ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม crustacean จะยังคงมีข้อมูลที่ไม่ทราบแน่ชัด แต่ก็เป็นไปได้เช่นกันที่ไวรัสตัวแดงดวงขาวจะเข้าติดเชื้อโดยการทำปฏิกิริยากับสารของเซลล์เจ้าบ้าน โดยเฉพาะสารที่เป็นตัวต้อนรับ (receptor) ของเซลล์เจ้าบ้าน (Wenlin *et al.*, 2005) ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเข้าติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีต่อกุ้งจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ซึ่งจะทำให้ทราบเกี่ยวกับคุณสมบัติและลักษณะของสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในระหว่างการเกิดกลไกดังกล่าว จากการศึกษาเพื่อค้นหายีนที่มีปฏิกิริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาว (เอื้อมนัส, 2545) โดยการนำ cDNA library จากเลือดกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มาแสดงออกบน phage โดยการใช้เทคนิค phage display และนำมาใช้ในการคัดเลือกยีนซึ่งผลิตโปรตีนที่สามารถจับกับไวรัสได้ พบว่าโปรตีนลูกผสมจากโคลน pC9 สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3000 Da และเรียกโปรตีนดังกล่าวว่า White Spot Syndrome Viral Binding Protein หรือ WBP เนื่องจากโปรตีน WBP เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะค้นหาว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถจับกับโปรตีนชนิดใดของไวรัสตัวแดงดวงขาว อีกทั้งนำโปรตีนชนิดนี้มาศึกษาความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยอาศัยกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์ในการทดลอง ซึ่งหากโปรตีน WBP สามารถลบล้างฤทธิ์ของไวรัสได้จริงโปรตีนชนิดนี้ก็อาจถูกนำมาใช้ในการป้องกันโรคได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. การแสดงออกส่วนของยีน WSSV binding protein (WBP)
2. การลบล้างฤทธิ์ของ WSSV (neutralization of WSSV infection)
3. ศึกษาแหล่งของ WSSV binding proteins
4. การโคลนยีนเต็มของ WSSV binding proteins
5. ค้นหา WSSV antigen ที่เกาะกับ WSSV binding protein (WBP)

2. วิธีการทดลองและวัสดุในการวิจัย

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

ทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีน WBP ที่มีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น *BamH*I กับ SalI โดยใช้ดีเอ็นเอจากโคลน pC9 เป็นต้นแบบ และเชื่อมยีน WBP เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy (Promega, USA) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′ ทำการย้ายยีน WBP เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Sweden) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′แล้วจึงทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน WBP บนพ

ลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′ และทำการย้ายดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-WBP เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

2.2 การเตรียมโปรตีนลูกผสม GST-WBP จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-WBP ในแบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2xYT (Yeast Extract Tryptone) ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 50 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นแบคทีเรียให้มีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyronositol) บ่มเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็งก่อนจะนำไปสกัดโปรตีน นำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na_3PO_4, pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยต้องทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและตะกอนเซลล์แยกออกจากกัน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟเรซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

2.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีน WBP โดยใช้ Glutathione sepharose 4 Fast Flow

นำสารละลายโปรตีนจากข้อ 2.2 บ่มกับ Glutathione sepharose 4 Fast Flow ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ได้จับกับเม็ดเจลออกและล้างเม็ดเจลด้วย PBS จำนวน 10 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ PBS (phosphate buffer saline) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อปริมาณเม็ดเจล 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสออก เติม PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม thrombin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรม/มิลลิลิตร ปริมาตร 15

ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นโปรตีน WBP เก็บไว้ ทำการชะด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ภายหลังการตัดโปรตีน WBP ออก จะเหลือส่วนของโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) จับอยู่กับเม็ดเจล ทำการชะโปรตีน GST ออกด้วย Elution buffer (20 mM reduced glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) ตรวจสอบผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟเรซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

2.4 การเตรียมตัวอย่างกุ้ง

กุ้ง ปราศจากโรคติดเชื้อ อายุ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 10-15 g ตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นำมาเลี้ยงในถังที่ให้อากาศตลอดเวลา เลี้ยงในน้ำทะเลที่ควบคุมความเค็มให้คงที่ที่ 15 ส่วนในพันส่วน ให้อาหารเม็ด 6% ของน้ำหนักตัวต่อวัน ทุก 8 ชั่วโมง ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน พักกุ้งไว้ประมาณ 5-7 วันก่อนการทดลอง เพื่อลดสภาพความเครียดจากการขนส่งและปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

2.5 การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ตัดเหงือก หัวใจ และขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) บดให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 ซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) M-199, 1.88 M NaCl, 0.66 M $CaCl_2.2H_2O$, 0.1 M L-glutamine, 9.14 mM Hepes, 10% (v/v) salt mixture (0.05 M KCl, 0.12M $MgSO_4.7H_2O$, 0.16 M $MgCl_2.6H_2O$, 3.12 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$, pH 7.3-7.6) ในอัตราส่วนน้ำหนักเนื้อเยื่อกุ้ง 1 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000xg นาน 20 นาที ทิ้งตะกอน นำส่วนใสมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองส่วนใสที่ได้ด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บสารละลายไวรัสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.6 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

สารละลายไวรัสจากข้อ 2.5 มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, pH 7.4) ให้มีความเข้มข้นเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-8} ฉีดเข้าสู่กุ้งตัวละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 15 ตัว ชุดควบคุมฉีดด้วย PBS ในปริมาตรที่เท่ากัน เลี้ยงกุ้งทดลองในตู้ทดลองขนาด 60x122x32.5 เซนติเมตร ให้อาหารเม็ด เปลี่ยนถ่ายน้ำ ทำความสะอาดตู้ บันทึกการตายเป็นระยะเวลา 15 วัน กุ้งทดลองที่ตายนำมาตรวจยืนยันสาเหตุการตายด้วยวิธี PCR

2.7 การทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (neutralization Assay)

กุ้งน้ำหนัก 10-15 กรัม แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว ทดลองนำโปรตีน GST และ GST-WBP ซึ่งผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วมาเจือจางด้วย PBS, pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 40 /50 ไมโครลิตร ตามลำดับ และนำเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) มาเจือจางด้วย PBS, pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้นเป็นสองเท่า ของความเข้มที่ทดสอบได้จากการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ WSSV โดยใช้ความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% ในระยะเวลา 3-5 วัน ทำการผสมโปรตีนกับเชื้อ WSSV ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1:1 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายโปรตีนผสมที่ได้ฉีดเข้าสู่กุ้งบริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่สามหรือสี่ของกุ้งปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร/ตัว เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดปกติ วันละ 3 มื้อ ในตู้กระจกขนาด 60x122x32.5 เซ็นติเมตร ให้อากาศตลอดเวลา บันทึกอัตราการตายของกุ้งแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน สุ่มกุ้งที่ตายและรอดตายมาตรวจการติดเชื้อ WSSV เปรียบเทียบอัตราการมีชีวิตรอดโดยใช้ค่า relative percent survival (RPS) (Amend, 1981) โดยคำนวณจากความสัมพันธ์ดังนี้

RPS = (1-เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดทดลอง/เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดควบคุม) x 100

2.8 การค้นหาแหล่งของยีน WBP

เนื้อกุ้งปกติ และกุ้งที่ติดเชื้อนำมาบดผสมใน extraction buffer บ่มที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เติม RNase ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดด้วย phenol/chloroform/isoamyl 2 ครั้ง แต่ละครั้งนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที สกัดด้วย phenol/isoamyl alcohol 1 ครั้ง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 2 M NaCl ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลาย และ absolute ethanol เป็นปริมาตร 2 เท่า หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol (เย็น) ทำให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนด้วย deionized water นำไปหาปริมาณและคุณภาพ Chromosomal DNA โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm นำมาเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR

2.9 การค้นยีนเต็มของ WSSV binding proteins

การทำ full-length clones ของ pC9 ซึ่งเป็น WSSV binding protein ทำได้โดยวิธี RACE (rapid amplification of cDNA ends) (Invitrogen, USA.) ใช้ total RNAปริมาณ 5 ไมโครกรัม 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 และ 2 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 จากนั้นจึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากPCR เข้า sequencing vector เพื่อหาการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิคต่อไป การทำ 3'end จะใช้ forward gene specific primer1, forward gene specific primer2 สังเคราะห์ขึ้นมาโดยใช้ลำดับของ DNA sequence จากวิทยานิพนธ์ของ เอื้อมนัส อินทรผาด (2545) กับ GeneRacer™ 3' Primer และ GeneRacer™ 3' Nested primer การทำเช่นเดียวกับการทำ 5' end RACE

2.10 Expression of Full-length WSSV binding protein

นำฟาจมิดลูกผสม pCANTAB-WBP ที่อยู่ใน *E.coli* (TG1) ที่ได้จากวิทยานิพนธ์ของเอื้อมนัส อินทรผาด (2545) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertaini) ที่มี Amplicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ TG1 ที่มีฟาจมิดลูกผสมดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี Amplicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อ 500 ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร LB ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Amplicillin ให้มีความเข้มสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เติม 4 x 10^{10} pfu ของ M13K07 เลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ 1,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนด้วย 5 มิลลิลิตร ของอาหารเหลวที่มี Amplicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ 1,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนของเหลวที่มีฟาจลูกผสมอยู่ เติม PEG/NaCl (0.025M polyethylene glycol-8000 และ 2.5M NaCl) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางบนน้ำแข็ง 30-60 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนใน 16 ไมโครลิตร ของอาหาร LB นำสารละลายตะกอนฟาจลูกผสม pCANTAB-WBP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาบ่มกับสารละลายเซลล์ *E. coli* HB2151 400 ไมโครลิตร ซึ่งอยู่ในระยะ log phase จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดมา 50 ไมโครลิตร ไปทำการ spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่มี Amplicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว LBG

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
1 ก.ค. 2555
243155

(LB+2%glucose) บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูดมา 1 มิลลิลิตร เติมลงใน 10 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว LBG (LB+2%glucose) ที่มี Amplicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร บ่มแบบเขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วย 10 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว LB ที่มี Amplicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ 1mM IPTG บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บโปรตีนส่วนที่เป็นของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งนำมาตรวจสอบด้วย 14% SDS-PAGE

2.10.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

เตรียมสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเป็น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ และเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่จะวัดโดยทำการเจือจางเป็น 1:1000 จากโปรตีนเริ่มต้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A ประกอบด้วย Copper tartrate carbonate solution (0.1% (w/v) $CuSO_4.5H_20$, 2% (w/v) $NaCO_3$, 1%(w/v) Sodium tartrate); 5%(w/v) SDS และ 0.8 M NaOH อัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ประกอบด้วย 2 N Folin ciocateus' reagent และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:5 ตามลำดับ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm และเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ BSA

2.10.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970)

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β-mercaptoethanol และ 0.1% (w/v) Bromophenol blue) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที และเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 12% ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2 โดยเทส่วนผสมของชั้น separating gel ระหว่างแผ่นกระจกปริมาตร 3 ใน 4 ของความสูงของกระจก ใช้น้ำกลั่นเติมบนผิวหน้าเจลเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เพื่อให้เกิดการโพลีเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ เทน้ำกลั่นทิ้งและซับให้แห้ง เทส่วนผสมของชั้น stacking gel ลงจนเต็ม เสียบหวีลงในแผ่นกระจกให้ไม่มีฟองอากาศ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน

30 min ดึงหวีออก นำเจลประกอบกับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส เติมสารละลายโปรตีนตัวอย่างลงในแต่ละช่องของเจล ใช้ Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine และ 0.1% (w/v) SDS) สำหรับทำอิล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปย้อมด้วยสี Brilliant Coomassie Blue (0.25% (w/v) Brilliant Coomassie Blue R-250, 50% (v/v) methanol และ 7.5% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destain 1 (50%(v/v) methanol และ 7% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ destain 2 (5% (v/v) methanol และ 7.5% (v/v) acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

2.10.3 การทำให้โปรตีน WBP บริสุทธิ์โดยใช้ Sephadex™G-25 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)

นำ column ของ Sephadex™ G-25 ขนาด 5 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเครื่อง AKTAprime plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) จากนั้นทำการปรับสภาพของ column ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 5 มิลลิลิตร/นาที นำสารละลายโปรตีนส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากข้อที่ 2.10 ซึ่งผ่านกรองด้วย filter ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วมาฉีดเข้าตัวเครื่องตรงตำแหน่งสำหรับฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเลือกไปยังเมนูสำหรับการทำ HiTrap™ Desalting เมื่อเวลาผ่านไป 6 นาที โปรตีนจะถูกชะออกมาด้วยสารละลาย PBS จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ในแต่ละ fraction มาตรวจวัดปริมาณพร้อมทั้งตรวจสอบด้วย 14% SDS-PAGE

2.10.4 การติดฉลากโปรตีน WBP ด้วย Biotin-conjugated

นำโปรตีน WBP (จากข้อ 2.10..3) ที่อยู่ในรูปของ lyophilize protein ปริมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายด้วยสารละลาย PBK (6.67 mM K_2HPO_4 และ 3.33 mM KH_2PO_4, pH 7.5) ที่มี 0.15 M KCl, pH 8.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย 0.15 M KCl, pH 8.8 ที่มี 0.2 M $NaHCO_3$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Biotin-N-Hydroxysuccinimide ester (Sigma, USA) (25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1 M NH_4Cl ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำสารละโปรตีนที่ติดฉลากแล้วมาทำการชะด้วยสารละลาย PBK จำนวน 10 ครั้งๆ ละ 3 มิลลิลิตร โดยการใช้ amicon ultra centrifugal filter (Millipore Ireland BV, Carrigtwohill, Co. Cork) ที่มีรูพรุนขนาด 3 kDa เป็นตัวกรอง ตรวจสอบผลการติดฉลากโปรตีนด้วยการนำโปรตีน WBP ที่ผ่านการติดฉลากแล้วแยกบน 14% SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยการนำเจลมาแช่ใน transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine และ 20% methanol) นาน 10 นาที วางกระดาษกรองที่ชุ่มบัฟเฟอร์เดียวกันกับเจลบนแผ่น

อิเล็กโทรดของเครื่อง Semi-Dry Electrophoric Transfer Cell (Bio-Rad, USA) แล้ววางทับด้วยแผ่นเมมเบรน จากนั้นวางแผ่นเจลโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นระหว่างแผ่เจลและแผ่นเมมเบรน วางทับด้วยกระดาษกรองด้านบน แล้วจ่ายกระแสไฟ 200 มิลลิแอมแปร์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มใน blocking solution (PBS + 5% skimmed milk) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween 20) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับ streptavidin-alkaline-phosphatase conjugated ซึ่งละลายอยู่ใน PBS ในอัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH7.5, 0.1 M NaCl และ 0.05 M $MgCl_2$, pH 9.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้งนาน 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับสารละลาย color substrate (Detection Buffer + NBT/BCIP 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) วางในที่มืดจนกระทั่งเกิดแถบสีม่วง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

2.11 การเตรียมโปรตีนลูกผสม GST-VP26 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-VP26

นำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-VP26 ใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2xYT ที่มี amplicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงต่อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 50 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{600}ประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นแบคทีเรียให้มีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyronositol) บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็ง หลังจากนั้นสกัดโปรตีนโดยนำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na_2PO_4 pH 8.0, 300 mM NaCl และ10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและตะกอนแยกออกจากกันที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry

(Lowry *et al.*, 1951) และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส แบบมีเอสดีเอส (SDS – PAGE)

นำสารละลายส่วนใสเพื่อทำการแยกโปรตีนลูกผสม GST-VP26 บน 14% SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนส่วนหนึ่งบนเจลไปทำการตรวจสอบโดยการนำเจลไปย้อมด้วยสี Brilliant Coomassie Blue เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบแถบของโปรตีนลูกผสม GST-VP26 จากนั้นนำเจลที่ไม่ได้ทำการย้อมด้วยสี Brilliant Coomassie Blue มาวางเทียบกับเจลที่ผ่านการย้อม Brilliant Coomassie Blue มาแล้ว เพื่อตัดเอาแถบของโปรตีนลูกผสม GST-VP26 ออกมาแล้วนำไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดเจลด้วยแท่งบด Micropestle จนเจลละเอียด เติม deionized water ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บดด้วยแท่งบด Micropestle อีกครั้ง ผสมให้กันด้วยการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนใสมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส แบบมีเอสดีเอส (SDS – PAGE)

2.12 การทดสอบการจับกันของโปรตีน WBP กับ โปรตีนลูกผสม GST-VP26 โดยการใช้เทคนิค Western blotting

ทำการแยกโปรตีน GST (Protein control) และ GST-VP9 (Negative protein control) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา) และ โปรตีนลูกผสม GST-VP26 ที่ได้จากข้อ 2.11 บน 14% SDS-PAGE โดยใช้ปริมาณโปรตีนของแต่ละตัวอย่างเท่ากับ 1 ไมโครกรัม จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยการนำเจลมาแช่ใน transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine และ 20% methanol) นาน 10 นาที วาง กระดาษกรองที่ชุ่มบัฟเฟอร์เดียวกันกับเจล บนแผ่นอิเล็กโทรดของเครื่อง Semi-Dry Electrophoric Transfer Cell (Bio-Rad, USA) แล้ววางทับด้วยแผ่นเมมเบรน จากนั้นวางแผ่นเจล โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นระหว่างแผ่เจลและแผ่นเมมเบรนวางทัยด้วยกระดาษกรองด้านบน แล้วจ่ายกระแสไฟ 200 มิลลิแอมแปร์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มใน blocking solution (PBS + 5% skimmed milk) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween 20) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับโปรตีน WBP ที่ติดฉลากแล้วจากวิธีการในข้อ 2.10.4 ซึ่งละลายอยู่ใน PBS ในอัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับ streptavidin-alkaline-phosphatase conjugated ซึ่งละลายอยู่ใน PBS ในอัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที ล้างแผ่นเมมเบรน ด้วย Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH7.5, 0.1 M NaCl และ 0.05 M

$MgCl_2$, pH 9.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้งนาน 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับสารละลาย color substrate (Detection Buffer + NBT/BCIP 0.25 mg/ml) วางในที่มืดจนกระทั่งเกิดแถบสีม่วง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

2.13 การทดสอบความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีน WBP แบบ *in vitro*

2.13.1 การเตรียมยีน VP19 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

นำหัวใจของกุ้งขาวที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมาบดใน TN buffer (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4) (Huang *et al.*, 2001) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ด้วยแท่งบด micropestle เพื่อให้เกิดเป็นลักษณะของเนื้อเยื่อที่นิ่มและละเอียด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลาอีก 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

2.13.2 การเพิ่มปริมาณยีน VP19 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.12.1 มาทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย DNA ที่ได้ 400 นาโนกรัม, 1 μM ของ VP19-FB: 5′CGGGATCCATGGCCACCACGACTAA 3′ และ VP19RX: 5′GCCTCGAGCCTGATGTTGTGTTT CTATA 3′ ซึ่งออกแบบมาจากยีน VP19 (AY249447), 0.4 mM ของ dNTP, 2.5 mM ของ $MgCl_2$, 1X PCR buffer และ 2.5 U Tag DNA polymerase โดยใช้สภาวะ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ จำนวน 30 รอบประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วนำไปหาปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm และทำการตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนของยีนที่ได้โดยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

2.13.3 การทำบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอ (ตามวิธีการของบริษัท QIAGEN, Germany)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาการแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis และตัดเจล บริเวณที่มีแถบดีเอ็นเออยู่ ทำการแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยการใช้ QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) โดยเติม QG buffer 300 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม isopropanol

1 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงใน spin column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อmin เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง เติม QG buffer 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง เติม PE buffer 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย spin column ไปยังหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้น้ำปราศจาก Nuclease ชะส่วนส่วนกลางของ spin column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm พร้อมทั้งตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5 % agarose gel electrophoresis

2.13.4 การคำนวณปริมาณ copy number ของดีเอ็นเอมาตรฐาน VP19 (ตามวิธีการของ Staroscik, 2004)

การคำนวณเพื่อเปลี่ยนดีเอ็นเอมาตรฐาน VP19 ในหน่วยกรัมให้อยู่หน่วยของโมเลกุล หรือ

copy number จะอาศัยค่าคงที่ของเลข Avogadro's number เป็นหลัก โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\textbf{Copies Number} = \frac{\textbf{(ปริมาณดีเอ็นเอ (กรัม) X 6.022 X } 10^{23} \textbf{ (โมเลกุลต่อโมล))}}{\textbf{(ความยาวดีเอ็นเอ (คู่เบส) X 650 (กรัมต่อโมลของคู่เบส))}}$$

2.13.5 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

นำกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ขนาดประมาณ 10-12 เซนติเมตร มาดูดเลือดผสมกับอาหาร KC-199 ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยอาหาร DMEM (Dulbecco' s Modified Eagle's Medium) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย อาหาร DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.13.6 การทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์

นำโปรตีน WBP (จากข้อที่ 2.10.3) ปริมาณ 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมและ PBS (positive control) มาบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาว (จำนวนเริ่มต้นประมาณ $1.6x10^8$ copies) ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบเวลาจึงนำโปรตีนลูกผสม WBP และ PBS ที่บ่มอยู่กับไวรัส มาบ่มกับเซลล์เม็ดเลือด (จำนวน $3.0x10^6$ เซลล์) ต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง จึงทำการล้างไวรัสตัวแดงดวงขาวส่วนที่ไม่เกาะกับเซลล์ออกด้วย PBS จำนวน 5 ครั้งๆละ 1 มิลลิลิตร โดยในแต่ละครั้งจะ

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที

2.13.7 การหาปริมาณไวรัสที่ได้หลังจากการทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ทำการเจือจางดีเอ็นเอมาตรฐาน VP19 ที่ได้จากวิธีการในข้อ 2.13.3 ให้มีปริมาณดีเอ็นอยู่ในช่วง $1x10^{1}$ ถึง $1x10^{9}$ copie สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการหาปริมาณไวรัส ด้วยเทคนิค Real-Time PCR พร้อมทั้งนำสารละลายดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.13.6 มาทำ Real-Time PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย iQTMSYBRGreen Supermix (BIO-RAD, USA) 12.5 ไมโครลิตร, 20 pmol ของ Primer VP19-FB และ VP19-RX, 1 ไมโครลิตร ของดีเอ็นเอแม่แบบ และน้ำปราศจากไอออน (DI water) ด้วยเครื่อง real time COBAS Tag Man 48 (Roche, USA) และ fluorescence detection Mx3000P™ (Stratagene, La Jolla, CA) โดยใช้สภาวะ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ

2.14 การทดสอบความสามารถในการลบฤทธิ์ไวรัสตัวแดงดวงขาวของโปรตีนWBP แบบ *in vivo*

2.14.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวมีชีวิตน้ำหนักตัว 10-15 กรัม อายุประมาณ 45 วันจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่ไม่มีประวัติการเกิดโรค เป็นกุ้งปกติไม่มีอาการของโรค ตัวใส เปลือกแข็งปกติ ตรวจไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส โดยเฉพาะเชื้อตัวแดงดวงขาว นำมาเลี้ยงในบ่อถังดำ ให้อากาศตลอดเวลา ควบคุมความเค็มของน้ำให้คงที่ที่ 20 ส่วนในพันส่วน (ppt) เลี้ยงไว้ก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ในช่วงของการเลี้ยงให้อาหารเม็ดวันละ 3 มื้อ ให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

2.14.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว

นำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมาเจือจางใน PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $Na_2HPO_4.7H_2O$, 1.4 mM KH_2PO_4 pH 7.4) ให้มีความเข้มข้นเป็น $1x10^{-1}$, $1x10^{-2}$, $1x10^{-3}$, $1x10^{-4}$, $1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$, $1x10^{-7}$ และ $1x10^{-8}$ ตามลำดับ จากนั้นนำมาฉีดในกุ้งขาวความเข้มข้นละ 7 ตัว ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว บริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่สามหรือสี่ของกุ้งขาวและเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดปกติวันละ 3 มื้อ โดยมีการให้อากาศตลอดเวลา พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนกุ้งที่

ตายในแต่ละชุดการของการทดลอง เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นภายในระยะเวลา 3-5 วัน (Deachamag *et al.*, 2006; Norihisa *et al.*, 2006)

2.14.3 การทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์

การทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ดังกล่าวนี้จะทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยจะเตรียมตู้กระจกขนาด 60x122x32.5 เซนติเมตร สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นนำโปรตีน WBP (จากวิธีการข้อ 2.10.3) ปริมาณ 80, 160, และ 320 ไมโครกรัม และ PBS ซึ่งผ่านการบ่มกับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มาแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไปฉีดเข้าตัวกุ้งโดยฉีดความเข้มข้นละ 9 ตัวในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว บริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่สามหรือสี่ของกุ้งขาว และเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดปกติ วันละ 3 มื้อ โดยมีการให้อากาศตลอดเวลา พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนกุ้งขาวที่ตายในแต่ละชุดการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยคำนวณอัตราการมีชีวิตรอด (relative percentage survival, RPS) จากสูตรดังนี้

$$\text{RPS} = \left(1 - \frac{\text{เปอร์เซ็นการตายของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{เปอร์เซ็นการตายของกลุ่ม Positive}} \right) \times 100$$

(Amend, 1981 อ้างโดย Li *et al.*, 2005)

2.14.4 การตรวจหาปริมาณไวรัสที่เหลือของกุ้งที่รอดหลังจากการทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

นำกุ้งขาวที่มีชีวิตรอดเป็นระยะเวลา 15 วัน หลังจากได้รับการฉีดด้วยโปรตีน WBP ปริมาณ 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม /ตัว ซึ่งผ่านการบ่มกับเชื้อ WSSV จำนวน 1.6 x 10^3 copies มาผ่าเพื่อเอาหัวใจของกุ้งออกมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการเตรียมสารลายดีเอ็นแม่แบบตามวิธีการในข้อ 2.13.1 แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้ไปใช้ในการตรวจสอบเพื่อหาจำนวณ copy ของไวรัสตัวแดงดวงขาว