การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP12 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยระบบ *Escherichia coli*

RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION OF VP12 FROM WHITE SPOT SYNDROME VIRUS USING *Escherichia coli* EXPRESSION SYSTEM

ช่อฟ้า สมยา
อธิวัฒน์ อู่ศิลปกิจ
อนาวิล แย้มเศียร

โครงงานพิเศษนี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION OF VP12 FROM WHITE SPOT SYNDROME VIRUS USING *Escherichia coli* EXPRESSION SYSTEM

CHOFAH SOMYA
ATHIWAT WUSILAPAKIT
ANAWIN YAMSIAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP12 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยระบบ *Escherichia coli*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวช่อฟ้า สมยา รหัสนักศึกษา 58050738 นายอธิวัฒน์ อู่ศิลปกิจ รหัสนักศึกษา 58050839 นายอนาวิล แย้มเศียร รหัสนักศึกษา 58050840
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ	ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP12 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยระบบ *Escherichia coli*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวช่อฟ้า สมยา รหัสนักศึกษา 58050738 นายอธิวัฒน์ อู่ศิลปกิจ รหัสนักศึกษา 58050839 นายอนาวิล แย้มเศียร รหัสนักศึกษา 58050840
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ	ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัส เป็นกุญแจสำคัญในการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง VP12 เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 95 ตัวที่แปลรหัสได้จากยีน WSSV065 แต่อย่างไรก็ตามหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ก็ยังไม่สามารถทราบได้อย่างแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อผลิตโปรตีน VP12 โดยใช้ระบบ *Escherichia coli* ยีน WSSV065 ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยโคลนเข้าเวคเตอร์ pET28(b) และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ใช้ IPTG ในการกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และทำให้โปรตีน VP12 บริสุทธิ์ด้วย Ni Sepharose™ 6 Fast Flow และนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blot โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนถูกผลิตขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 11.44 กิโลดาลตัน เพื่อนำไปศึกษาหน้าที่ ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสในกุ้งต่อไป

คำสำคัญ : *Escherichia coli*, WSSV065, โปรตีน VP12, ไวรัสตัวแดงดวงขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project	Recombinant protein expression of VP12 from white spot syndrome virus using *Escherichia coli* expression system
Student Name	Chofah Somya 58050738
	Athiwat Wusilapakit 58050839
	Anawin Yamsian 58050840
Degree	Bachelor of Science (Biology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year	2018
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Tipachai Vatanavichan

Abstract

The structural protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV) is an important key involved in viral infection in shrimp. The low abundance viral envelope protein, VP12, composed of 95 residues is encoded from WSSV065. However, the function of this protein is still unclear. Therefore, this research aimed to express the viral envelope protein, VP12 using *Escherichia coli* system. WSSV065 gene was amplified by PCR technique, cloned to pET28(b) vector and transformed to expression host, *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was produced using IPTG induction. The recombinant proteins VP12 was purified using Ni Sepharose™ 6 Fast Flow and analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The results showed that the recombinant protein was expressed with molecular weight of 11.44 kDa, approximately and characterized the function involved in viral infection in shrimp later.

Keywords: *Escherichia coli*, WSSV065, VP12, White Spot Syndrome Virus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายฝ่ายด้วยกัน คณะผู้จัดทำใคร่ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และกรุณาเป็นกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ นางสาววัชรยา มาศแจ้ง นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และสารเคมี ในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้

ช่อฟ้า สมยา
อธิวัฒน์ อู่ศิลปกิจ
อนาวิล แย้มเศียร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ช
คำย่อ.....ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....3
2.2 โรคตัวแดงดวงขาว.....6
2.2.1 สาเหตุ (Causative agent).....6
2.2.2 ชนิดของสัตว์ที่ยอมรับเชื้อ (Host).....6
2.2.3 ระยะของสัตว์ที่ไวต่อเชื้อ (Susceptible stages of the host).....7
2.2.4 สัตว์นำเชื้อ (Vector).....7
2.2.5 อวัยวะเป้าหมาย (Target organ).....7
2.2.6 อาการ (Clinical sign).....7
2.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรง (Factors Affect the Virulence).....7
2.2.8 การติดต่อและแพร่กระจาย (Transmission).....7
2.2.9 การป้องกัน (Prevention).....7
2.2.10 การควบคุม (Control).....8
2.2.11 การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis).....8
2.2.12 อัตราการตาย (mortality).....9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....9
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....11
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี....11
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์....11
3.1.2 สารเคมี....12
3.2 การเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ด้วยเทคนิค PCR....13
3.3 การตัดต่อยีนเพื่อเพิ่มจำนวน....14
ขั้นตอน Clean up (cut pET28b(+) และ cut PCR product)....15
Ligation....16
3.4 การตัดต่อยีนเพื่อผลิตโปรตีน....16
Cut Check (Plasmid)....17
3.5 กระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)....17
3.6 Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)....17
Western blot....18
3.7 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์....18
3.7.1 ขั้นตอนการล้างคอลัมน์....18
3.7.2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์....18
3.8 การทำไดอะไลซิส....19
3.9 การวัดความเข้มข้นโปรตีน Bradford method....19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย....20
4.1 การเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยระบบ *Escherichia Coli*....20
4.2 การเตรียมยีน WSSV065 และเวคเตอร์ pET28b(+)....21
4.3 การโคลนยีน WSSV065 เข้าในเวคเตอร์ pET28b(+)....21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.4 การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม.....22
4.4.1 ผลการ translation ตั้งแต่ start ถึง stop codon.....23
4.5 การตรวจสอบการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสม.....24
4.6 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni Sepharose™ 6 Fast Flow.....26
4.7 การหาความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford.....27
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....28
เอกสารอ้างอิง.....29
ภาคผนวก.....31
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....32
ภาคผนวก ข ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไวรัส.....34
ภาคผนวก ค การทำ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....35
ภาคผนวก ง การทำ Completent Cell.....37
ภาคผนวก จ การทำ Western blot hybridization.....38
ภาคผนวก ฉ การทำ กราฟมาตรฐาน BSA.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน....13
3.2 สภาวะในการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR....13
3.3 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย....14
3.4 สารที่ใช้ในการตัดชิ้นส่วน Recombinant WSSV065....14
3.5 ปริมาตรสารที่ใช้ในการ Cut Check (plasmid)....17
ง-1 ส่วนประกอบ separating gel 18%....36
ง-2 ส่วนประกอบ stacking 5%....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

3.1 pET28b(+) vector map 5368 bp.....15
4.1 แสดงชิ้นส่วนของยีน WSSV065 ขนาด 288 คู่เบสที่ได้จากการทำ RT-PCR แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2% แล้วนำมาส่องด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV (UV-Transilluminator).....20
4.2 แสดงชิ้นส่วนของเวคเตอร์ pET28b(+) ที่ถูกย่อยปลายด้วย *NcoI* และ *XhoI*.....21
4.3 แสดงตัวอย่างการคัดเลือกโคลน *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีพีซีอาร์ โดยจะได้พีซีอาร์โปรดักส์คือ WSSV065 ขนาด 309 คู่เบส ทำการแยกดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2 %.....22
4.4 ลำดับเบสทั้งหมดกับลำดับเบสของยีน WSSV065 ในฐานข้อมูลของ NCBI.....23
4.5 การกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG และตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE 18 % ย้อมสีด้วยคูแมสซีบริลเลียนท์บูล(Coomassie Brilliant Blue) พบการผลิตโปรตีนได้มากที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 3 โดยโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้มีขนาด 11.44 kDa.....24
4.6 ตรวจสอบโปรตีน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot หลังจากกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG และตรวจสอบด้วย HisDetector™Nickel-AP (KPL).....25
4.7 แสดงปริมาณโปรตีนที่อยู่ในส่วนตะกอน(pellet) และส่วนใส(soluble) หลังการแตกเซลล์ด้วย sonicate และตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE 18 % ย้อมสีด้วยคูแมสซีบริลเลียนท์บูล (Coomassie Brilliant Blue) 25
4.8 ผลการตรวจสอบการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE 18 %.....26
ฉ-1 กราฟมาตรฐาน BSA แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
WSSV	ยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB	อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani
PBS	Phosphate-buffered saline
DI water	Deionized water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

กุ้งไทยเป็นสินค้าที่มีศักยภาพการแข่งขันในตลาดโลกสูงมาก ช่วง 5 ปีที่ผ่านมาการส่งออกกุ้งของไทยเติบโตเฉลี่ยราว 12% ต่อปี สูงกว่าอัตราการเติบโตเฉลี่ยของโลกที่ 4% ต่อปี ปัจจุบันประเทศไทยผลิตกุ้งได้ราว 500,000 ตันต่อปี ผลผลิตส่วนใหญ่ 80% หรือ 400,000 ตัน ใช้เพื่อการส่งออก สามารถสร้างรายได้เข้าประเทศได้ปีละกว่า 90,000 ล้านบาท ส่งผลให้ไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกกุ้งรวมถึงผลิตภัณฑ์แปรรูปใหญ่เป็นอันดับ 1 ของโลกโดยในปี พ.ศ.2552 กุ้งและผลิตภัณฑ์แปรรูปของไทยครองส่วนแบ่งในตลาดโลกสูงถึง 23.9% โดยมีปริมาณการส่งออก 389,999 ตัน คิดเป็นมูลค่า 94,149 ล้านบาท

จากปัญหาโรคตัวแดงดวงขาว ที่พบการระบาดในประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี 2536 และมีการระบาดในประเทศไทยเมื่อปี 2537 สร้างผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศจนถึงปัจจุบันนี้ และส่วนมากมักพบบริเวณการเลี้ยงกุ้งทางภาคใต้ฝั่งตะวันออกของประเทศ คือ ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา และนครศรีธรรมราช ส่วนตะวันตกพบที่ ตรัง ซึ่งการระบาดของโรคดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง โดยความอันตรายของเชื้อดังกล่าวและการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้น ถือได้ว่าเกือบเทียบเท่ากับการระบาดของโรคหัวเหลือง ปัจจุบันมีหลายหน่วยงานที่เข้าไปศึกษาความเป็นไปได้ในการรักษาโรคตัวแดงดวงขาว โดยการพยายามเพิ่มภูมิคุ้มกันกุ้งขึ้นมาเพื่อรับความรุนแรงเชื้อตัวนั้นๆได้ แต่ปัจจุบันนี้ก็ยังทำได้ไม่เต็มที่มากนัก

ไวรัสดวงขาว เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการส่งออกกุ้งของประเทศไทย โดยไวรัสดวงขาว สามารถผลิตโปรตีนVP12 โดยโปรตีนVP12 เป็นโปรตีนที่สำคัญโดยทำหน้าที่เป็นตัวจับกับก้อนโปรตีนตัวรับของเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง โดยในการศึกษาเกี่ยวกับ White Spot Syndrome Virus จำเป็นต้องใช้โปรตีน VP12 เป็นจำนวนมากในการศึกษา ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงต้องการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์จากกุ้งกุลาดำใน *Escherichia coli* เพื่อนำโปรตีน VP12 ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับ White Spot Syndrome Virus โดยโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป เพื่อต่อยอดงานวิจัยไปจนดูลักษณะการติดเชื้อตลอดจนการป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ เพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตกุ้งของผู้ประกอบการและเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP12 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ผลิตโดยใช้ pET28b(+) เป็นเวกเตอร์
2. ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI*
3. ใช้ *E.coli* BL21 (DE3) เป็นโฮสเพื่อผลิตโปรตีน
4. กระตุ้นการผลิตโปรตีนด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
5. ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Affinity column

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP12 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยีในแบคทีเรีย (Recombinant DNA technology) ซึ่งอาจเรียกว่า พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) หรือการโคลนยีน (Gene cloning) เป็นการสร้างคอมบิชั่นใหม่ระหว่างสปีชีส์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันเลยและไม่เกิดในธรรมชาติ โดยการรวมดีเอ็นเอที่สร้างโดยวิธีการใดก็ได้ที่ภายนอกเซลล์เข้าไปในดีเอ็นเอของไวรัส พลาสมิดแบคทีเรีย หรือพาหะ (Vector) อื่น เพื่อยอมให้ถูกนำไปในสิ่งมีชีวิตให้อาศัย (Host organism) ที่ไม่ใช่สิ่งมีชีวิตให้อาศัยตามธรรมชาติ แต่สิ่งมีชีวิตให้อาศัยนั้นยอมให้ดีเอ็นเอเข้าไปเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นเปลี่ยนแปลงไป กระบวนการรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยีนั้น สิ่งที่ต้องการเป็นพื้นฐาน คือ พาหะสำหรับการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอพาหะอื่น ๆ ชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนที่เราสนใจ เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเอ็นไซม์ไลเกส (Ligase) และการนำพาหะที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (Tottora *et al.*, 1998) โดยวิธีการ การแยกพาหะ หรือพาหะการโคลน (Cloning vector) การแยกดีเอ็นเอจากเซลล์ผู้ให้ (Donor cell) การนำชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจเข้าสู่พาหะในหลอดทดสอบ การนำพาหะที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย ซึ่งพาหะนั้นต้องเพิ่มจำนวนได้ และเซลล์ที่ได้คือ เซลล์รีคอมบิแนนท์ เซลล์รีคอมบิแนนท์ถูกเลี้ยงเพื่อสร้างโคลน (Clone) ที่มีเซลล์ซึ่งมีพันธุกรรมเหมือนกันอยู่เป็นจำนวนมาก พลาสมิด (Plasmid) ซึ่งเป็นพาหะการโคลน มีหน้าที่ในการเคลื่อนย้าย ดีเอ็นเอระหว่างสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไปมีลักษณะเป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงแหวน (Circular form) พาหะควรมีความสามารถในการถ่ายแบบตัวเอง (Self-replication) ในเซลล์ให้อาศัย หรือต้องสามารถรวมเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ให้อาศัยอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้น พาหะต้องมียีนเครื่องหมาย (Gene marker) ที่ช่วยในการคัดเลือกง่าย ดังตัวอย่างพาหะการโคลนยีนแบคทีเรีย pET28b expression vector (ขนิษฐา, 2558)

DNA หรือ gene cloning คือการตัดต่อชิ้นส่วน DNA จาก chromosome หรือ gene ของสิ่งมีชีวิตใดๆ มาต่อกับ DNA พาหะ (cloning vector) ในหลอดทดลอง โดยที่ DNA พาหะนี้ คือ โมเลกุล DNA ซึ่งมีความสามารถที่จะแบ่งตัวได้ (replicate) เมื่ออยู่ใน host cell ซึ่งเป็นแบคทีเรีย การเชื่อมต่อชิ้นส่วนของ DNA เข้ากับ cloning vector นี้ ทำให้ได้ recombinant DNA (DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสม) เกิดขึ้น และโมเลกุลของ recombinant DNA จะถูกนำเข้าไปใน host cell ซึ่งอาจเป็น *E. coli* (*Escherichia coli*), yeast, เซลล์สัตว์หรือเซลล์พืช เมื่อมีการเพิ่มจำนวนของ host cell ก็จะเป็นผลทำให้เกิดการแบ่งตัว (replicate) ของ recombinant DNA ที่ถูกนำเข้าไปใน host cell นั้น เป็นผลให้มีการเพิ่มจำนวนของส่วนของ DNA ที่นำมาต่อกับ cloning vector นั้นด้วย ทำให้เราสามารถที่จะศึกษาส่วนของ DNA นั้นๆได้ ขั้นตอนต่างๆ ที่สำคัญในการทำ DNA cloning มีการเตรียม DNA ส่วนที่ต้องการจะทำการ clone และการเตรียม cloning vector การเชื่อมต่อกันระหว่างชิ้นส่วนของ DNA กับ cloning vector การนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell การคัดเลือกเชื้อที่มีส่วนของ DNA ที่ต้องการ

การเตรียม DNA และ cloning vector โดยนำDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการจะศึกษาและ cloning vector จะถูกนำมาตัดด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน คุณสมบัติที่ดีของ cloning vector ควรมีลักษณะคือ

1. มี origin of replication
2. มี marker ที่สามารถใช้เป็นตัวคัดเลือกคุณสมบัติต่างๆที่ต้องการ
3. มีตำแหน่งของ restriction site

การเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วน DNA กับ DNA พาหะให้ได้ rDNA (recombinant DNA) จะทำได้โดยใช้เอนไซม์เชื่อมต่อ คือ เอนไซม์ ligase ซึ่งมีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้คือ T4 DNA ligase เอนไซม์นี้จะสามารถเชื่อมต่อ DNA สายคู่ โดยสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ระหว่างปลาย DNA ที่มีหมู่ 5' phosphate กับหมู่ 3' hydroxyl end ซึ่งเอนไซม์ ligase นี้จะสามารถเชื่อมต่อได้ไม่ว่าปลายของสาย DNA สายคู่นั้นจะอยู่ในรูปที่เป็น sticky end (ปลายสาย DNA สายคู่นี้มีสาย DNA ที่อาจเป็นปลาย 5' หรือ 3' ยื่นออกมา) หรือ blunt end (คือ ปลาย DNA มี complementary base เสมอกันไม่มีนิวคลีโอไทด์ใดๆ ยื่นออกมา) ในการเชื่อมต่อด้วย ligase จะเชื่อมต่อปลาย blunt end เข้าด้วยกันได้ในทุกกรณีไม่ว่า blunt end นั้นจะเกิดมาจากวิธีการใด

การนำ DNA เข้าสู่ host cell หรือที่เรียกว่า transformation เป็นขบวนการที่จะนำ DNA สายผสมที่เราทำการตัดต่อในหลอดทดลองเข้าสู่เซลล์ การที่เราสามารถใส่ plasmid เข้าไปใน host cell ได้มีประโยชน์มาก เพราะสามารถศึกษาแยกแยะและเพิ่มการผลิต ผลิตผลของยีนหลายชนิดที่เราต้องการได้ เซลล์ที่นิยมนำมาใช้เป็น host cell ได้แก่ เซลล์แบคทีเรีย เซลล์ยีสต์ และ mammalian cell เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็น host cell มีอยู่หลายชนิด แต่ที่ใช้กันมากคือ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อที่เรารู้พื้นฐานทางพันธุกรรมและรู้หน้าที่ของยีนต่างๆ มากที่สุด การที่จะใส่ DNA เข้าไปในเซลล์ จะต้องปรับสภาพเซลล์ให้เหมาะสมที่จะรับ DNA เสียก่อน เซลล์ที่ถูกปรับสภาพให้เหมาะสมที่จะรับ plasmid นี้เรียกว่า competent cells การทำให้เซลล์ *E. coli* เป็น competent cells ทำได้โดยการแช่เซลล์ในสารละลาย $CaCl_2$ ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนั้นพบว่าถ้ามี $MgCl_2$ อยู่ด้วยจะยิ่งช่วยเพิ่ม transformation ได้ดีขึ้น นอกจากสารละลายดังกล่าวแล้ว dimethyl sulfoxide และ rubidium chloride ก็เป็นสารที่เหนี่ยวนำ ให้เซลล์เป็น competent cells ได้ดี และทำให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพใน transformation สูง จากนั้นจึงนำ host cell เหล่านี้ ไปเลี้ยงในวุ้นเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติให้ host cell ที่มี DNA อยู่ภายในสามารถเจริญเติบโตได้ตราบใดที่มีหมู่ 5' phosphate และหมู่ 3' hydroxyl end แต่ในกรณีที่ปลายเป็น sticky end นั้น ligase จะเชื่อมต่อได้เมื่อเบสปลายทั้งสอง complementary กันเท่านั้น (บ้านจอมยุทธ์, 2543)

เซลล์ *E.coli* BL21 และ BL21(DE3) ทั้งสองสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ B และทำให้ทั้งคู่ขาดเอนไซม์โปรตีเอส (enzyme protease) และโปรตีเอส OmpT โดยทั่วไปแล้วสายพันธุ์ B เป็นที่ต้องการโดยทั่วไปสำหรับการแสดงออกของโปรตีน recombinant การกำหนด DE3 หมายถึง สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องนั้นมี λDE3 lysogen ที่มียีนสำหรับ T7 RNA polymerase ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ lacUV5 IPTG จำเป็นต้องมีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกสูงสุดของ T7 RNA polymerase เพื่อแสดงยีนรีคอมบิแนนท์โคลนของ T7 BL21 (DE3) เหมาะสำหรับการแสดงออกจากโปรโมเตอร์ T7 หรือ T7-lac หรือโปรโมเตอร์ที่ได้รับการยอมรับจาก *E.coli* RNA polymerase : เช่น lac, แทค, trc, ParaBAD, PrhaBAD และ T5 โปรโมเตอร์ โปรดทราบว่า BL21 ไม่ได้มียีนสำหรับ T7 RNA polymerase ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการแสดงออกจากโปรโมเตอร์ที่ได้รับการยอมรับโดย *E.coli* RNA polymerase เช่น lac, tac, trc, ParaBAD, PrhaBAD และ T5

2.2 โรคตัวแดงดวงขาว

โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Disease : WSD) เป็นโรคที่ทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็วและจำนวนมาก พบการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง *Penaeus japonicus* ในประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2536 โดยเรียกไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคว่า penaeid rod-shape DNA virus (PRDV) หรือ rod-shraped nuclear virus of *P. japonicus* (RV-PJ) ในประเทศไทยพบการระบาดตอนปลายปี พ.ศ. 2537 โดยเรียกโรคนี้ว่า systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) พื้นที่ที่พบการติดเชื้อรุนแรงคือ ภาคตะวันออกแถบ จังหวัดจันทบุรี ตราด และภาคใต้ฝั่งตะวันออกในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช ปัตตานี ภาคใต้ฝั่งตะวันตก ในเขตจังหวัดตรัง

2.2.1 สาเหตุ (Causative agent)

โรคตัวแดงดวงขาวเกิดจากเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือ White Spot Virus (WSV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัส ชนิดดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA virus) ขนาด 305 กิโลเบส ถูกจัดอยู่ใน จีนัส Whispovirus Family Nimaviridea มีลักษณะเป็นรูปแท่งขนาด 80 -120 x 250-300 นาโนเมตร

2.2.2 ชนิดของสัตว์ที่ยอมรับเชื้อ (Host)

สัตว์น้ำจำพวกครัสเตเชียนได้แก่ กุ้งและปู ส่วนใหญ่สามารถรับเชื้อตัวแดงดวงขาวได้ กุ้งที่ตรวจพบการติดเชื้อในธรรมชาติได้แก่ *Penaeus monodon*, *P. vannamei*, *P. indicus*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P. merguiensis, *P. japonicus*, *P. stylirostris* สำหรับกุ้งที่พบการติดเชื้อในห้องทดลองได้แก่ *P. setiferus*, *P. aztecus*, และ *P. duodarum*

2.2.3 ระยะของสัตว์ที่ไวต่อเชื้อ (Susceptible stages of the host)

สามารถติดเชื้อได้ในกุ้งทุกระยะตั้งแต่ตัวอ่อน กุ้งวัยรุ่น จนถึงพ่อแม่พันธุ์

2.2.4 สัตว์นำเชื้อ (Vector)

โรติเฟอร์ (Rotifer), อาร์ทีเมียร์ (Artemia salina), โคพีพอด (Copepod), โพลิคีด (Polychaete worm), ตัวอ่อนแมลง (larvae insect), หอยทะเล (Marine mollusk)

2.2.5 อวัยวะเป้าหมาย (Target organ)

เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกชั้นเอคโตเดิร์ม (Ectodermal) และ มีโซเดิร์ม (Mesodermal) ได้แก่ เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหงือก

2.2.6 อาการ (Clinical sign)

กุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเชื้อจะเข้าทำลายระบบเนื้อเยื่อชั้นเอคโตเดิร์ด (Ectoderm) และ มีโซเดิร์ม (Mesoderm) โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออย่างชัดเจนบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหงือก และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (Lymphoid organ) โดยจะทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต บริเวณใต้เปลือกกุ้งตลอดทั้งตัวจะมีสีแดงเรื่อๆ ชมพูถึงเข้ม บางครั้งจะเป็นสีส้มและมีจุดขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิเมตร โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวและด้านข้างลำตัวส่วนหาง บางครั้งกุ้งจะลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบแล้วเปลือกไม่แข็ง ทำให้เกิดการตายของกุ้งสูงถึง 80-100 % ภายใน 4-5 วัน กุ้งจะเกยขอบบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยที่อัตราการกินอาหารยังปกติ ลักษณะของกุ้งที่มาเกยขอบบ่อในระยะแรกจะมีอาการตัวแดง เปลือกนิ่ม บาง โดยเฉพาะส่วนหัวและบริเวณสันหลังตลอดแนวลำตัวมีสีแดงก่อนส่วนอื่น ต่อมาประมาณ 3-4 วัน จะพบกุ้งที่มีอาการตัวแดงในยอ โดยจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและกุ้งจะเริ่มกินอาหารน้อยลง ต่อมา 5-7 วัน จะมีอัตราการตายมากขึ้นอย่างรวดเร็ว

2.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรง (Factors Affect the Virulence)

1.ความรุนแรงในกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มสูงมากกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำ

2.ที่อุณหภูมิต่ำความรุนแรงของโรคสูงกว่าที่อุณหภูมิสูง

2.2.8 การติดต่อและแพร่กระจาย (Transmission)

1. ทางตรง (Vertical transmission) จากพ่อแม่พันธุ์สู่ลูกพันธุ์กุ้ง

2. ทางอ้อม (Horizontal transmission)

2.1 การสัมผัสน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (water-borne routes)

2.2 การกินเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ติดเชื้อ (cannibalism, predation)

2.2.9 การป้องกัน (Prevention)

โรคตัวแดงดวงขาวยังไม่วิธีรักษาที่ได้ผล แต่สามารถป้องกันได้ด้วยวิธีการต่างๆดังนี้

1. หลีกเลี่ยงการเลี้ยงกุ้งในช่วงอุณหภูมิต่ำเนื่องจากเชื้อจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิต่ำ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ผู้ใดนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปล่อยลูกพันธุ์กุ้งที่ปลอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว หรือลูกพันธุ์กุ้งที่เป็นสายพันธุ์ปลอดเชื้อ (specific pathogen free; SPF)

3.ใช้ลูกพันธุ์กุ้งที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สำหรับลงเลี้ยงในบ่อดิน จะช่วยลดความเสี่ยงในกาเกิดโรคตัวแดงดวงขาวได้

4. สุ่มตัวอย่างกุ้งในบ่อเลี้ยงเพื่อตรวจสุขภาพกุ้งอย่างสม่ำเสมอ

5. หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้งเนื่องจากอาจเป็นพาหะของเชื้อไวรัสได้

6. จัดการปัจจัยที่ทำให้กุ้งเกิดความเครียดอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำอย่างฉับพลัน การลดความหนาแน่นของกุ้งที่ปล่อยลงเลี้ยง

7. ใช้ระบบการเลี้ยงที่มีการถ่ายน้ำน้อยเพื่อลดความเสี่ยงในการนำเชื้อจากภายนอกเข้ามาในบ่อเลี้ยง

8. เลี้ยงกุ้งในระบบที่มีการจัดการระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ

9. ใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดที่สามารถป้องกันเชื้อตัวแดงดวงขาวได้ เช่น เบต้ากลูแคน วิตามินซี ฟูคอยแดน (Fucoidan) ซึ่งเป็นสารสกัดจากสาหร่าย เป็นต้น

2.2.10 การควบคุม (Control) : กรณีเกิดโรคในฟาร์มต้องดำเนินการดังนี้

1. ปิดกั้นบริเวณบ่อที่เกิดโรคจากพื้นที่ส่วนอื่น เช่น ใช้ตาข่ายพลางแสง หรือแผ่นพลาสติก

2. ห้ามบุคคลที่ไม่เกี่ยวข้องเข้าออกพื้นที่ที่เกิดโรค

3. กรณีกุ้งเล็กไม่สามารถจับขายได้ให้ดำเนินการฆ่ากุ้งในบ่อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 30 พีพีเอ็ม ทิ้งไว้อย่างน้อย 14 วัน โดยไม่มีการปล่อยน้ำทิ้งสู่แหล่งน้ำภายนอก

4. กรณีกุ้งใหญ่ที่สามารถจับขายได้ต้องใช้วิธีการจับที่ไม่ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อไปยังพื้นที่อื่น เช่น มีการต้มบริเวณปากบ่อ (ความร้อนสามารถฆ่าเชื้อได้) ก่อนเคลื่อนย้ายกุ้งออกจากฟาร์ม

5. ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในกิจกรรมการเลี้ยงกุ้งทั้งหมด จนแน่ใจว่าปลอดเชื้อ

2.2.11 การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อตัวแดงดวงขาว สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีระดับความถูกต้องแม่นยำแตกต่างกัน

1. การวินิจฉัยขั้นต้น (Screening and Presumptive)

1.1 ดูลักษณะภายนอกและพฤติกรรมทั่วไป (Gross and clinical sign observations)

- กุ้งที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาวจะมีดวงสีขาวใต้เปลือก มีขนาด 0.1-2.0 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีแดงอมชมพูจนถึงส้ม
- กุ้งจะกินอาหารลดลง และมีอาการเซื่องซึม
- ภายใน 2-3 วัน กุ้งป่วยจะว่ายน้ำขึ้นมาเกยบริเวณขอบบ่อ และตายจำนวนมาก

1.2 เนื้อเยื่อวิทยา ตรวจสอบจากลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเป้าหมายที่มีการติดเชื้อ เช่น เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เหงือก

- ทำ wet mount ของเนื้อเยื่อใต้เปลือกสด โดยไม่ต้องย้อมสี แต่ fix ตัวอย่างด้วยฟอร์มาลิน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Dark field จะเห็นนิวเคลียสของเนื้อเยื่อใต้เปลือกมีลักษณะบวมโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่าย ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Hypertrophied nuclei)

- ย้อมชี่เหงือก (Gill filament) หรือ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (Lymphoid organ) ที่ผ่านการดองในน้ำยา Davidson's fixative ด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา จะเห็นนิวเคลียสมีลักษณะบวมโต (Hypertrophied nuclei)

2. การตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยัน (Confirmatory)

2.1 การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลระดับสูง ได้แก่เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) , in situ hybridization , Western blot analysis และ DNA sequencing of PCR products

2.2 การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (Transmission Electron microscopy) ดูลักษณะอนุภาค (Particle) ของเชื้อในเนื้อเยื่อเป้าหมายที่สงสัย

2.3 การตรวจด้วยวิธีชีววิเคราะห์ (Bioassay method) เป็นการแยกเชื้อจากกุ้งป่วย นำมาฉีดกลับเข้ากุ้งปกติ และเฝ้าติดตามอาการและพยาธิสภาพของกุ้งที่ป่วย ก่อนจะทำการแยกเชื้อมายืนยันลักษณะเฉพาะของเชื้อเดิมที่ฉีดเข้าไปโดยใช้เทคนิคใน ข้อ 2 หรือให้กุ้งปกติกินส่วนของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อและสังเกตลักษณะอาการและพยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

2.2.12 **อัตราการตาย (mortality)**

อัตราการตายซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 ถึง 2 วัน จะพบกุ้งตายเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ เนื่องจากเป็นโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจึงไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีใดๆ รักษาโรคชนิดนี้ได้

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัชรยา มาศแจ้ง, ศิริขวัญ ผลประทีป และธิปชัย วัฒนวิจารณ์ (2561) โปรตีนพลาสโมไลปินเป็นโปรตีนชนิดโปรติโอลิปิดและจัดอยู่ในกลุ่มของ tetraspan (4TM) myelin proteins ซึ่งโปรตีนพลาสโมไลปินเป็นตัวรับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาคำ และมีการแสดงออกของยีนพลาสโมไลปินเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการผลิตโปรตีนลูกผสมพลาสโมไลปินจากกุ้งกุลาดำใน *Escherichia coli* เพื่อนำโปรตีนพลาสโมไลปินที่ได้ไปใช้ในการศึกษาการจับกับไวรัสหัวเหลือง การผลิตโปรตีนลูกผสมพลาสโมไลปินเริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีนพลาสโมไลปินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ายีนพลาสโมไลปินมีขนาด 558 คู่เบส จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ pMXB10 แล้วจึงทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อทำการผลิตโปรตีนลูกผสม จากการตรวจสอบโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot พบว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้มีขนาด 42 กิโลดาลตัน เนื่องจากออกแบบให้โปรตีนลูกผสมพลาสโม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลปิน (18 กิโลดาลตัน) เชื่อมติดกับ chitin binding domain ที่มีขนาด 24 กิโลดาลตัน โปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบการจับกับไวรัสหัวเหลืองต่อไป

Jianbo Li, Limei Xu, Fang Li, Feng Yang (2013) VP12 และ VP150 เป็นโปรตีนย่อยของไวรัสตัวแดงจุดขาว (WSSV) ในการศึกษาก่อนหน้าของเราพบว่า VP12 ทำปฏิกิริยากับ VP150 ขนาด 53 kDa ในการศึกษานี้เรายืนยันการทำงานร่วมกันโดยการทดสอบแบบร่วมภูมิคุ้มกันและแสดงให้เห็นว่าขอบเขตการจับกับ VP12 การศึกษาเพิ่มเติมพบว่า VP12 สามารถติดกับ WSSV capsids โดยการโต้ตอบกับ capsid โปรตีน VP51 การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นว่า VP12 อาจทำหน้าที่เป็นโปรตีนลิงเกอร์ที่มีส่วนร่วมในการเชื่อมโยงระหว่าง VP12 / VP150 คอมเพล็กซ์และนิวคลีโอแคปไซด์ของไวรัส

Xixian Xie, Limei Xu, andFeng Yang (2006) ไวรัสบริสุทธิ์จากโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) ถูกทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อของเชื้อ *Procambarus clarkii* (กั้ง) ที่ติดเชื้อ การทำให้ WSSV บริสุทธิ์ โดยใช้ไทรทัน X-100 เพื่อแยกออกเป็นส่วน ๆ ของ nucleocapsid ต่อมาแยกด้วย 12 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ เยื่อหุ้มและโปรตีนนิวคลีโอแคปซิดถูกกำจัดไอออนแบบเมทริกซ์ การศึกษานี้มีโปรตีนโครงสร้าง 30 ชนิดของ WSSV ตรวจพบ 22 เยื่อหุ้ม 7 นิวคลีโอแคปซิด ใช้แอนติบอดี้ที่เฉพาะเจาะจงในการศึกษาการแปลโปรตีน 8 ตัวต่อไป การวิเคราะห์การปรับเปลี่ยนหลังการถ่ายโอนเผยให้เห็นว่าไม่มีโปรตีนใดที่เป็น glycosylated และ VP28 และ VP19 เป็น threonine phosphorylated นอกจากนี้การทดลองใช้ Far-Western และ co immunoprecipitation แสดงให้เห็นว่า VP28 มีปฏิสัมพันธ์กับทั้ง VP26 และ VP24 โดยสรุปข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ควรเป็นข้อมูลอ้างอิงที่สำคัญสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลของ WSSV morphogenesis ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina air flow) รุ่น V-3T-0811 (Microtech, USA)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. ชุด SDS-PAGE รุ่น Mini-PROTEAN Tetra cell (BIO-RAD, USA)
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น GI54TW (Zealay, USA)
6. เครื่อง sonicator รุ่น VCX 750 (Sonics, Australia)
7. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น ZHWY- 100H (ZHICHEN, China)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น UNIVERSAL320R (Hettish, Germany)
10. ตู้แช่เย็น
11. เครื่อง Electrophoresis รุ่น Mini-Sub Cell (Bio-RAD, USA)
12. เครื่องกำเนิดแสง UV (UV- Transilluminator)
13. เครื่อง Thermal cycler รุ่น T-100TM (BIO-RAD,USA)
14. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-1200 (MAPADA, China)
15. Water bath
16. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์
18. ทิป
19. Micro pipette รุ่น BENCHMATE II (Nichiryo, Japan)
20. ช้อนตักสาร
21. บีกเกอร์
22. แท่งแก้วรูปตัวแอล
23. ขวดรูปชมพู่
24. เข็มเขี่ยเชื้อปลายวงกลม
25. Centrifuge tube ขนาด 15 ml และ 50 ml (Corning , USA)
26. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml (Axygen, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. ชุดสำหรับการเตรียม Agarose gel
28. เครื่อง semidry blotter รุ่น WSE-4020 HorizeBLOT 2M-R (Atto, Japan)

3.1.2 สารเคมี

1. อะกาโรส(Agarose)
2. สีย้อมเจล (Biofactory) (Yuseong-Gu, Daejeaon, Korea)
3. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
4. Vector pET28b(+)
5. *NcoI* (BioLabs)
6. *XhoI* (BioLabs)
7. 0.5X TBE (BioLabs)
8. DNA marker
9. Ligation Enzyme (T4 Ligase)
10. Competent cell (XL1Blue)
11. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB)
12. $CaCl_2$
13. FavorPrep^{TM} plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp, Taiwan)
14. FavorPrep^{TM} GEL/PCR purification kit (Favorgen Biotech Corp, Taiwan)
15. Ecodye^{DM} Nucleic acid stanning solution (Yuseong-Gu, Daejeaon, Korea)
16. Coomassie Brilliant Blue (Merck Millipore)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ด้วยเทคนิค PCR

ในโครงงานพิเศษนี้ได้รับความอนุเคราะห์ ยีน WSSV065 จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะด้านอณูวิทยาและ จีโนมกุ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำยีนที่ได้มาทำการเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ด้วยวิธีการ PCR ที่สภาวะดังนี้

ตารางที่ 3.1 สารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน

ปริมาตร	สาร
8 µl	10 mM dNTP
4 µl	10 µM Primer F
4 µl	10 µM Primer R
20 µl	10X PCR Buffer
1.04 µl	Taq DNA Polymerase (5 unit/µl)
8 µl	DNA Template
150.96 µl	DI water
200 µl	**Total**

ปริมาตรสุทธิ 200 µl โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

ตารางที่ 3.2 สภาวะในการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR

กระบวนการ	เวลา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
Initial Denaturation	3 นาที	94	
Denaturation	30 วินาที	94	30 รอบ
Annealing	30 วินาที	55	
Extension	30 วินาที	72	
Final extension	5 นาที	72	

จากนั้นนำยีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep™ GEL/PCR purification Kit โดยปฏิบัติตามคู่มือ โดยทำการ ตัดเจลที่มีตัวอย่างใส่ลงใน microtube (1.5 ml) เติม FADF buffer 500 µl และ ทำการ vortex (set PCR kit ใส่หลอดละ 500 µl) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที นำออกมา vortex ทุกๆ 2 นาที จนเจลละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ใส่ FADF Column ลงใน Collection tube ดูดตัวอย่าง (เจลที่ละลายแล้ว) ใส่ใน FADF Column 800 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 g เวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งส่วนใส เติม wash buffer 750 µl ลงใน FADF Column

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 g เวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งส่วนใส นำ Column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 g เวลา 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง นำ FADF Column ใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม Elution buffer 40 µl หรือ น้ำ(DI) ลงตรงกลางของ membrane FADF column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 g เวลา 1 นาที เพื่อชะเอา DNA ออกมา นำส่วนใส หาความเข้มข้นของ DNA ที่ได้ (PCR Product) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.3 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	วัตถุประสงค์
Forward-pET28b-NcoI	ATCGCCATGGACCAGCTTACAGAAAAT	เพื่อเพิ่มปริมาณยีน WSSV065 ด้วยระบบ *E.coli*
Reward-pET28b-XhoI	ATCGCTCGAGCCCCTCCACACGCCTG	

3.3 การตัดต่อยีนเพื่อเพิ่มจำนวน

ตัดชิ้นส่วน Recombinant WSSV065 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* ที่สภาวะดังนี้

ตารางที่ 3.4 สารที่ใช้ในการตัดชิ้นส่วน Recombinant WSSV065

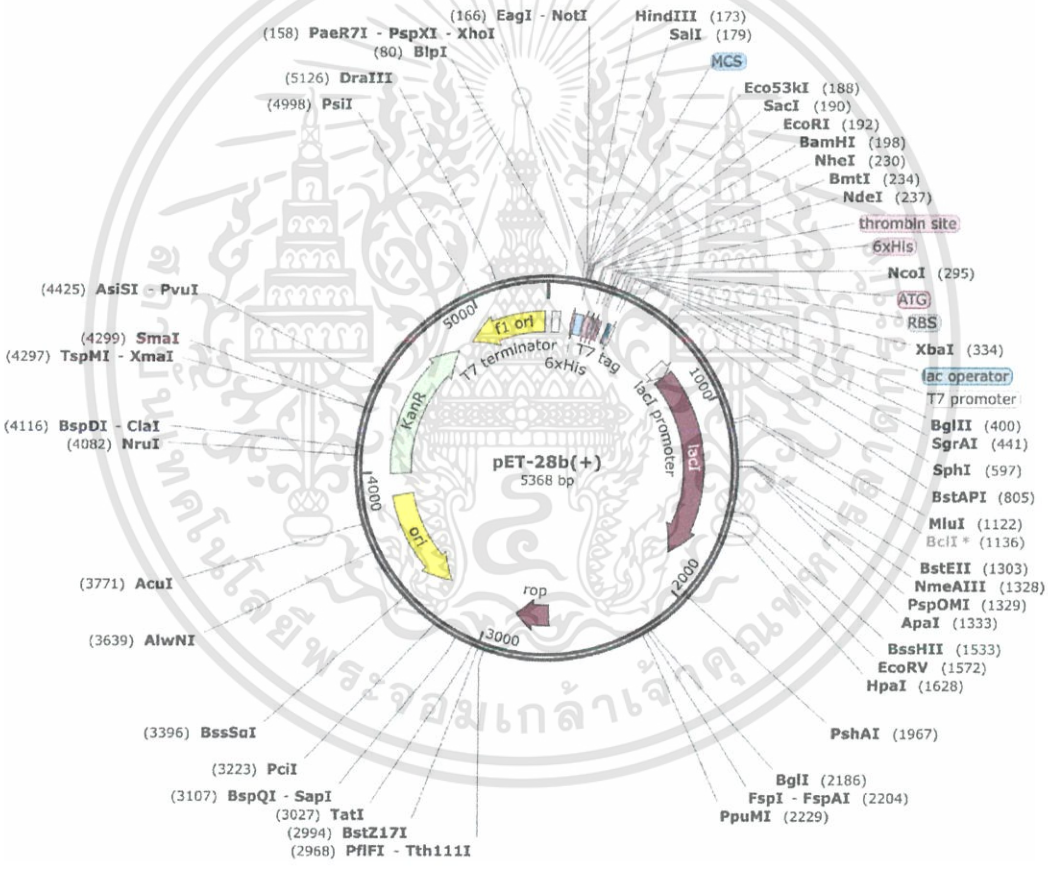
ปริมาตร	สาร
12.12 µl	Vector (1,000 ng)
1 µl	*NcoI*
1 µl	*XhoI*
5 µl	Cut smart Buffer
30.88 µl	DI water
50 µl	**Total**

ปริมาตรสุทธิ 50 µl จากนั้นกำจัดชิ้นส่วนที่ไม่ต้องการด้วย FavorPrep™ GEL/PCR purification kit โดยนำสารละลายชิ้นส่วนที่ต้องการมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET28b(+) ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* ด้วยสภาวะเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายพลาสมิดที่ได้ ย้ายเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ XL1 Blue ด้วยวิธีการ Heat Shock เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทิ้งไว้ข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอน Clean up (cut pET28 และ cut PCR product)

นำตัวอย่างใส่ microcentrifuge tube 50 µl เติม FADF buffer 250 µl จากนั้นทำการ vortex นำ FADF Column ใส่ใน collection tube แล้วย้ายสารที่ได้ลง column นำ Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 g เวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนที่ออกจาก column เติม wash buffer 750 µl ลงใน FADF Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 g เวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งส่วนใส นำ Column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 g เวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง นำ FADF column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม elution buffer 40 µl หรือน้ำ(DI) ลงตรงกลางของเมมเบรน FADF column ทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 g เวลา 1 นาที เพื่อชะเอา DNA ออกมา



รูปที่ 3.1 pET28b(+) vector map 5368 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ligation

Enzyme (T4 ligase)	1 µl
Buffer (T4 DNA ligase Buffer)	2 µl
Vector (pET28b)	7 µl
PCR Product	10 µl

บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

3.4 การตัดต่อยีนเพื่อผลิตโปรตีน

ทำการสกัดพลาสมิดด้วย FavorPrep™ plasmid DNA Extraction Mini Kit ย้ายเข้าสู่ *E.coli* BL21(DE3) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยทิ้งไว้ข้ามคืน ปิเปต start culture 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร นำไป centrifuge ที่ 12,000 rpm 1 นาที ทิ้งส่วนใสทำซ้ำจนกว่า start culture จะหมด เติม FAPD 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต เติม FAPD 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการ invert หลอดไปมา 10 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เติม FAPD 3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วทำการ invert หลอด 10 ครั้งทันทีอย่างระมัดระวัง นำ FAPD column ใส่ใน collection tube ปิเปตส่วนใสใส่ column จากนั้นนำไป centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส ใส่ W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไป centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส ใส่ wash buffer 600 ไมโครลิตร centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส ทำการ dry column เป็นเวลา 3 นาที นำ column ใส่หลอด microcentrifuge 1.5 ml เติม Elution Buffer 50 – 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไป centrifuge 1 นาที เมื่อสกัดพลาสมิดเสร็จ ทำการเก็บพลาสมิด ดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cut Check (Plasmid)

ตารางที่ 3.5 ปริมาตรสารที่ใช้ในการ Cut Check (plasmid)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
CUT Smart buffer	2
NcoI	1
XhoI	1
Template	16
Total	20

3.5 กระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

เลี้ยง Recombinant WSSV065 pET28b(+) ใน *E.coli* BL21(DE3) ในอาหารเหลว โดยนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนได้ค่าดูดกลืนแสง 0.4 - 0.6 จากนั้นนำไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3 และ 4

โดยวิธีการเก็บตัวอย่างของแต่ละชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm เวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วเติม 1X PBS 100 ไมโครลิตร เติมสี 5X SDS 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที ตรวจสอบด้วย SDS-PAGE

3.6 Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ความบริสุทธิ์ของโปรตีน VP12 ถูกตรวจสอบบน 18% SDS-PAGE เจลถูกย้อมด้วยคูแมสซีบริลเลียนท์บู (Coomassie Brilliant Blue) นอกจากนี้ทำการตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยการตรวจสอบด้วย HisDetector™Nickel-AP (KPL)

ทำการประกอบชุดอุปกรณ์ทำ gel electrophoresis เตรียม resolving gel 18% gel acrylamide ใช้ปิเปตดูด resolving gel ลงในชุดรันเจล รอเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เตรียม stacking 5% gel acrylamide จากนั้นดูด stacking gel ลงไปแล้วทำการปัก comb รอให้เจลแข็งตัวจึงนำ comb ออก ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดเศษเจล เติม 1X SDS running solution ลงในช่อง run gel ด้านในและกล่อง run gel ด้านนอก โหลดตัวอย่างโปรตีนที่ต้มแล้ว 20 ไมโครลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

standard protein ladder 2 ไมโครลิตรลงใน well ต่อชุดอุปกรณ์ gel electrophoresis เข้ากับ power supply ปรับกระแสไฟฟ้า 25 mA ใช้เวลาประมาณ 70 นาที เมื่อ run gel เสร็จทำการนำแผ่นเจลออกจากชุดอุปกรณ์ แล้วนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสีย้อม คูแมสซีบริลเลียนท์บูล (Coomassie Brilliant Blue) เพื่อดูขนาดโปรตีน ใช้เวลา 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน นำแผ่นเจลที่ทำการย้อมสี คูแมสซีบริลเลียนท์บูล(Coomassie Brilliant Blue) มาล้างสีย้อมโดยการแช่ใน Destain Solution ทิ้งไว้ข้ามคืน นำแผ่นเจลมาดูขนาดโปรตีน

Western blot

ทำการแช่แผ่น membrane, nitrocellulose ใน transfer buffer จากนั้นเรียงแผ่น membrane, SDS-PAGE และ nitrocellulose ลงในเครื่อง semi-dry blotting โดย Western blot กระแสจะวิ่งจากด้านบนลงล่าง ทำให้เกิดการบีบโปรตีนจากแผ่น SDS-PAGE ลงไปอยู่บนแผ่น nitrocellulose และ Membrane – PVDF ต้อง Active ใน Methanol ก่อน 30 วินาทีแล้วแช่ใน Transfer buffer เมื่อวางแต่ละชั้นลงบนเครื่อง semi-dry blotting ให้ใช้แท่งแก้วไล่ฟองอากาศออก ปิดฝาครอบ ต่อสายไฟเข้ากับ power supply ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose ใส่ลงใน block เท 5% skim milk ให้ท่วม membrane นำไปเขย่า 30 นาที เท 5% skim milk เก็บไว้จากนั้นล้าง membrane ด้วย wash buffer โดยการตรวจสอบด้วย HisDetector™ Nickel-AP (KPL)

3.7 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ด้วยเครื่อง Sonicate ในสภาวะ 50% Amplitude 2 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Affinity column Ni Sepharose™ 6 Fast Flow

3.7.1 ขั้นตอนการล้างคอลัมน์

ล้างคอมลัมน์ด้วย 0.1 NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนเต็มหลอด 1 รอบ เติม 50 mM Imidazole in PBS 1-2 รอบ เติม Ni Sepharose™ 6 Fast Flow ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.7.2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

ทำการล้างคอลัมน์ ด้วย DI water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ ด้วย Washing buffer (50 mM Imidazole in PBS) 2 ครั้ง เติมโปรตีนที่ต้องการจะทำให้บริสุทธิ์ ลงไป เก็บสารละลายที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็น flow through ล้างคอลัมน์ ด้วย Washing buffer (50 mM Imidazole in PBS) เมื่อครบ 4 รอบเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

wash จากนั้น Elute ด้วย Elution buffer (300 mM Imidazole in PBS) เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ใส่ Eppendorf ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายโปรตีนที่ elute ได้ 100 ไมโครลิตร ใส่ 5X SDS 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีไมโครลิตร

3.8 การทำไดอะไลซิส

นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยนำมาผ่าน Affinity column โดยนำสารละลายโปรตีนมาบรรจุลงถุงไดอะไลซิส cut–off ขนาด 3 kDa แล้วนำไปแช่ลงใน 1X PBS โดยนำ 300 mM Imidazole in PBS ที่ใช้ชะโปรตีนออกมาจาก Affinity column ออกเพราะมีความเป็นพิษต่อโปรตีน แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โดยจะทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง

3.9 การวัดความเข้มข้นโปรตีน Bradford method

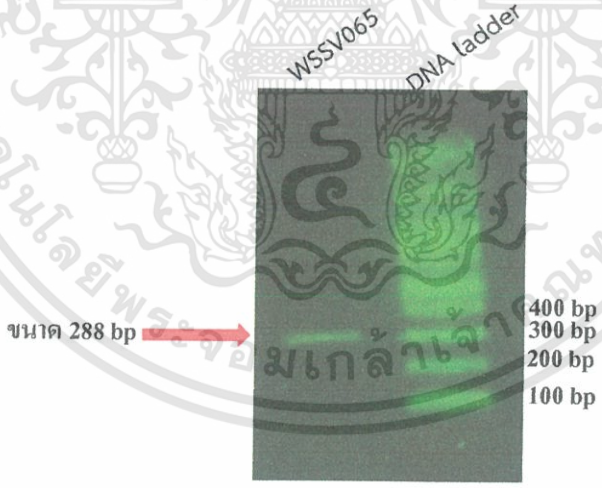
โดยจะต้องทำ standard curve ทุกครั้ง เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น stock 1 mg/ml เตรียม standard curve ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/ml , 0.1 mg/ml , 0.2 mg/ml , 0.3 mg/ml , 0.4 mg/ml และ 0.5 mg/ml เตรียมโปรตีนที่ใช้ในการวัดสารละลายมาตรฐานและโปรตีนที่ต้องการวัด โดยทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานและโปรตีน 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 1X Bradford dye 200 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยระบบ *Escherichia coli*

เพิ่มจำนวนยีน WSSV065 โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ เมื่อทำการเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ด้วยวิธี PCR จะได้พีซีอาร์โปรดักส์ คือ WSSV065 จากการตรวจสอบขนาดของพีซีอาร์โปรดักส์ WSSV065 เปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส1.2 % ได้ผลดังรูปที่ 4.1 พบว่ายีน WSSV065 ที่ได้จากพีซีอาร์โปรดักส์ WSSV065 มีขนาดเท่ากับ 288 คู่เบส ซึ่งรวมส่วนของเรสตริกชั่นเอนไซม์ (restriction enzyme) ที่ปลาย 5' และ 3' ของพีซีอาร์โปรดักส์ จากนั้นทำการแยกพีซีอาร์โปรดักส์ WSSV065 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (PCR Purification kit) เพื่อจะนำมาเตรียมโคลนนิ่งเข้าสู่เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกใน pET28b(+)

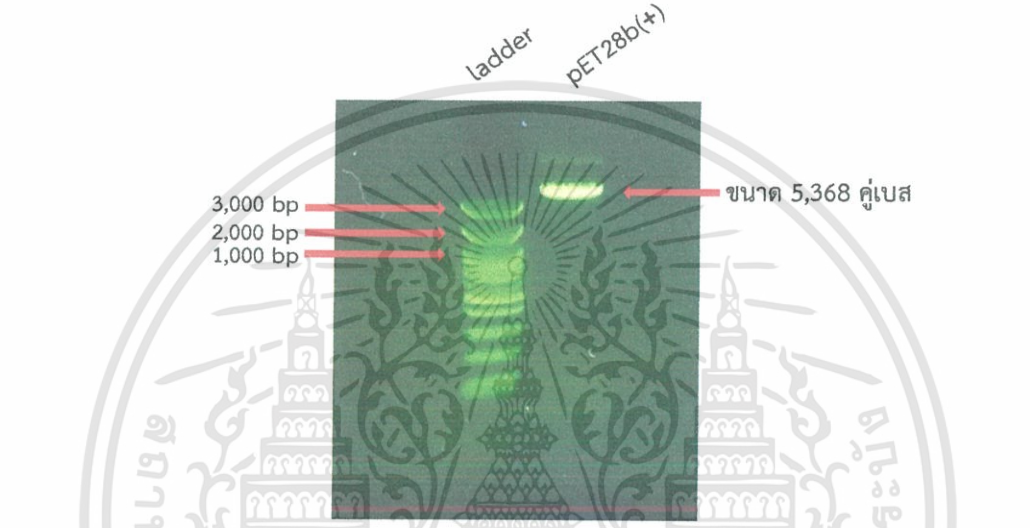


รูปที่ 4.1 แสดงชิ้นส่วนของยีน WSSV065 ขนาด 288 คู่เบสที่ได้จากการทำ RT-PCR แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2% แล้วนำมาส่องด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV (UV-Transilluminator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเตรียมยีน WSSV065 และเวคเตอร์ pET28b(+)

ในการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ WSSV065 (ที่ได้จากการทำ PCR) ก่อนนำไปโคลนเข้าเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน (pET28b(+)) ได้ทำการย่อยปลาย 5' และ 3' ของยีน WSSV065 เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปลายเหนียว (cohesive end) พร้อมที่จะไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ดีเอ็นเอ pET28(b) ได้ ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ 2 ตัวคือ *NcoI* และ *XhoI* ในรูปที่ 4.2 แสดงการตรวจสอบขนาดของเวคเตอร์ pET28b(+) หลังจากการย่อยปลาย ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2 % (แถวที่ 2)



รูปที่ 4.2 แสดงชิ้นส่วนของเวคเตอร์ pET28b(+) ที่ถูกย่อยปลายด้วย *NcoI* และ *XhoI*

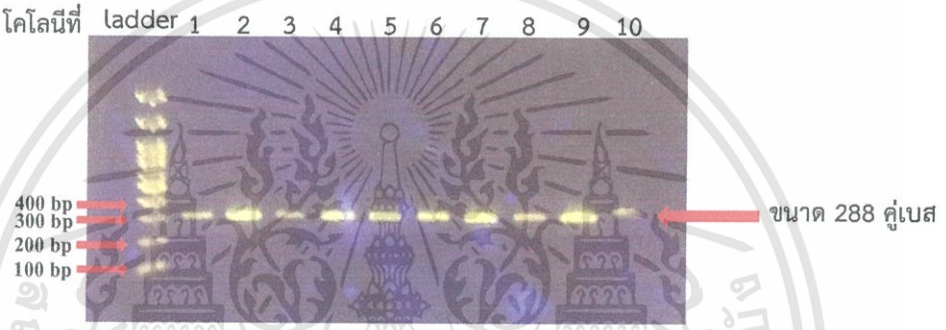
4.3 การโคลนยีน WSSV065 เข้าในเวคเตอร์ pET28b(+)

ในการเชื่อมต่อยีน WSSV065 และเวคเตอร์ pET28b(+) ที่ตำแหน่ง *NcoI* และ *XhoI* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase และทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ XL1Blue (completent cell) จากการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมด้วยยากานาไมซิน พบว่าจานเลี้ยงเชื้อ(Plate) ที่มีเวคเตอร์ pET28b(+)/WSSV065 จะพบโคโลนีสีขาว แสดงว่าในการทำทรานสฟอร์มยีน WSSV065 ที่มีเวคเตอร์ pET28b(+) เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ XL1Blue หลังจากนั้นทำการสุ่มโคโลนีที่ได้จากจานเลี้ยงเชื้อที่มีเวคเตอร์ pET28b(+) เพื่อทำการคัดเลือกเฉพาะโคลน *E.coli* (pET28b(+)/WSSV065)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม

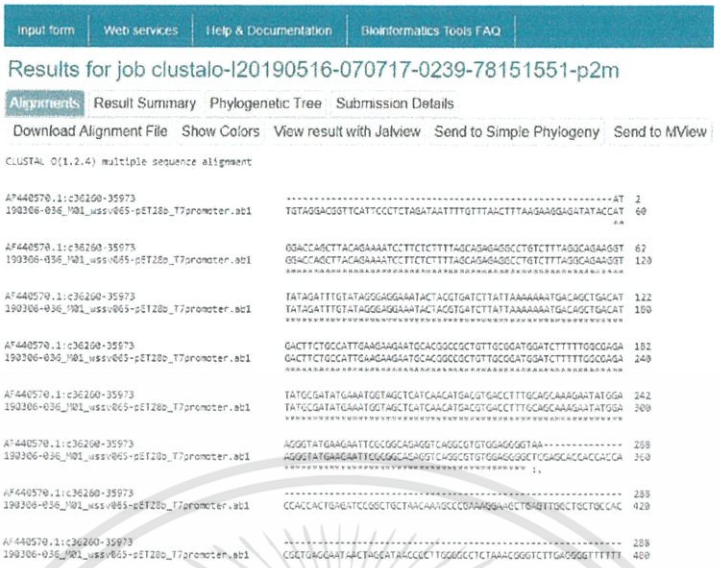
การคัดเลือกโคโลนี *E.coli* ที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชั่นจำนวน 10 โคโลนี เพื่อให้ได้เฉพาะ *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ ให้ผลดังรูปที่ 4.3 พบว่ามี *E.coli* จำนวน 10 โคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pET28b(+) (โคโลนีที่ 1-10) จากนั้นนำทรานสฟอร์มที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกโดยวิธีพีซีอาร์ มาทำการยืนยันผลซ้ำ โดยการนำทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอลูกผสม ด้วยวิธีสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทำการย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ *NcoI* และ *XhoI* ซึ่งเป็นตำแหน่งในการโคลนยีน WSSV065 เข้าเวคเตอร์ pET28b(+) พบว่าโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมจะมีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ คือ ดีเอ็นเอของ WSSV065 ขนาด 288 คู่เบส ทั้ง 10 โคโลนี



รูปที่ 4.3 แสดงตัวอย่างการคัดเลือกโคลน *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีพีซีอาร์ โดยจะได้พีซีอาร์โปรดักส์คือ WSSV065 ขนาด 288 คู่เบส ทำการแยกดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2 %

หลังจากนั้น สารละลายพลาสมิด WSSV065 pET28b(+) ได้ถูกส่งตรวจสอบลำดับเบส เมื่อได้ลำดับเบสมาแล้วจึงนำมาตรวจสอบความถูกต้องของยีนจากลำดับเบสทั้งหมด ด้วยวิธีการ pair wise alignment ลำดับเบสทั้งหมดกับลำดับเบสของยีน WSSV065 ในฐานข้อมูลของ NCBI ได้ผลดังรูปที่ 4.4 และตรวจสอบซ้ำอีกรอบด้วยการนำส่วนที่ซ้ำกัน ไปเข้าโปรแกรม BLAST ผลคือเป็นยีน WSSV065 จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลำดับเบสทั้งหมดกับลำดับเบสของยีน WSSV065 ในฐานข้อมูลของ NCBI

4.4.1 ผลการ translation ตั้งแต่ start ถึง stop codon

1 atg gac cag ctt aca gaa aat cct tct ctt tta gca gag agg cct gtc ttt agg cag aag 60

1 M D Q L T E N P S L L A E R P V F R Q K 20

61 gtt ata gat ttg tat agg gag gaa ata cta cgt gat ctt att aaa aaa atg aca gct gac 120

21 V I D L Y R E E I L R D L I K K M T A D 40

121 atg act tct gcc att gaa gaa gaa tgc acg gcc gct gtt gcg gat gga tct ttt tgg cga 180

41 M T S A I E E E C T A A V A D G S F W R 60

181 gat atg cga tat gaa atg gta gct cat caa cat gac gtg acc ttt gca gca aag aat atg 240

61 D M R Y E M V A H Q H D V T F A A K N M 80

181 gat atg cga tat gaa atg gta gct cat caa cat gac gtg acc ttt gca gca aag aat atg 240

61 D M R Y E M V A H Q H D V T F A A K N M 80

241 gaa ggg tat gaa gaa ttc gcg gca gag gtc agg cgt gtg gag ggg ctc gag cac cac cac 300

81 E G Y E E F A A E V R R V E G L E H H H 100

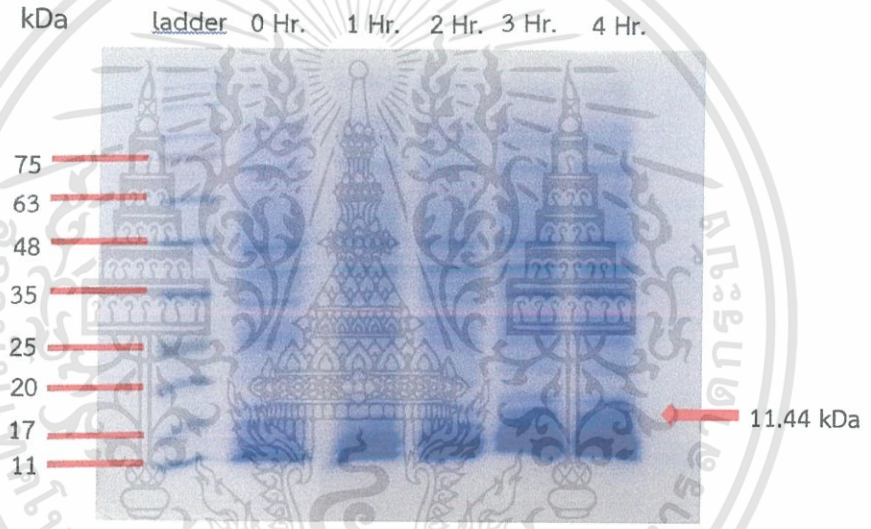
301 cac cac cac tga

101 H H H *

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

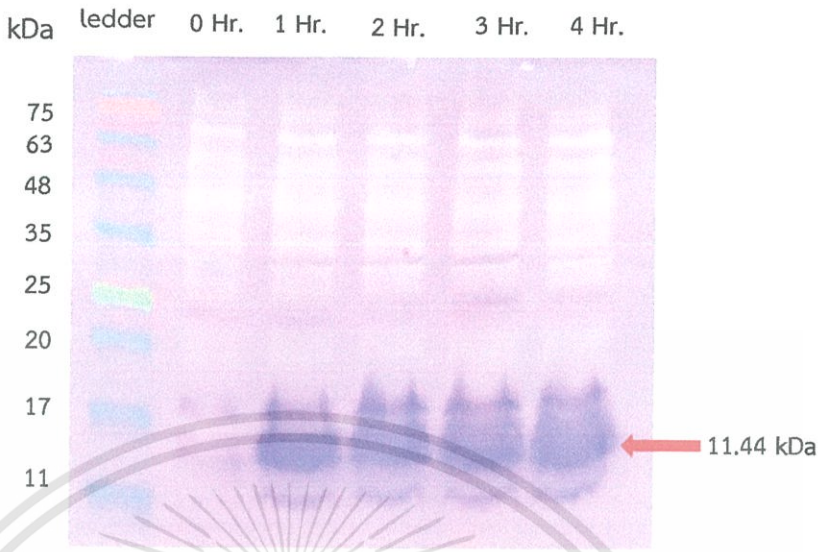
4.5 การตรวจสอบการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสม

จากการนำโคลนที่คัดเลือกว่ามีพลาสมิดลูกผสม มาเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะ log phase หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.4-0.6 แล้วจึงเติมสารละลาย 1 mM IPTG ได้ผลดังรูปที่ 4.5 เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้เติมสารละลาย 1 mM IPTG (ชั่วโมงที่ 0) และเลี้ยงต่อไปอีก 4 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเซลล์นำมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า SDS-PAGE 18 % ที่สภาวะกระแสไฟฟ้า 25 mA เป็นเวลา 70 นาที และตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นด้วยการวิเคราะห์ Western blot รูปที่ 4.6 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงอัลตราโซนิค (Ultrasonicator) และปั่นแยกสารละลายโปรตีนจากเซลล์เป็นส่วนน้ำใส

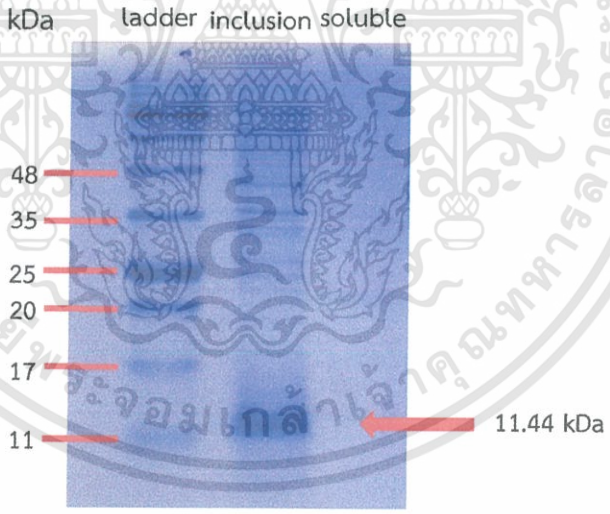


รูปที่ 4.5 การกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG และตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE 18 % ย้อมสีด้วยคูแมสซีบริลเลียนท์บูล(Coomassie Brilliant Blue) พบการผลิตโปรตีนได้มากที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 4 โดยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ผลิตได้มีขนาด 11.44 kDa

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ตรวจสอบโปรตีน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot หลังจากกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG และตรวจสอบด้วย HisDetector™Nickel-AP (KPL)



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณโปรตีนที่อยู่ในส่วนตะกอน(inclusion) และส่วนใส(soluble) หลังการแตกเซลล์ด้วย sonicate และตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE 18 % ย้อมสีด้วยคูแมสซีบริลเลียนท์บูล (Coomassie Brilliant Blue)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni Sepharose™ 6 Fast Flow

หลังจากการนำโปรตีนที่อยู่ในส่วนของตะกอน ไปทำการละลายด้วย 0.1M NaOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา1ชั่วโมง ได้นำสารละลายส่วนที่มีโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni Sepharose™ 6 Fast Flow นำสารละลายในแต่ละส่วนมาทำตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE 18 % โดยทำการโหลดโปรตีนได้มา 5ไมโครลิตร 10ไมโครลิตร และ20ไมโครลิตรได้ผลดังรูป4.8

รูปที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE 18 %

4.7 การหาความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford

เมื่อนำสารละลายโปรตีนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ทั้งหมดไปทำการไดอะไลซิส แล้วนำมาหาความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford เมื่อนำสารละลายโปรตีนมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร พบว่ามีค่าดูดกลืนแสง 0.825 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA พบว่ากราฟมาตรฐานมีค่า R^2 = 0.9945 ได้โปรตีนที่ความเข้มข้น 306 mg/L culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน WSSV065 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยระบบ *E.coli* โดยการประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนยีน WSSV065 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี PCR ยีน WSSV065 ที่ได้จากพีซีอาร์ ถูกเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์เพื่อแสดงออกสำหรับ *E.coli* สายพันธุ์ XL1Blue คือ เวคเตอร์ pET28b(+) ที่ตำแหน่ง *NcoI* และ *XhoI* และทรานสฟอร์มเข้าใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โคลน *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)ที่มีพลาสมิดลูกผสมจะถูกคัดเลือกโดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์และตรวจสอบการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 1 mM IPTG ซึ่งผลิตโปรตีนได้ดีที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 4 ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 18 % ย้อมสีด้วยคูแมสซีบริลเลียนท์บูล(Coomassie Brilliant Blue) ตรวจสอบโปรตีน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot หลังจากกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG และตรวจสอบด้วย HisDetector^{TM}Nickel-AP (KPL) จากนั้นนำโปรตีนที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ Ni Sepharose^{TM} 6 Fast Flow ทำการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE 18 % ซึ่งโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในรูปของตะกอน(inclusion) และนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford ได้โปรตีนที่ความเข้มข้น 306 mg/L culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุ้งกุลาดำ.[Online]. Available: https://www.thaikasetsart.com/กุ้งกุลาดำ. (สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

กุ้งกุลาดำ.[Online]. Available: https://th.wikipedia.org/wiki/กุ้งกุลาดำ.(สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

ขนิษฐา ดิษทับ. 2558."การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase จากปลาสวาย (Pangasianodon hypophthalmus) และ การใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้เป็นโปรไบโอติกส์ในอาหารปลา" วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บ้านจอมยุทธ์. 2543. การนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell (transformation). [Online]. Available:https://www.baanjomyut.com/library_2/extension2/techniques_in_molecular_biology/10.html (สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

บ้านจอมยุทธ์. 2543. เทคนิค DNA cloning.[Online].Available:http://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/techniques in_molecular_biology/08.html (สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

บ้านจอมยุทธ์. 2543. การเชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA กับ cloning vector เพื่อให้ได้ recombinant DNA. [Online]. Available:https://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/techniques in_molecular_biology/09.html (สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

วัชรายา มาศแจ้ง. 2537."การผลิตโปรตีนลูกผสมพลาสโมไลปินจากกุ้งกุลาดำด้วย *Escherichia coli* Production of Recombinant Protein from Black Tiger Shrimp, *Penaeus Monodon* y *Escherichia coli*" (วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ,2561.)

โรคตัวแดงดวงขาวเกิดจากเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV).[Online]. Available: http://www.aquathai.org/jvmyhn19-4.html (สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

Durand S, Lightner DV, Nunan LM, Redman RM, Mari J, bonami JR (1996) Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Dis Aquat Org 27:59-66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inouye,K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T.Kimura, K. Momoyama and M. Hiraoka.1994.Mass morta ities of cultured kurama shrimp *Penaeusjaponicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish. Pathol.29:149-158

Jianbo Li, Limei Xu, Fang Li, Feng Yang. 2013. "Low-abundance envelope protein VP12 of white spot syndrome virus interacts with envelope protein VP150 and capsid protein VP51". Virus Research. 178: 260-210.

Mayo, M. A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV.Arch.Virol. 147:1655-1663

Nathaporn4293. 2016. กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. [Online]. Available :http://oceanmaidblog.wordpress.com/-penaeus-monodon.

pET28b(+) vector map 5368 bp.[Online]. Available:https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/? set=pet_and_duet_vectors_(novagen) &plasmid =pET28b(%2B) &fbclid=IwAR2f2a2py1XfRWwqxjOEm6UP6SOcGM0vKaJhd-zSA-TekJR0LS2Ybl3Yv9U (สืบค้นวันที่ 26 พฤษภาคม 2562)

Tahashi Y, Itami T, Kondo M, Maeda M, Fuji R, Tomonaga S, Supamattaya K, Booyaratpalin S (1994) Electron microscopic evidence of bacilliform virus inflection in Kuruma shrimp (Penaeus japonicus). Fish Pathol 29:121-125

Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. (1998). Microbiology: An introduction. (6th ed.). Addison Wesley Longman: USA.

Wongteerasupaya, C., S. Wongwisansri, V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G.L. Nash, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with viral infection in six penaeid shrimp species Aquaculture 143:23-32

What is the difference between BL21 and BL21(DE3) competent *E.coli* cells. [Online]. Available: https://international.neb.com /faqs /2016/01/21/what-is-the-difference-between-bl21-and-bl21-de3-competent-e-coli-cells2 (สืบค้นวันที่ 1 พฤษภาคม 2562)

xian Xie, Limei Xu, and Feng Yang. 2006. "Poteomic Analysis of the major Envelope and Nucleocapsid Proteins of White Spot Syndrome Virus". Journal of Virology. 80(21): 10615-10623.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. **10% sodium dodecyl sulphate (SDS)**

   ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

   SDS 10 กรัม

   ละลาย SDS ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง

2. **10% ammonium persulfate (APS)**

   ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

   ammonium persulfate 10 กรัม

   ละลาย ammonium persulfate ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. **10x Running buffer**

   ในการเตรียมสารปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

   Tris base 30.3 กรัม

   Glycine 144 กรัม

   SDS 10 กรัม

   ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. **การเตรียม 1.2 Agarose gel**

   ชั่ง Agarose 0.24 กรัม จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 1XTBE นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agarose ละลาย เติมสารฟลูออเรสเซนส์โดยใช้ Red Safe 1 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเทในกระบะ รอให้เจลแข็ง

5. **การเตรียม Destain Solution**

   ในการเตรียมสารปริมาณ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Methanol	100	มิลลิลิตร
placial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. **การเตรียม Coomassie Brilliant Blue**

ในการเตรียมสารปริมาณ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Coomassie Brilliant Blue	1	กรัม
Methanol	450	มิลลิลิตร
placial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

7. **การเตรียม 10X PBS pH 7.4**

ในการเตรียมสารปริมาณ 1 ลิตร ประกอบด้วย

NaCl	80	กรัม
KCl	20	กรัม
Na_2PO_4	14.4	กรัม
KH_2PO_4	2.4	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น แล้วนำไปปรับให้ได้ค่า pH = 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

8. **การเตรียม Washing Buffer** (50 mM Immidazole in PBS)

10X PBS	5	มิลลิลิตร
2M Immidazole	1.25	มิลลิลิตร
DI water	50	มิลลิลิตร

9. **การเตรียม luria-Bertani Medium (LB Medium)**

ในการเตรียมอาการเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย

Trpton	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Nacl	10	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับปริมาตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไวรัส

>190306-036_M01_wssv065-pET28b_T7promoter.ab1 1280

TGTAGGACGGTTCATTCCCTCTAGATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA

GATATACCATGGACCAGCTTACAGAAAATCCTTCTCTTTTAGCAGAGAGG

CCTGTCTTTAGGCAGAAGGTTATAGATTTGTATAGGGAGGAAATACTACG

TGATCTTATTAAAAAAATGACAGCTGACATGACTTCTGCCATTGAAGAAG

AATGCACGGCCGCTGTTGCGGATGGATCTTTTTGGCGAGATATGCGATAT

GAAATGGTAGCTCATCAACATGACGTGACCTTTGCAGCAAAGAATATGGA

AGGGTATGAAGAATTCGCGGCAGAGGTCAGGCGTGTGGAGGGGCTCGAGC

ACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAA

GCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGG

GGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATAT

CCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGG

GTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCG

CCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTT

TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTG

CTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGT

AGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTC

CACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACC

CTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCC

TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA

CAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG

CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC

TCATGAATTAATTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGGCA

TTTATTCTTTTCCGGATTATCATACCCTATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTG

GAATGAAGGAGAAAATCTCCCAGGGAGTTCCTAGGAGGGGAGAAACCGGG

ATCGGGCTGGGAATTCCAACCGCCCAAATAAAACAAACCATTAATTTCCC

CCGCCAAAAAAAGGGTTTCAGGGGAAAACC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การทำ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การเตรียม SDS-PAGE ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. ทำการเตรียมอุปกรณ์สำหรับทำ SDS-PAGE

เริ่มจากทำความสะอาดแผ่นกระจก (glass plates) ที่วาง(casting stand) และกรอบวาง (casting frames) ให้สะอาดโดยใช้เอทานอล 70% และปล่อยให้แห้งก่อนทำการประกบแผ่นกระจก จากนั้นประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้บน spacer plate นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่น วางลงใน Casting Frame โดยวางกระจกแผ่นสั้น (Short plate) ไว้ด้านบน Casting Frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อยๆกดล็อคด้วย Pressure Cams ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากกระจกอาจแตกจากการประกบไม่เข้ารูป จากนั้นนำแผ่นกระจกที่ประกบเข้ากันแล้ววางบน Casting stand และรีเช็คการรั่วของแผ่นกระจก โดยใช้น้ำกลั่นทดสอบการรั่วของแผ่นกระจก

2. การเตรียม separating gel

โดยผสมสารเคมีตามเปอร์เซ็นต์เจลที่ต้องการใช้ ดังตาราง ง-1 จากนั้นทำการปิเปตสารละลาย polyacrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 20 – 30 นาที

3. การเตรียม stacking gel

โดยผสมสารเคมีตามตารางเปอร์เซ็นต์เจลที่ต้องการ ดังตาราง ง-2 ปิเปต polyacrylamide gel ส่วน stacking gel ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก จากนั้นจึงวาง Comb ให้ตรง อย่าให้มีฟองอากาศโดยทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 15 – 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-1 ส่วนประกอบ separating gel 18%

สารเคมี	ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
DI water	1,290 ไมโครลิตร
Acrylamide mix	6,000 ไมโครลิตร
Tris (1.5M , pH8.8)	2,500 ไมโครลิตร
SDS (10%)	100 ไมโครลิตร
Ammonium persulfate (10%)	100 ไมโครลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร

ตารางที่ ง-2 ส่วนประกอบ stacking 5%

สารเคมี	ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
DI water	2,700 ไมโครลิตร
Acrylamide mix	670 ไมโครลิตร
Tris (1.5M , pH6.8)	500 ไมโครลิตร
SDS (10%)	40 ไมโครลิตร
Ammonium persulfate (10%)	40 ไมโครลิตร
TEMED	4 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การทำ Competent Cell

การทำ Competent

1. นำเชื้อ starter Nico (DE3) 200 µl *LB 10 ml (No Amp)
2. บ่มใน shaker 37 องศาเซลเซียส ที่ 250 rpm ให้ได้ค่า OD600 (ใช้เวลาประมาณ 2.5-3 ชั่วโมง)
3. นำออกจากเครื่อง shaker แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm 5 นาที ทิ้งส่วนใส
4. ละลายตะกอนด้วย 0.1M $CaCl_2$ 600 µl จากนั้นแช่น้ำแข็ง 10 นาที
5. นำไปปั่นเหวี่ยงทีความเร็วรอบ 5,000 rpm 5 นาที ทิ้งส่วนใส
6. ละลายตะกอนด้วย 0.1 M $CaCl_2$ 100 µl จากนั้นแช่ในน้ำแข็งเพื่อเตรียม transform
7. ใส่ plasmid 1 µl ลงในหลอด competent (จากข้อ6) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
8. นำไปแช่ใน water bath 42 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
9. เติม LB ลงไป 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ใน shaker ที่ 250 rpm
10. ปิเปตมา 100 µl เพื่อ spread บน plate LB kana บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

Transformation (XL1Blue)

1. ปิเปต vector 1 µl ใส่ในหลอด competent cell (XL1Blue) จากนั้น mix เบาๆ
2. แช่น้ำแข็ง 30 นาที
3. Heat shock 1-2 นาที อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส
4. แช่น้ำแข็ง 1-2 นาที
5. ปิเปต LB Broth ใส่ในหลอด competent 1 ml
6. บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g 3 นาที ทิ้งส่วนใส
8. เอาตะกอนมา spread plate บน LB kanamycin เป็นเวลาข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การทำ Western blot hybridization

การทำ Western blot hybridization ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังนี้

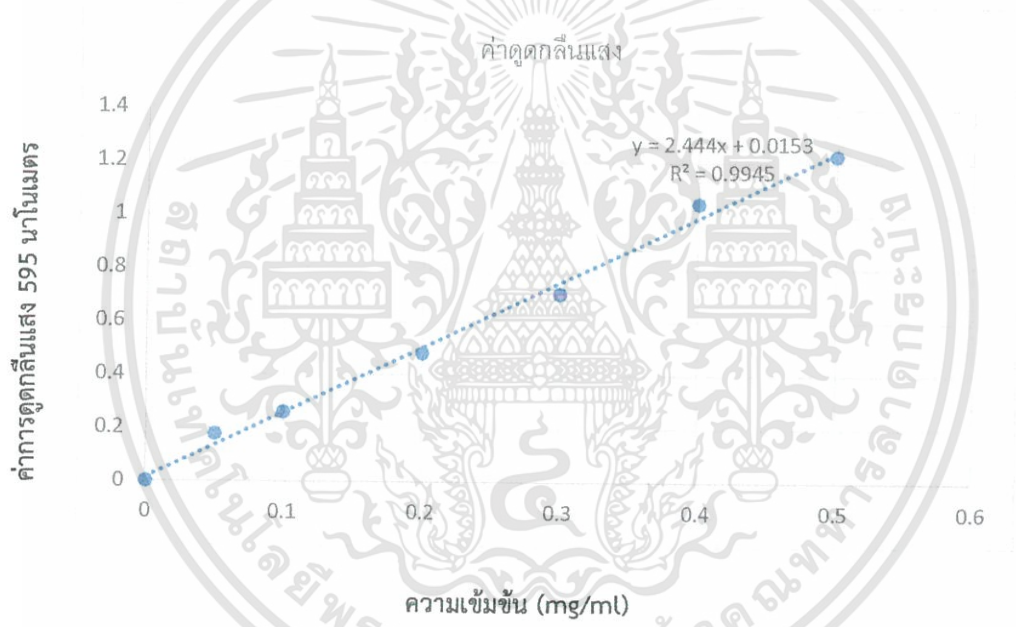
1. ทำการแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ตามขั้นตอนในภาคผนวก ง
2. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่ PVDE membrane (ทำการ activate membrane ด้วยเมทานอลก่อนใช้งาน) ด้วยเครื่อง semi-dry bolting โดยทำการแช่ PVDE membrane , support membrane และ เจล SDS ด้วยสารละลาย transfer buffer เป็นเวลา 30 นาที ทำการเรียงแผ่นเมมเบรนลงบนเครื่อง semi-dry bolting ดังนี้ เริ่มจาก support membrane แล้วนำ PVDE membrane ที่ผ่านการแช่เมทานอลแล้ววางลงแผ่น support membrane จากนั้นนำแผ่นเจล SDS-PAGE วางลงบน PVDE membrane แล้วปิดทับด้วยแผ่น support อีกครั้ง จากนั้นทำการถ่ายโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 100 mA เป็นเวลา 60 นาที
3. บ่มเมมเบรนด้วย blocking buffer (5% skim milk ใน PBS pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. บ่มเมมเบรนด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
5. ล้างเมมเบรนด้วย Washing buffer (PBS pH 7.4 และ 0.01% tween 20) จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
6. บ่มเมมเบรนด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ล้างเมมเบรนด้วย washing buffer (PBS pH 7.4 และ 0.01% tween20) จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
8. ทำการตรวจสอบการเกิดสีของซับสเตรทด้วย NBT-BCIP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

การทำกราฟมาตรฐาน BSA

โดยนำสารละลายมาตรฐาน BSA มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน BSA ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและและความเข้มข้นของสารละลาย BSA พบว่ากราฟมาตรฐานมีค่า R^2 = 0.9945 ได้โปรตีนที่ความเข้มข้น 0.306 mg/ml



รูปที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐาน BSA แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้