บทคัดย่อ

T145665

งานวิจัยในชุดโครงการวิจัยนี้เป็นการสร้างเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอณูชีววิทยา ซึ่งประกอบด้วย

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

การหาลำดับ cDNA บางส่วนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสโรคหัวเหลือง ทำโดยแยกยีน p135 โดยวิธี RT-PCR (ซึ่งใช้ cDNA ที่สร้างจาก RNA ของ YHV เป็น template) พบว่าได้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 4200 bp และจากการหาลำดับ DNA บางส่วน (1720 bp) ของผลผลิต RT-PCR นี้ พบว่ามีความสอดคล้องกับยีน gp116 ของ YHV ที่รายงานโดย Jitrapakdee และคณะ (2003) จากการแยกยีน p65 และ p65F78 (p65 ที่ปราศจาก transmembrane region) โดยวิธี RT-PCR พบว่าได้แถบ DNA ขนาด 1708 bp และ 1630 bp ตามลำดับ แต่ผลการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้ pQE30 expression vector พบว่ายังไม่ประสบผลสำเร็จ จากความพยายามในการแยกยีน p22 โดยวิธี RT-PCR พบว่าได้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 750 bp และจากการหาลำดับ DNA และการวิเคราะห์ open reading frame (ORF) ของผลผลิต RT-PCR นี้ พบว่าไม่มี ORF ที่สอดคล้องกับโปรตีนขนาด 22 kD ดังนั้นจึงคาดว่าลำดับ DNA ที่ได้น่าจะเป็นส่วนของ 3' untranslated region ของ YHV

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยวิธี multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส 3 ชนิดพร้อมกันด้วยวิธีนี้คือ ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง และไวรัส HPV (hepato-pancreatic parvo-like virus) และยังได้พัฒนาการตรวจสอบโดยวิธี multiplex RT-PCR ของไวรัสหัวเหลืองและ GAV (gill associated virus) ทำให้แยกการติดเชื้อจากไวรัสต่าง ๆ ได้

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส HPV ทำโดยแยกสกัด HPV จากตับของกุ้งกุลาดำที่แคระ ทำให้บริสุทธิ์และนำมาปลูกภูมิคุ้มกันในหนู สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 12 โคลน โดยทุกโคลนจับกับโปรตีนขนาด 97 กิโลดาลตัน แต่ยังไม่ได้โคลนที่จับกับโปรตีนขนาด 54 กิโลดาลตัน ซึ่งจะต้องพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อไปอีก