่ 1 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 2. เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง ที่ 2 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 3. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 1 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 4. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 2 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 5. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 3 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
- positive control negative control

ภาพที่ 22 แสดงผลการหา titer ของแอนติเจน ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถตรวจเจอโดยวิธี dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200, positive control ; polyclonal antibody. negative control ; myeloma culture fluid.



1. เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่างที่ 1 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 2. เลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง ที่ 2 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 3. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 1 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 4. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 2 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
 5. เลือดกึ่งปกติ ตัวอย่าง ที่ 3 เจือจาง
1:400 1:800 1:1,600 1: 3,200 1:6,400 1: 12,800 1: 25,600
- positive control negative control

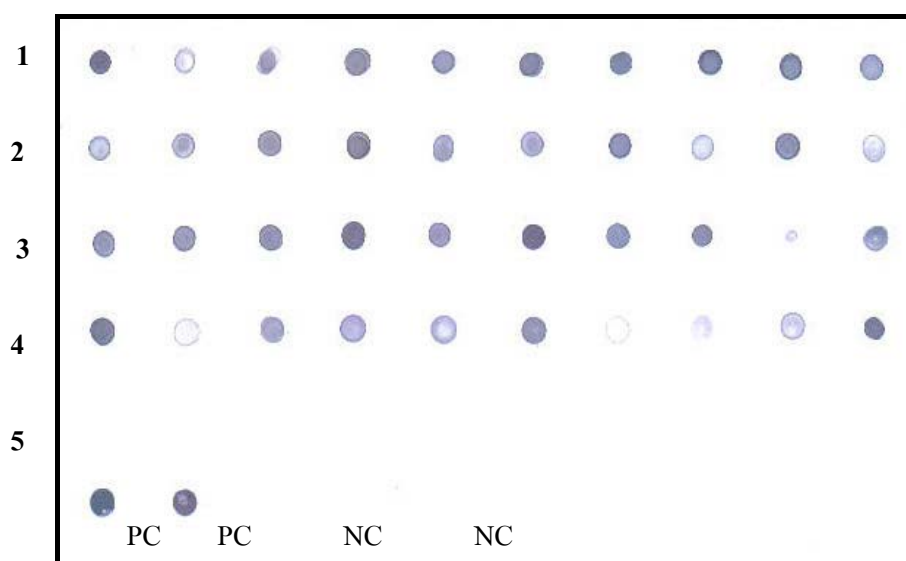
ภาพที่ 23 แสดงผลการหา titer ของแอนติเจน ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถตรวจเจอโดยวิธี dot ELISA ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:6,400, positive control; polyclonal antibody, negative control ; myeloma culture fluid.



1. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 1-10
2. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 11-20
3. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 21-30
4. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 31-40
5. เลือดกึ่งกลาดำปกติ ตัวอย่าง 1-10

positive control positive control negative control negative control

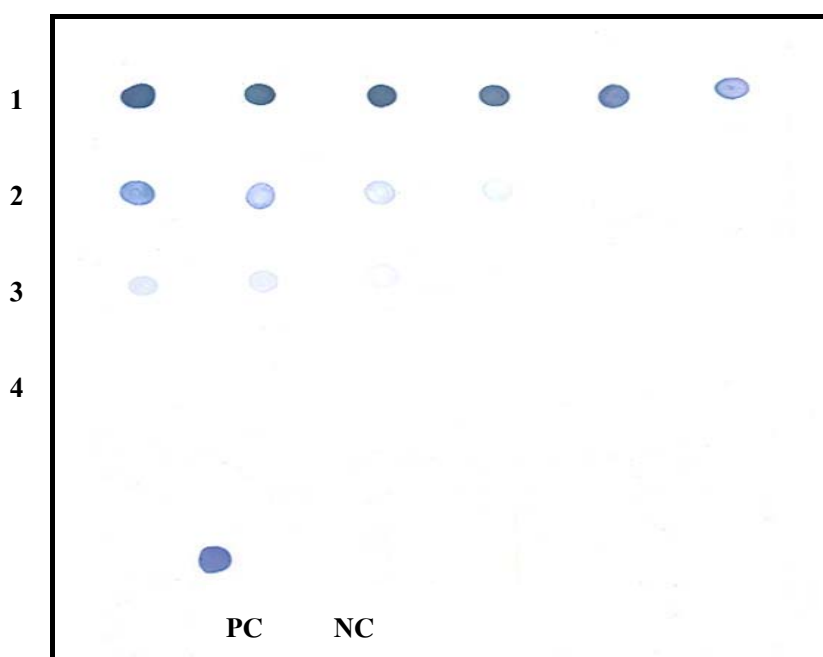
ภาพที่ 24 แสดงผลตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ จากตัวอย่างกึ่ง 40 ตัวอย่าง
เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี BS-dot ELISA เจือจางแอนติเจน 1:400
ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200, positive control; polyclonal
antibody, negative control; myeloma culture fluid.



1. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 1-10
2. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 11-20
3. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 21-30
4. เลือดกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ตัวอย่าง 31-40
5. เลือดกึ่งกลาดำปกติ ตัวอย่าง 1-10

positive control positive control negative control negative control

ภาพที่ 25 แสดงผลตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ จากตัวอย่างกึ่ง 40 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี BS-dot ELISA เจือจางแอนติเจน 1:800 ใช้ biotin conjugated monoclonal antibody 1:3,200, positive control ; polyclonal antibody, negative control ; myeloma culture fluid.



ก. เลือดกึ่งกลูตาต้าติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น (μg/ml)						
1.	200	100	50	25	12.5	6.25
2.	3.125	1.562	0.781	0.390	0.195	0.098
ข. เลือดกึ่งกลูตาต้าปกติความเข้มข้น (μg/ml)						
3.	200	100	50	25	12.5	6.25
4.	3.125	1.562	0.781	0.390	0.195	0.098
positive control			negative control			

ภาพที่ 26 แสดงผลการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5G5 ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-dot ELISA, positive control; polyclonal antibody, negative control; myeloma culture fluid.

15. การเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูดดำ

จากการทดลองใช้โมโนโคลนอลที่ผลิตจากไฮบริโดมารหัส 5G5 ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้วิธี indirect ELISA , BS-DAS ELISA , dot ELISA , BS-dot ELISA พบว่ามีความแตกต่างกันด้านระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ความถูกต้องในการตรวจและ sensitivity โดยวิธีที่ใช้เวลาในการตรวจน้อยที่สุด คือ BS- dot ELISA ใช้เวลา 4 ชั่วโมง 20 นาที และมีความถูกต้องในการตรวจ 100 เปอร์เซ็นต์ มี sensitivity สูง สามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยที่สุด 0.390 µg/ml วิธีที่ดีรองลงมาคือวิธี dot ELISA ใช้เวลา 4 ชั่วโมง 50 นาที มีความถูกต้องในการตรวจ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มี sensitivity ต่ำ สามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยที่สุด 50 µg/ml ส่วน indirect ELISA เป็นวิธีที่ใช้เวลา 5 ชั่วโมง มีความถูกต้องในการตรวจ 92.5 เปอร์เซ็นต์ และมี sensitivity สูงมาก สามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยที่สุด 0.195 µg/ml ในส่วน BS-DAS ELISA เป็นวิธีที่ใช้เวลาในการตรวจมากที่สุดคือ 6 ชั่วโมง 15 นาที และมีความถูกต้อง เพียง 87.5 เปอร์เซ็นต์ และมี sensitivity ในการตรวจพบไวรัสได้น้อยที่สุด 1.562 µg/ml เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธี BS-dot ELISA กับ dot ELISA พบว่าการใช้ biotin streptavidin conjugate สามารถพัฒนาการตรวจ ช่วยเพิ่ม sensitivity และความถูกต้องในการตรวจเพราะ biotin กับ streptavidin สามารถจับกันอย่างแน่นหนา แต่เมื่อเทียบกับวิธี indirect ELISA กับวิธี BS-DAS ELISA พบว่าวิธี indirect ELISA มี sensitivity และความถูกต้องในการตรวจมากกว่าวิธี BS-DAS ELISA ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ condition ของวิธี BS-DAS ELISA ยังไม่เหมาะสมเท่าที่ควรและมีขั้นตอนที่มากกว่า ในการตรวจไวรัสทั้งสองวิธีนี้มีความถูกต้องในการตรวจไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นผลมาจาก non specific ส่วนเมื่อเปรียบเทียบวิธี BS- dot ELISA กับวิธี indirect ELISA ถึงแม้วิธี indirect ELISA จะมี sensitivity สูงกว่า แต่ความถูกต้องในการตรวจน้อยกว่าและระยะเวลาที่ใช้มากกว่า ดังนั้นวิธี BS-dot ELISA จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูดดำ อีกทั้งไม่ต้องใช้เครื่องมือในการอ่านผลแต่สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าได้ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว
ในกุ้งกุลาดำ

วิธีการตรวจ	กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ตรวจพบ/ กุ้งติดเชื้อทั้งหมด (ตัวอย่าง)	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์	ความไวในการตรวจ (µg/ml)	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)
indirect ELISA	37/40	92.5	0.195	5
BS-DAS ELISA	35/40	87.5	1.562	6.15
dot ELISA	40/40	100	50	4.50
BS –dot ELISA	40/40	100	0.390	4.20

หมายเหตุ BS-DAS ELISA; biotin streptavidin double antibody sandwich ELISA

BS-ELISA; biotin streptavidin dot ELISA

สรุปผลการทดลอง

เตรียมไวรัสตัวแดงดวงขาวจากเลือดกึ่งและเหงือกกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ ให้บริสุทธิ์โดยการปั่นแยกใน 10-50 % continuous sucrose gradient และเมื่อนำไวรัสบริสุทธิ์ มาตรวจดูแถบโปรตีนของไวรัสโดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนทั้งหมด 6 แถบ โปรตีน ได้แก่โปรตีน ขนาด 24, 28, 40, 43, 120 และ 180 kDa พบว่าโปรตีนของไวรัสที่ตรงกับงานวิจัยอื่นมี 2 แถบ ได้แก่โปรตีนขนาด 24 และ 28 kDa

ทำการเชื่อมเซลล์ม้ามหนู Balb/c ที่ผ่านการฉีดกระตุ้นด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์ กับ myeloma cell (P3-X63- Ag.8.653) ได้ไฮบริโดมาทั้งหมด 240 หลุม จากการเชื่อมเซลล์ทั้งหมด 3 ครั้ง ตรวจพบว่าการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ทั้งหมด 36 หลุม ผลการทดลองพบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมา 1 โคลน ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับไวรัสตัวแดงดวงขาว คือโคลน 5G5 ซึ่งเมื่อนำมาเตรียมในรูป ascitic fluid พบว่าให้ระดับ antibody titer สูงถึง 1:1,280,000

ผลจากการตรวจหาชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotype) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากไฮบริโดมาโคลน 5G5 เป็น IgG2a มี light chain เป็นชนิด kappa และในการทดลองดูความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากไฮบริโดมาโคลน 5G5 ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี Western blot พบว่ามีความจำเพาะกับแถบโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว ขนาด 180 kDa โดยที่ไม่มี cross reaction กับไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus)

ทดลองนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากไฮบริโดมาโคลน 5G5 มาใช้ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว ในตัวอย่างกึ่งกลาดำติดเชื้อไวรัส 40 ตัวอย่าง เทียบกับการตรวจในกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง โดยวิธี indirect ELISA, biotin streptavidin double antibody sandwich antibody ELISA (BS-DAS ELISA), dot ELISA และ biotin streptavidin dot ELISA (BS-dot ELISA) พบว่าวิธี BS-dot ELISA เป็นวิธีที่ให้ผลในการตรวจพบไวรัสถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ มี sensitivity สูง ตรวจพบไวรัสความเข้มข้นต่ำสุด 0.390 µg/ml และเวลาที่ใช้ในการตรวจเพียง 4 ชั่วโมง 20 นาที การอ่านผลการตรวจสามารถดูได้ด้วยตาเปล่า การตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในเลือดกึ่งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี BS-dot ELISA เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก เหมาะที่จะใช้ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในฟาร์มกึ่งกลาดำ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- เบญจมินทร์ ทองเปิง. 2547. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน. ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.
- ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ. 2531. เทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ.
- พรรณีภา หาญวัฒนกิจ. 2531. การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทย. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2532. กุ้งกุลาดำ. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. กรุงเทพฯ.
- สนั่น ร่วมรักษ์. 2518. การเลี้ยงกุ้งในญี่ปุ่นและไทย. สมาคมส่งเสริมความรู้ด้านเทคนิคระหว่างประเทศ. กรุงเทพฯ.
- สุดา ตันทวนิช และ ฉันทนา แก้วตาปี. 2543. การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำและสัตว์น้ำที่อาจเป็นพาหะในพื้นที่ฝั่งอันดามัน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2543. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอันดามัน.
- สุปราณี ชินบุตร. 2546. การผลิตกุ้ง. กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- อรวิดี หาญวิวัฒน์วงศ์. 2539. อิมมูโนโกลบูลิน, น. 50-51. ใน ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. วิทยาภูมิคุ้มกัน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- อภิชัย พฤษศิริสมบัติ. 2549. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. www.talaythai.com/Education/4162047/4162047.php3.

เอี่ยมนัส อินทรผาด, วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ อมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2545. การค้นหาชิ้นที่มีปฏิกิริยาต่อเชื้อตัวแดงดวงขาว. น. 540. ใน การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28. กรุงเทพฯ.

Anil, T.M., K.M. Shankar and C.V. Mohan. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Dis. Aquat. Org.** 51: 67-75.

Chen, L.L., J.H. Leu, C.J. Huang, C.M. Chou, S.M. Chen, C.H. Wang, C.F. Lo, G.H. Kou. 2002. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. **Virology** 293: 44-53.

Chen, X.F., C. Chen, D.H. Wu, H. Huai and X.C. Chi. 1997. A new baculovirus of culture shrimp. **Sci. Chi. Ser. C.** 40: 630-635.

Jiravanichpaisal, P. 2005. White Spot Syndrome Virus Interaction with a Freshwater Crayfish. **Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology** 47. Uppsala university. 56.

Huang, C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xu and C.L. Hew. 2002. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome by mass spectrometry. **J. Gen. Virol.** 83: 2385-2392.

Kim, D.K., I.K. Jang, H.C. Seo, S.O. Shin, S.Y. Yang and J.W. Kim. 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. **Aquaculture** 237: 21-30.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fuse cell secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256: 495-497.

- Kono, T., R. Savan, M. Sakai and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. **J. Virol. Meth.** 115: 59-65.
- Leu, J.H., J.M. Tsai, H.C. Wang, A.H.J. Wang, C.H. Wang, G.H. Kou and C.F. Lo. 2005. The unique stacked ring in the nucleocapsid by the major structural protein ever found. **J. Virol.** 79: 140-149.
- Li, H., Y. Zhu, X. Xie and F. Yang. 2006. Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus. **Virus Res.** 115: 76-84.
- Li, L., X. Xie and F. Yang. 2005. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31. **Virology** 340: 125-132.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Marielle, C.W., V. Hulten, J. Witteveldt, M. Snippe and J.M. Vlak. 2001. White spot syndrome Virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. **Virology** 285: 228-233.
- _____, V. Hulten, M. Reijns, A.M.G. Vermeesch, F. Zandbergen and J.M. Vlak. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural protein. **J. Gen. Virol.** 83: 257-265.
- _____, V. Hulten, M. Westenberg, S.D Goodall and J.M. Vlak. 2000a. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. **Virology** 266: 227-236.

- _____, V. Hulten, R.W. Goldbach and J.M. Vlak. 2000b. Three functionally diverged major structural protein of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. **J. Gen. Virol.** 81: 2525-2529.
- Okumura, T., F. Nagai, S. Yamamoto, K. Yamano, N. Oseko, K. Inouye, H. Oomura and H. Sanwada. 2004. Detection of white spot syndrome virus from stomach tissue homogenate of the Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) by reverse passive latex agglutination. **J. Virol. Meth.** 119: 11-16.
- Poulos, B.T., C.R. Pantoja, D. Bradley-Dunlop, J. Aguilar and D.V. Lightner. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 47: 13-23.
- Rameshthangam, P. and P. Ramasamy. 2005. Protein expression in white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon* fabricius. **Virus Res.** 110: 133-141.
- Sathish, S., C. Selvakkumar, A.S. Sahul Hameed and R.B. Narayanan. 2004. 18-kDa protein as a marker to detect WSSV infection in shrimps. **Aquaculture** 238: 39-50.
- Shih, H.H. 2004. Neutralization of white spot syndrome virus by monoclonal antibody against Viral envelop proteins. **Taiwania** 49: 159-165.
- Tsai, J.M, H.C Wang, J.H. Leu, H.H. Hsiao, A.H.J. Wang, G.H. Kou and C.F. Lo. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. **J. Virol.** 78: 11360-11370.
- Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst and J.M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology** 286: 7-22.

- Vlak, J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, G.H. Kou, D.V. Lightner, C.F. Lo, P.C. Loh and P.J. Walker. 2002. Nimaviridae: A new virus family infecting aquatic invertebrates. **International Congress of Virology**. Paris 2002. 1.
- Witteveldt, J., A. M. G. Vermeesch, M. Langenhof, A. Lang, J.M. Vlak and M.C.W. van Hulten. 2005. Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. **Arch. Virol.** 150: 1121-1133.
- Witteveldt, J., C.C. Cifuentes, J.M. Vlak, C.W. Marielle and M.C. van Hulten. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. **J. Virol.** 78: 2057-2061.
- Wu, W., L. Wang and X. Zhang. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) Envelope proteins involved in shrimp infection. **Virology** 332: 578-583.
- Xie, X., H. Li, L. Xu and F. Yang. 2005. A simple and efficient method for purification of Intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. **Virus Res.** 108: 63-67.
- Yang, F., J. He, X. Lin, O. Li, D. Pan, X. Zhang and X. Xun. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **J. Virol.** 75: 11811-11820.
- Yoganandhan, K., S. Sathish, V. Murugan, R.B. Narayanan and A.S. Sahul Hameed. 2003. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. **Aquaculture** 215: 21-29.
- Zhan, W.B., Y.H. Wang, J.L. Fryer, K.K. Yu, H. Fukada and O.X. Meng. 1998. White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. **J. Aquat. Anim. Health.** 10: 405-410.

Zhu, Y.B., H.Y. Li and F. Yang. 2005a. Identification of an envelope protein (VP39) gene from shrimp white spot syndrome virus. **Arch. Virol.** 151: 71-82.

Zhu, Y.B., X. Xie and F. Yang. 2005b. Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virus Res.** 113: 100-106.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ ก1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการรายงาน

รายงานผลการวิจัย	น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน WSSV (kDa)
Mariella <i>et al.</i> (2000a,b)	19, 24, 26, 28
Mariella <i>et al.</i> (2002)	15, 19, 24, 26, 28
Wu <i>et al.</i> (2005)	22, 26, 28, 68, 281, 292, 466
Zhu <i>et al.</i> (2005b)	124
Zhu <i>et al.</i> (2005a)	39
Li <i>et al.</i> (2005)	31
Witteveldt <i>et al.</i> (2005)	15
Rameshthangam and Ramasamy (2005)	53
Leu <i>et al.</i> (2005)	664
Li <i>et al.</i> (2006)	187

ตารางผนวกที่ ก2 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงวงขาวและ
goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA

		OD 492 nm												
mouse serum	antigen dilution (µg/ml)	conjugate dilution												
		1:5,000						1:10,000						blank
		antibody dilution												
		1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	
pre-immunized	5	0.077	0.071	0.061	0.042	0.045	0.046	0.049	0.045	0.045	0.047	0.043	0.043	0.062
	2.5	0.064	0.054	0.050	0.043	0.055	0.045	0.054	0.052	0.049	0.046	0.044	0.051	0.063
immunized	5	3.173	3.164	3.080	2.906	2.615	2.185	2.737	2.560	2.494	2.278	1.932	1.486	0.063
	2.5	3.169	3.064	2.813	2.529	2.133	1.627	2.554	2.426	2.156	1.828	1.474	1.029	0.063
	blank	0.063	0.052	0.062	0.062	0.062	0.065	0.054	0.060	0.063	0.062	0.061	0.062	0.063

ตารางผนวกที่ 3 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหาความเข้มข้นของแอนติเจนเลือดกึ่งกลูตาปกติและ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate โดยวิธี indirect ELISA

		OD 492 nm												
		conjugate dilution												
mouse serum	antigen dilution	1:5,000						1:10,000						blank
	($\mu\text{g/ml}$)	antibody dilution												
		1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	
pre-immunized	2.5	0.087	0.138	0.046	0.048	0.044	0.043	0.053	0.045	0.047	0.042	0.042	0.041	0.042
	5	0.051	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.049	0.045	0.045	0.047	0.043	0.043	0.035
immunized	2.5	3.007	2.809	2.482	1.942	1.606	1.175	2.347	2.171	1.737	1.389	0.990	0.710	0.045
	5	2.712	2.314	1.904	1.371	0.960	0.664	1.857	1.538	1.155	0.829	0.592	0.398	0.044
	blank	0.041	0.053	0.040	0.056	0.042	0.041	0.043	0.052	0.042	0.041	0.042	0.042	0.044

ตารางผนวกที่ ก4 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา titer ที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในซีรุ่มหนู โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ความเข้มข้นของแอนติเจน 5 µg/ml และ goat anti-mouse IgG- HRP conjugate เจือจางที่ 1: 10,000

antigen	OD 492 nm											blank
	reciprocal of polyclonal antibody (×10 ³)											
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	
haemolymph (WSSV)	3.620	2.865	2.150	1.587	1.064	0.647	0.414	0.243	0.145	0.100	0.074	0.054
haemolymph (normal)	2.249	1.612	1.224	0.782	0.650	0.319	0.218	0.154	0.096	0.081	0.060	0.053
blank	0.056	0.054	0.052	0.053	0.052	0.052	0.051	0.051	0.052	0.049	0.050	0.051

หมายเหตุ haemolymph (WSSV); haemolymph from WSSV infected shrimp.
haemolymph (normal); haemolymph from normal shrimp.

ตารางผนวกที่ ก5 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้จาก ascitic fluid ของการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3

code of hybridoma cell	OD 492 nm												
	reciprocal dilution of monoclonal antibody to WSSV (x10 ³)												blank
	2.5	5	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	
1B5	0.044	0.041	0.042	0.043	0.045	0.035	0.044	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.045
3G3*	0.512	0.511	0.463	0.447	0.360	0.307	0.247	0.171	0.116	0.075	0.054	0.048	0.043
4D11	0.041	0.043	0.042	0.050	0.043	0.043	0.042	0.039	0.042	0.042	0.042	0.045	0.025
5G5*	1.530	1.486	1.624	1.560	1.562	1.213	0.810	0.448	0.248	0.133	0.085	0.059	0.059
NC	0.032	0.035	0.030	0.030	0.031	0.034	0.033	0.036	0.033	0.031	0.032	0.024	0.043

หมายเหตุ * เป็น hybridoma cell ที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

NC; negative control (polyclonal antibody)

ตารางผนวกที่ 6 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา titer ของแอนติเจนและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว ในตัวอย่างกุ้งโดยวิธี indirect ELISA

OD 492 nm														
type of antigen														
source	antibody dilution	haemolymph (WSSV)						haemolymph (normal)						blank
		antigen dilution												
		1:5	1:25	1:125	1:625	1:3,125	1:15,625	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3,125	1:15,625	
culture fluid	1:8	2.186	2.008	1.858	1.073	0.667	0.403	0.646	0.758	0.812	0.370	0.206	0.142	0.043
	1:16	2.246	2.002	1.819	1.587	0.697	0.583	0.664	0.725	0.755	0.336	0.171	0.126	0.041
	1:32	2.189	1.734	1.670	1.466	0.638	0.376	0.524	0.616	0.709	0.310	0.178	0.115	0.041
	1:64	2.259	1.923	1.736	1.404	0.636	0.390	0.510	0.702	0.718	0.309	0.188	0.118	0.042
ascetic	1:6,400	1.874	1.879	1.816	1.536	0.617	0.358	0.564	0.677	0.705	0.360	0.162	0.112	0.044
	1:32,000	1.732	1.711	1.441	1.367	0.514	0.324	0.460	0.570	0.604	0.259	0.137	0.091	0.041
	1:160,000	1.729	1.451	1.349	1.133	0.475	0.263	0.421	0.521	0.559	0.247	0.137	0.088	0.042
	1:800,000	1.582	1.563	1.312	1.077	0.454	0.263	0.445	0.495	0.573	0.240	0.093	0.090	0.041
blank		0.044	0.043	0.041	0.041	0.041	0.047	0.043	0.041	0.041	0.045	0.034	0.042	0.041

หมายเหตุ haemolymph (WSSV); haemolymph from WSSV infected shrimp.

haemolymph (normal); haemolymph from normal shrimp.

ตารางผนวกที่ ๗ แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี indirect ELISA

type of antigen	OD 492 nm											
	antigen concentration (µg/ml)											
	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390	0.195	0.098	0.049	0.024	0.012	blank
haemolymph (WSSV)	2.303	2.197	1.763	1.313	0.874	0.529	0.260	0.116	0.055	0.051	0.047	0.050
haemolymph (normal)	0.324	0.185	0.112	0.081	0.066	0.054	0.051	0.053	0.052	0.055	0.043	0.048
blank	0.043	0.044	0.050	0.058	0.049	0.048	0.046	0.050	0.047	0.052	0.050	0.051

หมายเหตุ haemolymph (WSSV); haemolymph from WSSV infected shrimp.

haemolymph (normal); haemolymph from normal shrimp.

ตารางผนวกที่ ก8 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการทำ chequerboard titration ระหว่างแอนติเจนกับ conjugated biotin monoclonal antibody ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว

concentration of antigen (μg/ml)	type of antigen	OD 492 nm								blank
		reciprocal dilution of biotin conjugated monoclonal antibody to WSSV								
		100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	
20	haemolymph (WSSV)	2.215	2.094	2.110	2.033	1.639	1.379	0.994	0.519	0.042
	haemolymph (normal)	0.398	0.360	0.328	0.267	0.217	0.158	0.111	0.093	0.040
10	haemolymph (WSSV)	1.828	1.685	1.440	1.243	0.838	0.656	0.411	0.293	0.041
	haemolymph (normal)	0.278	0.263	0.317	0.179	0.138	0.118	0.088	0.088	0.040
5	haemolymph (WSSV)	1.605	1.513	1.280	1.154	0.899	0.654	0.584	0.303	0.041
	haemolymph (normal)	0.155	0.258	0.239	0.123	0.117	0.105	0.092	0.092	0.044
	blank	0.041	0.040	0.040	0.042	0.040	0.039	0.041	0.042	0.040

หมายเหตุ haemolymph (WSSV); haemolymph from WSSV infected shrimp.
haemolymph (normal); haemolymph from normal shrimp.

ตารางผนวกที่ ๑๑ แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา titer ของแอนติเจนและ purified immunoglobulin ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว ในตัวอย่างกุ้ง โดยวิธี indirect ELISA

type of antigen	OD 492 nm												blank
	reciprocal dilution of purified immunoglobulin 5G5												
	1000	2000	4000	8000	16,000	32,000	64,000	12,800	256,000	512,000	1,024,000	2,048,000	
haemolymph (WSSV)	0.968	0.853	0.920	0.976	1.023	0.605	0.610	0.685	0.610	0.463	0.449	0.389	0.056
haemolymph (normal)	0.581	0.554	0.706	0.632	0.792	0.423	0.360	0.256	0.220	0.209	0.219	0.180	0.051
blank	0.023	0.012	0.023	0.026	0.022	0.022	0.032	0.021	0.020	0.022	0.024	0.021	0.022

หมายเหตุ haemolymph (WSSV); haemolymph from WSSV infected shrimp.

haemolymph (normal); haemolymph from normal shrimp.

ตารางผนวกที่ ก10 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการหา sensitivity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-DAS ELISA

type of antigen	OD 492 nm											
	antigen concentration ($\mu\text{g/ml}$)											
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390	0.195	blank
haemolymph (WSSV)	1.570	1.155	0.792	0.593	0.466	0.396	0.310	0.230	0.123	0.063	0.043	0.048
haemolymph (normal)	0.650	0.476	0.384	0.312	0.228	0.184	0.106	0.053	0.050	0.052	0.041	0.047
blank	0.046	0.041	0.044	0.046	0.043	0.063	0.042	0.047	0.043	0.049	0.040	0.043

หมายเหตุ haemolymph (WSSV); haemolymph from WSSV infected shrimp.

haemolymph (normal); haemolymph from normal shrimp.

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์
ทั้ง 3 ครั้ง นำมาทำการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดย
วิธี indirect ELISA

การเชื่อมเซลล์ในครั้งแรกไม่มีผลแสดง

เนื่องจากการเชื่อมเซลล์ครั้งแรก ไม่มีหลุมไหนที่ได้เซลล์ไฮบริโดมาเลย จึงไม่มีการ
นำน้ำเลี้ยงเซลล์นำมาทำการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี
indirect ELISA

ตารางผนวกที่ ข1 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการเชื่อม
เซลล์ครั้งที่ 2 นำมาทำการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดง
ดวงขาว โดยวิธี indirect ELISA

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
1	1B2*	0.741	0.402	0.044	0.042
2	1B3	0.300	0.459	-	-
3	1B7	0.597	0.814	-	-
4	1C2	0.392	0.249	-	-
5	1D4	0.267	0.177	-	-
6	1E5	0.230	0.140	-	-
7	1F10	0.301	0.215	-	-
8	2B10	0.349	0.244	-	-
9	2C5	0.329	0.238	-	-
10	2C6	0.271	0.174	-	-
11	2D7	0.325	0.223	-	-
12	2D11	1.284	1.532	-	-
13	2E3	0.242	0.159	-	-
14	2E11	0.216	0.144	-	-
15	2F2	0.332	0.228	-	-
16	2G3	0.303	0.176	-	-
17	2G6	0.343	0.204	-	-
18	3C3	0.217	0.128	-	-
19	3C6	0.232	0.259	-	-
20	3F3	1.278	1.796	-	-
21	3F4	0.536	0.448	-	-

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
22	3F6	0.181	0.153	-	-
23	3F11	0.112	0.093	-	-
24	3G2	0.260	0.223	-	-
25	4B8	0.255	0.180	-	-
26	4C3	0.274	0.261	-	-
27	4C7	0.271	0.211	-	-
28	4C8	0.206	0.188	-	-
29	4C9	0.307	0.252	-	-
30	4C10	0.315	0.305	-	-
31	4E3	0.172	0.145	-	-
32	4F2	0.207	0.189	-	-
33	4F5	0.173	0.150	-	-
34	4F6	0.167	0.134	-	-
35	4F8	1.994	1.911	-	-
36	4F9*	1.333	0.694	0.041	0.040
37	4G2	0.282	0.215	-	-
38	4G4	0.200	0.170	-	-
39	4G6	0.274	0.209	-	-
40	5B2	0.925	1.115	-	-
41	5B5	0.262	0.229	-	-
42	5B10	0.462	0.542	-	-
43	5C7	0.344	0.241	-	-
44	5E5	0.240	0.213	-	-

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
45	5E8	0.329	0.321	-	-
46	5E7*	1.181	0.532	0.044	0.042
47	5F3	0.243	0.225	-	-
48	5F7	0.233	0.191	-	-
49	5F9	0.180	0.217	-	-
50	5G2	0.282	0.221	-	-
51	6G11*	0.481	0.290	0.045	0.044
52	7D2	0.471	0.393	-	-
53	6F11	0.415	0.242	-	-
54	1B4	0.578	0.444	-	-
55	1G6	0.226	0.228	-	-
56	3D7	0.854	0.837	-	-
57	1B10	0.248	0.196	-	-
	PC	2.920	2.799	2.428	2.207
	NC	0.058	0.058	0.052	0.054
	Blank	0.054	0.049	0.032	0.030

หมายเหตุ ไฮบริโดมา เซลล์รหัส 1B2*, 4F9*, 5E7*, 6G11* เป็นไฮบริโดมาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการเชื่อมเซลล์ ครั้งที่ 2 ที่ให้ค่า OD สูงกว่าไฮบริโดมาเซลล์รหัสอื่น, HAE(wssv); haemolymph from WSSV infected shrimp, HAE (normal); haemolymph from normal shrimp, PC; positive control (polyclonal antibody), NC; negative control (myeloma culture fluid), cutoff = $\bar{X} + 2SD = 0.055 + 0.003 = 0.058$

ตารางผนวกที่ ข2 แสดงค่า OD ที่ 492 nm ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้จากการเชื่อม
เซลล์ครั้งที่ 3 นำมาทำการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตัวแดง
ดวงขาวโดยวิธี indirect ELISA

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
1	1B3	0.133	0.212	-	-
2	1B4	0.710	0.716	-	-
3	1B5**	1.505	0.847	1.227	0.652
4	1B6	0.528	0.627	-	-
5	1B7	0.074	0.065	-	-
6	1B8	0.073	0.082	-	-
7	1B9*	0.574	0.314	-	-
8	1B10	0.307	0.351	-	-
9	1B11	0.064	0.074	-	-
10	1C2	0.054	0.069	-	-
11	1C3	0.299	0.335	-	-
12	1C4	0.059	0.083	-	-
13	1C7	0.073	0.064	-	-
14	1C8	0.091	0.091	-	-
15	1C9	0.050	0.055	-	-
16	1C10	0.048	0.048	-	-
17	1C11	0.075	0.085	-	-
18	1D3	1.341	1.621	-	-
19	1D4	0.386	0.406	-	-
20	1D7	0.339	0.314	-	-
21	1D9	0.135	0.183	-	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
22	1D11	0.057	0.083	-	-
23	1E7	0.137	0.145	-	-
24	1E9	0.279	0.301	-	-
25	1E10	0.061	0.069	-	-
26	1E11	0.122	0.200	-	-
27	1F2	0.252	0.278	-	-
28	1F3	0.170	0.221	-	-
29	1F5	0.448	0.467	-	-
30	1F7	2.908	2.075	-	-
31	1F8	0.422	0.475	-	-
32	1F10	0.064	0.069	-	-
33	1F11	0.092	0.105	-	-
34	1G2	0.068	0.069	-	-
35	1G3*	0.828	0.409	-	-
36	1G7	0.154	0.174	-	-
37	1G8	0.388	0.563	-	-
38	1G9*	0.692	0.326	-	-
39	1G10	0.374	0.408	-	-
40	1G11	0.077	0.094	-	-
41	2B2	0.161	0.159	-	-
42	2B3*	1.331	0.729	0.737	0.429
43	2B4	0.122	0.133	-	-
44	2B6	0.129	0.171	-	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
45	2B7	0.407	0.437	-	-
46	2B9*	0.617	0.283	-	-
47	2B8	0.078	0.078	-	-
48	2B10	0.316	0.333	-	-
49	2B11	0.211	0.426	-	-
50	2C2	0.096	0.098	-	-
51	2C3	0.088	0.131	-	-
52	2C6	0.195	0.196	-	-
53	2C9	0.120	0.134	-	-
54	2C10	0.067	0.100	-	-
55	2C11	0.065	0.064	-	-
56	2D2	0.135	0.167	-	-
57	2D3	0.237	0.249	-	-
58	2D5	0.661	0.910	-	-
59	2D6	0.069	0.069	-	-
60	2D10	0.270	0.303	-	-
61	2D11	0.180	0.254	-	-
62	2E2	0.093	0.085	-	-
63	2E3	0.056	0.053	-	-
64	2E5	0.067	0.063	-	-
65	2E6*	0.616	0.498	-	-
66	2E7	0.159	0.426	-	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
67	2E8	0.328	0.431	-	-
68	2E10	0.276	0.270	-	-
69	2F3	0.254	0.306	-	-
70	2F4	0.726	1.511	-	-
71	2F5*	1.359	0.651	0.951	0.702
72	2F7*	0.692	0.315	-	-
73	2F8*	1.274	0.605	0.629	0.308
74	2F9	0.264	0.295	-	-
75	2F10	0.477	0.345	-	-
76	2F11	0.078	0.096	-	-
77	2G2	0.099	0.105	-	-
78	2G4	0.105	0.099	-	-
79	2G7	1.210	2.353	-	-
80	2G8	0.307	0.318	-	-
81	2G10	0.088	0.094	-	-
82	2G11	0.184	0.198	-	-
83	3B2	0.065	0.085	-	-
84	3B3	0.079	0.084	-	-
85	3B4	0.610	0.624	-	-
86	3B7	0.162	0.235	-	-
87	3B8	0.103	0.124	-	-
88	3B9	0.068	0.071	-	-
89	3B10	0.059	0.083	-	-

ตารางผนวกที่ ๒2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
90	3B11	0.120	0.141	-	-
91	3C3	1.784	1.867	-	-
92	3C8*	1.181	0.873	-	-
93	3C9	0.413	0.476	-	-
94	3C10	0.176	0.244	-	-
95	3C11*	0.853	0.340	-	-
96	3D2*	0.334	0.193	-	-
97	3D4	0.067	0.080	-	-
98	3D7	0.727	0.789	-	-
99	3D8	0.105	0.120	-	-
100	3E7*	0.764	0.327	-	-
101	3F3*	0.810	0.298	-	-
102	3F10	0.713	0.694	-	-
103	3F11	0.095	0.104	-	-
104	3G2	0.113	0.145	-	-
105	3G3**	1.301	0.656	0.651	0.316
106	3G4	0.091	0.080	-	-
107	3G5	0.098	0.156	-	-
108	3G6*	0.814	0.333	-	-
109	3G7	0.461	0.453	-	-
110	3G9	0.151	0.203	-	-
111	3G11	0.320	0.376	-	-
112	4B2	0.911	0.586	-	-

ตารางผนวกที่ ๒2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
113	4B4	1.456	1.429	-	-
114	4B5*	0.988	0.458	-	-
115	4B6	0.168	0.209	-	-
116	4B7	0.062	0.063	-	-
117	4B8*	0.979	0.425	-	-
118	4B10	0.101	0.123	-	-
119	4C3	0.176	0.187	-	-
120	4C4*	0.988	0.458	-	-
121	4C5*	0.982	0.470	-	-
122	4C6	0.230	0.311	-	-
123	4C8	2.424	2.331	-	-
124	4C10*	0.718	0.353	-	-
125	4D2*	0.239	0.147	-	-
126	4D3	0.198	0.177	-	-
127	4D5	0.203	0.114	-	-
128	4D11**	1.469	0.671	0.612	0.279
129	4E2	0.107	0.124	-	-
130	4E3	0.278	0.282	-	-
131	4E5	0.408	0.384	-	-
132	4E7	0.114	0.142	-	-
133	4E11	0.238	0.268	-	-
134	4F2	0.523	0.523	-	-
135	4F3	0.059	0.063	-	-

ตารางผนวกที่ ๒2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
136	4F5	0.046	0.066	-	-
137	4F6*	0.251	0.082	-	-
138	4F7	0.056	0.064	-	-
139	4F9*	0.610	0.140	-	-
140	4F11	0.053	0.053	-	-
141	4G3*	0.612	0.259	-	-
142	4G4	1.321	2.122	-	-
143	4G5*	0.643	0.310	-	-
144	4G7	0.175	0.244	-	-
145	4G8	0.424	0.461	-	-
146	4G9	1.034	1.249	-	-
147	5B2	0.242	0.300	-	-
148	5B3	0.088	0.124	-	-
149	5B5	0.248	0.240	-	-
150	5B6	1.760	1.150	-	-
151	5B7	0.473	0.490	-	-
152	5B8	0.086	0.084	-	-
153	5B10	1.006	0.963	-	-
154	5B11	0.071	0.072	-	-
155	5C2	1.696	1.972	-	-
156	5C3	0.239	0.229	-	-
157	5C4	0.218	0.201	-	-
158	5C6	0.155	0.220	-	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
159	5C7	0.110	0.106	-	-
160	5C8	0.153	0.250	-	-
161	5C11*	0.410	0.189	-	-
162	5D3*	0.544	0.389	-	-
163	5D4	0.162	0.231	-	-
164	5D5	0.155	0.212	-	-
165	5D6	0.097	0.170	-	-
166	5D9*	1.128	0.699	0.145	0.169
167	5D10	0.258	0.296	-	-
168	5D11	0.067	0.067	-	-
169	5E2	0.218	0.272	-	-
170	5E11	0.131	0.187	-	-
171	5F2	0.335	0.391	-	-
172	5F5	0.101	0.058	-	-
173	5F6	0.178	0.228	-	-
174	5F10	0.093	0.155	-	-
175	5F11	0.060	0.082	-	-
176	5G2	0.446	0.412	-	-
177	5G3	0.136	0.176	-	-
178	5G5**	1.203	0.047	2.924	0.528
179	5G6	0.069	0.054	-	-
180	5G7	0.086	0.123	-	-
181	5G8	0.073	0.090	-	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

No.	Code of hybridoma	OD _{492 nm}			
		1 st screening		2 nd screening	
		HAE (wssv)	HAE (normal)	HAE (wssv)	HAE (normal)
182	5G9	0.156	0.372	-	-
183	5G10	0.106	0.107	-	-
	PC	2.207	2.153	2.512	2.226
	NC	0.053	0.051	0.083	0.078
	Blank	0.047	0.042	0.063	0.065

หมายเหตุ * เป็นไฮบริโดมาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 ที่ให้ค่า OD น้อย,** เป็นไฮบริโดมาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการเชื่อมเซลล์ ครั้งที่ 3 ที่ให้ค่า OD สูงกว่าไฮบริโดมาเซลล์รหัสอื่น, HAE (wssv); haemolymph from WSSV infected shrimp, HAE (normal); haemolymph from normal shrimp, PC; positive control (polyclonal antibody), NC; negative control (myeloma culture fluid), cutoff = $\bar{X} + 2SD = 0.052 + 0.001 = 0.053$

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงค่า OD ที่ 492 nm ของการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว จากตัวอย่าง
กึ่งติดเชื้อ 40 ตัวอย่าง เทียบกับตัวอย่างกึ่งปกติ 10 ตัวอย่าง
โดยวิธี indirect ELISA และ BS-DAS ELISA

ตารางผนวกที่ ค1 การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี indirect ELISA

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	OD _{492 nm}	การแปลผล
1	1.175	positive
2	1.047	positive
3	0.988	positive
4	0.731	positive
5	0.591	positive
6	1.180	positive
7	0.943	positive
8	0.704	positive
9	0.704	positive
10	0.753	positive
11	0.404	positive
12	0.302	positive
13	0.483	positive
14	0.499	positive
15	0.658	positive
16	0.267	positive
17	1.170	positive
18	0.836	positive
19	1.076	positive
20	0.613	positive
21	0.679	positive
22	1.031	positive
23	0.887	positive
24	1.083	positive

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ตัวอย่างกึ่งกลาคำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	OD _{492 nm}	การแปลผล
25	1.001	positive
26	0.894	positive
27	0.540	positive
28	0.779	positive
29	0.555	positive
30	0.641	positive
31	1.048	positive
32	0.134	negative
33	0.868	positive
34	0.227	positive
35	0.696	positive
36	0.958	positive
37	0.105	negative
38	0.601	positive
39	1.078	positive
40	0.178	negative
blank	0.041	
PC	1.191	
NC	0.053	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ตัวอย่างกึ่งกลดำปกติ	OD _{492 nm}
1	0.140
2	0.167
3	0.165
4	0.144
5	0.174
6	0.123
7	0.200
8	0.146
9	0.184
10	0.155
blank	0.041
PC	1.191
NC	0.053
$\bar{X} = 0.159$	
Standard deviation (SD) = 0.023	
$\text{cutoff} = \bar{X} + 2SD = 0.159 + 0.046 = 0.205$	

หมายเหตุ PC; positive control (polyclonal antibody)

NC; negative control (myeloma culture fluid)

ตารางผนวกที่ ค2 การทดลองตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี BS-DAS ELISA

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	OD _{492 nm}	การแปลผล
1	0.471	positive
2	0.321	positive
3	0.393	positive
4	0.333	positive
5	0.272	positive
6	0.306	positive
7	0.350	positive
8	0.155	positive
9	0.144	negative
10	0.137	negative
11	0.107	negative
12	0.147	negative
13	0.221	positive
14	0.639	positive
15	0.356	positive
16	0.119	negative
17	0.264	positive
18	0.228	positive
19	0.367	positive
20	0.325	positive
21	0.248	positive
22	0.284	positive
23	0.281	positive
24	0.497	positive

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

ตัวอย่างกึ่งกลาคำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	OD _{492 nm}	การแปลผล
25	0.346	positive
26	0.637	positive
27	0.327	positive
28	0.435	positive
29	0.190	positive
30	0.435	positive
31	0.283	positive
32	0.179	positive
33	1.103	positive
34	1.303	positive
35	0.432	positive
36	0.614	positive
37	0.283	positive
38	1.277	positive
39	1.273	positive
40	0.739	positive
blank	0.069	
PC	0.985	
NC	0.063	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

ตัวอย่างกึ่งกลาดำปกติ	OD _{492 nm}
1	0.063
2	0.095
3	0.090
4	0.087
5	0.099
6	0.072
7	0.093
8	0.083
9	0.089
10	0.100
blank	0.069
PC	0.985
NC	0.063
$\bar{X} = 0.087$ Standard deviation (SD) = 0.033 $\text{cutoff} = \bar{X} + 2SD = 0.087 + 0.066 = 0.153$	

หมายเหตุ PC; positive control (polyclonal antibody)

NC; negative control (myeloma culture fluid)

ภาคผนวก ง

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารละลายสำหรับใช้เตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

TN buffer (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl pH 7.4)

Tris-HCl	2.4228 mg
NaCl	2.3376 mg
น้ำกลั่น	800 ml
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 l	

การเตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10-50 % (continuous sucrose gradient)

ซูโครส 10 % ปริมาตร 7 ml และซูโครส 50 % ปริมาตร 7 ml นำสารละลายน้ำตาลซูโครสใส่ลงในเครื่องทำ gradient โดยใส่สารละลายซูโครส 50 % ลงใน mixing chamber ที่ทำการกวนในอัตราเร็ว 70 รอบต่อนาที และใส่สารละลายซูโครส 10 % ลงใน containing chamber ที่เชื่อมต่อกับ mixing chamber ด้วยสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm ยาว 1 cm เมื่อต้องการทำ gradient จึงทำการเปิดสายยางที่เชื่อมระหว่าง 2 chamber และเปิด peristaltic pump โดยควบคุมอัตราการไหล 4 ml ต่อนาที และนำปลายสายยางที่ต่อออกจาก peristaltic pump แตะไว้ที่ปลายหลอดหมุนเหวี่ยงเพื่อให้สายละลายซูโครสไหลลงอย่างช้าๆ จนมีปริมาตร 11 ml

การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

HT (hypoxanthine และ thymidine) stock 100 เท่า

Hypoxanthine (MW 131.1)	
(6-hydroxypurine: GibCo BRL, Cat.NO.16034-019)	68.05 mg
น้ำกลั่นกรอง (ละลายที่อุณหภูมิ 45-50 °C นาน 1 ชั่วโมง)	25 ml
Thymidine (MW 242.2: GibCo BRL, Cat.NO.16495-038)	18.9 mg
ละลายในน้ำกลั่นกรอง	25 ml
นำสารละลายทั้งสองชนิดมารวมกันแล้วกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 μ m แบ่งใส่หลอดแก้วหลอดละ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C	

aminopterin stock

aminopterin (MW 440.4,A5159, CAS. NO 54-62-6)	1 ขวด
(4-amino folic acid; 4-aminopteroyl-L- glutamic acid, 4-amino-PGA : Sigma)	
ละลายด้วย RPMI-1640+Fetal bovine serum 10 ml	10 ml
หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมเพื่อไม่ให้ถูกแสง เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C	

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

RPMI-1640(GibCo) ถ้าเสร็จรูปที่นำมาใช้ได้เลย	
โดยละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ	900 ml
gentamycin (40mg/ml) ให้มีความเข้มข้น 50 µg/ml	
เติม NaHCO ₃	2 g
ปรับด้วย pH ด้วย HCl ให้ได้ pH ประมาณ 7.0-7.2	
เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรครบ 1 l	
กรองอาหารด้วย millipore ขนาด	
0.22 µm ในตู้ lamina flow แล้วแบ่งใส่ขวดละ 500 ml เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C	

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ HAT

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	90 ml
fetal bovine serum (Hyclone)	10 ml
HT stock (100X)	1 ml
A stock	2 ml

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ HT

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	90 ml
fetal bovine serum (Hyclone)	10 ml
HT stock (100X)	1 ml

การเตรียมสารละลาย PEG ความเข้มข้น 50%

นำสารละลาย PEG (P7777, MW 1,300-1,600:Sigma)	5 g
น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	5 ml

การเตรียมน้ำยาแข็ง

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	5 ml
fetal bovine serum	4 ml
dimethyl sulfoxide	1 ml
ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0-4 °C	

การเตรียม feeder cell

feeder cell ทำหน้าที่ช่วยขจัดซากเซลล์ที่ตายแล้วโดยกระบวนการ phagocytosis และปล่อย growth factor เพื่อช่วยให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเร็วขึ้น feeder cell ที่ใช้จะเป็นเซลล์พวก splenocyte, peritoneum macrophage, thymocyte หรือ fibroblast การทำ feeder ใช้ม้ามของหนู swiss albino เพศเมีย อายุ 2 เดือน จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล อ.สาธิต จ.นครปฐม โดยจะใช้ 1 ตัว ต่อ 1 fusion เตรียมได้โดยทำการฆ่าหนูด้วยวิธีเคลื่อนกระดูกคอ (cervical dislocation) แล้วเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธี aseptic technique บดม้ามที่นำออกมาบนตะแกรงลวดตาถี่โดยใช้ด้าม (plunger) ของหลอดฉีดยาขนาด 5 ml เป็นตัวบด จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างใน RPMI 1640 ที่ความเร็ว 300 g นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้งก่อนนำ feeder cell ที่ได้มาใส่ใน HAT medium โดยปรับความหนาแน่นของ feeder cell ให้ได้ 10^6 cell/ml จากนั้นหยดลง plate ขนาด 96 หลุม ปริมาณหลุมละ 100 μ l รอไว้ให้หลังการเชื่อมเซลล์ โดยต้องทำ feeder cell ก่อนการเชื่อมเซลล์ 1 วัน และเก็บไว้ที่ตู้บ่ม CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน

การเตรียมสารละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

Coating buffer (carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.93 g
ละลายน้ำให้ได้ปริมาณครบ	1 l

PBS-T (PBS pH 7.4 + Tween 20 ความเข้มข้น 0.05 %)

KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	0.8 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g

KCl	0.2 g
ละลายน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ	1 l
Tween 20	0.5 ml

Blocking solution

Skim milk power (Gibco)	2 g
PBS-T	100 ml

Citrate phosphate buffer (pH 5.0)

Citric acid (monohydrate)	10.3 g
Sodium phosphate (Na_2HPO_4)	18.16 g
ละลายน้ำกลั่น	900 ml
ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยแล้วเติมน้ำให้ครบ 1 l	

สารละลายสับสเตรท [o-phenylenediamine (OPD) : Fermentas]

OPD in citrate phosphate buffer pH 5.0	
(อัตราส่วน 5 เม็ดต่อ substrate buffer 12.5 ml)	
ละลายใน citrate phosphate buffer pH 5.0	12.5 ml
เติม 30% H_2O_2	12.5 μl
ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง	

สารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยา (2N H_2SO_4)

H_2SO_4	39.2 ml
น้ำกลั่น	160 ml

สารละลายที่ใช้หาความเข้มข้นของโปรตีน

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1000 mg/ml)

Bovine serum albumin	2 g
น้ำกลั่น	2 ml

สารละลาย A

Na_2CO_3	2 g
สารละลาย 0.1 M NaOH	100 ml

สารละลาย B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

สารละลาย C

sodium-potassium tartrate	2 g
น้ำกลั่น	100 ml
เติมสารละลาย A:B:C (alkaline copper solution) ในอัตราส่วน 100:1:1	

การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGEMonomer solution

Acrylamide	15 g
Bisacrylamide	0.4 g
เติมน้ำ deionize ให้ครบ	50 ml

Stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)

Tris (FW 121.1)	9.075 g
เติมน้ำ deionize	38 ml
ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วย HCl	
เติมน้ำ deionize ให้ครบ	50 ml

Stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)

Tris (FW 121.1)	1.5 g
เติมน้ำ deionize	15 ml
ปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วย HCl	

เติมน้ำ deionize ให้ครบ	20 ml
-------------------------	-------

10% SDS

SDS (sodium dodesyl sufate)	2.5 ml
-----------------------------	--------

เติมน้ำ deionize ให้ครบ	25 ml
-------------------------	-------

10% ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.1 g
---------------------	-------

เติมน้ำ deionize ให้ครบ	1 ml
-------------------------	------

TEMED

สำหรับ TEMED (N,N,N'N' –tetramethyl ethylenediamine) ใช้ได้เลยโดยไม่ต้องทำให้เจือจางก่อนใช้

Loading buffer

Stacking gel buffer	1.25 ml
---------------------	---------

10% SDS	2 ml
---------	------

glycerol	1 ml
----------	------

bromphenol blue	1 mg
-----------------	------

dithiothreitol (DDT ; FW 154.2)	0.256 g
---------------------------------	---------

เติมน้ำ deionize ให้ครบ	5 ml
-------------------------	------

เก็บไว้ที่ -20 °C

Tank buffer (0.025 M tris , 0.192 M glycine, 0.1 % SDS pH 8.3)

Tris(FW 121.1)	3.028 g
----------------	---------

Glycine	14.41 g
---------	---------

SDS	1 g
-----	-----

เติมน้ำ deionize ให้ครบ	1 l
-------------------------	-----

Staining solution (0.025% coomassie brilliant blue R250, 40% methanol, 7% acetic acid)

Coomassie brilliant blue R	0.025 g
Methanol	400 ml
กวนจนกระทั่งละลายแล้วเติม acetic acid	70 ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 l

Destaining solution 1 (40% methanol, 7 % acetic acid)

methanol	400 ml
acetic acid	70 ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 l

Destaining solution 2 (5% methanol, 7 % acetic acid)

methanol	50 ml
acetic acid	70 ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 l

12 % polyacrylamide gel (10 ml)

30 % acrylamide	4.0 ml
resolving gel buffer	2.5 ml
น้ำ deionize	3.4 ml
10% SDS	0.1 ml
10% ammonium persulfate	50 µl
TEMED	5 µl

15 % polyacrylamide gel (10 ml)

30 % acrylamide	5.0 ml
resolving gel buffer	2.5 ml
น้ำ deionize	2.4 ml
10% SDS	0.1 ml
10% ammonium persulfate	50 µl

TEMED	5 μ l
-------	-----------

4 % polyacrylamide gel (10 ml)

30 % Acrylamide	1.3 ml
stacking gel buffer	2.5 ml
dd deionize	6.1 ml
10% SDS	0.1 ml
10% ammonium persulfate	50 μ l
TEMED	10 μ l

protein molecular weight marker (BIORAD)

myosin	200 kDa
β -galactosidase	116.25 kDa
Phosphorylase b	97.4 kDa
bovine serum albumin	66.2 kDa
ovalbumin	45 kDa
carbonic anhydrase	31 kDa
soybean trypsin inhibitor	21.5 kDa
lysozyme	14.4 kDa
aprotinin	7 kDa

protein molecular weight marker (Fermentas)

β -galactosidase	116 kDa
bovine serum albumin	66.2 kDa
ovalbumin	45 kDa
lactate dehydrogenase	35 kDa
restriction endonuclease <i>Bsp</i> 981	25 kDa
β -lactoglobulin	18.4 kDa
lysozyme	14.4 kDa

การเตรียมสารสำหรับปฏิกิริยา Western blot

Transfer buffer (25 mM tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol pH 8.3)

Tris	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200 ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 l

Amido black B

Amido black	10 g
Methanol	40 ml
Glacial acetic acid	10 ml
น้ำกลั่น	50 ml

Destain solution

Methanol	250 ml
Glacial acetic acid	100 ml
น้ำกลั่น	650 ml

Blocking solution

Skim milk powder (Gibco)	2 g
PBS-T	100 ml

Washing buffer

PBS buffer	1 l
เติม tween 20	0.5 ml

การทำ Western blot analysis

1. ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส (whatman :0.45 μm) ให้มีขนาดเท่ากับแผ่น resolving gel แล้ว equilibrate แผ่น resolving gel แผ่นไนโตรเซลลูโลส กระดาษกรอง จำนวน 2 แผ่น และแผ่นฟองน้ำ (fiter pad) จำนวน 2 แผ่น โดยแช่ใน transfer buffer นาน ประมาณ 15-30 นาที
2. วาง fiter pad ลงบน gel holder cassette แล้ววางทับเป็นชั้นๆ ต่อไปด้วย กระดาษกรอง resolving gel แล้ว equilibrate แผ่น resolving gel แผ่นไนโตรเซลลูโลส กระดาษกรอง จำนวน 2 แผ่น และแผ่นฟองน้ำ (fiter pad) จำนวน 2 แผ่น โดยแช่ใน transfer buffer นานประมาณ 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
3. นำชุด cassette ประกอบเข้ากับ electrode module แล้วนำไปใส่ลงใน buffer tank ที่มีชุดทำความเย็นบรรจุอยู่ภายใน ใส่ transfer buffer ลงไปให้ท่วม cassette และนำ buffer tank ที่ประกอบเรียบร้อยแล้วไปตั้งบน magnetic stirrer ที่ปรับความเร็วที่ประมาณ 30 rpm เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโปรตีน
4. ต่อเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้ากับชุด electrode module และเปิดสวิตช์โดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 V 90 mA นาน 16-18 ชั่วโมง โดยเมื่อครบเวลาให้ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส ส่วนหนึ่งย้อมด้วยสี amido black นาน 10 นาที ก่อนใช้ destain solution ล้างสีส่วนเกินออกเพื่อดูประสิทธิภาพการถ่ายโปรตีนส่วน resolving gel ที่ผ่านการถ่ายโปรตีนแล้วให้นำมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R -250
5. สำหรับแผ่นไนโตรเซลลูโลสอีกส่วนหนึ่งให้นำมาทำปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยนำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นาน ครั้งละ 3 นาที
6. เติม blocking solution ปริมาตร 10 ml ลงไปก่อนนำไป rotate ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นาน ครั้งละ 3 นาที
7. เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ไม่เจอจาง ลงไปก่อนนำไป rotate ที่ อุณหภูมิ ห้อง นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นาน ครั้งละ 3 นาที

8. เติม goat anti-mouse IgG- HRP โดยเจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1 : 10,000 ลงไปก่อนนำไป rotate ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง นาน ครั้งละ 3 นาที

9. เติมสารละลายสับสเตรท TMB (tetramethylbenzidine) แล้ว rotate เป็น เวลา 1 นาที หรือจนกระทั่งปรากฏแถบสีน้ำตาลเกิดขึ้น จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารสำหรับการทดลอง dot ELISA

PBS-T (PBS pH 7.4 + Tween 20 ความเข้มข้น 0.05 %)

KH_2PO_4	0.2 g
NaCl	0.8 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
ละลายน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ	1 l
Tween 20	0.5 ml

Blocking solution

Skim milk power (Gibco)	2 g
PBS-T	100 ml

การเตรียมสารสำหรับทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

Binding buffer (20 mM sodium-phosphate pH 7.0)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.27 g
Na_2HPO_4	0.94 g
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 l

Elution buffer (0.1 M citric acid pH 3.0)

Citric acid	10.507 g
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 l

การเตรียมสารสำหรับ conjugate โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ กับ biotin

PBS (0.1M phosphate/ 0.15 M NaCl pH 7.2)

KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
ละลายน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ	1 l

0.1M NaHCO₃ pH 8.2

NaHCO ₃	8.394 g
ละลายน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ	1 l

สารละลาย biotiny-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS, Sigma)

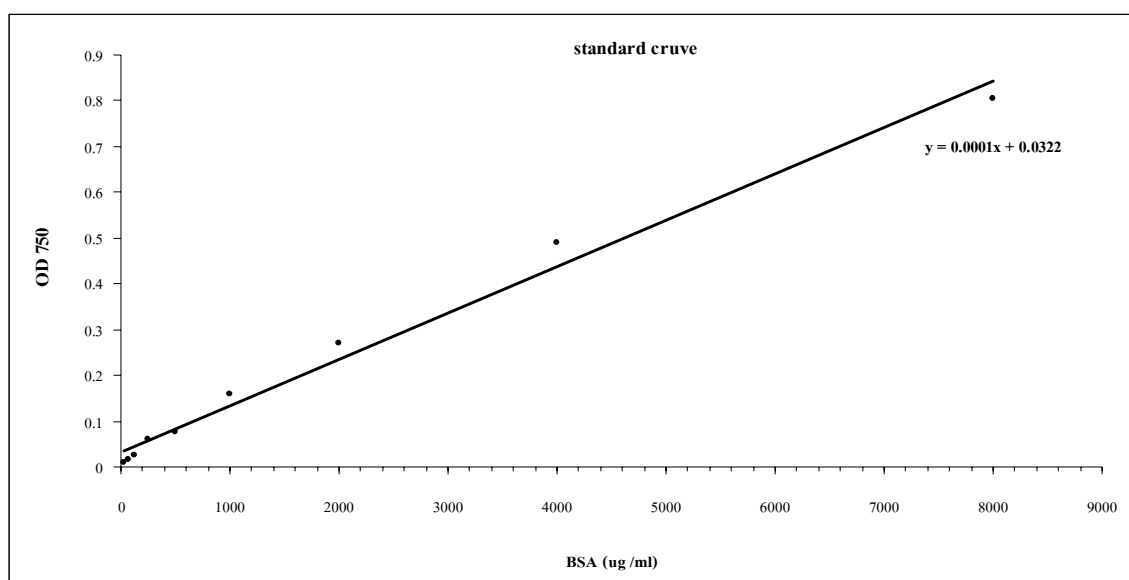
biotiny-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS, Sigma)	1 mg
dimethylsulfoxide	1 ml
ละลายใน glass tube	

ภาคผนวก จ

กราฟโปรตีนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ จ1 แสดงค่า OD ที่ 750 nm ของปริมาณ โปรตีนมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น

ปริมาณ โปรตีน (µg/ml)	ค่า OD 750 nm
8,000	0.804
4,000	0.491
2,000	0.270
1,000	0.159
500	0.075
250	0.059
125	0.024
62.5	0.016
31.25	0.008



กราฟผนวกที่ จ1 แสดงค่า OD ที่ 750 nm เปรียบเทียบกับปริมาณ โปรตีนในการสร้างกราฟ
มาตรฐาน