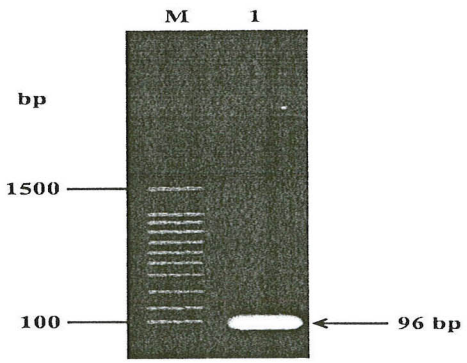
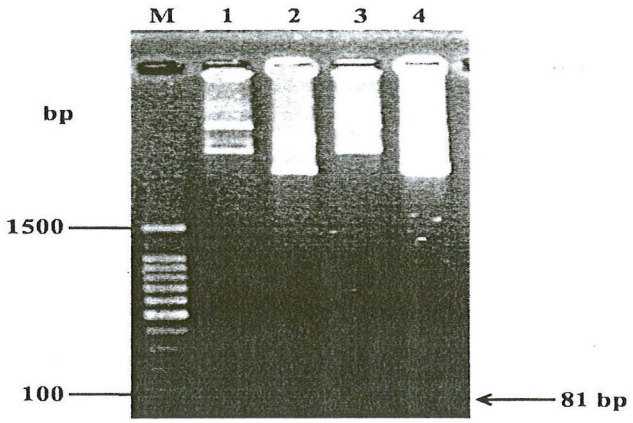
3. ผลการวิจัย

1. ตรวจสอบ sequence ของโคลน pC9 และออกแบบ primer และเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

จากการนำพลาสมิดลูกผสม pCANTAB-WBP ของโคลน PC9 (เอื้อมนัส, 2545) มาตรวจสอบการเรียงตัวของกรดนิวคลิอิคพบว่ามีการเรียงตัวเหมือนกับที่เคยวิเคราะห์ไว้จึงกำหนด primerเพื่อใช้เพิ่มจำนวนยีนคือ PC9-FB: 5′GGGATCCATGCAACAAGAA 3′และ PC9-RS: 5′AGTCGACCTTACATGGCAATT3′และเพิ่มปริมาณยีน WBP ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer PC9-FB และ PC9-RS ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sal* I พบว่ายีน WBP ดังกล่าวมีขนาดประมาณ 96 bp ดังรูปที่1 แล้วทำการเชื่อมยีนเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM-T-easy® ในแบคทีเรีย*E.coli* สายพันธุ์ Top 10F'และทำการเชื่อมยีน WBP เข้าสู่พลาสมิด pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Top 10F' เมื่อคัดเลือกโคลนแบบสุ่ม พบโคลนซึ่งมียีน WBP จำนวน 2 โคลน จาก 10 โคลน เมื่อนำโคลนดังกล่าวไปตรวจสอบด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal* I พบว่าโคลนทั้งสองมียีน WBP แทรกอยู่ ดังแสดงในรูปที่ 2 และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคีโอไทด์ของยีน WBP บนพลาสมิด เวกเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Top 10F' โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับยีน WBP ดั้งเดิมของโคลน PC9 ที่มีอยู่ในคลังยีน (เอื้อมนัส, 2545) พบว่ายีนดังกล่าวมีความเหมือนกัน จากนั้นทำการย้ายดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-WBP เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อใช้ในการเตรียมโปรตีน WBP ในขั้นต่อไป



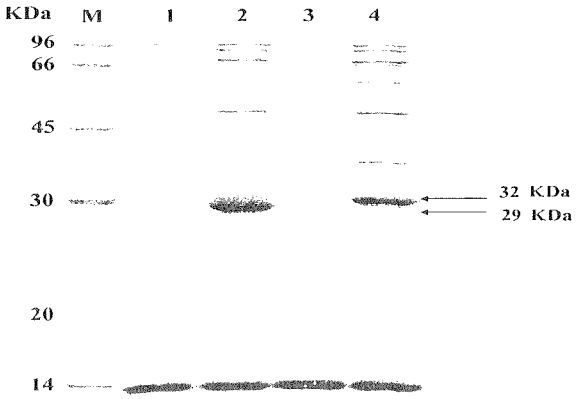
รูปที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน WBP จากการสังเคราะห์โดยวิธี PCR มีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น *Bam*HI และ *Sal* I โดยวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis แถว M: 100 bp DNA ladder แถวที่ 2 แถบดีเอ็นเอยีน WBP



รูปที่ 2 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-WBP โคลนหมายเลข 1 และ 8 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal* I โดยวิเคราะห์บน1.5% agarose gel electrophoresis แถว M: 100 bp DNA ladder แถวที่ 1 และ 3: ดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- WBP ที่ยังไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถวที่ 2 และ 4: ดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- WBPที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal* I ตามลำดับ

2. การแสดงออกส่วนของยีน WSSV binding protein (WBP)

การเตรียมโปรตีนลูกผสม WBP จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-WBP จากดีเอ็นเอลุกผสม pGEX-WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้โปรตีน GST ที่สร้างจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าโปรตีน GST-WBP ที่ได้เมื่อนำมาแยกบน SDS-PAGE พบว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน โดยเป็นน้ำหนักของโปรตีน GST ประมาณ 29 kDa และเป็นน้ำหนักของโปรตีน WBP ประมาณ 3 kDa ดังรูปที่ 3 โปรตีนที่ผลิตได้ในรูปของโปรตีนรวม (total protein) นำไปไดอะไลซิสในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์ต่อไป ในการทดลองนี้ได้พยายามตัด WBP ออกจาก GST โดย Thrombin หากแต่ตัดไม่สำเร็จ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ GST-WBP เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไปและใช้ GST เป็นโปรตีนควบคุม



รูปที่ 3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST และ GST-WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี เอสดีเอส (14% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue แถว M: โปรตีนมาตรฐาน, แถวที่1: โปรตีนก่อนการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX, แถวที่2: โปรตีนหลังการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX , แถวที่ 3: โปรตีนก่อนการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX-WBP, แถวที่4: โปรตีนหลังการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX-WBP

3. การลบล้างฤทธ์ของ WSSV (Neutralization of WSSV infection)

3.1 การทดสอบความสามารถในการลบฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน GST-WBP แบบ *in vivo*

จากการทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ของเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) โดยใช้โปรตีนลูกผสม GST-WBP ที่ผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วในปริมาณ 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งได้ผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) อัตราความเข้มข้น 1×10^{-6} ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 h โดยวิธีฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อบริเวณปล้องที่สามหรือสี่ของกุ้งขาว น้ำหนัก 13-15 กรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยโปรตีน GST ในปริมาณ 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งได้ผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) อัตราความเข้มข้น10^{-6} ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง, กลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วย PBS, pH 7.4 ที่ผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) อัตราความเข้มข้น 1×10^{-6} ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เช่นกัน (Positive control) และกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วย PBS, pH 7.4 อย่างเดียว (Negative control) โดยมีการบันทึกอัตราการมีชีวิตรอดเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่ากลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน GST-WBPในปริมาณ 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) อัตราความเข้มข้น 1×10^{-6} นั้น มีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 33.33%, 40%, 40%, 20% และ 0% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับโปรตีน GST ในปริมาณ 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/ตัว ที่ผ่านการบ่มกับเชื้อ White

Spot Syndrome Virus (WSSV) อัตราความเข้มข้น 1 x 10^{-6} , กลุ่มที่เป็น Positive control และกลุ่มที่เป็น Negative control นั้น มีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 6.66%, 6.66% , 20%, 33.33%, 0%, 0% และ 100% ตามลำดับ ดังรูปที่4 โดยมีค่า RPS (Relative percentage survival) ของโปรตีน GST-WBP ในแต่ละกลุ่มเป็น 33.33%, 40%, 40%, 20% และ 0% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็น Positive control ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตลูกผสม GST-WBP และโปรตีน GST ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV อัตราความเข้มข้น 1 x 10^{-6}

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
GST-WBP (1 μg)	66.67	33.33
GST (1 μg)	93.34	6.66
PBS + WSSV (1 x 10^{-6})	100.00	
GST-WBP(5 μg)	60.00	40.00
GST(5 μg)	93.34	6.66
PBS + WSSV (1 x 10^{-6})	100.00	
GST-WBP(10μg)	60.00	40.00
GST(10 μg)	80.00	20.00
PBS + WSSV (1 x 10^{-6})	100.00	
GST-WBP(20 μg)	80.00	20.00
GST(20 μg)	67.67	33..33
PBS + WSSV (1 x 10^{-6})	100.00	0
GST-WBP(40 μg)	100.00	0
GST(40 μg)	100.00	0
PBS + WSSV (1 x 10^{-6})	100.00	0

RPS= relative percent survival

4. การทำ full-length clones ของ pC9 ซึ่งเป็น WSSV binding protein ทำได้โดยวิธี RACE (rapid amplification of cDNA ends) (Invitrogen, USA.)

ใช้ total RNAปริมาณ 5 μg จากกุ้งติดเชื้อ เชื่อมเข้ากับ GeneRacer™ RNA Oligo การทำ 5'end RACE ของยีนจะใช้ specific primer GeneRacer™ 5' Primer กับGeneRacer™ 5' Nested primer และ reverse gene specific primer 1 และ2 ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาโดยใช้ลำดับของ DNA sequence จากยีน PC9 ซึ่งสามารถทำโดยทำ 1st PCR ใช้ specific primer GeneRacer™ 5' และ reverse gene specific primer1 และในการทำ 2nd PCR โดยใช้ GeneRacer™ 5' Nested

primer และ reverse gene specific primer2 จากนั้นจึงโคลน PCR product เข้า sequencing vector เพื่อหาการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิคต่อไป การทำ 3'end จะใช้ forward gene specific primer 1, forward gene specific primer 2 สังเคราะห์ขึ้นมาโดยใช้ลำดับของ DNA sequence จากวิทยานิพนธ์ของ เอื้อมนัส อินทรผาด (2545) กับ GeneRacer™ 3' Primer และ GeneRacer™ 3' Nested primer การทำเช่นเดียวกับการทำ 5' end RACE ผลการทดลองได้ยีนที่มีขนาดเท่ากับโคลนเดิม PC9 คือประกอบด้วย 171 bp และ putative amino acids 25 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 4

```
1   GGCACGAGGATGCAACAAGAACCTTTGTTATCGCTAATTCACCTCGAGTGGTGCCGACGA
                M  Q  Q  E  P  L  L  S  L  I  H  L  E  W  C  R  R

61  GGTCGAAGAACTGGAATTGCCATGTAACCAACCCCATTTAGAGGTATCAGCGGTGGATTC
      G  R  R  T  G  I  A  M  *

121 TTGTATTTATTTTCTGTGGAGAACTCATTTAATTGTTTATCGATTGA
```

รูปที่ 4. การเรียงตัวของกรดนิวคลีอิคและกรดอะมิโน ของโปรตีนที่จับกับไวรัสตัวแดงดวงขาว

5. การค้นหาแหล่งของยีน WBP

นำโครโมโซมของกุ้งกุลาดำทั้งที่ติดเชื้อ WSSV และไม่ติดเชื้อมาเพิ่มจำนวนด้วย PCR ที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลองพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 bp และเมื่อนำไปตรวจหาการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิคพบว่ามีการเรียงตัวเช่นที่แสดงในรูปที่ 4 จึงแสดงว่า WBPเป็นยีนที่พบในกุ้ง

6. การกระตุ้นการสร้างโปรตีน WBP จากโคลน pC9 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151

จากการที่ GST สามารถกระตุ้นการป้องกันกุ้งได้บ้าง และจากการที่พบว่ายีนWBP ที่มีอยู่เป็นยีนสายเต็มแล้วดังนั้นจึงเตรียม WBP เพียงอย่างเดียวโดยไม่มี GST เชื่อมอยู่โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีน WBP จากดีเอ็นเอลูกผสม pCANTAB-WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 โดยใช้โปรตีนที่สร้างจากพลาสมิด pCANTAB ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าโปรตีน WBP ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3 กิโลดาลตันในขณะที่โปรตีนที่สร้างจากพลาสมิด pCANTAB ซึ่งทำหน้าที่เป็นกลุ่มควบคุมนั้นไม่มีแถบของโปรตีนดังกล่าวปรากฏตรงตำแหน่งบริเวณเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อนำ column ของ Sephadex™ G-25 ขนาด 5 ml ต่อเข้ากับเครื่อง AKTAprime plus (GE Healthcare Bio-Sciences

AB, Sweden) แล้วฉีดสารละลายโปรตีน WBP ส่วนที่เป็นของเหลวเข้าตัวเครื่องตรงตำแหน่งสำหรับฉีดสารตัวอย่าง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 นาที โปรตีน WBP จะถูกชะออกมาด้วยสารละลาย PBS อยู่ในช่วงของหลอดทดลองการเก็บตัวอย่างที่ 3-5 และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย 14% SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 3 kDa ดังแสดงในรูปที่ 5

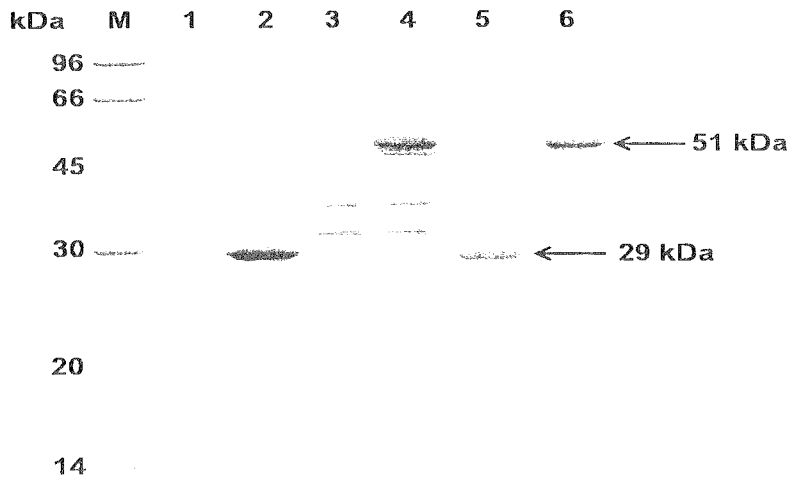
รูปที่ 5 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี เอสดีเอส (14% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue
แถว M: โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 1: โปรตีนหลังการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pCANTAB
แถวที่ 2: โปรตีนก่อนการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pCANTAB-WBP
แถวที่ 3: โปรตีนหลังการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pCANTAB-WBP
แถวที่ 4: โปรตีน WBP (3 kDa) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-25

7. การกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-VP26 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-VP26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

การกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-VP26 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-VP26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้โปรตีน GST ที่สร้างจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าโปรตีน pGEX-VP26 ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51 kDa โดยเป็นน้ำหนักของโปรตีน GST ประมาณ 29 kDa และเป็นน้ำหนักของโปรตีน VP26 ประมาณ 22 kDa ดังแสดงในรูปที่ 6

เมื่อทำการแยกโปรตีนลูกผสม GST-VP26 บน 14% SDS-PAGE แล้วตัดเอาแถบของโปรตีนลูกผสมดังกล่าวมาบดในน้ำปราศจากไอออน (DI water) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยก

เอาสารละลายส่วนใสออกมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนและทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (SDS – PAGE) พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 51 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 6

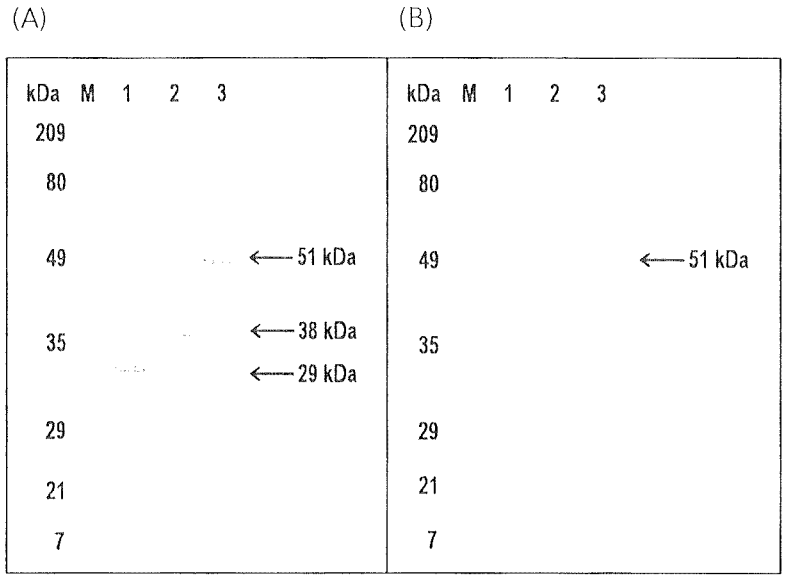


รูปที่ 6 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST และ GST-VP26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (14% SDS-PAGE) ย้อม ด้วยสี coomassie brilliant blue แถว M: โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1: สารละลายเซลล์ก่อนการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลนpGEX แถวที่ 2: สารละลายเซลล์หลังการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX แถวที่ 3: สารละลายเซลล์ก่อนการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX-VP26 แถวที่ 4: สารละลายเซลล์หลังการชักนำด้วย 1 mM IPTG ของโคลน pGEX-VP26 แถวที่ 5. โปรตีน GST ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว (29 kDa) แถวที่ 6: โปรตีน GST-VP26 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว (51 kDa)

8. การทดสอบการจับกันของโปรตีน WBP กับ โปรตีนลูกผสม GST-VP26 โดยการใช้เทคนิค Western blotting

เมื่อทำการแยกโปรตีน GST (Protein control), GST-VP9 (Negative protein control) และโปรตีนลูกผสม GST-VP26 บน 14% SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 7A แล้วย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ในโตรเซลลูโลสเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ได้มาบ่มกับโปรตีน WBP-biotin-labeled เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วบ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง ด้วย Streptavidin- conjugated Alkaline-phosphatase และเมื่อนำแผ่นเมมเบรนดังกล่าวมาบ่มกับสารละลาย color substrate พบว่าบนแผ่นเมมเบรนเกิดแถบสีม่วงตรงบริเวณตำแหน่งของโปรตีนลูกผสม GST-VP26 (แถวที่ 3) ขนาด

ประมาณ 51 kDa ในขณะที่ไม่เกิดแถบสีม่วงตรงบริเวณตำแหน่งของโปรตีนลูกผสม GST (29 kDa) และ GST-VP9 (38 kDa) (แถวที่ 1 และ 2) ดังแสดงในรูปที่ 7B



รูปที่ 7 แสดงการวิเคราะห์แถบของโปรตีนลูกผสม GST, GST-VP9 และ GST-VP26 ด้วย 14% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue ก่อนทำการย้ายไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (A) และแสดงแถบของโปรตีนลูกผสม GST-VP26 บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนเมื่อทดสอบการกันกับ WBP-biotin-labeled protein แล้วตรวจสอบด้วยการบ่มกับ Streptavidin-conjugated Alkaline-phosphatase โดยอาศัยเทคนิค Western blotting (B)

แถว M (A และ B): โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่1 (A และ B): โปรตีน GST (29 kDa)

แถวที่2 (A และ B): โปรตีน GST-VP9 (38 kDa)

แถวที่3 (A และ B): โปรตีน GST-VP26 (51 kDa)

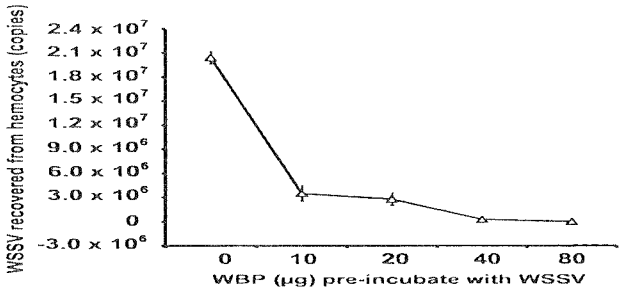
9. การศึกษาสมบัติของโปรตีน WBP ที่ผลิตจากโคลน pC9 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 กับความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP แบบ *in vitro*

เมื่อนำโปรตีน WBP ปริมาณ 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวประมาณ $1.6x10^8$ copiesซึ่งคำนวณจากปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายผสมดังกล่าวมาบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดประมาณ $3.0x10^6$ เซลล์ ต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการล้างไวรัสตัวแดงดวงขาวส่วนที่ไม่เกาะกับเซลล์ออกด้วย PBS แล้วละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย PBS เพื่อ

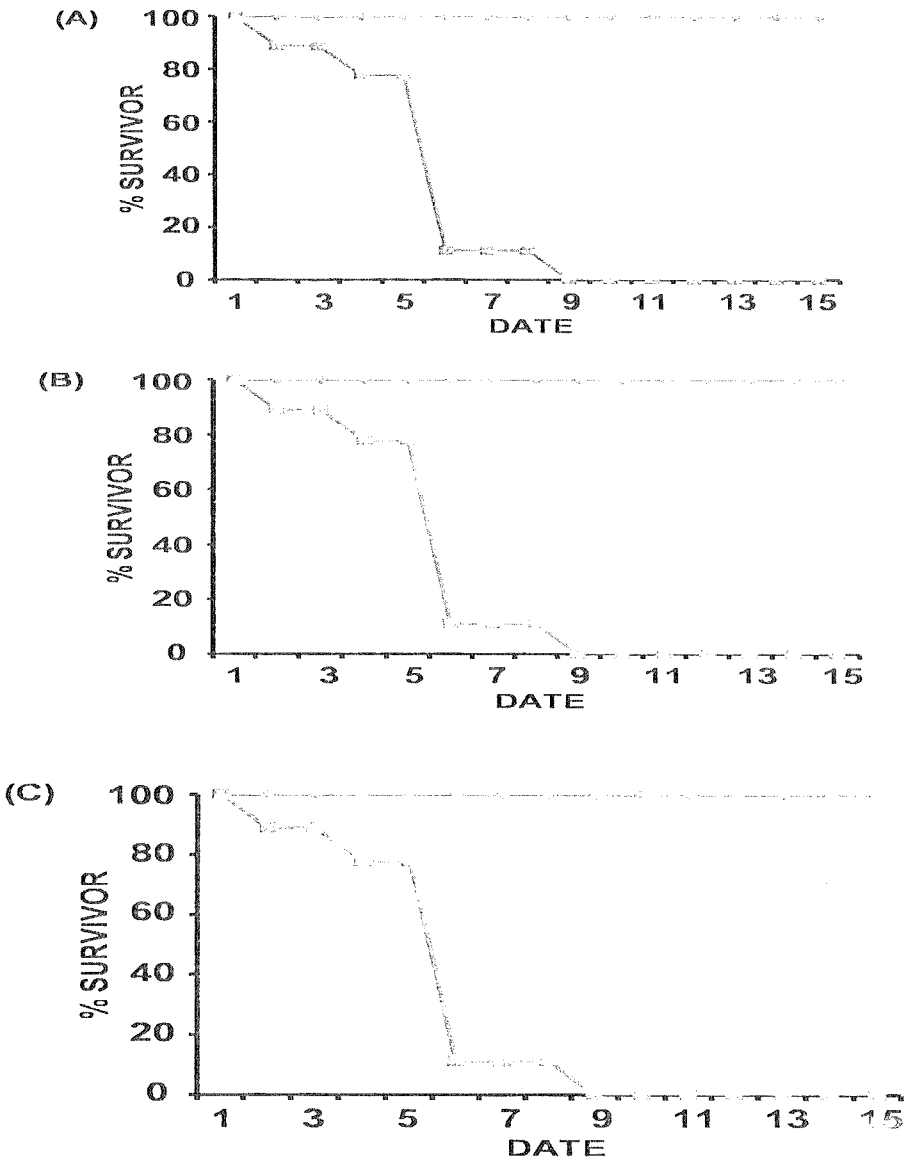
นำไปต้มในน้ำเดือดสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการหาปริมาณของไวรัสที่เหลือโดยการใช้เทคนิค Real-time PCR แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าโปรตีน WBP ที่ปริมาณ 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม มีผลทำให้จำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดลดลงเหลือเท่ากับ $3.5x10^{6}$, $2.8x10^{6}$, $2.8x10^{5}$ และ $6.0x10^{2}$ copies ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น Positive control ซึ่งมีจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดได้เท่ากับ $2.0x10^{7}$ copies ดังแสดงในรูปที่ 8

10. การทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP แบบ *in vivo*

จากการทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ของเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) โดยใช้โปรตีน WBP ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วในปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม ซึ่งได้ผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) จำนวน 1.6×10^{3} copies ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวิธีฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อบริเวณปล้องที่สามหรือสี่ของกุ้งขาวน้ำหนัก 13-15 กรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มซึ่งฉีดด้วย PBS, pH 7.4 ที่ผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) จำนวน 1.6×10^{3} copies ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเช่นกัน (positive control) และกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วย PBS, pH 7.4 อย่างเดียว (Negative control) โดยมีการบันทึกอัตราการมีชีวิตรอดเป็นระยะ เวลา 15 วัน พบว่ากลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน WBP ในปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) จำนวน 1.6×10^{3} copies นั้น มีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 89%, 85%, และ 73% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่เป็น positive control และกลุ่มที่เป็น negative control นั้น มีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 0% และ 100% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยมีค่า RPS (relative percentage survival) ของโปรตีน WBP ในแต่ละกลุ่มเป็น 89%, 85% และ 73% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็น positive control ดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 10



รูปที่ 8 แสดงผลการหาจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวหลังจากการทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ด้วยโปรตีน WBP ที่ปริมาณ 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม (mean ±SD และ n=3)

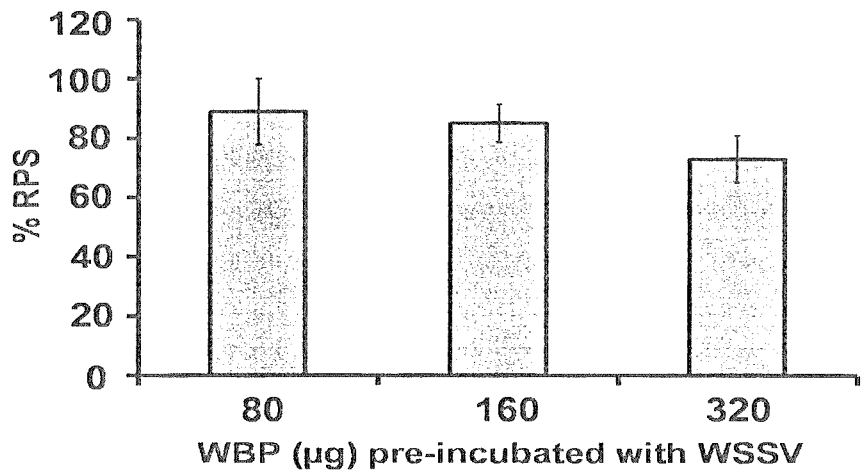


รูปที่ 9 แสดงเปอรเซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดโปรตีน WBP ปริมาณ 80 (A), 160 (B) และ320 (C) ไมโครกรัม/ตัวซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV จำนวน 1.6×10^3 copies (mean ±SD และ n=3)

(PBS buffer, WSSV+PBS buffer, WSSV + WBP)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตีน WBP ปริมาณ 80, 160, และ 320 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV จำนวน 1.6 x 10^3 copies

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
WBP (80mg)+WSSV	11.0	89.0
PBS + WSSV	100.0	
WBP(160mg)+WSSV	15.0	85.0
PBS + WSSV	100.0	
WBP(320mg)+WSSV	27.0	73.0
PBS + WSSV	100.0	



รูปที่ 10 แสดงค่า relative percentage survival (RPS) ของกุ้งขาวหลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตีน WBP ปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV จำนวน 1.6 x 10^3 copies (mean ±SD และ n=3)

11. การตรวจหาปริมาณไวรัสที่เหลือของกุ้งที่รอดหลังจากการทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

เมื่อนำกุ้งขาวที่รอดชีวิตหลังจาก 15 วัน ของการฉีดด้วยโปรตีน WBP ปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV จำนวน 1.6 x 10^3 copies มาผ่าเอาหัวใจของกุ้งเพื่อทำการบดในสารละลาย TN buffer แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการหาปริมาณของไวรัสที่เหลือโดยการใช้เทคนิค Real-time PCR แล้วนำข้อมูล