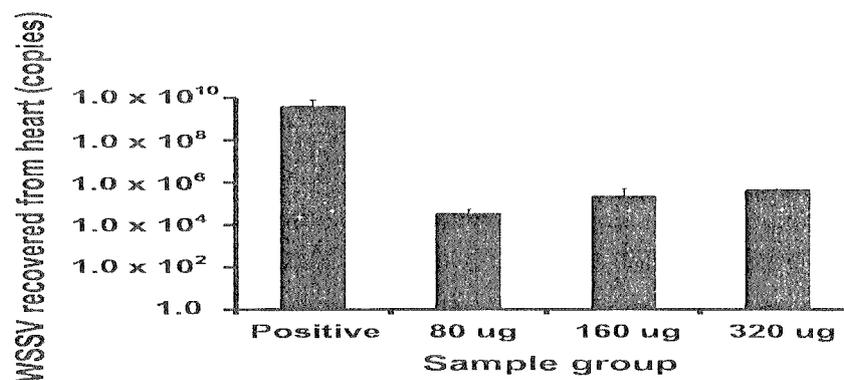


ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าหัวของกุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับการฉีดโปรตีน WBP ปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV จำนวน  $1.6 \times 10^3$  copies มีจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่ที่เท่ากับ  $3.1 \times 10^4$ ,  $2.1 \times 10^5$  และ  $4.4 \times 10^5$  copies/mg ของน้ำหนักหัวใจกุ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น positive control ซึ่งมีจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวเท่ากับ  $3.7 \times 10^9$  copies/mg ของน้ำหนักหัวใจกุ้ง ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงผลการหาจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เหลือในหัวใจของกุ้งขาวที่รอดชีวิต หลังจาก 15 วันของการทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ไวรัส WSSV ด้วยโปรตีน WBP ที่ปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/ตัว (mean  $\pm$ SD และ n=3)

#### 4. วิจัยารณ์ผลการวิจัย

##### 4.1 การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน WBP กับ โปรตีน VP26

White Spot Syndrome Viral Binding Protein หรือ WBP เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 3 kDa ซึ่งถูกค้นพบจากการนำเทคนิค phage display มาใช้ในการค้นหาชิ้นที่มีปฏิกริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาว (เชื้อมนัส, 2545) โดยการนำ cDNA library จากเลือดกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มาแสดงออกบน phage แล้วนำมาใช้ในการคัดเลือกชิ้นซึ่งผลิตโปรตีนที่สามารถจับกับไวรัสได้จากการศึกษาในเบื้องต้นของเชื้อมนัส (2545) พบว่า โปรตีน WBP สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีนของไวรัสขนาดประมาณ 19 kDa อย่างไรก็ตามการศึกษาในระดับดังกล่าวยังไม่สามารถที่จะระบุได้ว่าโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวขนาดประมาณ 19 kDa นี้เป็นโปรตีนชนิดใดของไวรัสตัวแดงขาวในปัจจุบัน ทั้งนี้โปรตีนที่มีความน่าจะเป็นไปได้สูงที่จะจับกับโปรตีน WBP คือโปรตีนในกลุ่มซึ่งอยู่บนเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัส (envelope) ที่เชื่อว่าไวรัสจะอาศัยโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวเป็นส่วนสำคัญในการยึดเกาะและเชื่อมต่อกับผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน (Tang *et al.*, 2007) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า

โปรตีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่เป็น Envelope ของไวรัสมีอยู่ประมาณ 21 ชนิด โดยจะพบการกระจายตัวของโปรตีนชนิด VP26 และ VP28 มากที่สุดคิดเป็นสองในสามของโปรตีนในกลุ่มดังกล่าว (Xie *et al.*, 2006 อ้างโดย Tang *et al.*, 2007) อีกทั้งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตามทฤษฎีประมาณ 22 kDa (Van Hulten *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2006) ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกับ 19 kDa มากที่สุด จึงทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่โปรตีน WBP จะสามารถจับกับโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อนำโปรตีนลูกผสม rVP28 มาทดสอบการจับกับโปรตีนที่สกัดได้จากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งไม่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวที่นำมาทดสอบจัดเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือด (shrimp hemocyte membrane, SHM) ผลจากการทดลองพบว่าโปรตีนลูกผสม rVP28 สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน Cyclic AMP-regulated protein-like protein, GTP-binding protein yptV5 (Rab7) และ Hemocyte kazal-type proteinase inhibitor (Sritunyalucksana *et al.*, 2006) โดยเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม SHM ทั้งสามชนิดนี้มาเปรียบเทียบกับโปรตีน WBP พบว่าไม่ปรากฏส่วน Conserve sequence อยู่บนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าโปรตีน WBP ไม่ได้เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น receptor ซึ่งอยู่บนผนังเมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดเหมือนกับโปรตีนในกลุ่ม SHM ทั้งสามชนิด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกโปรตีน VP26 มาใช้ในการทดสอบการจับกับโปรตีน WBP โดยการผลิตโปรตีนลูกผสม GST-VP26 มาทดสอบการจับกับโปรตีน WBP ซึ่งผ่านการเชื่อมด้วย Biotin โดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า western blotting ซึ่งผลจากการทดสอบพบว่าบนแผ่นเมมเบรนเกิดแถบสีม่วงตรงบริเวณตำแหน่งของโปรตีนลูกผสม GST-VP26 (51 กิโลดาลตัน) ในขณะที่ไม่เกิดแถบสีม่วงตรงบริเวณตำแหน่งของโปรตีน GST (29 kDa) ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมที่ใช้เป็นตัวระบุว่าแถบสีม่วงของโปรตีนลูกผสม GST-VP26 ที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้มีผลมาจากโปรตีน GST หากแต่เกิดจากการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง โปรตีน VP26 และโปรตีน WBP นั่นเอง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโปรตีน WBP ไม่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม GST-VP9 (38 kDa) ซึ่งใช้เป็นโปรตีน Negative control ของการทดลอง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าโปรตีน VP9 เป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีคุณสมบัติไม่เกี่ยวกับโครงสร้าง (Non-structural protein) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีน (transcriptional regulation) (Liu *et al.*, 2006) ดังนั้นการที่โปรตีน WBP ไม่สามารถจับกับโปรตีน GST-VP9 ได้เป็นสิ่งชี้ให้เห็นว่าโปรตีน WBP สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน VP26 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีคุณสมบัติเกี่ยวกับโครงสร้าง (Structural protein) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (Escobedo *et al.*, 2008) และมีตำแหน่งอยู่บนเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัส (Envelope) (Tang *et al.*, 2007) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลตามทฤษฎีประมาณ 22 กิโลดาลตัน (Van Hulten *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2006) ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาดประมาณ 19 kDa ที่ เชื้อมนัส

(2545) ได้ทำการทดลองไว้ในเบื้องต้น ดังนั้นจึงอาจจะสรุปได้ว่าโปรตีนของไวรัสขนาดประมาณ 19 kDa ที่สามารถจับโปรตีน WBP ได้อย่างจำเพาะคือโปรตีน VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปัจจุบัน

#### 4.2 การทดสอบความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP แบบ *In vitro*

การเข้าติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์เจ้าบ้านเริ่มต้นขึ้นเมื่อไวรัสเข้ายึดเกาะและเชื่อม ต่อโปรตีนกับผนังเซลล์ (Cell membrane) ของเซลล์เจ้าบ้าน (Yuan *et al.*, 2007) จากนั้นไวรัสจะทำการปลดปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปนิวเคลียสและมีการเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัสมากขึ้นจนเซลล์เกิดการเสียหาย (Marielle *et al.*, 2002; Namita *et al.*, 2007; Escobedo *et al.*, 2008) การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างของไวรัสเป็นสิ่งสำคัญ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเข้าติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์เจ้าบ้านมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกลุ่มซึ่งอยู่บนเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัส (Envelope) ที่เชื่อว่าไวรัสจะอาศัยโปรตีนในกลุ่มดังกล่าว เป็นส่วนสำคัญในการยึดเกาะและเชื่อมต่อกับผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน (Tang *et al.*, 2007) ทั้งนี้หากสามารถค้นพบวิธีการในการขัดขวางการทำงานของโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวของไวรัสได้ ก็อาจจะเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่าวิธีการดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ในการป้องกันการเข้าติดเชื้อของไวรัสได้ต่อไปในอนาคต ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อนำโปรตีน PmRab7 ที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีนของไวรัสชนิด VP28 มาทดสอบคุณสมบัติการหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เป็นสัตว์ในการทดลองพบว่าโปรตีน PmRab7 สามารถหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัสแล้วทำให้กุ้งมีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 85% (Sritunyalucksana *et al.*, 2006) ดังนั้นการที่พบว่าโปรตีน WBP สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน VP26 ซึ่งเป็นโปรตีนชนิด Envelope ของไวรัสตัวแดงดวงขาวเช่นเดียวกับ VP28 ก็อาจจะเป็นไปได้เช่นกันที่โปรตีน WBP จะมีความสามารถในการขัดขวางการเข้าติดเชื้อหรือหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำโปรตีน WBP มาทดสอบความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัส โดยในเบื้องต้นได้ทำการศึกษาความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ในรูปแบบของ *In vitro* เพื่อเป็นการศึกษาแนวโน้มในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ของโปรตีน WBP ที่มีต่อไวรัสก่อนที่จะทำการทดสอบการหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัสในรูปแบบของ *in vivo* ซึ่งจากรายงานผลการทดลองของ Yuan และคณะ (2007) เมื่อนำ porcine polyclonal antiserum ปริมาณ 20, 60 และ 120 ไมโครกรัม มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ  $3.0 \times 10^6$  copies แล้วนำไปบ่มต่อกับ primary cell ของเซลล์ lymphoid พบว่า Porcine polyclonal antiserum สามารถหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวและส่งผลให้จำนวนของไวรัสที่สามารถเกาะและยึดจับกับ primary cell

ของเซลล์ Lymphoid มีจำนวน copies ของไวรัสลดลงตามปริมาณ antiserum ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำโปรตีน WBP ปริมาณ 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม มาทำการทดสอบคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ของไวรัส ซึ่งเมื่อนำโปรตีน WBP ปริมาณต่างๆ มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาว ประมาณ  $1.6 \times 10^8$  copies ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายผสมดังกล่าวมาบ่มกับเซลล์เม็ดเลือดประมาณ  $3.0 \times 10^6$  เซลล์ ต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าโปรตีน WBP สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว และส่งผลให้จำนวนของไวรัสที่สามารถเกาะและยึดจับกับเซลล์เม็ดเลือด (Hemocytes) มีจำนวน copies ของไวรัสลดลงตามปริมาณของโปรตีน WBP ที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือโปรตีน WBP ที่ปริมาณ 80 ไมโครกรัม สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีที่สุด ซึ่งทำให้จำนวนของไวรัสลดลงเหลือเท่ากับ  $6.0 \times 10^2$  copies เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น positive control ซึ่งมีจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถเกาะกับเซลล์เม็ดเลือดได้ เท่ากับ  $2.0 \times 10^7$  copies ดังนั้นการศึกษาคูณสมบัติของโปรตีน WBP ในเบื้องต้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีน WBP เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวได้จริง

#### 4.3 การทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP แบบ *In vivo*

จากการทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP ในรูปแบบ *in vitro* ซึ่งให้เห็นว่าโปรตีน WBP เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวได้จริง ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงมุ่งประเด็นไปที่การทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP ในรูปแบบ *in vivo* โดยการใช้อุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เป็นสัตว์ในการทดลอง ซึ่งจากรายงานผลการทดลองของ Kim และคณะ (2004) เมื่อนำ anti-TrVP28:19 IgY ปริมาณ 10, 100 และ 500 ไมโครกรัม มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวจำนวนความเข้มข้น  $1 \times 10^{-7}$  ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วนำไปฉีดในกุ้ง *Penaeus chinensis* เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่า anti-TrVP28:19 IgY ที่ปริมาณ 100 ไมโครกรัม สามารถทำให้อุ้งมีอัตราการมีชีวิตรอดมากที่สุดเท่ากับ 85% ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำโปรตีน WBP ปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม มาทำการทดสอบโดยการนำโปรตีน WBP ที่ปริมาณต่างๆ มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวจำนวน  $1.6 \times 10^3$  copies ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปฉีดในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าโปรตีน WBP ที่ปริมาณ 80 ไมโครกรัม สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วทำให้อุ้งมีอัตราการมีชีวิตรอดมากที่สุดโดยมีค่า RPS (relative percentage survival) เท่ากับ 89% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีน WBP เข้าไปจับกับโปรตีน VP26 ของไวรัสแล้วทำให้โครงสร้างหรือรูปร่างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป (Conformational change) ส่งผลให้ประสิทธิ

ภาพในการจับกับ receptor บนผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านและการเพิ่มจำนวนของไวรัสลดน้อยลง (Li *et al.*, 2005) จึงทำให้กึ่งมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ในรูปแบบ *in vivo* ดังกล่าวนี้อาจมีการใช้ปริมาณโปรตีน WBP ที่มากเกินไป ก็จะทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของกึ่งมีค่า RPS ลดต่ำลงไปด้วย เนื่องจากปริมาณโปรตีน WBP ที่มากจนเกินไป (160 และ 320 ไมโครกรัม) อาจจะมีความเป็นพิษต่อตัวกึ่ง ซึ่งผลจากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าหากมีการใช้โปรตีน WBP ในปริมาณที่เหมาะสมมาทำการลบล้างฤทธิ์ของไวรัส โปรตีนดังกล่าวจะสามารถช่วยในการป้องกันการติดเชื้อของไวรัสได้

นอกจากนี้เมื่อนำหัวใจของกึ่งที่รอดหลังจากการทดสอบมาตรฐานตรวจสอบเพื่อหาจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เหลือโดยอาศัยเทคนิค Real-time PCR พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวยังคงมีเหลืออยู่และมีจำนวนใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มของการทดลอง โดยหัวใจของกึ่งในกลุ่มที่รอดหลังจากการฉีดด้วยโปรตีน WBP ปริมาณ 80 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจำนวน  $1.6 \times 10^3$  copies มีจำนวนของไวรัสเหลือน้อยที่สุด เท่ากับ  $3.1 \times 10^4$  copies/mg ของน้ำหนักหัวใจกึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น positive control ซึ่งมีจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวเท่ากับ  $3.7 \times 10^9$  copies/mg ของน้ำหนักหัวใจกึ่ง ทั้งนี้สาเหตุที่ไวรัสยังคงมีเหลืออยู่อาจเป็นเพราะไวรัสใช้โปรตีนชนิดอื่นที่มีบทบาทสำคัญในการเข้าติดเชื้อจับกับ receptor บนผนังเซลล์ของกึ่ง เช่น ใช้โปรตีน VP28 จับกับโปรตีน PmRab7 ของกึ่งเพื่อเป็นตัวนำพาไวรัสเข้าสู่เซลล์ (Sritunyalucksana *et al.*, 2006) หรือแม้กระทั่ง โปรตีน VP26 ที่สามารถจับโปรตีน WBP ได้อย่างจำเพาะก็อาจจะมี Receptor อย่างอื่นนอกเหนือจากโปรตีน WBP ตัวอย่างเช่น โปรตีน Actin หรือ Actin-binding protein ที่พบว่าสามารถจับกับโปรตีน VP26 ของไวรัสได้ (Xie *et al.*, 2005) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีน VP26 มีบทบาทสำคัญในการนำพา nucleocapsid ไปยังนิวเคลียสของเซลล์โดยการจับกับโปรตีน actin ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้ไวรัสที่เหลือรอดจากการดักจับของโปรตีน WBP มีโอกาสที่จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในระดับที่สามารถตรวจสอบเจอด้วยเทคนิค real-time PCR อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระดับดังกล่าวก็ไม่สามารถที่จะส่งผลให้กึ่งมีการตายเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 15 วันของการทดลอง ดังจะเห็นได้จากอัตราการมีชีวิตรอดของกึ่งในกลุ่มที่ใช้โปรตีน WBP ปริมาณ 80 ไมโครกรัม ในการลบล้างฤทธิ์ของไวรัส ซึ่งให้ค่า RPS มากที่สุดโดย เท่ากับ 89% ในขณะที่กลุ่มการทดลองดังกล่าวนี้ตรวจพบไวรัสที่เหลืออยู่ในหัวใจของกึ่งเป็นจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ  $3.1 \times 10^4$  copies/mg ของน้ำหนักหัวใจกึ่ง