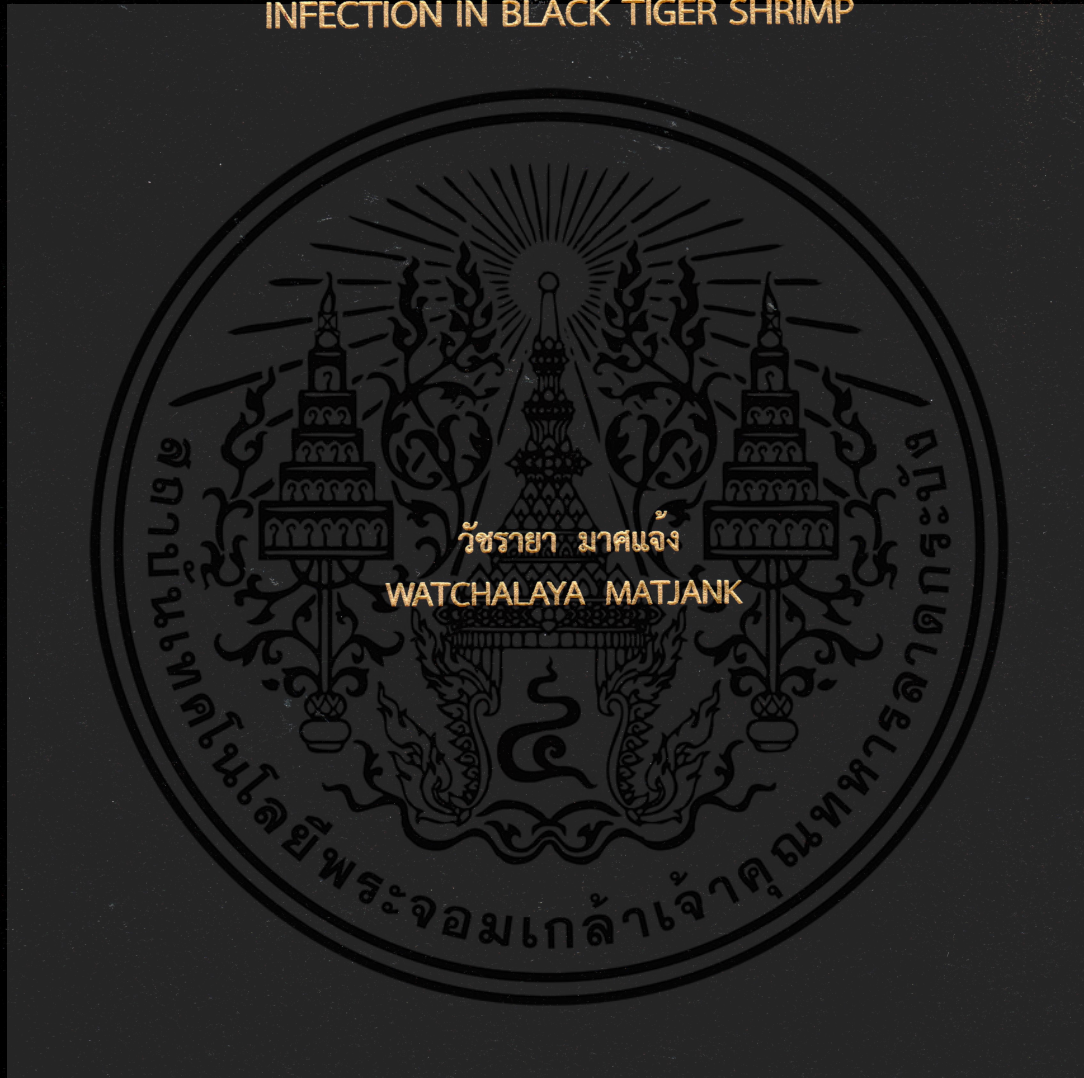


บทบาทและหน้าที่ของพลาสมาไลปินในการเป็นตัวต้อนรับ
ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ROLE OF PLASMOLIPIN AS A RECEPTOR OF YELLOW HEAD VIRUS
INFECTION IN BLACK TIGER SHRIMP



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-016-003

บทบาทและหน้าที่ของพลาสมอลิพินในการเป็นตัวต่อรับ
ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ROLE OF PLASMOLIPIN AS A RECEPTOR OF YELLOW HEAD VIRUS
INFECTION IN BLACK TIGER SHRIMP



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-016-003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทและหน้าที่ของพลาสมอลิพินในการเป็นตัวต้อนรับ
ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ROLE OF PLASMOLIPIN AS A RECEPTOR OF YELLOW HEAD VIRUS
INFECTION IN BLACK TIGER SHRIMP



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-016-003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ROLE OF PLASMOLIPIN AS A RECEPTOR OF YELLOW HEAD VIRUS
INFECTION IN BLACK TIGER SHRIMP



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
YEAR 2018
KMITL-2018-SC-M-016-003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2018

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	บทบาทและหน้าที่ของพลาสมาไมโอไลปินในการเป็นตัวต้นรับต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลางดำ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชัชรายา มาศแจ่ง
รหัสประจำตัว	57605039
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง(สจล.)
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ศิริขวัญ พลประทีป

บทคัดย่อ

พลาสมาไมโอไลปินเป็นโปรตีนชนิด proteolipid protein และจัดอยู่ในกลุ่มของ tetraspan (4TM) myelin proteins ในงานวิจัยก่อนหน้านี้นพบโปรตีนพลาสมาไมโอไลปินในกึ่งกลางดำ 2 ไอโซฟอร์มคือ *PmPLP1* และ *PmPLP2* จากฐานข้อมูล expressed sequence tags (EST) โดยพบว่ายีน *PmPLP1* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ดังนั้นในงานวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ของโปรตีน *PmPLP1* ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในฐานะเป็นตัวรับเชื้อไวรัส ผลการทำ immunoblotting และ immunofluorescence แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีน *PmPLP1* อย่างมาก และพบอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเหงือกกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง นอกจากนี้เซลล์แมลง Sf9 ที่สามารถสร้างโปรตีน *PmPLP1* ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมากขึ้น จากการทำ ELISA แสดงให้เห็นว่าไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์สามารถจับกับรูปภายนอกของโปรตีน *PmPLP1* (EL*PmPLP1*) และการทำให้เป็นกลางของไวรัสหัวเหลืองด้วย EL*PmPLP1* ช่วยลดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าบทบาทของโปรตีน *PmPLP1* น่าจะเป็นตัวรับที่ส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่ง

คำสำคัญ : พลาสมาไมโอไลปิน รีคอมบิแนนท์โปรตีน ทรานส์เมมเบรนโปรตีน กึ่งกลางดำ ไวรัสหัวเหลือง

Thesis Title	ROLE OF PLASMOLIPIN AS A RECEPTOR OF YELLOW HEAD VIRUS INFECTION IN BLACK TIGER SHRIMP
Student Name	Miss. Watchalaya Matjank
Student ID	57605039
Degree	Master of Science (Environmental Chemistry)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Year	2018
Thesis Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn
Thesis Co-advisor	Dr. Sirikwan Ponprateep

Abstract

Plasmolipin is a proteolipid protein and belongs to the tetraspan molecule (4TM) family. In black tiger shrimp, two isoforms of plasmolipin gene, *PmPLP1* and *PmPLP2*, were previously identified from the shrimp expressed sequence tags (EST) database. *PmPLP1* transcript levels were highly up-regulated in yellow head virus (YHV) infected shrimp. In this research, we demonstrated the function of *PmPLP1* involved in YHV infection as a viral receptor. The immunoblotting and immunofluorescence results showed that the *PmPLP1* was highly expressed and located at plasma membrane of YHV-infected gill. Moreover, the Sf9 insect cells expressed *PmPLP1* at the membrane were more susceptible to YHV infection. The ELISA assay showed that the purified YHV could bind with the external loop of *PmPLP1* (EL*PmPLP1*). The neutralization of YHV with EL*PmPLP1* reduced the YHV infection. These results suggested that the role of *PmPLP1* was likely to be a receptor promoted the YHV infection in shrimp

Keywords : Plasmolipin, Recombinant protein, Transmembrane protein, *Penaeus monodon*, Yellow head virus

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้จัดทำใคร่ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้

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

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ และ ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำให้คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวก ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และสารเคมี ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และสารเคมี ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยสังเคราะห์ภาพระดับนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวก ในการใช้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

วัชรยา มาศแจ้ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กุ้งกุลาดำ.....	4
2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ.....	4
2.1.2 อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ.....	4
2.2 โรคหัวเหลือง (Yellow Head Virus).....	5
2.2.1 การเพิ่มปริมาณ (Replication).....	5
2.2.2 ความคงตัว (Stability).....	5
2.2.3 อาการ (Clinical sign).....	5
2.2.4 การติดต่อ (Transmission).....	6
2.2.5 อวัยวะเป้าหมาย (Target organ).....	6
2.2.6 อัตราการตาย (Mortality).....	6
2.3 กลไกการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ.....	6
2.4 โปรตีนพลาสโมไลปิน (plasmolipin).....	7
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	9
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	9
3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	9
3.1.2 สารเคมี.....	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2 ตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง.....	10
3.2.1 กุ้งกุลาดำ.....	10
3.2.2 การเตรียมไวรัสหัวเหลือง.....	10
3.2.2.1 การทำให้ไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์.....	10
3.2.2.2 การหาจำนวนของไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription PCR (realtime RT-PCR)	11
3.2.2.3 การตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองด้วย SDS-PAGE	12
3.2.2.4 การตรวจสอบความสมบูรณ์ของไวรัสหัวเหลืองด้วย Transmission electron microscopy (TEM)	12
3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลบินในระบบ <i>Escherichia coli</i>	13
3.3.1 การเพิ่มปริมาณยีนพลาสโมไลบินด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	13
3.3.2 การโคลนยีนพลาสโมไลบินลงใน.....	14
3.3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลบิน (protein expression).....	15
3.3.4 การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot.....	15
3.3.5 การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i>	15
3.3.6 การทำรีคอมบิแนนท์พลาสโมไลบินให้บริสุทธิ์.....	16
3.4 การออกแบบการสังเคราะห์เปปไทด์ ELPmPLP1	16
3.5 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนพลาสโมไลบินของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Western blot	17
3.6 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนพลาสโมไลบินในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค Western blot.....	17
3.7 การระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสโมไลบินในกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Immunofluorescence	18
3.8 การตรวจสอบการจับกันระหว่างเปปไทด์ ELPmPLP1 และไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค ELISA	19
3.9 การศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	19
3.10 การศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่ออัตราการตายของกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.11 การการสร้างเซลล์แมลง sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสมิโดไลปิน ไอโซฟอร์ม 1.....	21
3.12 การศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน พลาสมิโดไลปิน.....	23
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	24
4.1 การทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลือง.....	24
4.1.1 จำนวนไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	24
4.1.2 ความสมบูรณ์ของไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	24
4.2 ผลการผลิต และการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสมิโดไลปิน.....	25
4.3 ความจำเพาะของแอนติบอดี (anti-ELPmPLP1) ต่อโปรตีนพลาสมิโดไลปินจาก กึ่งกลาดำ.....	29
4.4 การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนพลาสมิโดไลปินไอโซฟอร์ม 1 ในกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัส หัวเหลือง.....	29
4.5 ผลการระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสมิโดไลปินในเหงือกของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัว เหลือง.....	30
4.6 ผลการจับกันระหว่างเปปไทด์ ELPmPLP1 และไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค ELISA.....	31
4.7 ผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลาดำ.....	32
4.8 การลดอัตราการตายของกึ่งจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1.....	33
4.9 ผลการสร้างเซลล์แมลง sf9 ที่สามารถผลิตโปรตีนพลาสมิโดไลปิน.....	33
4.10 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเซลล์แมลง sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสมิ โดไลปิน.....	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	36
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	36
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	36
เอกสารอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก.....	40
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพลาสมิโดไลปินไอโซฟอร์ม 1 (<i>PmPLP1</i>)	44
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์และแผนภาพของเวกเตอร์	45
ภาคผนวก ง การหาจำนวนพลาสมิดสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน	46
ภาคผนวก จ การทำ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	47
ภาคผนวก ฉ การทำ Western blot hybridization.....	49
ภาคผนวก ช การคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลืองด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์.....	50
ภาคผนวก ซ ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	52
ซ-1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ่มกุลาดำ.....	52
ซ-2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง sf9.....	53
ประวัติผู้เขียน.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 โพรเมออร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย.....	13
3.2 สารที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่กึ่งกลาดำในการศึกษามลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	20
3.3 สารที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่กึ่งกลาดำในการศึกษามลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่ออัตราการตายของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	21
จ-1 ส่วนประกอบสำหรับเตรียม Separating gel.....	47
จ-2 ส่วนประกอบสำหรับเตรียม stracking gel.....	48
ช-1 การคำนวณการแสดงผลของไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลาดำ.....	50
ช-2 การคำนวณการแสดงผลของไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง Sf9.....	51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 มูลค่าการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2545-2560.....	1
2.1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ	4
2.2 ลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง	5
2.3 แผนภาพแสดงกลไกการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ.....	6
2.4 โครงสร้างพลาสมาไมโอโกลบินของหนู	7
4.1 กราฟมาตรฐานระหว่าง Cq และ จำนวนก๊อปปี้ของยีน <i>gp64</i> ใช้ในการหาจำนวน ไวรัสหัวเหลือง	24
4.2 (ก) โปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE	25
4.2 (ข) การตรวจสอบรูปร่างของไวรัสหัวเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Transmission Electron Microscopy.....	25
4.3 การเพิ่มปริมาณยีนพลาสมาไมโอโกลบินด้วยวิธี PCR.....	26
4.4 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพลาสมาไมโอโกลบินไอโซฟอร์ม 1.....	27
4.5 ผลการตรวจสอบโปรตีนพลาสมาไมโอโกลบินไอโซฟอร์ม 1 ตรวจสอบวิธี Western blot.....	27
4.6 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนพลาสมาไมโอโกลบินไอโซฟอร์ม 1 ด้วยคอลัมน์ chitin binding domain.....	28
4.7 ตำแหน่งของอะมิโนที่ทำการผลิตแอนติบอดีต่อ ELPmPLP1	28
4.8 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อ ELPmPLP1 กับโปรตีนพลาสมาไมโอโกลบินในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี SDS-PAGE.....	29
4.9 การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณโปรตีนพลาสมาไมโอโกลบินในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	30
4.10 การแสดงออกของโปรตีนพลาสมาไมโอโกลบินในเซลล์แมลง sf9 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal laser scanning microscope.....	31
4.11 กราฟ ELISA ระบุว่าความเข้มข้นของเปปไทด์ ELPmPLP1 และค่าการดูดกลืนแสงที่ A405.....	32
4.12 การแสดงออกของยีน <i>gp64</i> ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR	32
4.13 อัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำที่ช่วงเวลาต่างๆหลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.14 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพลาสมิโดโลปินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ confocal laser scanning microscope.....	34
4.15 การแสดงออกของยีน <i>gp64</i> ในเซลล์แมลง <i>sf9</i> หลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR	35



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
cDNA	คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELPmPLP1	โปรตีนพลาสโมไลปิน ไอโซฟอร์ม1 บริเวณลูบด้านนอก
LB	อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani
O.D.	ค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density)
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PmPLP1	โปรตีนพลาสโมไลปิน ไอโซฟอร์ม1
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEM	Transmission electron microscopy
YHV	ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus)

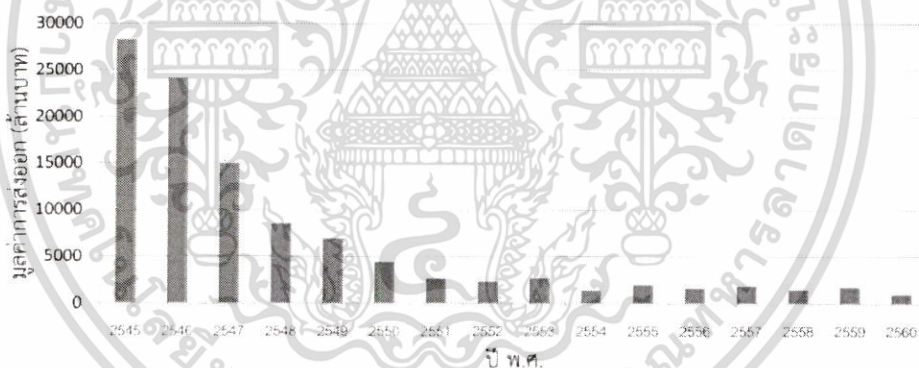
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทยเนื่องจากประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งเป็นอันดับหนึ่งของโลก (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2558) โดยในปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งกุลาดำมีมูลค่าสูงถึง 28,299.88 ล้านบาท แต่ในปัจจุบันมูลค่าการส่งออกกุ้งกุลาดำมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ในปี 2560 ประเทศไทยส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นมูลค่า 1,001.61 ล้านบาท ซึ่งลดลงจากปี 2559 ถึงร้อยละ 43.68 และเมื่อเทียบกับการส่งออกของปี 2545 พบว่ามีจำนวนลดลงถึงร้อยละ 96.46 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) สาเหตุหนึ่งเกิดจากการแพร่ของโรคระบาดภายในประเทศ ส่งผลให้กุ้งเกิดการติดเชื้อและตายในที่สุด ซึ่งโรคระบาดที่พบในกุ้งมักเกิดจากการติดเชื้อไวรัส เช่น โรคดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) และโรคหัวเหลือง (Yellow Head Virus, YHV) และโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคตายด่วน (EMS) และโรคเรืองแสง



รูปที่ 1.1 มูลค่าการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2560

โรคหัวเหลืองเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (Yellow Head Virus:YHV) และเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการตาย ทั้งในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vanamei*) โรคหัวเหลืองถูกพบครั้งแรกในกุ้งกุลาดำเลี้ยงในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2533 และต่อมาได้มีรายงานการแพร่กระจายในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งในทวีปเอเชีย (Kanokudom et al., 2018) ไวรัสหัวเหลืองเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Single-strand RNA virus) จัดอยู่ในกลุ่มของ Retrovirus ซึ่งอยู่ในสกุล *Okavirus* วงศ์ *Roniviridae* และอันดับ *Nidovirales* มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร และมีความยาว 150-200 นาโนเมตร เมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองลำตัวกุ้งจะมีสีซีด ส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจากตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลือง จะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการตายสูงและรวดเร็ว (Jitrapakdee *et al.*, 2003 ; European Community Reference Laboratory for Crustacean Diseases leaflet, 2008) ปัจจุบันโรคหัวเหลืองยังไม่มีวิธีการรักษา มีแต่เพียงวิธีป้องกันการเกิดโรคและการแพร่กระจายของโรค เช่น การใช้ลูกพันธุ์กุ้งที่เป็นสายพันธุ์ปลอดเชื้อ การสุ่มตัวอย่างกุ้งในบ่อเลี้ยงเพื่อตรวจสุขภาพอย่างสม่ำเสมอ กำจัดของเสียให้เหลือตกค้างน้อยที่สุด เลี้ยงกุ้งในระบบที่มีการจัดการระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา, 2555) ในการควบคุมและป้องกันโรคระบาดในกุ้งนั้นเราจะต้องทราบกลไกการติดเชื้อไวรัส และกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกันของกุ้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจกลไกการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำเพื่อเป็นแนวทางที่ทำให้เราสามารถป้องกันและแก้ปัญหาการระบาดของโรคหัวเหลืองในกุ้งได้

ขั้นแรกของการติดเชื้อคือการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสโดยมีโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป็นตัวรับ เช่น โปรตีน integrin ที่สามารถเป็นตัวรับสำหรับไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus (WSSV)) (Li *et al.*, 2007) โปรตีน laminin receptor (Lamr) สามารถเป็นตัวรับสำหรับไวรัสดวงขาว ไวรัสทอรา (Taura syndrome virus:TSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) (Busayarat *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2016) งานวิจัยล่าสุดพบโปรตีนที่คาดว่าเป็นตัวรับสำหรับไวรัสหัวเหลืองคือ โปรตีน พลาสโมไลปิน (PmPLP) (Vatanavicharn *et al.*, 2012) พลาสโมไลปินเป็นโปรตีนชนิด proteolipid protein มีขนาด 18 kDa พบได้ในส่วนสมองและไตของหนู โดยโปรตีนพลาสโมไลปินจัดอยู่ในกลุ่มของ tetraspan (4TM) myelin proteins มีสมบัติเป็น hydrophobic membrane protein สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี (Bosse *et al.*, 2003 ; Fischer and Victor, 1994) และในงานวิจัยก่อนหน้ามีการพบว่าโปรตีนพลาสโมไลปินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส *Mus caroli* endogenous retrovirus (McERV) ในหนู (*Mus caroli*) และพบว่าโปรตีนพลาสโมไลปินเกี่ยวข้องกับการรับเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ โดยจำกัดชนิดของเซลล์ที่ไวรัสสามารถเข้าไปได้ (Miller *et al.*, 2008) ในส่วนของกุ้งกุลาดำพบว่ายีนพลาสโมไลปินมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นภายหลังการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และพบว่ายีนพลาสโมไลปินมีการแสดงออกมากที่สุดในเหงือก และ epipodite ซึ่งเป็นอวัยวะหลักในการติดเชื้อของไวรัสหัวเหลือง จึงคาดว่าโปรตีนพลาสโมไลปินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (Vatanavicharn *et al.*, 2012) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาหน้าที่ในการเป็นตัวรับไวรัสหัวเหลืองของโปรตีนพลาสโมไลปินในกุ้งกุลาดำเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสโมไลปินในกุ้งกุลาดำ และเซลล์แมลง Sf9
2. เพื่อศึกษาการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ โดยใช้ลูบด้านนอกของโปรตีนพลาสโมไลปิน (ELPmPLP1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง
2. ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสมิโดไลปิน ด้วยระบบ *Escherichia coli* และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue คู่กับวิธี Western blot
3. สังเคราะห์เปปไทด์สายสั้นเฉพาะส่วนลูบด้านนอกของโปรตีนพลาสมิโดไลปิน (ELPmPLP1) บริเวณอะมิโนตำแหน่งที่ 127 - 140 จากนั้นผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเปปไทด์ ELPmPLP1 (anti-ELPmPLP1)
4. ตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีนพลาสมิโดไลปินในกึ่งกลูตาต้า ด้วยวิธี immunofluorescence โดยใช้แอนติบอดี anti-ELPmPLP1 ในการติดตามโปรตีนพลาสมิโดไลปิน
5. ตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีนพลาสมิโดไลปิน (ELPmPLP1) และไวรัสหัวเหลือง ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
6. ศึกษาการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลูตาต้าด้วยเปปไทด์สายสั้น ELPmPLP1
7. ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสมิโดไลปินด้วยระบบ Insect cells-baculovirus โดยใช้เซลล์แมลง Sf9 ตรวจสอบการผลิตโปรตีน และระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสมิโดไลปินด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning microscope

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการทำงานของโปรตีนพลาสมิโดไลปินต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลูตาต้า
2. สามารถนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลูตาต้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

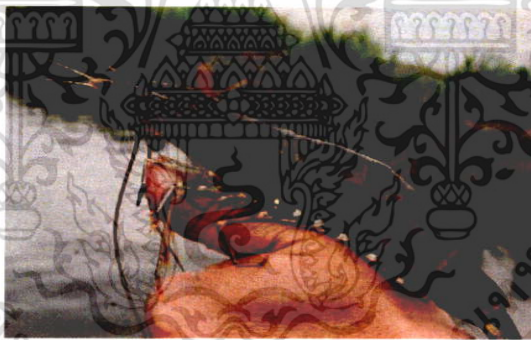
บทที่ 2

ทฤษฎี และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งกุลาดำ

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* ในประเทศไทยนั้นเรียกได้หลายชื่อเช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งทะเล กุ้งก้ามกราม กุ้งเสือดำนก กุ้งเสือดำนก หรือกุ้งลาย เป็นกุ้งทะเล ขนาดประมาณ 18-25 เซนติเมตร เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ *Penaeidae* อาศัยอยู่ในเขตร้อน ชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึก ห่างออกจากฝั่ง และชอบพื้นที่ที่เป็นดินทราย สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทยอยอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำได้ดี เช่น บริเวณป่าชายเลน แหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทะเลแถบอินโดแปซิฟิกพิกัดตะวันตก อัฟริกาตะวันออกและตะวันตกเฉียงใต้ และคาบสมุทรอินเดีย กุ้งกุลาดำมีลักษณะลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขาว 9 ลาย ซึ่งลายที่พาดขวางนั้นจะมีสีน้ำตาล สลับแถบขาว ด้านบนของกริมมีฟัน 7 ถึง 8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ สันกริยาวเกือบถึงคาราเปสมีสันดับ (Hepatic Crest) ยาวตรงขนานไปกับลำตัว หนวดยาวไม่มีลายชัดเจน ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาว่ายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงิน โคนสีขา (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2561)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ
ที่มา: Indiamart (2015)

2.1.2 อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ (จรรยาภรณ์, 2553)

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*

Species *monodon*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โรคหัวเหลือง (Yellow Head Virus)

โรคหัวเหลืองพบการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยในปี 2533 และต่อมาได้มีการแพร่กระจายในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งในทวีปเอเชีย (Chaivisuthangkura *et al.*, 2014 ; (Kanokudom *et al.*, 2018) สาเหตุของโรคหัวเหลืองเกิดจากไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus) ซึ่งมีลักษณะเป็นไวรัสที่มีอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Single-strand RNA virus) จัดอยู่ใน สกุล *Okavirus* วงศ์ *Roniviridae* และอันดับ *Nidovirales* ลักษณะเป็นรูปท่อน ความยาว 150-200 นาโนเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค 40-50 นาโนเมตร (Vatanavicharn *et al.*, 2012) พบอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ และช่องว่างระหว่างเซลล์ (Duangsuwan *et al.*, 2011)

2.2.1 การเพิ่มปริมาณ (replication)

กุ้งกุลาดำที่เกิดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะปรากฏอาการภายใน 7-10 วันหลังจากได้รับเชื้อ

2.2.2 ความคงตัว (stability)

ไวรัสหัวเหลืองสามารถอาศัยอยู่ในน้ำทะเลได้นานถึง 72 ชั่วโมง การยับยั้งการเติบโตของไวรัสหัวเหลืองคือการให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือนำไปสัมผัสคลอรีนที่ความเข้มข้น 30 ppm

2.2.3 อาการ (Clinical sign)

กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ลำตัวกุ้งจะมีสีซีด ส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจากตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลืองเช่นเดียวกับสีของตัวด้งรูปที่ 2.2 และกุ้งจะเริ่มเข้าอ้อมมากผิดปกติแต่ไม่กินอาหาร หลังจากนั้นจะเริ่มมีกุ้งตายโดยสังเกตเห็นส่วนหัวหรือส่วนตับและตับอ่อนมีสีเหลืองหรือสีเหลืองส้ม หลังจากมีกุ้งตายในบ่อการตายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยใช้เวลาเพียง 2-3 วัน กุ้งจะตายหมดบ่อ



รูปที่ 2.2 ลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง(ซ้าย)

ที่มา: สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา (2555)

2.2.4 การติดต่อ (transmission)

1. ทางตรง (Vertical transmission) ผ่านทางพ่อแม่สู่ลูก
2. ทางอ้อม (Horizontal transmission) โดยการกินกันเอง และ ผ่านทางน้ำ เช่น การเลี้ยงกุ้งปกติร่วมกับกุ้งป่วย

2.2.5 อวัยวะเป้าหมาย (Target organ)

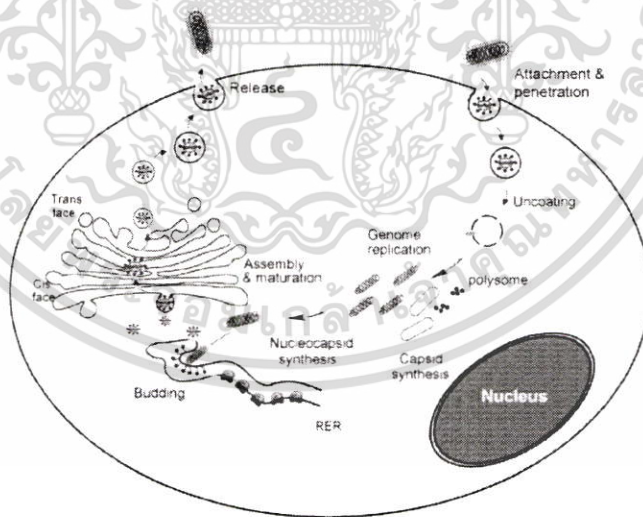
เนื้อเยื่อผิวได้เปลือกชั้นเอกโตเดิร์ม (Ectodermal) และมีโซเดิร์ม (Mesodermal) ได้แก่ ต่อม้ำเหลือง (lymphoid organ) เม็ดเลือด (haemocytes) เหงือก (gill) และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haematopoietic tissue)

2.2.6 อัตราการตาย (mortality)

การตายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยกุ้งจะตายหมดบ่อในเวลาเพียง 2-3 วัน หลังจากปรากฏอาการติดเชื้อ (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา, 2555 และ European Community Reference Laboratory, 2008)

2.3 กลไกการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

Duangsuwan *et al.*, (2011) รายงานกลไกการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ แสดงแผนภาพดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงกลไกการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ

ที่มา: Duangsuwan *et al.*, (2011)

ขั้นที่ 1 ไวรัสจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ และชั้นไขมันที่ล้อมรอบไวรัส จะช่วยให้ไวรัสสามารถแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าบ้านด้วยวิธีเอนโดไซโตซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

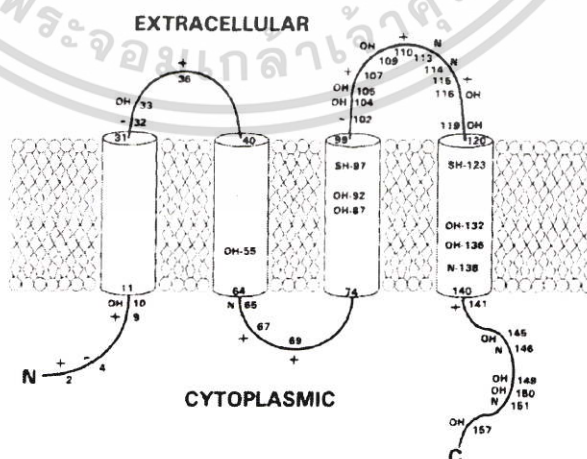
ขั้นที่ 2 ที่เวลา 18 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ไวรัสจะทำการปลดปล่อยกรดนิวคลีอิกเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน โดยการทำลายเยื่อหุ้มเอนโดโซม

ขั้นที่ 3 ที่เวลา 24-36 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ มีการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกของไวรัสบริเวณไซโตพลาสซึม และพบอนุภาคของไวรัสบางส่วนอยู่บริเวณกอลจิคอมเพล็กซ์ และเอนโดพลาสมีเรติคูลัม (rough endoplasmic reticulum) ในขั้นตอนนี้ไวรัสจะมีการสังเคราะห์ส่วนประกอบของไวรัสด้วยระบบ RER-Golgi

ขั้นที่ 4 ที่เวลา 48-60 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์จะถูกบรรจุอยู่ในเวสิเคิลซึ่งติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ด้วยวิธี เอกโซไซโทซิส

2.4 โปรตีนพลาสโมไลปิน (plasmolipin)

พลาสโมไลปิน เป็นโปรตีนชนิดโปรติโอไลปิดเนื่องจากสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ มีขนาด 18 kDa จัดอยู่ในกลุ่มของ tetraspan (4TM) myelin protein โปรตีนพลาสโมไลปินสามารถพบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ไตและสมอง (Cochary *et al.*, 1990 ; Bosse *et al.*, 2003; Hamacher *et al.*, 2001) โดยโปรตีนชนิดนี้จะแทรกอยู่บริเวณผนังเซลล์ดังรูปที่ 2.4 และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมและขนส่งไอออนผ่านเซลล์ (Fischer and Sapirstein, 1994) เช่นในเยื่อหุ้มไมอีลินของระบบประสาทในสมอง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบว่าโปรตีนพลาสโมไลปินเกี่ยวข้องกับการรับเชื้อไวรัส *Mus caroli* endogenous retrovirus (McERV) เข้าสู่เซลล์ จึงทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวในหนู (*Mus caroli*) (Miller *et al.*, 2008) และพบว่าโปรตีนพลาสโมไลปินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus) ในกิ้งกูดดำ (Vatanavicharn *et al.*, 2012)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างพลาสโมไลปินของหนู

ที่มา: Fischera and Sapirstein (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Miller. *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษากลไกการติดเชื้อไวรัส *Mus caroli* Endogenous Retrovirus (McERV) ในหนู (*Mus caroli*) พบว่ามีกลุ่มเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อไวรัส McERV จึงทำการตรวจหาเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับไวรัส McERV เข้าสู่เซลล์ โดยทำการตรวจสอบโครโมโซมของยีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับไวรัส พบว่ายีนพลาสโมไลปิน (PLLP; TM4SF11) ทำหน้าที่เป็นตัวรับไวรัส โดยการแสดงออกของยีนพลาสโมไลปินทำให้เซลล์ของหนู และหนูแฮมสเตอร์ไวต่อการติดเชื้อไวรัส McERV โดยพลาสโมไลปินนั้นทำหน้าที่คล้ายกับ voltage-dependent potassium ion channel พบมากในไต และสมอง พลาสโมไลปินยังจำกัดชนิดของเซลล์ไวรัส McERV ที่สามารถติดเชื้อ

Lang Gui *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาการป้องกันการติดเชื้อไวรัสดวงขาวในกึ่งจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) ด้วยโปรตีน Tetraspanins โดยทำการผลิตแอนติบอดี (anti-LEL) ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน Tetraspanins บริเวณโดเมน large extracellular loop (LEL) ซึ่งอยู่บริเวณตำแหน่งอะมิโนลำดับที่ 140-205 ของโปรตีน FcTetraspanin-3 พบว่าเมื่อทำการฉีดแอนติบอดี anti-LEL เข้าสู่กึ่งจีนเพื่อให้แอนติบอดี anti-LEL จับกับโปรตีน FcTetraspanin-3 พบว่าสามารถลดอัตราการตายของกึ่งจีนเมื่อทำการฉีดไวรัสดวงขาวเข้าสู่กึ่งจีนได้ ดังนั้นโปรตีน FcTetraspanin-3 อาจมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสดวงขาวในกึ่งจีน และบริเวณโดเมน LEL ของ FcTetraspanin-3 อาจเป็นตัวกลางในการรับไวรัสดวงขาวเข้าสู่เซลล์

Vatanavicharn *et al.* (2012) ทำการระบุยีนพลาสโมไลปินจากกึ่งกุลาดำ โดยใช้ 5' RACE พบว่ากึ่งกุลาดำมียีนพลาสโมไลปิน 2 ไอโซฟอร์ม คือ PmPLP1 และ PmPLP2 ซึ่งมีขนาด 558 คู่เบส และ 537 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีโครงสร้างไม่ชอบน้ำ และประกอบด้วย four trans membrane เหมือนกับโปรตีนพลาสโมไลปินในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า PmPLP1 มีการแสดงออกมากในบริเวณเหงือก และ epipodite PmPLP2 มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และต่อม antennal มีการแสดงออกของยีน PmPLP1 ในเม็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญหลังจากติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และไวรัสดวงขาวที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อตามลำดับ นอกจากนี้ PmPLP2 มีการแสดงออกของยีนเพียงเล็กน้อยเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และไวรัสดวงขาว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีนพลาสโมไลปินทั้งสองไอโซฟอร์มมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการติดเชื้อหรือการตอบสนองต่อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกุลาดำ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และ สารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และ เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน รุ่น JEM-2100 (Jeol, USA)
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning microscope (Olympus, Japan)
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น ZHWY-100H (ZHICHEN, China)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น UNIVERSAL320R (Hettish, Germany)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น FLUOstar OPTIMA microtiter plate reader (BMG LABTECH, Germany)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1200 (MAPADA, China)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง NanoDrop รุ่น 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific, USA)
8. เครื่อง Electrophoresis รุ่น Mini-Sub Cell GT Cell (BIO-RAD, USA)
9. เครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 (BIO-RAD, USA)
10. เครื่อง semidry blotter รุ่น WSE-4020 HorizeBLOT 2M-R (Atto, Japan)
11. เครื่อง sonicator รุ่น VCX 750 (Sonics, Australia)
12. เครื่อง Thermal cycler รุ่น T-100TM (BIO-RAD, USA)
13. ชุด SDS-PAGE รุ่น Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD, USA)
14. ตั้ปหลอดเชื้อ รุ่น V-3T-0811 (Microtech, USA)
15. เพลทเลี้ยงเชื้อ 24 หลุม รุ่น Costar TC-Treated Multiple Well Plates (Corning, USA)
16. เพลท 96 หลุม รุ่น Costar Clear Polystyrene 96-Well Plates (Corning, USA)
17. ไมโครปิเปต รุ่น BENCHMATE II (Nichiryo, Japan)
18. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคอตโนมิติ รุ่น GI54TW (Zealay, USA)
19. หลอด centrifuge ขนาด 15 mL และ 50 ml (Corning, USA)
20. หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL และ 1.5mL (Axygen, USA)

3.1.2 สารเคมี

1. ชุดเชื่อมต่อชิ้นยีนที่สนใจกับเวคเตอร์ (T4 DNA ligase) (BioLabs, USA)
2. ชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit) (Favorgen Biotech Corp, Taiwan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ชุดเพิ่มปริมาณ DNA (RBC taq DNA Polymerase) (RBCBioscience, Taiwan)
4. ชุดสำหรับนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ eukaryote (Effectene Transfection Reagent (Qigen, Germany)
5. ชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit) (Favorgen Biotech Corp, Taiwan)
6. ชุดสกัด total RNA (FavorPrep™ Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit) (BioFact, Korea)
7. ชุดสร้าง cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)) (ThermoFisher Scientific, USA)
8. เปปไทด์ ELPmPLP1 และ แอนติบอดี (anti-ELPmPLP1) (Biosynthesis, USA)
9. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB)
10. อาหารเลี้ยงเซลล์ sf900 (Thermo Fisher Scientific, USA)
11. Agar powder (TMMEDIA bacteriological grade, India)
12. Agarose (LE Agarose, USA)
13. Ligation enzyme (T4 ligase) + buffer
14. Restriction enzyme (*NdeI*, *EcoRI*, *NcoI* และ *SacI*) + buffer
15. Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2 ตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 กุ้งกุลาดำ

ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์กุ้งกุลาดำ ขนาด 3-5 กรัม และขนาด 15-20 กรัม จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง จ.สุราษฎร์ธานี ประเทศไทย ทำการปรับสภาพกุ้งกุลาดำโดยเลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 20 พีพีที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.2.2 การเตรียมไวรัสหัวเหลือง

3.2.2.1 การทำให้ไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำโดยใช้น้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำน้ำเลือดกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองมาเจือจาง 10^{-7} เท่าด้วย 0.85% NaCl และฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำขนาด 15-20 กรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีอาการใกล้ตาย ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 3 วันหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยทำการเก็บในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยกไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์โดยพัฒนาวิธีการมาจากการแยกไวรัสตัวแดงดวงขาวจากงานวิจัยของ Xie *et al.* (2005) โดยนำเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจำนวน 1 กรัมใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ TNE (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA และ 1 mM PMSF) 200 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบดเหียงกับน้ำแข็งเพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นเติมน้ำบัฟเฟอร์ TNE (เย็น) เพิ่มอีก 1 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหียงที่ความเร็ว 5,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษซากเซลล์จากเหียงกึ่ง นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านตัวกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตรที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหียงที่ความเร็ว 16,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนไวรัสไปละลายในบัฟเฟอร์ TM (50 mM Tris-HCl pH 8.5 และ 10mM MgCl₂) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเก็บส่วนตะกอนนี้ไว้บนน้ำแข็ง ในส่วนของสารละลายที่ได้หลังจากแยกตะกอนไวรัสให้นำไปปั่นเหียงอีกครั้งที่ความเร็ว 16,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งจะได้ตะกอนสีขาว ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำตะกอนไวรัสทั้งสองครั้งมารวมกัน และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.2.2 การหาจำนวนของไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription PCR (realtime RT-PCR)

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลืองมาสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณไวรัส โดยเก็บเหียงของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย TRI reagent 200 ไมโครลิตร แล้วสกัดอาร์เอ็นเอตามคำแนะนำของคู่มือ สังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ oligo (dT)₁₈ เป็นไพรเมอร์ร่วมกับชุด RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit โดยปฏิบัติตามคู่มือ ทำการเพิ่มปริมาณยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คอมพลิเมนท์อาร์ดีเอ็นเอ (cDNA) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้ *gp64_YHV_Forward* และ *gp64_YHV_Reverse* ดังตารางที่ 3.1 และ ใช้ RBC *taq* DNA polymerase ในการเพิ่มปริมาณยีนปริมาตรรวมของปฏิกิริยา PCR 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 8 ไมโครลิตร 10x buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.8 50 มิลลิโมลาร์ (NH₄)₂SO₄ Triton X-100 0.1% (v/v) และ 2.5 มิลลิโมลาร์ MgCl₂) 20 ไมโครลิตร dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์คู่ละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ RBC *Taq* DNA polymerase 10 ยูนิต โดยทำ PCR ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 2 ทั้งหมด 30 รอบ ขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นทำยีนให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel purification kit นำชิ้นยีนที่ได้ไปเชื่อมต่อกับ TA cloning vector โดยทำตามคู่มือของชุด RBC TA cloning vector โดยใช้ TA vector 50 นาโนกรัม และ ชิ้นยีน 200 นาโนกรัม นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) สายพันธุ์ XL-1Blue โดยวิธีการ Heat Shock Transformation ทำโดยผลสมริคอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บีแชนท์ พลาสมีด กับ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1Blue นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาสเปรดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่มีแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 100 ไมโครโมลาร์ เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการสกัดรีคอมบีแนนท์ พลาสมีดออกจากแบคทีเรียด้วยชุด Plasmid DNA Extraction kit โดยปฏิบัติตามคู่มือ แล้วหาความเข้มข้นของพลาสมีดเพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในการหาจำนวนไวรัสหัวเหลือง

การสร้างกราฟมาตรฐาน และการหาจำนวนไวรัสหัวเหลือง เริ่มจากเจือจางรีคอมบีแนนท์ พลาสมีดที่มียีน *gp64* ให้มีความเข้มข้น 10^5 - 10^9 ก้อนป้อนต่อไมโครลิตร เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสร้างกราฟมาตรฐาน ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ โดยใช้ชุด BioFACT™ Total RNA Prep Kit จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบในการหาจำนวนไวรัสหัวเหลือง โดยใช้ชุด iTaq Universal SYBRGreen One-Step RT-qPCR โดยมีปริมาตรรวมของ PCR 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x iTaq universal SYBR reaction mix 5 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ *gp64*_YHV_Forward และ *gp64*_YHV_Reverse อย่างละ 0.1 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร และ iScript reverse transcriptase 1.25 ไมโครลิตร (สำหรับตัวอย่างที่ต้นแบบเป็นอาร์เอ็นเอ) จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่อง real-time PCR detection system ด้วยสถานะดังนี้ ขั้นที่ 1 Reverse Transcription Reaction ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ขั้นที่ 2 Polymerase Activation และ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ขั้นที่ 3 การเพิ่มปริมาณยีน *gp64* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 วินาที และ Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที จากนั้นวัดค่า fluorescence intensity โดยทำขั้นที่ 3 ทั้งหมด 40 รอบ

3.2.2.3 การตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองด้วย SDS-PAGE

นำไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากขั้นตอนข้างต้นมาตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างของไวรัส ด้วยการนำไวรัสที่ได้มาผสมกับ 0.4% (v/v) Triton X-100 ด้วยสัดส่วน 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของ Polyacrylamide gel ที่ 12% และ นำไปย้อมโปรตีนด้วยวิธี Coomassie

3.2.2.4 การตรวจสอบความสมบูรณ์ของไวรัสหัวเหลืองด้วย Transmission electron microscopy (TEM)

นำไวรัสที่สกัดได้มาตรึงลงบนกริดคอปเปอร์ (copper grids, 200 mesh) และย้อมแบบ negative (2% uranyl acetate) โดยทำการส่งตัวอย่างไปทำการย้อม negative stain ที่ศูนย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้อง Transmission electron microscopy เพื่อตรวจสอบรูปร่างของไวรัสหัวเหลี่ยม

ตารางที่ 3.1 โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย

ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	วัตถุประสงค์
<i>PmPLP1-NdeI_Foward</i>	GGTGGTCATATGCATCATCATCATCA CATGGCCGAGACTCACCCCA	เพิ่มปริมาณยีนพลาสมอไลบิน(<i>PmPLP1</i>) ด้วยระบบ <i>E.coli</i>
<i>PmPLP1-EcoRI_Reverse</i>	GGTGGTGAACAGGATTGCGCTTGAGGAC GG	
<i>PmPLP_pDHSP70_Foward</i>	ATCGGGATCCATGATGGCCGAGACTCAC	เพิ่มปริมาณยีนพลาสมอไลบิน(<i>PmPLP1</i>) ด้วย Sf9 cell
<i>PmPLP_pDHSP70_Reverse</i>	ATCGGCGGCCGCAAGGATTGCGCTTGAG GAC	
<i>gp64_YHV_Foward</i>	CATGGATCGTTTGGCTTTCGTTC	Real-time RT-PCR
<i>gp64_YHV_Reverse</i>	TCACTATTACTCCAGTTATCA	
<i>EF1-α_Foward</i>	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC	Internal control สำหรับ real-time RT-PCR
<i>EF1-α_Reverse</i>	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGA	
<i>actin_Foward</i>	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGA	Internal control สำหรับ real-time RT-PCR
<i>actin_Reverse</i>	GGAGGCGTGGGGCAGGGCRTA	

3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสมอไลบินในระบบ *Escherichia coli*

ยีนพลาสมอไลบินโอโซพอร์ม 1 (GenBank accession code JX012238) ของกึ่งกุลาคำประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 558 คู่เบส ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame, ORF) จำนวนทั้งสิ้น 185 โมเลกุล และมีขนาด 26 กิโลดาลตัน โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบโปรตีนพลาสมอไลบินเชื่อมต่อกับ chitin binding domain (CBD) เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

3.3.1 การเพิ่มปริมาณยีนพลาสมอไลบินด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ในงานวิจัยนี้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ cDNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเริ่มจากการสกัด total RNA จากเหงือกของกึ่งกุลาคำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมด้วยสารละลาย TRI reagent ด้วยวิธีตามคำแนะนำของคู่มือ จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ oligo (dT)₁₈ เป็นโพรเมอร์ร่วมกับชุด RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit โดยปฏิบัติตามคู่มือที่ให้มา เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบด้วยวิธี PCR โดยได้ทำการออกแบบโพรเมอร์ให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRI* โดยใช้ไพรเมอร์ *PmPLP1-NdeI_Forward* และ *PmPLP1-EcoRI_Reverse* ดังตาราง 3.1 ทำการเพิ่มปริมาณยีนพลาสมิโดไลปินด้วยวิธี PCR ด้วย RBC *taq* DNA polymerase ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา PCR 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 5 ไมโครลิตร 10x buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.8 50 มิลลิโมลาร์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Triton X-100 0.1% (v/v) และ 2.5 มิลลิโมลาร์ MgCl_2) 20 ไมโครลิตร dNTP ชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ไพรเมอร์คู่ละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ RBC *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต โดยทำ PCR ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ขั้นที่2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 2 ทั้งหมด 30 รอบ ขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (w/v) หากปรากฏแถบที่เอ็นเอที่ต้องการนำผลผลิตที่ได้มาทำบริสุทธิ์ Gel purification kit จากนั้นนำยีนพลาสมิโดไลปินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วไปทำการโคลนเข้าเวกเตอร์ pMXB10 และทรานส์ฟอร์มเข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เพื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสมิโดไลปินต่อไป

3.3.2 การโคลนยีนพลาสมิโดไลปิน

เมื่อได้ยีนพลาสมิโดไลปินจากการทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำยีนพลาสมิโดไลปินที่ได้ และเวกเตอร์ pMXB10 ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยยีนพลาสมิโดไลปิน หรือ เวกเตอร์ pMXB10 1 ไมโครกรัม, เอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRI* อย่างละ 1 ยูนิต 100 mM Tris-HCl pH 7.5 50 mM NaCl 10 mM MgCl_2 และ 0.025% Triton X-100 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำยีนพลาสมิโดไลปินที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pMXB10 โดยทำการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยประกอบด้วย ยีนพลาสมิโดไลปิน และเวกเตอร์ pMXB10 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างละ 150 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ เอนไซม์ T4 DNA ligase 40 units และ 10x T4 ligase (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์ MgCl_2 1 มิลลิโมลาร์ ATP และ 10 มิลลิโมลาร์ DTT) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ด้วยวิธี Heat shock transformation โดยผสมรีคอมบิแนนท์พลาสมิโดไลปินกับ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมา สเปรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลือกโคโลนีแบคทีเรียขึ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิโดไลปินออกจากแบคทีเรียด้วยชุด Plasmid DNA Extraction kit โดยปฏิบัติตามคู่มือ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ พลาสมิโดไลปินดังกล่าวเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Heat Shock Transformation โดยผสมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด กับ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมา สเปรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมโลปต่อไป

3.3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมโลป (protein expression)

เมื่อได้เชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดสำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมโลปเรียบร้อยแล้ว ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 เหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชม. โดยทำการเก็บเซลล์แบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ทุกชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG เพื่อตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของแบคทีเรีย ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย phosphate buffer saline pH 7.4

3.3.4 การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot

ทำการสกัดโปรตีนจากตะกอนเซลล์แบคทีเรียจากขั้นตอนข้างต้นด้วยการบ่มกับ SDS loading buffer ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมโลปด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue นอกจากนี้ทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมโลปด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ mouse anti-CBD ที่จับจำเพาะกับ chitin binding domain (CBD) ที่ติดอยู่กับรีคอมบิแนนท์โปรตีน เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 3000 (โดยปริมาตร) และใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse ที่จับจำเพาะกับ mouse anti-CBD เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 10000 (โดยปริมาตร) โดยเอนไซม์ alkaline phosphatase จะใช้ NBT-BCIP เป็นซับสเตรทแล้วทำให้เกิดสีขึ้น

3.3.5 การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

หลังจากทราบการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมโลปในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แล้ว ทำการตรวจสอบรูปแบบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนว่าอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ของแบคทีเรีย หรืออยู่ในส่วนของสารละลาย โดยทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนของสารละลาย และตะกอน จากนั้นนำตะกอนไปละลายด้วย Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS) ก่อนนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ mouse anti-CBD เจือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 3000 (โดยปริมาตร) และ ใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 10000 (โดยปริมาตร) โดยเอนไซม์ alkaline phosphatase จะใช้ NBT-BCIP เป็นซับสเตรทแล้วทำให้เกิดสีขึ้น

3.3.6 การทำรีคอมบิแนนท์พลาสโมไลปินให้บริสุทธิ์

หลังจากทราบรูปแบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลปินจากแบคทีเรีย คือส่วนของสารละลายแล้ว ทำการทำบริสุทธิ์โปรตีนพลาสโมไลปินด้วยการใช้ คอลัมน์ chitin binding domain ตามขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากการล้างคอลัมน์ด้วย column buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการใส่โปรตีนพลาสโมไลปินให้มีอัตราการไหลเมื่อสารละลายผ่านคอลัมน์ เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการล้างคอลัมน์ด้วย column buffer (20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.5 500 มิลลิโมลาร์ NaCl 1 มิลลิโมลาร์ EDTA 0.1% (v/v) Tween 20 และ PMSF 20 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการตัดโปรตีนพลาสโมไลปินออกจากโปรตีน chitin binding domain ด้วย Cleavage Buffer (50 mM DTT) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทำการชะโปรตีนพลาสโมไลปินออกจากคอลัมน์ด้วย Column Buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ ทำการชะโปรตีน chitin binding domain ออกจากคอลัมน์ด้วย 0.3 นอร์มอล NaOH ที่เจือจางใน column buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ mouse anti-CBD เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 3000 (โดยปริมาตร) และ ใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 10000 (โดยปริมาตร) โดยเอนไซม์ alkaline phosphatase จะใช้ NBT-BCIP เป็นซับ สเตรทแล้วทำให้เกิดสีขึ้น

3.4 การออกแบบการสังเคราะห์เปปไทด์ ELPmPLP1

นำลำดับอะมิโนของโปรตีนพลาสโมไลปินโอโซฟอร์ม 1 (GenBank accession code JX012238) ของกุงกุลาดำมาวิเคราะห์โครงสร้าง Trans membrane domain ด้วยโปรแกรม TMHMM Server v. 2.0 จากนั้นทำการวิเคราะห์เปปไทด์ ELPmPLP1 ที่บริเวณ outer loop ระหว่างโดเมนที่ 3 และ 4 ของโครงสร้างโปรตีนพลาสโมไลปิน ตรงกับกรดอะมิโนลำดับที่ 127-140 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 14 โมเลกุล ดังนี้ SSVTRPRPPSRLKP โดยทำการสังเคราะห์เปปไทด์ ELPmPLP1 และแอนติบอดี rabbit polyclonal antibodies (anti-ELPmPLP1) โดยบริษัท Bio-Synthesis, USA

3.5 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนพลาสโมไลปินของกิ้งกูด้าด้วยเทคนิค Western blot

นำเหงือกของกิ้งกูด้ามาบดใน homogenized buffer (เย็น) (10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 7.2 250 มิลลิโมลาร์ sucrose และ 1 มิลลิโมลาร์ EDTA) จากนั้นนำไป sonicate ที่ amplitude 30% เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายส่วนใสมาใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี โดยนำตัวอย่างที่ได้มาทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่ 12% จากนั้นทำการถ่ายโปรตีนลงบนเมมเบรน PVDF ทำการตรวจสอบโปรตีนพลาสโมไลปิน โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit anti-ELPmPLP1 ที่จับจำเพาะกับโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 1000 (โดยปริมาตร) และ ใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ horseradish peroxidase conjugated Goat anti-rabbit (Goat anti-rabbit HRP) ที่จับจำเพาะกับ rabbit anti-ELPmPLP1 เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 10000 (โดยปริมาตร) จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescence โดยใช้ Clarity Western ECL substrate

3.6 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนพลาสโมไลปินในกิ้งกูด้าที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค Western blot

นำกิ้งกูด้าขนาด 15-20 กรัม จำนวน 10 ตัว มาแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองปริมาณ 3×10^3 ก้อนปี้ โดยทำการเจือจางไวรัสหัวเหลืองด้วย 0.85% NaCl และกลุ่มที่ 2 ทำการฉีด 0.85% NaCl (กลุ่มควบคุม) โดยทำการฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกิ้งกูด้าปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อตัว จากนั้นเก็บเหงือกของกิ้งกูด้าทั้งสองกลุ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อมาสกัดโปรตีน โดยนำเหงือกของกิ้งกูด้าล้างด้วย 0.85% NaCl จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นบดใน homogenized buffer (เย็น) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน ทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของโปรตีนพลาสโมไลปินด้วยวิธี Western blot โดยนำโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมา 50 ไมโครกรัม ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่ 12% จากนั้นทำการถ่ายโปรตีนลงบนเมมเบรน PVDF ทำการตรวจสอบโปรตีนพลาสโมไลปิน โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit anti-ELPmPLP1 ที่จับกับโปรตีนพลาสโมไลปิน ไอโซฟอร์ม 1 ทำการเจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 1000 (โดยปริมาตร) และ ใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-rabbit HRP เจือจางด้วย 1% skim milk สัดส่วน 1 ต่อ 10000 (โดยปริมาตร) จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescence โดยใช้ Clarity Western ECL substrate

3.7 การระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสมโมไลปินในกึ่งกลาดำด้วยเทคนิค Immunofluorescence

นำกึ่งกลาดำขนาด 15-20 กรัม จำนวน 10 ตัว มาแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองปริมาณ 3×10^3 ก้อนปี้โดยการเจาะจงไวรัสหัวเหลืองด้วย 0.85% NaCl และกลุ่มที่ 2 ทำการฉีด 0.85% NaCl (กลุ่มควบคุม) โดยทำการฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกึ่งกลาดำปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว จากนั้นเก็บเหงือกของกึ่งกลาดำที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง ทำการเก็บตัวอย่างไว้ในบัฟเฟอร์ 10% formaldehyde neutral จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่างและ นำตัวอย่างที่ได้ไปตรึงในพาราพลาส (Paraplast) ทำการตัดชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร และนำชิ้นตัวอย่างที่ได้ไปวางลงบนแผ่นสไลด์ชนิด poly-L-lysine จากนั้นนำสไลด์ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

ในการระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสมโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 นำสไลด์ตัวอย่างมาทำการ deparaffin และ rehydrate ตามขั้นตอนดังนี้ ทำการแช่สไลด์ใน xylene ที่บรรจุอยู่ในโถแก้วย้อมสไลด์ (Coplín Jar) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เวลา 2 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำสไลด์ไปแช่ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 100% 95% 70% และ 50% ความเข้มข้นละ 5 นาทีตามลำดับ จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น (เย็น) บ่มตัวอย่างด้วย blocking buffer (5% FBS ใน PBS) โดยการหยด blocking buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง บ่มตัวอย่างต่อด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit anti-ELPmPLP1 โดยเจาะจงแอนติบอดีปฐมภูมิด้วย 1% FBS ใน PBS อัตราส่วน 1:1000 (โดยปริมาตร) หยดแอนติบอดีปฐมภูมิลงบนสไลด์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 1 คืน ล้างสไลด์ด้วย washing buffer (0.1%(v/v) Tween20 ใน PBS) โดยหยด washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์ ทำการล้างสไลด์ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นบ่มตัวอย่างด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-rabbit conjugated fluorescence dye Alexa 488 โดยเจาะจงแอนติบอดีทุติยภูมิด้วย 1% FBS ใน PBS อัตราส่วน 1:5000 (โดยปริมาตร) หยดแอนติบอดีทุติยภูมิลงบนสไลด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วย washing buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บ่มตัวอย่างต่อด้วย PureBlu Hoechst 33342 nuclear staining dye เพื่อย้อมนิวเคลียส โดยเจาะจงด้วย PBS อัตราส่วน 1:100 (โดยปริมาตร) และหยดลงบนสไลด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที ล้างสไลด์ด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกสไลด์โดยใช้น้ำยา ProLong Gold antifade ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำสไลด์ตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีนพลาสมโมไลปินโดยทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning microscope (Olympus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การตรวจสอบการจับกันระหว่างเปปไทด์ ELPmPLP1 และ ไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค ELISA

ทำการวัดปริมาณไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นทำการตรึงไวรัสหัวเหลืองความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ PBS บัฟเฟอร์ (กลุ่มควบคุม) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงบนเพลท 96 หลุม (Costar Clear 96-well plate) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายบนเพลทออก แล้วบ่มตัวอย่างต่อด้วย 5% bovine serum albumin (BSA) ใน PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 1 คืน จากนั้นดูดสารละลายบนเพลทออกและใส่เปปไทด์ ELPmPLP1 ที่ความเข้มข้น 0 0.03125 0.0625 0.125 0.25 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (0.05% Tween20 ใน PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที บ่มเพลทต่อด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ anti-ELPmPLP1 เจือจางด้วย 1% BSA 1:1000 (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (0.05% (v/v) Tween20 ใน PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จากนั้นบ่มเพลทด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ anti-rabbit conjugated AP เจือจางด้วย 1% BSA 1:3000 (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตรวจสอบการเกิดสีด้วย *p*-nitrophenylphosphate (Bio-Rad) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{405} เป็นเวลา 30 นาทีด้วยเครื่อง FLUOstar OPTIMA microtiter plate reader.

3.9 การศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ในการศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการเพิ่มปริมาณของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี real-time RT-PCR เริ่มจากนำกึ่งกลาดำขนาด 3-5 กรัมจำนวน 15 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ในแต่ละกลุ่มจะทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองจำนวน 3×10^4 ก๊อบปีต่อตัว โดยผสมกับ 0.85% NaCl หรือโปรตีน BSA 4.2 ไมโครกรัม หรือเปปไทด์ ELPmPLP1 4.2 ไมโครกรัม ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ปริมาตรรวมของสารผสมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มไวรัสกับสารต่างๆบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกึ่งกลาดำ หลังจากนั้นทำการเก็บเหงือกของกึ่งกลาดำในแต่ละตัวที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการฉีด ทำการสกัด total RNA ด้วยสารละลาย Trizol ด้วยวิธีตามคำแนะนำของคู่มือ จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ oligo (dT)₁₈ เป็นไพรเมอร์ร่วมกับชุด RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit โดยปฏิบัติตามคู่มือที่ให้มา

ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของไวรัสหัวเหลืองโดยนำ cDNA ที่สร้างมาจากกึ่งทั้งสามกลุ่มด้วยเทคนิค Quantitative PCR (Luna Universal qPCR Master Mix) โดยทำการตรวจสอบยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง และใช้ยีน *EF1- α* เป็นยีนควบคุม ปริมาตรรวมของ PCR 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x qPCR master mix 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *gp64* _YHV_Forward และ

gp64 _YHV_Reverse ในการตรวจสอบยีน *gp64* หรือ *EF1- α* _Forward และ *EF1- α* _Reverse ในการตรวจสอบยีน *EF1- α* ใช้ไพรเมอร์อย่างละ 0.1 ไมโครโมลาร์ และ cDNA 1 ไมโครลิตร จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่อง real-time PCR ด้วยสภาวะดังนี้ ชั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ชั้นที่ 2 การเพิ่มปริมาณยีน *gp64* และ ยีน *EF1- α* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 วินาที และ annealing และ extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที จากนั้นวัดค่า fluorescence intensity โดยทำชั้นที่ 2 ทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นนำค่า Cq ที่ได้ไปคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลือง ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Pfaffl (2001)

ตารางที่ 3.2 สารที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่กุงกุลาดำในการศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

กลุ่มที่	สารที่ผสมกันก่อนฉีดเข้าสู่กุงกุลาดำ				จำนวน ตัวอย่าง
	ไวรัสหัวเหลือง	0.85% NaCl	โปรตีน BSA	เปปไทด์ ELPmPLP1	
1	✓	✓	-	-	5
2	✓	-	✓	-	5
3	✓	-	-	✓	5

3.10 การศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่ออัตราการตายของกุงกุลาดำจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

นำกุงกุลาดำขนาด 3-5 กรัมจำนวน 120 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม โดยทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองจำนวน 3×10^4 ก้อนปี้ต่อตัว โดยผสมกับ 0.85% NaCl หรือโปรตีน BSA 4.2 ไมโครกรัม หรือเปปไทด์ ELPmPLP1 4.2 ไมโครกรัม ดังตารางที่ 3.3 ปริมาตรรวมของสารผสมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มไวรัสกับสารต่างๆบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกุงกุลาดำ จดบันทึกจำนวนกุงๆ 6 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์อัตราการตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สารที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่กึ่งกลาดำในการศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่ออัตราการตายของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

กลุ่ม	สารที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่กึ่งกลาดำ				จำนวน ตัวอย่าง
	ไวรัสหัวเหลือง	0.85% NaCl	โปรตีน BSA	เปปไทด์ ELPmPLP1	
1	✓	✓	-	-	10
2	✓	-	✓	-	10
3	✓	-	-	✓	10
4	-	✓	-	-	10
5	-	-	✓	-	10
6	-	-	-	✓	10

3.11 การการสร้างเซลล์แมลง Sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลบินไอโซฟอร์ม 1

ทำการเพิ่มปริมาณยีนพลาสโมไลบินไอโซฟอร์ม 1 โดยใช้ cDNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบด้วยวิธี PCR โดยใช้ RBC *taq* DNA polymerase โดยใช้ไพรเมอร์ *PmPLP_pDHSP70_Forward* และ *PmPLP_pDHSP70_Reverse* (ตาราง 3.1) โดยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *NcoI* และ *SacI* ปริมาตรรวมของ PCR 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 5 ไมโครลิตร 10x buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.8 50 มิลลิโมลาร์ $(NH_4)_2SO_4$ Triton X-100 0.1% (v/v) และ 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$) 20 ไมโครลิตร dNTP ชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์คู่ละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ RBC *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต โดยทำ PCR ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 2 ทั้งหมด 30 รอบ ขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที นำผลผลิตที่ได้มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุด Gel purification kit จากนั้นนำยีนพลาสโมไลบินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วไปทำการโคลนลงในเวกเตอร์ GFP_pDHsp70/V5-His ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เวกเตอร์จาก Professor Chu-Fang Lo (Institute of Bioinformatics and Biosignal Transduction, College of Bioscience and Biotechnology, National Cheng Kung University, Taiwan) โดยเวกเตอร์นี้ได้มีการออกแบบให้มีโปรตีน heat shock protein 70 เชื่อมต่อกับโปรตีน green fluorescent protein (GFP) โดยนำยีนพลาสโมไลบินและเวกเตอร์ GFP_pDHsp70/V5-His ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* ในปริมาตรรวม 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ประกอบด้วยชั้นยีนพลาสมิโดไลปิน หรือ เวกเตอร์ GFP_pDHsp70/V5-His ปริมาณ 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ *NcoI* และ *SacI* อย่างละ 1 ยูนิต 100 mM Tris-HCl pH 7.5 50 mM NaCl 10 mM MgCl₂ และ 0.025% (v/v) Triton X-100 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำชั้นยีนที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ GFP_pDHsp70/V5-His โดยทำการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยประกอบด้วย ชั้นยีนพลาสมิโดไลปิน และ เวกเตอร์ GFP_pDHsp70/V5-His ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างละ 150 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ เอนไซม์ T4 DNA ligase 40 ยูนิต 10x T4 ligase (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ 1 มิลลิโมลาร์ ATP และ 10 มิลลิโมลาร์ DTT) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ด้วยวิธี Heat shock transformation โดยผสมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด กับ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1Blue นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมา สเปรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีซีไอซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลือกลโคโลนีแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (*PmPLP1*- GFP_pDHsp70/V5-His) ขึ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีซีไอซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากแบคทีเรียด้วยชุด Plasmid DNA Extraction kit จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *PmPLP*_GFP_pDHSP70/V5-His และ GFP_pDSHP70/V5-His (ชุดควบคุม) ที่ได้นำเข้าสู่เซลล์ Sf9 (ThermoFisher) ด้วยชุด Effectene Transfection Reagent (Qiagen)

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ เริ่มจากทำการเลี้ยงเซลล์ Sf9 ลงใน 24 well plate ให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 1×10^5 - 4×10^5 เซลล์ต่อหลุม โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร sf900 จากนั้นผสมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการนำเข้าสู่เซลล์ ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม กับ EC buffer ให้มีปริมาตรรวม 60 ไมโครลิตร และ เติมนิวคลีโอไซด์ 8 ไมโครลิตร ทำการวอร์เทกซ์ 10 วินาที จากนั้นบ่มสารผสมที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที เติมนิวคลีโอไซด์ 5 ไมโครลิตร ลงในสารผสม ทำการวอร์เทกซ์ 1 นาที จากนั้นบ่มสารผสมที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที ทำการเปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ Sf9 เป็นอาหาร sf900 ที่มี 10% FBS (v/v) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมนิวคลีโอไซด์ลงในหลุมที่ทำการเลี้ยงเซลล์ไว้ บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารที่มีสารผสมออกแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป 350 ไมโครลิตร บ่มที่ 27°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการกระตุ้นในเซลล์มีการผลิตโปรตีนด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที นำเซลล์ไปบ่มต่อที่ 27°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนทำการตรวจสอบการผลิตโปรตีนด้วยการย้อมนิวเคลียสด้วย PureBlu Hoechst 33342 Nuclear staining dye ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที และ ติดตามการแสดงออกของโปรตีน green fluorescent protein ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning microscope (Olympus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 การศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง Sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสมัลโมไลบิน

นำเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีนจากขั้นตอนที่ 3.11 มาทำการบ่มกับไวรัสหัวเหลืองที่ความเข้มข้น 3×10^6 ก้อนปืดต่อหลุม โดยทำการผสมไวรัสหัวเหลืองกับอาหารเลี้ยงเซลล์ sf900 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ Sf9 มาทำการสกัด total RNA ด้วย TRI reagent ด้วยวิธีตามคำแนะนำของคู่มือ จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA ปริมาณ 1 นาโนกรัม โดยใช้ oligo (dT)₁₈ เป็นไพรเมอร์ร่วมกับชุด RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit โดยปฏิบัติตามคู่มือที่ให้มา นำ cDNA ที่สร้างได้มาทำการเจือจาง 1:10 เท่า เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบปริมาณของไวรัสหัวเหลือง ด้วยเทคนิค Quantitative real-time PCR โดยใช้ fluorescent dye SYBR Green (Luna Universal qPCR Master Mix) โดยทำการตรวจสอบยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง และ ยีน *β-actin* เป็นยีนควบคุม ปริมาตรรวมของ PCR 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x qPCR master mix 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *gp64* _YHV_Forward และ *gp64* _YHV_Reverse ในการตรวจสอบยีน *gp64* และ *actin* _Forward และ *actin* _Reverse ในการตรวจสอบยีน *β-actin* อย่างละ 0.1 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่อง real-time PCR ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ขั้นที่ 2 การเพิ่มปริมาณยีน *gp64* และ ยีน *β-actin* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 วินาที และ annealing และ extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 3 ทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นนำค่า Cq ที่ได้ไปคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลืองด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Pfaffl (2001)

3.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 และ คำนวณนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) กับการทดสอบของ Duncan ที่ค่านัยสำคัญ $P < 0.05$

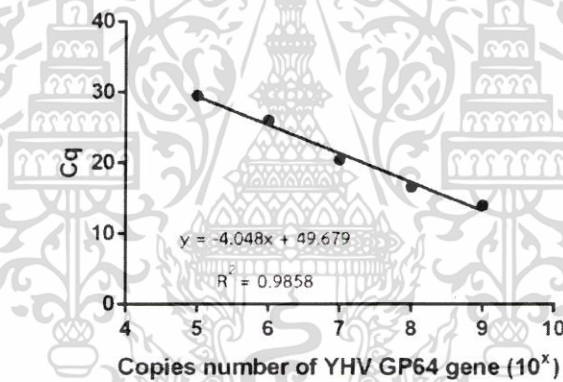
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลือง

4.1.1 จำนวนไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลืองในการตรวจสอบ โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน จากรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด *gp64* -TA cloning vector เพื่อใช้ในการหาจำนวนของไวรัสหัวเหลือง ด้วยวิธี RT-qPCR ให้กราฟเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 4.1 และมีค่า $R^2=0.9858$ เมื่อนำค่า C_q ของไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แทนค่าลงในสมการเส้นตรงพบว่า ไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนเท่ากับ 6.53×10^7 ก๊อปปีต่อไมโครลิตร ซึ่งได้จำนวนของไวรัสหัวเหลืองน้อยกว่าการแยกไวรัสตัวแดงดวงขาว ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีของ Xie *et al.*, (2005) ซึ่งเป็นผลมาจากการลดระยะเวลา และความเร็วยิ่งขึ้นในการปั่นเหวี่ยงในขั้นของการตะกอนไวรัส



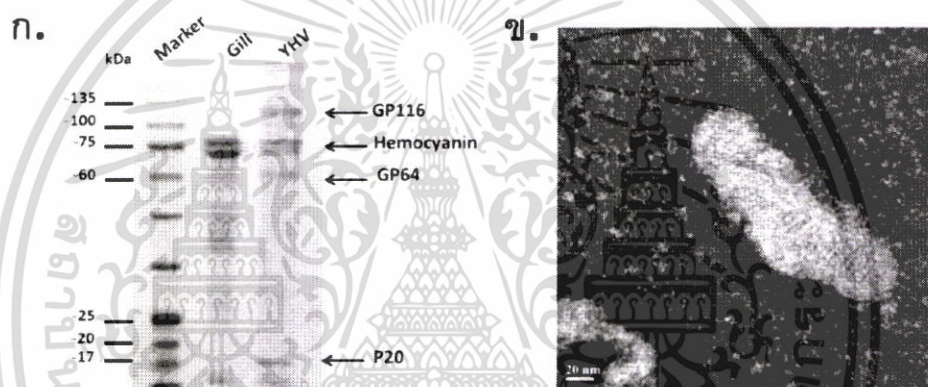
รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานระหว่าง C_q และ จำนวนก๊อปปีของยีน *gp64* ใช้ในการหาจำนวน ไวรัสหัวเหลือง

4.1.2 ความสมบูรณ์ของไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

หลังจากนำไวรัสผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE พบมีการแสดงออกของโปรตีนโปรตีนหลักอยู่ 3 ชนิด คือ P20 เป็นโปรตีนชนิดนิวคลีโอโปรตีน *gp64* และ *gp116* เป็นโปรตีนชนิดไกลโคโปรตีน ซึ่งโปรตีนมีขนาดประมาณ 20 64 และ 116 กิโลดาลตันตามลำดับ และพบการปนเปื้อนของโปรตีนฮีโมไซยานินทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม ซึ่งมีขนาด 73 และ 75 กิโลดาลตัน ดังแสดงรูปที่ 4.2 (ก) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ของ Jitrapakdee *et al.*, (2003) และ Sittidilokratna *et al.*, (2009) ที่ทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงด้วยเครื่องเครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์และพบการปนเปื้อนของโปรตีนฮีโมไซยานิน 2 ไอโซฟอร์ม แสดงให้เห็นว่าวิธีการทำบริสุทธิ์ไวรัสในงานวิจัยนี้สามารถแยกไวรัสหัวเหลืองออกมาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

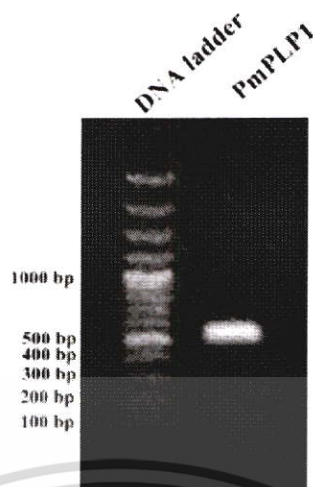
แต่ไวรัสที่ผ่านวิธีการทำให้บริสุทธิ์พบการปนเปื้อนของโปรตีนฮีโมไซยานินจากน้ำเลือดกึ่งมากับตัวอย่างไวรัสด้วย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการล้างตัวอย่างเหือกกึ่งด้วยน้ำเกลือบ่อยเกินไป การเพิ่มจำนวนการล้างเหือกกึ่งหลังการเก็บตัวอย่างจะช่วยลดการปนเปื้อนฮีโมไซยานินได้ อย่างไรก็ตามภายในเหือกกึ่งยังคงมีน้ำเลือดตกค้างอยู่ภายในส่งผลให้ไม่สามารถล้างออกได้หมดด้วยวิธีการล้างเพียงอย่างเดียว ในส่วนของการตรวจสอบพื้นฐานของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) ผลที่ได้พบว่าไวรัสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีรูปร่างเป็นท่อนมีขนาดกว้างประมาณ 50 นาโนเมตร และยาวประมาณ 180 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.3 (ข) และพื้นผิวของไวรัสมีลักษณะขรุขระของเอนโดพลาสมิก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสที่สกัดได้มีความสมบูรณ์ มีขนาดและ ลักษณะเดียวกับไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์ร่วมกับ discontinuous sucrose gradient (Nadala *et al.*, 1997)



รูปที่ 4.2 (ก) โปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% Acrylamide (ข) การตรวจสอบรูปร่างของไวรัสหัวเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Transmission Electron Microscopy

4.2 ผลการผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลปิน

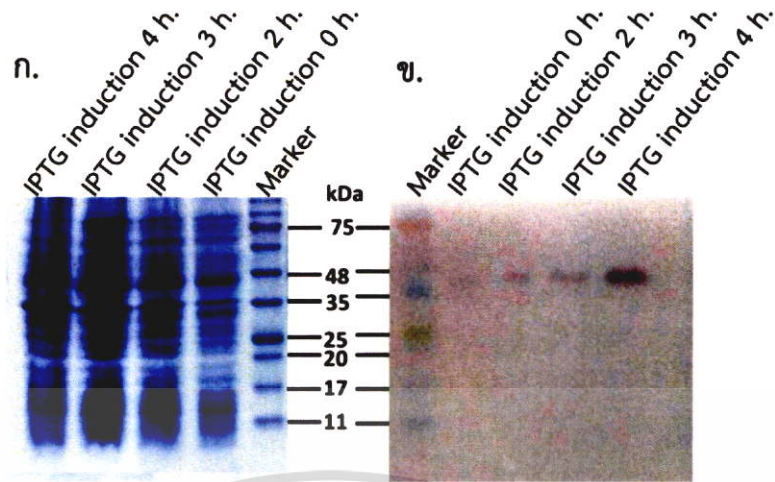
ในการเพิ่มปริมาณยีนพลาสโมไลปินด้วยเทคนิค PCR จะทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 ด้วยไพรเมอร์ *PmPLP1-NdeI_Forward* และ *PmPLP1-EcoRI_Reverse* เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (w/v) ผลที่ได้พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 558 คู่เบส ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งตรงกับขนาดของยีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 (*PmPLP1*) ตามที่ Vatanavicharn *et al.*, (2011) รายงานขนาดของยีนพลาสโมไลปิน 2 ไอโซฟอร์ม คือ *PmPLP1* และ *PmPLP2* ซึ่งมีขนาด 558 คู่เบส และ 537 คู่เบส ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 การเพิ่มปริมาณยีนพลาสโมไลบินด้วยวิธี PCR โดยทำการตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (w/v)

เมื่อได้ยีนพลาสโมไลบินแล้วทำการโคลนยีนพลาสโมไลบินเข้าสู่เวกเตอร์ pMXB10 และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิทที่มียีนพลาสโมไลบินไปทรานส์ฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ด้วยวิธี heat shock transformation จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลบินโดยทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนด้วย IPTG จากการศึกษาวิเคราะห์การผลิตโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot พบแถบโปรตีนขนาด 50 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เกิดจากโปรตีนลูกผสมพลาสโมไลบิน (26 กิโลดาลตัน) เชื่อมติดกับ chitin binding domain ที่มีขนาด 24 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.4) จากรูปแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลบินทั้งก่อน และหลังการกระตุ้นด้วย IPTG และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีนพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีนได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 หลังการกระตุ้นด้วย IPTG

การตรวจสอบฟอร์มของโปรตีนพลาสโมไลบินพบว่าโปรตีนพลาสโมไลบินมีการแสดงออกในรูปของสารละลาย ดังรูปที่ 4.5 จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ chitin binding domain เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีการออกแบบให้มีการเชื่อมต่อยีนพลาสโมไลบินเข้ากับเวกเตอร์ pMXB10 ที่มีโปรตีน chitin binding domain จึงเป็นผลให้โปรตีน chitin binding domain เชื่อมต่อกับโปรตีนพลาสโมไลบิน เพื่อใช้โปรตีน chitin binding domain ในการทำบริสุทธิ์ ผลการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลบินด้วยคอลัมน์ chitin binding domain แสดงดังรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถทำบริสุทธิ์ได้เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้เกิดการ auto-cleavage เนื่องจากในแถบของโปรตีนก่อนทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ chitin binding domain (crude protein) พบแถบโปรตีนของขนาด ซึ่งคาดว่าเป็นแถบของโปรตีนพลาสโมไลบิน และแถบของโปรตีน chitin binding domain



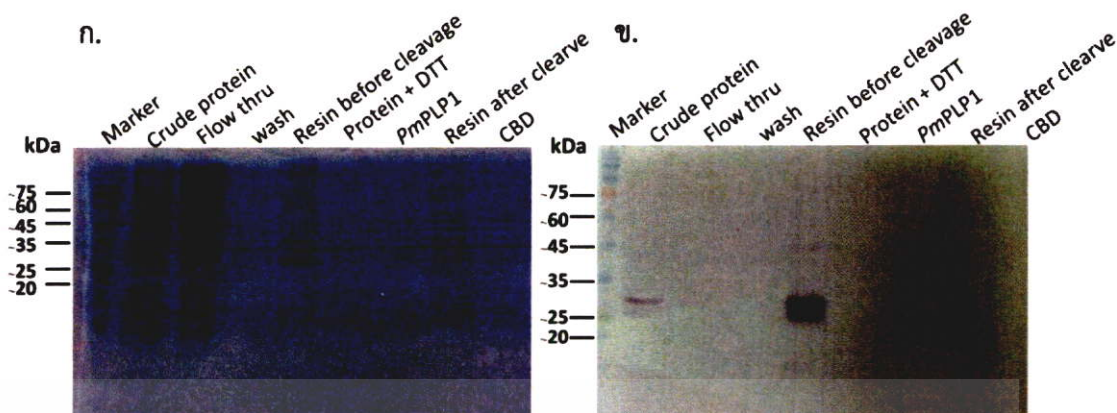
รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพลาสมิโดไลบิโนไอโซฟอร์ม 1

(ก) การตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue (ข) การตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐุมภูมิ mouse anti-CBD และแอนติบอดีทุติยภูมิ alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse



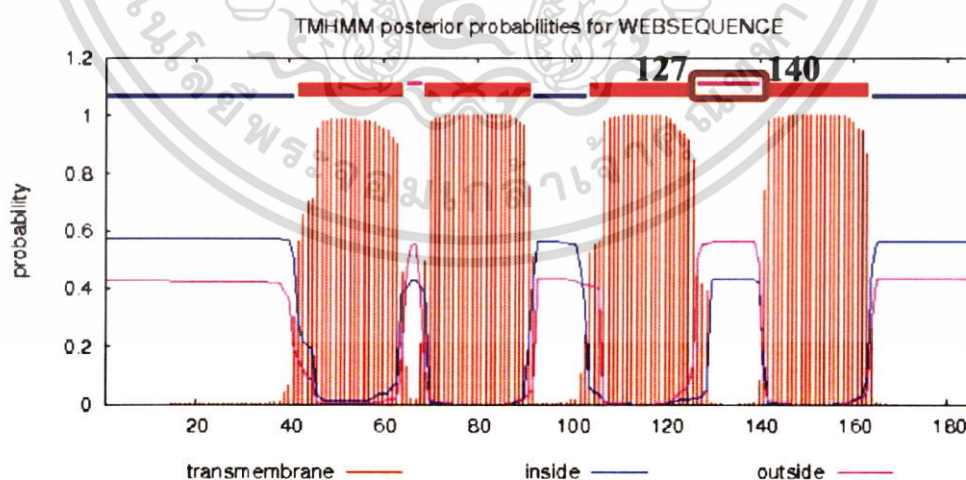
รูปที่ 4.5 ผลการตรวจสอบโปรตีนพลาสมิโดไลบิโนไอโซฟอร์ม 1 ตรวจสอบวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐุมภูมิ mouse anti-CBD และแอนติบอดีทุติยภูมิ alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนพลาสมิโดไลบิโนไซฟอรัม 1 ด้วยคอลัมน์ chitin binding domain (ก) การตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue (ข) การตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ mouse anti-CBD และแอนติบอดีทุติยภูมิ alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse

ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ELPmPLP1 โดยทำการสังเคราะห์เปปไทด์ที่บริเวณ outer loop ระหว่างโดเมนที่ 3 และ 4 ของโครงสร้างโปรตีนพลาสมิโดไลบิโน ประกอบด้วยอะมิโนตำแหน่งที่ 127-140 (SSVTRPRPPSRLKP) ดังรูปที่ 4.7 และนำโปรตีนที่ได้ไปทำการผลิตแอนติบอดี anti-ELPmPLP1 ด้วยบริษัท Bio-Synthesis

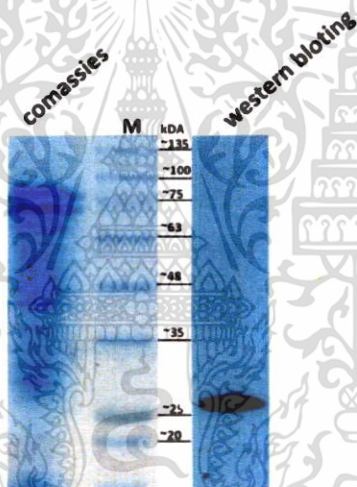


รูปที่ 4.7 ตำแหน่งของอะมิโนที่ทำการผลิตแอนติบอดีต่อ ELPmPLP1 โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้าง Trans membrane domain ด้วยโปรแกรม TMHMM Server v. 2.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ความจำเพาะของแอนติบอดี (anti-ELPmPLP1) ต่อโปรตีนพลาสมาโมไลบินจาก กุ้งกุลาดำ

เนื่องจากแอนติบอดี anti-ELPmPLP1 ผลิตโดยใช้เปปไทด์สายสั้นที่เลือกเฉพาะบริเวณที่เป็น external loop ของโปรตีนพลาสมาโมไลบินเป็นแอนติเจน ดังนั้นก่อนนำไปใช้ในการตรวจจับกับโปรตีนในกุ้งกุลาดำจึงต้องทำการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับโปรตีนพลาสมาโมไลบินจากกุ้งกุลาดำ โดยทำการสกัดโปรตีนจากเหงือกกุ้งและ นำโปรตีนที่ได้ไปแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit anti-ELPmPLP1 และแอนติบอดีทุติยภูมิ Goat anti-rabbit HRP จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescence โดยใช้ Clarity Western ECL substrate ผลที่ได้พบแถบของโปรตีนที่ขนาด 26 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.8) ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนพลาสมาโมไลบินของกุ้งกุลาดำ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดี anti-ELPmPLP1 สามารถจับกับโปรตีนพลาสมาโมไลบินไอโซฟอร์ม 1 ในกุ้งกุลาดำอย่างจำเพาะเจาะจง

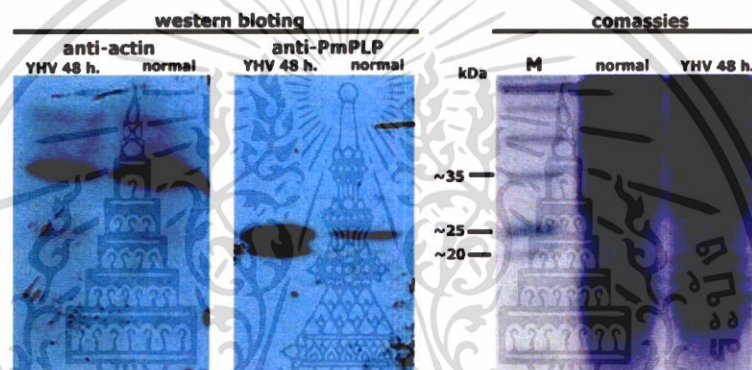


รูปที่ 4.8 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อELPmPLP1 กับโปรตีนพลาสมาโมไลบินในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% Acrylamide คู่กับวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit anti-ELPmPLP1 และ แอนติบอดีทุติยภูมิ Goat anti-rabbit HRP ตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence

4.4 การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนพลาสมาโมไลบินไอโซฟอร์ม 1 ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

จากการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณโปรตีนพลาสมาโมไลบินไอโซฟอร์ม 1 จากโปรตีนที่สกัดได้จากเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เปรียบเทียบกับเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส และนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit anti-ELPmPLP1 สำหรับการตรวจสอบโปรตีนพลาสมาโมไลบิน และแอนติบอดี anti-actin ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบโปรตีน β -actin (โปรตีนควบคุม) และใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ Goat anti-rabbit HRP จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescence จากรูปที่ 4.9 พบว่าแถบโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตันซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนพลาสโมไลบินในกึ่งกลาดำ ในกึ่งกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมีความเข้มของแถบโปรตีนพลาสโมไลบินมากกว่ากึ่งกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 35 กิโลดาลตัน ที่เป็นแถบของโปรตีน β -actin (โปรตีนควบคุม) มีความเข้มใกล้เคียงกัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณโปรตีนพลาสโมไลบินในกึ่งกลาดำกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ จากผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Vatanavicharn *et al.*, (2012) ที่พบการแสดงออกของยีนพลาสโมไลบินเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกลาดำ

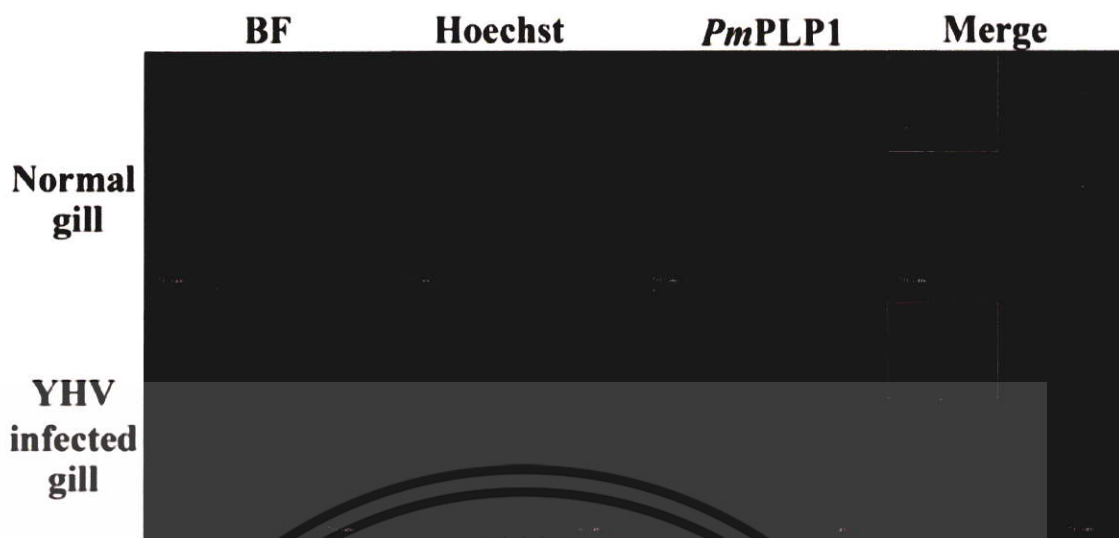


รูปที่ 4.9 การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณโปรตีนพลาสโมไลบินในกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% Acrylamide คู่กับวิธี Western blot และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence

4.5 ผลการระบุตำแหน่งของโปรตีนพลาสโมไลบินในเหงือกของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

การศึกษาตำแหน่งของโปรตีนพลาสโมไลบินในเหงือกของกึ่งกลาดำ เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะเป้าหมายในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาดำแหน่ง และการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลบินในกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และกึ่งกลาดำที่ไม่ได้รับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal laser scanning microscope โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ anti-ELPmPLP1 และแอนติบอดีทุติยภูมิ Alexa Flour 488 ในการตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีน จากรูปที่ 4.10 พบว่าในตัวอย่างกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลบินที่มากกว่ากึ่งไม่ติดเชื้อ โดยพบโปรตีนพลาสโมไลบินบริเวณ gill filament บริเวณขอบของเซลล์เหงือกกึ่งกลาดำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนพลาสโมไลบินเป็นโปรตีนชนิดเมมเบรนโปรตีน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vatanavicharn *et al.*, (2012) ที่รายงานแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลบินในเหงือกของกึ่งกลาดำ

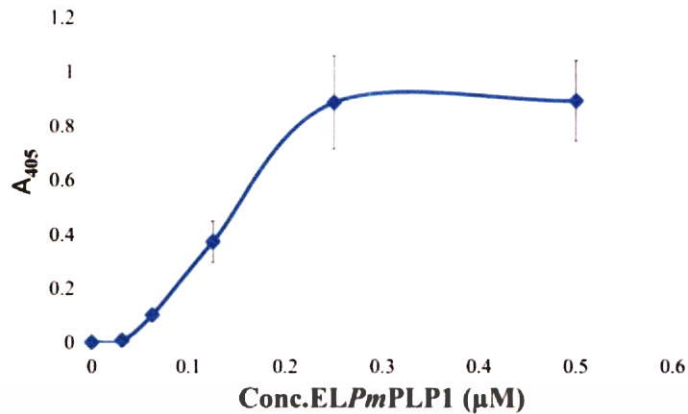
เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การแสดงออกของโปรตีนพลาสมาโมไลปินในเซลล์แมลง Sf9 โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ anti-ELPmPLP1 และแอนติบอดีทุติยภูมิ Alexa Flour 488 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal laser scanning microscope

4.6 ผลการจับกันระหว่างเปปไทด์ ELPmPLP1 และ ไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค ELISA

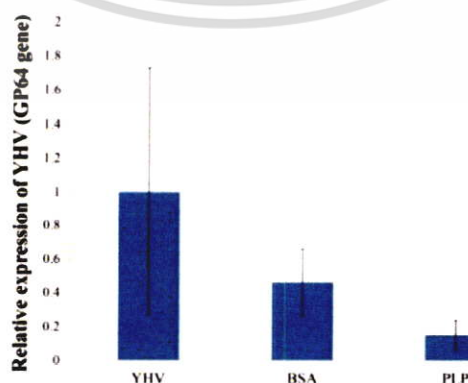
เนื่องจากงานวิจัยนี้คาดว่าโปรตีนพลาสมาโมไลปินเป็นตัวรับของไวรัสหัวเหลือง จึงได้ศึกษาการจับกันระหว่างเปปไทด์ ELPmPLP1 และไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค ELISA โดยทำการตรึงไวรัสหัวเหลืองลงในเพลท จากนั้นจึงนำไปบ่มกับเปปไทด์ ELPmPLP1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และทำการตรวจสอบการจับของเปปไทด์ ELPmPLP1 ด้วยแอนติบอดี anti-ELPmPLP1 ผลของกราฟ ELISA พบว่ามีการจับของเปปไทด์ ELPmPLP1 กับไวรัสมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเปปไทด์ ELPmPLP1 มากขึ้นและเริ่มอิ่มตัวที่ความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากับ 0.25 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.11) ผลที่ได้แสดงให้เห็นเปปไทด์ ELPmPLP1 สามารถจับกับไวรัสหัวเหลืองได้ จึงนำเปปไทด์ ELPmPLP1 ไปทำการจับกับไวรัสหัวเหลืองเพื่อทำให้ไวรัสหัวเหลืองเป็นกลางในการศึกษาการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 4.11 กราฟ ELISA ระหว่างความเข้มข้นของเปปไทด์ ELPmPLP1 และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{405}

4.7 ผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกิ้งกูดดำ

หลังจากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเปปไทด์ ELPmPLP1 ในการจับกับไวรัสหัวเหลือง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากบ่มไวรัสกับเปปไทด์ ELPmPLP1 หรือ BSA (ชุดควบคุม) แล้วทำการฉีดไวรัสที่ทำการบ่มกับโปรตีนเข้าสู่กิ้งกูดดำ โดยตรวจสอบปริมาณไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT-qPCR โดยทำการตรวจสอบยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากยีน *gp64* สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีน *gp 64* ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลือง และยีน *EF1-α* (ยีนควบคุม) จากรูปที่ 4.12 การแสดงออกของยีน *gp64* ในกลุ่มตัวอย่างที่บ่มไวรัสด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1 ลดลง 5 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ชุดที่บ่มด้วย 0.85% NaCl) และลดลง 2 เท่าในกลุ่มที่บ่มไวรัสด้วยโปรตีน BSA ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ ELPmPLP1 สามารถลดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกิ้งได้ เนื่องมาจากผลการจับกันระหว่างเปปไทด์ ELPmPLP1 และไวรัสหัวเหลืองจึงเป็นผลให้ไวรัสไม่สามารถทำงานได้

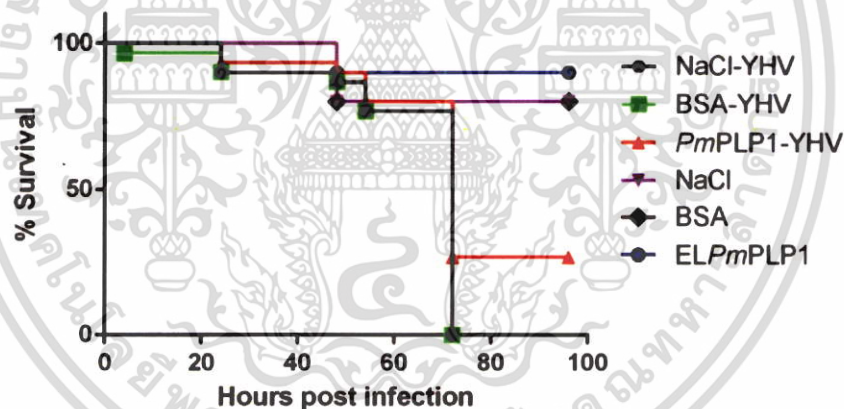


รูปที่ 4.12 การแสดงออกของยีน *gp 64* ในตัวอย่างกิ้งกูดดำ หลังจากได้รับเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง

เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การลดอัตราการตายของกึ่งจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1

จากการศึกษาผลของเปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทำให้ทราบว่าเปปไทด์ ELPmPLP1 สามารถลดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำไวรัสหัวเหลืองมาบ่มกับโปรตีน BSA และเปปไทด์ ELPmPLP1 ตามลำดับที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 4.2 ไมโครกรัม และ กลุ่มควบคุมบ่มกับ 0.85% NaCl จากนั้นทำการฉีดไวรัสบริเวณกล้ามเนื้อของกึ่งกุลาดำ และทำการบันทึกอัตราการตายของกึ่งกุลาดำในแต่ละช่วงเวลา ดังแสดงผลในรูปที่ 4.13 กลุ่มตัวอย่างที่บ่มไวรัสหัวเหลืองด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1 สามารถอยู่รอดได้ประมาณ 26% ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่บ่มไวรัสด้วย 0.85% NaCl หรือโปรตีน BSA มีอัตราการตาย 100% ที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากผลการทดลองสรุปได้ว่าเปปไทด์ ELPmPLP สามารถลดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกุลาดำได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในการศึกษาเปปไทด์ ELPmPLP1 ที่มีผลต่อการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกุลาดำ และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Gui *et al.*, (2012) ที่รายงานถึงหน้าที่ของโปรตีนบริเวณโดเมน large extracellular loop (LEL) ของโปรตีน FcTetraspanin-3 ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งจีน

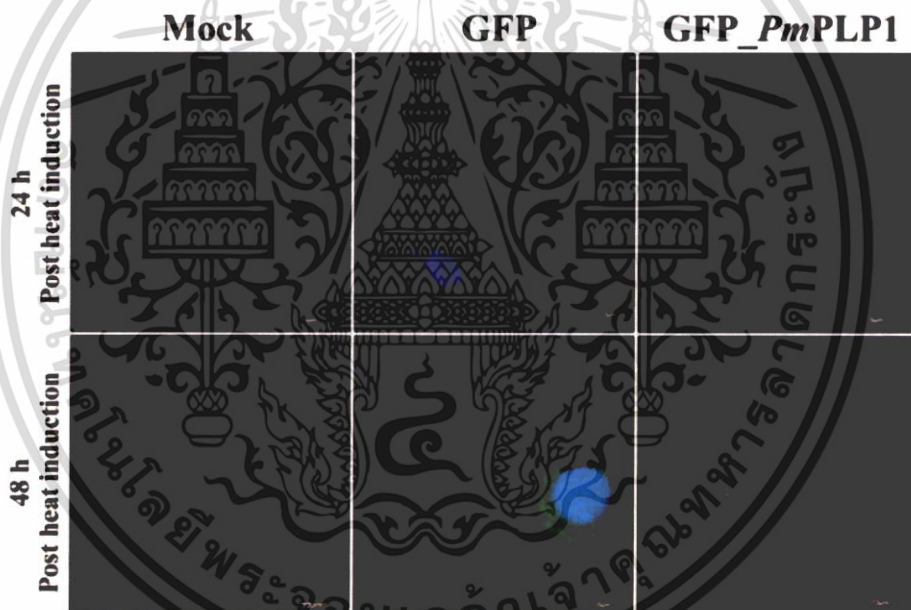


รูปที่ 4.13 อัตราการรอดตายของกึ่งกุลาดำที่ช่วงเวลาต่างๆหลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง

4.9 ผลการสร้างเซลล์แมลง Sf9 ที่สามารถผลิตโปรตีนพลาสโมไลปิน

เพื่อยืนยันหน้าที่ของโปรตีนพลาสโมไลปินที่เกิดขึ้นในกึ่งกุลาดำ งานวิจัยนี้จึงได้ใช้เซลล์แมลงเป็นโมเดลในการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนพลาสโมไลปินต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากเซลล์แมลง Sf9 เป็นเซลล์ไข่ของ *Spodoptera frugiperda* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มคลาสนครัสตาเซียนเช่นเดียวกับกึ่งกุลาดำ การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพลาสโมไลปินในระบบเซลล์แมลง Sf9 เริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีนพลาสโมไลปินไอโซพอร์ม 1 จากนั้นโคลนยีนพลาสโมไลปินเข้าสู่เวกเตอร์ pDhsp70 และนำรีคอมบิแนนท์พลาสโมไลปินเข้าสู่เซลล์ด้วย Effectene Transfection Reagent (Qiagen) ทำการกระตุ้นให้เซลล์แมลง Sf9 เกิดการผลิตโปรตีนด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เซียส เวลา 30 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลปินในช่วงโม่งที่ 24 และ 48 หลังการกระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal laser scanning microscope โดยติดตามการแสดงออกของโปรตีน GFP (สีเขียว) และทำการย้อมกรดนิวคลีอิกด้วย PureBlu Hoechst 33342 (สีฟ้า) ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 4.14 เซลล์แมลงที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลปิน เมื่อเทียบกับเซลล์แมลงที่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP ที่ใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า โปรตีน GFP ในกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของโปรตีนบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์แมลง Sf9 ในขณะที่โปรตีนพลาสโมไลปินมีการแสดงออกของโปรตีนบริเวณขอบของเซลล์ Sf9 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์แมลงที่สร้างขึ้นสามารถผลิตโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 ที่เป็นโปรตีนชนิด transmembrane protein ที่สามารถพบได้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาดำเนินการของโปรตีนพลาสโมไลปินในเหงือกของกิ้งก่าดำที่พบการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลปินบริเวณขอบเขตของเหงือกกิ้งก่าดำ

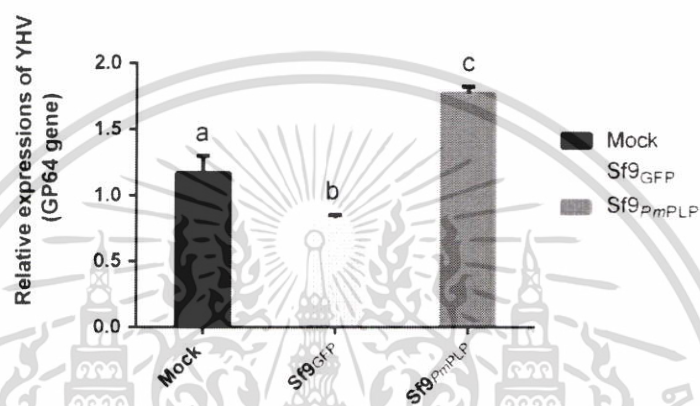


รูปที่ 4.14 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลปินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ confocal laser scanning microscope (Olympus)

4.10 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเซลล์แมลง Sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลปิน

เมื่อสามารถสร้างเซลล์แมลง Sf9 ที่สามารถผลิตโปรตีนพลาสโมไลปินได้แล้ว จึงได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง Sf9 โดยทำการบ่มไวรัสหัวเหลืองกับเซลล์แมลง Sf9 ที่ผ่านการกระตุ้นการผลิตโปรตีนพลาสโมไลปินในเซลล์แมลง จากนั้นทำการเก็บเซลล์แมลง Sf9 ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ด้วยวิธี quantitative RT-PCR โดยทำการตรวจสอบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง และยีน β -actin (ยีนควบคุม) ผลที่ได้พบว่าเมื่อบ่มกับไวรัสหัวเหลืองกับเซลล์แมลง Sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลบิน มีการแสดงออกของยีน *gp64* มากกว่าชุดควบคุม (mock และ Sf9_{GFP}) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 4.15 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนพลาสโมไลบินไอโซฟอร์ม 1 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรับเชื้อไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากเมื่อเซลล์แมลง Sf9 มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลบินมากขึ้นจะส่งผลให้ไวรัสหัวเหลืองสามารถเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 4.15 การแสดงออกของยีน *gp64* ในเซลล์แมลง Sf9 หลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

พลาสโมไลปิน คือโปรตีนจัดอยู่ในกลุ่มของ proteolipid protein ที่ประกอบด้วย transmembrane 4 กลุ่ม ก่อนหน้านี้นี้มีการพบโปรตีนพลาสโมไลปินในกึ่งกุลาตา แต่ยังไม่มีการรายงานถึงหน้าที่ของโปรตีนพลาสโมไลปินในกึ่งกุลาตา งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนพลาสโมไลปินต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกุลาตา ในงานวิจัยนี้ได้ทำการได้ทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลืองจากกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีอย่างง่าย พบว่าไวรัสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีปริมาณ 6.53×10^7 ก้อนป้อนต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไปในงานวิจัยนี้ จากนั้นผู้วิจัยสังเคราะห์โปรตีนพลาสโมไลปินบริเวณลูบด้านนอก (ELPmPLP1) และผลิตแอนติบอดี (anti-ELPmPLP1) เพื่อใช้ในการศึกษาตำแหน่งของโปรตีนพลาสโมไลปินด้วยวิธี immunofluorescence พบว่าโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 มีการแสดงออกของโปรตีนเป็นจำนวนมากบริเวณพลาสมาเมมเบรนทั้งในเหงือกของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และในเซลล์แมลง Sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพลาสโมไลปิน จึงสามารถยืนยันได้ว่าโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 เป็นโปรตีนชนิดทรานซ์เมมเบรนโปรตีน จากนั้นทำการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 ในการเป็นตัวรับเชื้อไวรัส ผลการจับกันของโปรตีนกับไวรัสด้วยเทคนิค ELISA พบว่าเปปไทด์ ELPmPLP1 สามารถจับกับไวรัสหัวเหลืองได้ ในส่วนของการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ ELPmPLP1 สามารถลดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และลดอัตราการตายของกึ่งจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในส่วนของการผลิตโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 พบว่าเกิดการเพิ่มขึ้นของไวรัสในเซลล์แมลงที่มีการผลิตโปรตีนดังกล่าว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนพลาสโมไลปินไอโซฟอร์ม 1 มีความสามารถในการเป็นตัวรับไวรัสหัวเหลืองในกึ่งกุลาตา

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาความคงตัวของเปปไทด์ ELPmPLP1 ในการศึกษาการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1 ในกึ่งกุลาตา
2. ควรศึกษาป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยโปรตีน PmPLP1 หรือเปปไทด์ส่วนอื่นๆของโปรตีน PmPLP1 เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้เปปไทด์ ELPmPLP1
3. ควรศึกษาป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน PmPLP1 เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำให้เป็นกลาง (neutralization) ด้วยเปปไทด์ ELPmPLP1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- จรรยาภรณ์ เพชรคง. 2553. “การโคลนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสใน กุ้งกุลาลำ (*Penaeus monodon*).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการสำหรับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2558. กุ้ง สถานการณ์ในปัจจุบันและ แนวโน้มในอนาคต. [Online]. Available : <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/trends/index.php>
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2561. ลักษณะทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ. [Online]. Available : <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/controller/index.php>
- สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา. 2555. โรคสัตว์น้ำ : โรคหัวเหลือง (Yellow Head Disease; YHD). [Online]. Available : <http://www.aquathai.org/oy4snqnm-7.html?&Page=ArticlePlay&Article=215>
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. สถิติการส่งออก (Export) – กุ้งกุลาดำ : ปริมาณและ มูลค่าการส่งออกรายเดือน. [Online]. Available : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php
- Bosse, F. Hasse, B. Pippirs, U. Greiner-Petter, R. and Müller, H.W. 2003. “Proteolipid plasmolipin: Localization in polarized cells, regulated expression and lipid raft association in CNS and PNS myelin.” *Journal of Neurochemistry*. 86(2) : 508–518.
- Busayarat, N. Senapin, S. Tonganunt, M. Phiwsaiya, K. Meemetta, W. Unajak, S. Jitrapakdee, S. Lo, C.F. and Phongdara, A. 2011. “Shrimp laminin receptor binds with capsid proteins of two additional shrimp RNA viruses YHV and IMNV.” *Fish and Shellfish Immunology*. 31(1) : 66–72.
- Chaivisuthangkura, P. Longyant, S. and Sithigorngul, P. 2014. “Immunological-based assays for specific detection of shrimp viruses.” *World Journal of Virol*. 3(1) : 1-10
- Cochary, E.F. Bizzozero, O.A. Sapirstein, V.S. Nolan, C.E. and Fischer, I. 1990. “Presence of the plasma membrane proteolipid (plasmolipin) in myelin.” *Journal of Neurochemistry*. 55(2) : 602–610.
- Duangsuwan, P. Tinikul, Y. Withyachumnarnkul, B. Chotwiwatthanakun, C. and Sobhon, P. 2011. “Cellular targets and pathways of yellow head virus infection in lymphoid organ of *Penaeus monodon* as studied by transmission

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- electron microscopy.” *Songklanakarinn Journal Science and Technology*. 33 (2) : 121-127.
- European Community Reference Laboratory for Crustacean Diseases leaflet. 2008. Yellowhead Disease.
- Fischer, I. and Sapirstein, V.S. 1994. “Molecular Cloning of Plasmolipin.” *The Journal of Biological Chemistry*. 269(40) : 24912–24919.
- Gui, L. Wang, B. Li, F.H. Sun, Y.M. Luo, Z. and Xiang, J.H. 2012. “Blocking the large extracellular loop (LEL) domain of FcTetraspanin-3 could inhibit the infection of white spot syndrome virus (WSSV) in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*.” *Fish and Shellfish Immunology*. 32(6) : 1008–1015.
- Hamacher, M. Pippirs, U. Kohler, A. Muller, H.W. and Bosse, F. 2001. “Plasmolipin: genomic structure, chromosomal localization, protein expression pattern, and putative association with Bardet-Biedl syndrome.” *Mammalian Genome*. 12(12) : 933–937.
- Indiamart, 2015. **Penaeus Monodon & Black Tiger Prawn**. [Online]. Available : <https://www.indiamart.com/proddetail/penaeus-monodon-black-tiger-prawn-9467773655.html>
- Jitrapakdee, S. Unajak, S. Sittidilokratna, N. Hodgson R.A.J. Cowley, J.A. Walker, P.J. Panyim, S. and Boonsaeng, V. 2003. “Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp.” *Journal of General Virology*. 84(4) : 863–873.
- Kanokudom, S. Prateeprat, T. Attasart, P. Roytrakul, S. Panyim, S. Smith, D.R. and Assavalapsakul, W. 2018. “*In Vitro* Neutralization of Yellow Head Virus Infection in shrimp using recombinant PmYRP65 protein.” *Aquaculture*. 486 : 266–270.
- Li, D.F. Zhang, M.C. Yang, H.J. Zhu, Y.B. and Xu, X. 2007. “ β -integrin mediates WSSV infection.” *Virology*. 368 : 122–132.
- Liu, W.J. Li, Y.C. Kou, G.H., and Lo, C.F. 2016. “Laminin receptor in shrimp is a cellular attachment receptor for white spot syndrome virus.” *PLoS ONE*. 11(6) : 1–14.

- Miller, A.D. Bergholz, U. Ziegler, M. and Stocking, C. 2008. "Identification of the myelin protein plasmolipin as the cell entry receptor for *Mus caroli* endogenous retrovirus." *Journal of Virology*. 82(14) : 6862–6868.
- Nadala, E.C.B. Tapay, L.M. and Loh, P.C. 1997. "Yellow-head virus: A rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp." *Diseases of Aquatic Organisms*. 31(2) : 141–146.
- Pfaffl, M.W. 2001. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Research*, 29(9) 45–45.
- Sittidilokratna, N. Chotwiwatthanakun, C. Wijegoonawardane, P.K.M. Unajak, S. Boonnad, A. Wangnai, W. Jitrapakdee, S. Cowley, J.A. and Walker, P.J. 2009. "A virulent isolate of yellow head nidovirus contains a deformed envelope glycoprotein gp116." *Virology*. 384(1) : 192–200.
- Vatanavicharn, T. Pongsomboon, S. and Tassanakajon, A. 2012. "Two plasmolipins from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* and their response to virus pathogens." *Developmental and Comparative Immunology*. 38(2) : 389–394.
- Xie, X. Li, H. Xu, L. and Yang, F. 2005. "A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles." *Virus Research*. 108(1–2) : 63–67.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 10X Phosphate buffer saline (PBS)

ในการเตรียมสารปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

NaCl	80	กรัม
KCl	20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	14.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 1M HCl ให้ได้ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 5X Tris Boric EDTA

ในการเตรียมสารปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 1.5 M TRIS pH 8.8

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tris base	18.17	กรัม
-----------	-------	------

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 1 M TRIS pH 6.8

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tris base	12.114	กรัม
-----------	--------	------

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

SDS 10 กรัม

ละลาย SDS ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. 10% ammonium persulfate (APS)

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

ammonium persulfate 10 กรัม

ละลาย ammonium persulfate ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. 10X Running buffer

ในการเตรียมสารปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris base 30.3 กรัม

Glycine 144 กรัม

SDS 10 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. การเตรียม 1.5 Agarose gel

ซึ่ง Agarose 0.48 กรัม จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 1XTBE นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agarose ละลาย เติมสารฟลูออเรสเซนต์โดยใช้ Red Safe 1 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเทในกระเบ รอให้ เจลแข็ง

9. การเตรียม transfer buffer pH 9.2 สำหรับ Western bolt

ในการเตรียมสารปริมาตร 200 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tris pH 9.2 1.164 กรัม

Glycine 0.586 กรัม

Methanol 40.0 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร ควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้ง

ก่อนใช้งาน

10. Luria-Bertani Medium (LB Medium)

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Trptone 10 กรัม

Yeast extract 5 กรัม

NaCl 10 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. 10% Neutral Buffered Formalin

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

37% formaldehyde solution 10 ml

NaCl 0.8 กรัม

NaH₂PO₄ 0.4 กรัม

Na₂HPO₄ 0.65 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพลาสมิโดลินไอโซพอร์ม 1 (*PmPLP1*)

1 atgatggccg agactcacc ccaatccgag gtgtcgtcca cggtgaccac
 m m a e t h p k s e v s s t v t
 51 ctgcccgacc tacgccgcc ctcagaagtc gtcgggaatc tctctgtgcc
 t s p t y a a p q k s s g i s l c
 101 ttgagtactt taagacggcc cggggaatca tcaagatcat cgaactggtg
 l e y f k t a p g i i k i i e l v
 151 atcggcatct tctgcatggc ctgcccagca ccggcctgga cgaacggcac
 i g i f c m a c a a p a w t n g
 201 gcaactggtc ctgttcgtgg tcgtcacagc ctctgtgtca acagccctct
 t h w f l f v v v t a f v s t a l
 251 ggtgtttcat ctaccttctg aatctcaaga acgcatcaa cctcccatt
 w c f i y l l n l k n a i n l p i
 301 gattggctcc tcaactgaact cattctaaca gctctcttg cggtgcttta
 d w l l t e l l i l t a l f a v l
 351 cataatagct agcattgtcc agttaatcag ctctgtcaca aggccggggc
 y i i a s i v q l i s s v t r p r
 401 cagccagtcg cctgaaaccc ttctacatat tgcgggggat cttcggcatc
 p p s r l k p f y i l s g i f g i
 451 ttcaacctga tcgctacgg catcggctcc ttctacctgt accgcgactg
 f n l i a y g i g s f y l y r d
 501 gaagacagc caccctcaact cctccttctc cggctccgtc ctcaagcgca
 w k d s h p h s s f s g s v l k r
 551 atccttag
 n p -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การหาจำนวนพลาสมิดสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. การหาน้ำหนักของพลาสมิด

ขนาดของ TA vector	2723	คู่เบส
ขนาดของยีน GP64	250	คู่เบส
ฉะนั้น ขนาดของพลาสมิด เท่ากับ	2973	คู่เบส
น้ำหนักของพลาสมิด เท่ากับ	2937×650	$= 1.91 \times 10^6$ ดาลตัน
		$= (1.91 \times 10^6) \times (1.66 \times 10^{-24})$
		$= 3.17 \times 10^{-18}$ กรัม
		$= 3.17 \times 10^{-9}$ นาโนกรัม

2. การหาจำนวนพลาสมิด

จาก น้ำหนักของพลาสมิด	3.17×10^{-9} นาโนกรัม
ความเข้มข้นของพลาสมิดที่สกัดได้	198 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
ฉะนั้น ใน 1 ไมโครลิตร มีพลาสมิด	6.2×10^{10} ก้อนต่อไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

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) ให้สะอาดและแห้งก่อนทำการประกบแผ่นกระจก จากนั้นประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้บน spacer plate นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่น วางลงใน CastingFrame โดยวางแผ่นสั้น (Short Plate) ไว้ด้านหน้า CastingFrame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อยๆกดล๊อคด้วย Pressure Cams ด้วยความระมัดระวัง เพราะกระจกอาจแตกจากการประกบไม่เข้ารูป จากนั้นวางบน casting stand และรเช็คการรั่วของแผ่นกระจก โดยใช้ น้ำกลั่นทดสอบการรั่วของแผ่นกระจก

2. เตรียม Separating gel

โดยผสมสารเคมีตามเปอร์เซ็นต์เจลที่ต้องการใช้ ดังตาราง ง-1 จากนั้นปิเปตสารละลาย poly acrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ทั้งไว้ 20 -30 นาทีเพื่อรอให้เจลเซตตัว

3. เตรียม stacking gel

โดยผสมสารเคมีตามปริมาณที่ต้องการ ดังตาราง ง-2 ปิเปต polyacrylamide gel ส่วน stacking gel ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก จากนั้นวาง comb ให้ตรง อย่านำให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 - 20 นาที

ตารางที่ จ-1 ส่วนประกอบสำหรับเตรียม Separating gel

Percentage	14%	12%		10%		7.5%	
Total	40 ml	10 ml	5 ml	10 ml	5 ml	10 ml	5 ml
D.Water	10.33 ml	3.35 ml	1.68 ml	4.0 ml	2.0 ml	4.85 ml	2.43 ml
Tris buffer (1.5M, pH 8.8)	10 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml	1.25 ml
Acrylamide : Bis acrylamide	18.67 ml	4.0 ml	2.0 ml	3.33 ml	1.67 ml	2.5 ml	1.25 ml
10% SDS	400 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl
10% APS	200 µl	50 µl	25 µl	50 µl	25 µl	50 µl	25 µl
TEMED	40 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-2 ส่วนประกอบสำหรับเตรียม stracking gel

Percentage	4%	
	10 ml	5 ml
Total	10 ml	5 ml
D.Water	3.35 ml	1.68 ml
Tris buffer (0.5M, pH 6.8)	2.5 ml	1.25 ml
Acrylamide : Bis acrylamide	4.0 ml	2.0 ml
10% SDS	100 μ l	50 μ l
10% APS	50 μ l	25 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

การทำ Western blot hybridization

การทำ Western blot hybridization ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. ทำการแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ตามขั้นตอนในภาคผนวก ก
2. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่ nitrocellulose membrane(ทำการ activate membrane ด้วยเมทานอลก่อนใช้งาน) ด้วยเครื่อง semi-dry bolting โดยทำการแช่ nitrocellulose membranes support membrane และ เจล SDS ด้วยสารละลาย transfer buffer เป็นเวลา 30 นาที ทำการเรียงแผ่นเมมเบรนลงบนเครื่อง semi-dry bolting ดังนี้ เริ่มจาก support membrane แล้วนำ nitrocellulose membrane ที่ผ่านการแช่เมทานอลแล้ววางลงบนแผ่น support membrane จากนั้นนำแผ่นเจล SDS-PAGE วางลงบน nitrocellulose 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% tween20) 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. ทำการตรวจสอบการเกิดสีของซับสเตรท NBT-BCIP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลืองด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

สมการที่ใช้ในการคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลือง

$$\text{ratio} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

ตารางที่ ข-1 การคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

		NaCl-YHV		dCT (Ctarget- Ccontrol)	ddCT (Csample- Ccontrol)	2^{-ddCT}
shrimp	YHV	EF				
1	21.22	23.59	-2.37	1.37	0.39	
2	15.00	19.77	-4.77	-1.03	2.04	
3	21.40	24.98	-3.58	0.16	0.90	
4	16.98	21.63	-4.65	-0.91	1.87	
5	20.37	23.70	-3.33	0.41	0.75	
avg			-3.74	0.00	1.00	
sd					0.73	
		BSA-YHV				
shrimp	YHV	EF				
1	21.99	24.58	-2.59	1.15	0.45	
2	18.68	22.06	-3.38	0.36	0.78	
3	22.95	24.42	-1.47	2.27	0.21	
4	23.41	25.94	-2.53	1.21	0.43	
5	23.36	25.96	-2.60	1.14	0.45	
avg					0.46	
sd					0.20	
		PLP_YHV				
shrimp	YHV	EF				
1	18.93	20.93	-2.00	1.74	0.30	
2	22.55	22.68	-0.14	3.60	0.08	
3	21.94	22.29	-0.34	3.40	0.10	
4	24.95	25.19	-0.24	3.50	0.09	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4	20.12	21.43	-1.31	2.43	0.19
avg					0.15
sd					0.09

ตารางที่ ข-2 การคำนวณการแสดงออกของไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง Sf9

	Mock		dCT (Ctarget- Ccontrol)	ddCT (Csample- Ccontrol)	2-ddCT
shrimp	YHV	EF			
1	21.76	18.76	3.15	-0.40	1.32
2	22.03	18.63	3.42	-0.13	1.09
3	22.01	18.49	3.40	-0.15	1.11
avg		18.63	3.32	-0.23	1.17
sd					0.13
	Sf9 _{GFP}				
shrimp	YHV	EF			
1	21.05	17.36	3.79	0.24	0.85
2	21.11	17.30	3.85	0.30	0.81
3	21.10	17.17	3.84	0.29	0.82
avg		17.28	3.83	0.28	0.83
sd					0.02
	Sf9 _{PmPLP}				
shrimp	YHV	EF			
1	18.47	15.92	2.68	-0.87	1.83
2	18.54	15.83	2.75	-0.80	1.74
3	18.53	15.75	2.74	-0.81	1.75
avg		15.83	2.72	-0.83	1.77
sd					0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ซ-1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาผลของแปปไทด์ ELPmPLP1 ต่อการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองในกึ่งกุลาดำ

Oneway ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.836	2	1.418	7.388	.008
Within Groups	2.304	12	.192		
Total	5.140	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00002

	(I)	(J)	95% Confidence Interval				
			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	.72600*	.27710	.022	.1222	1.3298
		3	1.03800*	.27710	.003	.4342	1.6418
	2	1	-.72600*	.27710	.022	-1.3298	-.1222
		3	.31200	.27710	.282	-.2918	.9158

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3	1	-1.03800*	.27710	.003	-1.6418	-.4342
	2	-.31200	.27710	.282	-.9158	.2918

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

VAR00002

	1=YHV, 2=BSA, 3=PLP	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	3	5	.1520	
	2	5	.4640	
	1	5		1.1900
Sig.			.282	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

ซ-2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง Sf9

Oneway ANOVA

1 = mock, 2 = Sf9_{sfp}, 3 = Sf9_{Pmplp1}

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.376	2	.688	108.091	.000
Within Groups	.038	6	.006		
Total	1.415	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:1 = mock, 2 = Sf9_{GFP}, 3 = Sf9_{Pmp1p1}

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	VAR00004	VAR00004					
LSD	1	2	.34667*	.06515	.002	.1873	.5061
		3	-.60000*	.06515	.000	-.7594	-.4406
	2	1	-.34667*	.06515	.002	-.5061	-.1873
		3	-.94667*	.06515	.000	-1.1061	-.7873
	3	1	.60000*	.06515	.000	.4406	.7594
		2	.94667*	.06515	.000	.7873	1.1061

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

1 = mock, 2 = Sf9_{GFP}, 3 = Sf9_{Pmp1p1}

VAR00004	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a	2	3	.8267	
	1	3		1.1733
	3	3		1.7733
Sig.			1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววีชรายา มาศแจ้ง
วัน เดือน ปีเกิด	9 มกราคม 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	334/5 หมู่13 ตำบลวัดไทร อำเภอเมืองนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ 60000
ประวัติการศึกษา	2557 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม เกรดเฉลี่ย 2.87 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2561 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนค่าศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ IAMBEST ครั้งที่ 3 (The 3 rd National Conference on Informatics, Agriculture, Management, Business Administration, Engineering, Sciences and Technology) ในระหว่างวันที่ 24-25 พฤษภาคม 2561 เรื่อง การผลิตโปรตีนลูกผสม พลาสโมไลปินจากกุ้งกุลาดำด้วย <i>Escherichia coli</i> (Production of recombinant plasmolipin protein from black tiger shrimp, <i>Penaeus monodon</i> by <i>Escherichia coli</i>) 2. บทความวิจัยในวารสารวิทยาศาสตร์ มศว. เรื่อง วิธีอย่างง่ายและมี ประสิทธิภาพในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของไวรัสหัวเหลือง(A simple and efficient method for partial purification of yellow head virus) 3. บทความวิจัยในวารสาร Developmental and Comparative Immunology เรื่อง Plasmolipin, <i>PmPLP1</i> , from <i>Penaeus monodon</i> is a potential receptor for yellow head virus infection

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้