การสร้างอนุภาคเหมือนเดนโซไวรัสในกุ้งและการทดสอบประสิทธิภาพ

นายรพี สินเนืองนอง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF SHRIMP DENSOVIRUS LIKE PARTICLES AND EFFICIENCY TEST

Mr. Rapee Sinnuengnong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างอนุภาคเหมือนเดนโซไวรัสในกุ้งและการทดสอบประสิทธิภาพ
โดย	นายรพี สินเนืองนอง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. พงโสภี อัตศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. พงโสภี อัตศาสตร์)

....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. นลวัฒน์ บุญญาลัย)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. สุพัตรา ตรีรัตน์ตระกูล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รพี สินเนืองนอง : การสร้างอนุภาคเหมือนเดนโซไวรัสในกุ้งและการทดสอบประสิทธิภาพ (PRODUCTION OF SHRIMP DENSOVIRUS LIKE PARTICLES AND EFFICIENCY TEST) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. พงโสภี อัตศาสตร์, 122 หน้า.

โรคหัวเหลืองเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง มีสาเหตุจากการติดไวรัสหัวเหลือง วิธีการหนึ่งในการป้องกันการติดไวรัสหัวเหลือง คือ การใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อยีนของไวรัสหัวเหลืองมากระตุ้นผ่านกระบวนการ RNA interference อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัด เนื่องจากการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเข้าสู่กุ้งโดยตรง อาจถูกย่อยโดยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสภายในกุ้ง ดังนั้นการใช้อนุภาคเหมือนไวรัสในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่อาจจะช่วยป้องกันการย่อยสลายของอาร์เอ็นเอสายคู่ภายในกุ้ง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งได้ โดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคเหมือนไวรัสที่คล้ายคลึงกับไวรัสที่พบในธรรมชาติและสามารถเข้าจับแบบจำเพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV เพื่อใช้เป็นตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV พบว่ามีขนาดประมาณ 1,600 และ 1,000 คู่เบสตามลำดับ มาเชื่อมเข้ากับ พลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออก pET28a(+) เพื่อแสดงออกใน *E.coli* Rosetta-gami ผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกเมื่อชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis พบรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 64 และ 37 กิโลดาลตันตามลำดับและโปรตีนดังกล่าวสามารถถูกจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮีสติดีนได้ จากนั้นนำไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography พบว่าสามารถทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสทั้งสองชนิดให้บริสุทธิ์ได้และเกิดการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการทำโปรตีนให้เสียสภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV จึงได้คัดเลือกอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV มาใช้เป็นพาหะในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองต่อไป โดยนำรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียมาสร้างเป็นเซลล์คอมพีเทนต์และทรานสฟอร์มพลาสมิดที่สร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (YHV-Protease) ให้เกิดการแสดงออกภายในเซลล์แบคทีเรียเดียวกันผ่านการชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีนและอาร์เอ็นเอสายคู่ จากนั้นนำไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และตรวจสอบการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส ซึ่งพบการรวมกลุ่มกันของอนุภาคเหมือนไวรัสและสามารถห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองได้ ต่อมานำอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่มาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง ผลการทดลองพบว่าการใช้อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองสามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งได้ดีกว่าการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าสู่กุ้งโดยตรง เมื่อควบคุมปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ในปริมาณที่เท่ากัน นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในระยะยาว พบว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV สามารถทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองป้องกันการย่อยสลายของอาร์เอ็นเอสายคู่จากเอนไซม์จากกุ้ง และป้องกันการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองในระยะยาวได้อีกด้วย

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	....

5472885723 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEYWORDS: DOUBLE STRANDED RNA / RNA INTERFERENCE / DENSOVIRUS / VIRUS LIKE PARTICLE / YHV INHIBITION

RAPEE SINNUENGNONG: PRODUCTION OF SHRIMP DENSOVIRUS LIKE PARTICLES AND EFFICIENCY TEST. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: PONGSOPEE ATTASART, Ph.D., 122 pp.

Yellow head disease, caused by yellow head virus (YHV), is a major problem in shrimp farming industry. One approach for protection the shrimp from YHV infection is double-stranded RNA (dsRNA)-mediated RNAi pathway. However, dsRNA might be digested by endonuclease after direct injection into the shrimp. Thus, the virus like particles (VLPs) might protect dsRNA from endonuclease and enhance the efficiency of the YHV inhibition. The aim of this study was to construct the *Pm*DNV and *Pst*DNV VLPs in order to deliver YHV-specific dsRNA and apply for YHV inhibition in shrimp. The *Pm*DNV and *Pst*DNV capsid protein genes (1,600 and 1,000 bp, respectively) were amplified and ligated into the pET28a(+) expression plasmid. The recombinant plasmids were transformed into *E.coli* Rosetta-gami, and the capsid proteins were induced by 0.4 mM IPTG at 30 °c for 3 h. The results found the size of *Pm*DNV and *Pst*DNV capsid protein approximately 64 and 37 kDa, respectively and these proteins were able to bind with anti-histidine monoclonal antibody. Next, the recombinant proteins were purified by Nickel Affinity Chromatography for VLP visualization by TEM. The results indicated that the both *Pm*DNV and *Pst*DNV recombinant proteins were successfully purified and could form the VLPs. However, *Pm*DNV VLPs had a limitation because the *Pm*DNV VLPs could be formed under denaturing condition. Thus, *Pst*DNV was selected for deliver YHV-Protease dsRNA (dsYHV). The recombinant *Pst*DNV clone was used to be the host for transforming the YHV-Protease dsRNA encoding plasmid. After induction with IPTG, the recombinant *Pst*DNV VLP-dsYHV clone was investigated the expression of the recombinant protein and dsRNA. The results showed that the *Pst*DNV capsid protein and dsRNA were able to express in the bacterial cell. Then, the protein was purified and visualized the VLPs by TEM. The results indicated that the VLPs could be formed and contained dsYHV. Finally, the purified *Pst*DNV VLP-dsYHV was tested to suppress the YHV replication in shrimp. The results showed that the purified *Pst*DNV VLP-dsYHV could suppress YHV replication in shrimp more efficient than the only dsYHV. It might be concluded that the *Pst*DNV VLPs could protect dsRNA from host endonuclease for a long time in shrimp and might be developed the oral feed supplement to prevent shrimp mortality from YHV during an outbreak of infection.

Department:	Microbiology	Student's Signature	....
Field of Study:	Microbiology	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2016	Co-Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จากรองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ กำลังใจ สอนเทคนิคต่าง ๆ ในการจัดระบบความคิดหรือการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างทำการวิจัยและช่วยแก้ไข ตรวจทานให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พงโสภี อัตศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความเมตตา ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ การจัดระเบียบข้อมูลและจัดระบบความคิดในการแก้ไขปัญหาตามหลักวิทยาศาสตร์ ความรู้ความเข้าใจทางด้านชีววิทยาโมเลกุลของกุ้ง รวมถึงการให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยที่เกี่ยวกับกุ้งให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ประธานกรรมการสอบ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดิถี-สิริศรัทธา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และช่วยให้ข้อคิดเห็นต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุพัตรา ตรีรัตน์ตระกูล ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกและให้คำแนะนำ กำลังใจ รวมถึงความรู้ทางด้านโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และสารเคมีบางชนิดที่ใช้สำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ทำให้ข้าพเจ้ามีความรู้ทางด้านโปรตีนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังให้ข้อเสนอแนะดีๆ ในการทำวิจัยทางด้านชีววิทยาโมเลกุลของกุ้งอีกด้วย และ ดร.นลวัฒน์ บุญญาลัย ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกและให้คำแนะนำ กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ ห้องวิจัยชีววิทยาโมเลกุลของกุ้ง (ดร.พงโสภี อัตศาสตร์) และน้องๆ พี่ๆ ในหน่วยวิจัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นที่ปรึกษาที่ดีตลอดการทำวิจัย จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ น้องๆ ห้องวิจัย 2014 ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดการทำวิจัย รวมถึงพี่ๆ น้องๆ บุคลากรภายในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำดีๆ รวมถึงกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ที่ให้กำลังใจ คำปรึกษา ได้รับความรัก การดูแลด้วยดีเสมอมา และให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกด้านจนสำเร็จการศึกษาตามที่ได้ตั้งใจไว้

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการวิจัย พัฒนาวิศวกรรม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ P-10-11168) ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และทุนมูลนิธิการศึกษาเชล 100 ปี ปีการศึกษา 2556

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..........ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..........จ

กิตติกรรมประกาศ..........ฉ

สารบัญ..........ช

สารบัญรูป..........ญ

สารบัญตาราง..........ฒ

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์..........ณ

บทที่ 1..........1

บทนำ..........1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..........1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..........3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..........3

บทที่ 2..........4

ปริทรรศน์วรรณกรรม..........4

2.1 ไวรัสที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย..........4

2.1.1 ไวรัสหัวเหลือง..........4

2.1.2 ไวรัส *Pm*DNV..........8

2.1.3 ไวรัส *Pst*DNV..........11

2.2 RNAi interference..........14

2.2.1 กระบวนการ RNAi Pathway..........14

2.2.2 การประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi ในการยับยั้งโรคที่เกิดจากไวรัส..........17

2.3 การใช้พาหะในการขนส่งยีนบำบัด..........18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

บทที่ 3 25
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 25
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 25
3.2 ไพร์เมอร์ 26
3.3 พลาสมิด 27
3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ 28
3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 28
3.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 29
3.7 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV 33
3.8 การทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ 38
3.9 การตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV 42
3.10 การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง 42
3.11 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 46
3.12 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะเวลา 10 วัน 49
บทที่ 4 51
ผลการทดลอง 51
4.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV 51
4.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV 54
4.3 การทดสอบการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV 57
4.4 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV ให้บริสุทธิ์ 59

หน้า

4.5 การตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV 60

4.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV 62

4.7 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ใน *E.coli* 70

4.8 การทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ 72

4.9 การตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV 75

4.10 การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง 77

4.11 การทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง 79

4.12 การตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัสของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัส หัวเหลือง 80

4.13 ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่จากอนุภาคเหมือนไวรัสของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและการตรวจสอบคุณสมบัติของอาร์เอ็นเอสายคู่ 82

4.14 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 84

4.15 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะเวลา 10 วัน 90

บทที่ 5 94

อภิปรายผลการทดลอง 94

บทที่ 6 103

สรุปผลการทดลอง 103

รายการอ้างอิง 105

ภาคผนวก 116

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 122

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1 มูลค่าการส่งออกของกุ้งสด แช่เย็น แช่แข็งและแปรรูปของประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553-2558 1

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน 5

รูปที่ 2.2 แสดงจีโนมของไวรัสหัวเหลือง 5

รูปที่ 2.3 แสดงขบวนการจำลองตัวเองของไวรัสหัวเหลือง 6

รูปที่ 2.4 แสดงพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดไวรัสหัวเหลือง 7

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลือง 7

รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของกุ้งที่ติดไวรัส *Pm*DNV 8

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะรูปร่างของ *Pm*DNV 9

รูปที่ 2.8 แสดงจีโนมของไวรัส *Pm*DNV 9

รูปที่ 2.9 แสดงขบวนการจำลองตัวเองของไวรัสในตระกูล Parvovirus 10

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของเซลล์ตับอ่อนที่ติดไวรัส *Pm*DNV 11

รูปที่ 2.11 แสดงกุ้งที่ติดไวรัส *Pst*DNV 12

รูปที่ 2.12 แสดงจีโนมของไวรัส *Pst*DNV 12

รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะของเซลล์ที่ติดไวรัส *Pst*DNV เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดไวรัส 13

รูปที่ 2.14 ลักษณะของ RNA ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi Pathway 15

รูปที่ 2.15 กระบวนการ RNAi ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ 16

รูปที่ 2.16 กระบวนการ RNAi ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย miRNA ที่เกิดจากภายในเซลล์ 17

รูปที่ 2.17 แสดงโครงสร้างของไวรัสที่สามารถสร้างอนุภาคเหมือนของไวรัส 22

รูปที่ 3.1 พลาสมิด pET-28a (+) 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และพลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออก (pET28a) ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe* I และ *Xho* I ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 51

รูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV 53

รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) และ *Pm*DNV (C) ของ Total cell lysate จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 55

รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของของ Total cell lysate จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดยการแปรผันความเข้มข้น IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 56

รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์การละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของ Total cell lysate จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 58

รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของตะกอนรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ที่ละลายขึ้นมาด้วย 1% SDS และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography 60

รูปที่ 4.7 อนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 100000X เปรียบเทียบกับอนุภาคของไวรัส *Pm*DNV ที่พบในธรรมชาติ 61

รูปที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 62

รูปที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEMT-Easy vactor เปรียบเทียบกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากฐานข้อมูล........ 64

รูปที่ 4.10 ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากฐานข้อมูล 65

รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก pET28a และยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nde* I และ *Xho* I 66

รูปที่ 4.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลน หมายเลข 19 67

รูปที่ 4.13 ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 ที่ใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม 69

รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 70

รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์การชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยการแปรผันความเข้มข้น IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) 71

รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์การละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและนำมาทดสอบด้วย Enzhance lysis Buffer ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B)................................... 72

รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) 74

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.18 อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยายต่าง ๆ (150,000X 200,000X และ 300,000X ตามลำดับ) (A) อนุภาคไวรัส *Pst*DNV ที่พบในธรรมชาติ (B)........ 76

รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงด้วย 12% SDS-PAGE (A) western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) และอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (C) 78

รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และ อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและผ่านการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B)........ 80

รูปที่ 4.21 อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยายต่าง ๆ (10,000X 50,000X 150,000X 200,000X และ 300,000X ตามลำดับ)........ 81

รูปที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้จากอนุภาคเหมือนไวรัสของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 4% (A) การตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่ เมื่อบ่มด้วยเอนไซม์ DNase I RNase A และ RNase III (B) 83

รูปที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดจาก *E.coli* HT115 ที่จำเพาะต่อไวรัส หัวเหลืองที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง หลังการติดไวรัสหัวเหลืองเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)........ 85

รูปที่ 4.24 ผลการวิเคราะห์ความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง หลังจากฉีดเข้าสู่กุ้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 87

รูปที่ 4.25 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีนไวรัสหัวเหลืองต่อยีนแอกตินของกลุ่มการทดลองในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง........ 89

รูปที่ 4.26 กราฟแสดงอัตราการตายสะสมของกุ้งเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะยาวแบบฉีดร่วมกับอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV VLPs-dsYHV คู่กับไวรัสหัวเหลือง.......... 91

รูปที่ 4.27 กราฟแสดงอัตราการตายสะสมของกุ้งในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะยาวแบบฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV VLPs - dsYHV ก่อนเป็นเวลา 7 วันตามด้วยการฉีดไวรัส หัวเหลือง.......... 93

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงปัญหาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ยีนบำบัดในการรักษาโรค โดยทำการส่งผ่านเซลล์โดยตรง 19

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง........ 25

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง 26

ตารางที่ 3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง (Fermentas, USA) 28

ตารางที่ 3.4 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV........ 29

ตารางที่ 3.5 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV........ 30

ตารางที่ 3.6 การเตรียม SDS-PAGE สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน........ 35

ตารางที่ 3.7 องค์ประกอบของการตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่........ 44

ตารางที่ 3.8 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส สำหรับวิเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่ ... 45

ตารางที่ 3.9 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับตรวจสอบการติดไวรัสหัวเหลือง 48

ตารางที่ 5.1 แสดงชนิดของพาหะที่ใช้ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ในการป้องกันการติดไวรัสในกุ้ง 100

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

°ซ	=	องศาเซลเซียส
APS	=	ammonium persulfate
bp	=	base pair
cDNA	=	complementary DNA
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
HRP	=	horse radish peroxidase
IPTG	=	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
mM	=	millimolar
PBS	=	phosphate buffer saline
PBST	=	phosphate buffer saline-Tween 20
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

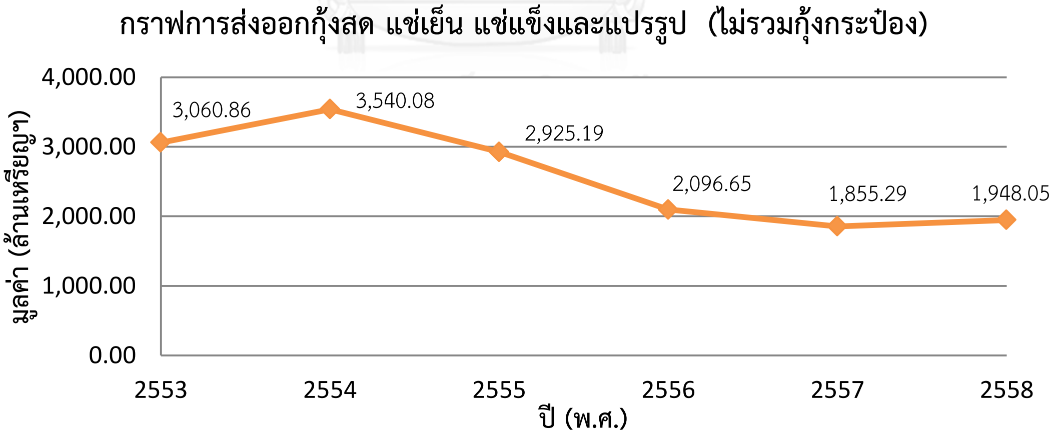
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกสินค้าสัตว์น้ำในลำดับต้นของโลก โดยมีมูลค่าการส่งออกสินค้าในหมวดสินค้ากุ้ง หมึก ปลาสดแช่เย็นแช่แข็ง รวมทั้งผลิตภัณฑ์ทูน่าในปริมาณมาก ถือว่าเป็นสินค้าอุตสาหกรรมเกษตรที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศในอันดับต้น โดยเฉพาะสินค้าในหมวดกุ้ง จะเห็นได้ว่าในปี พ.ศ. 2553- 2554 รายได้ในการส่งออกกุ้งมีมูลค่าประมาณ 3,000-3,500 ล้านเหรียญ แต่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 เป็นต้นมา พบว่ารายได้จากการส่งออกกุ้งทุกประเภท ไม่รวมกุ้งกระป๋องมีมูลค่าการส่งออกลดลง (รูปที่ 1.1) สาเหตุหลักคือการเกิดโรคในกุ้ง โดยเฉพาะโรคตายด่วน (EMS) ทำให้ปริมาณกุ้งลดลงส่งผลให้ประเทศคู่ค้าหลักได้หันไปซื้อกุ้งจากประเทศคู่แข่งเพิ่มมากขึ้น (เอนกพร เกษมสุข, 2558)



รูปที่ 1.1 มูลค่าการส่งออกของกุ้งสด แช่เย็น แช่แข็งและแปรรูปของประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553-2558 (เอนกพร เกษมสุข, 2558)

นอกจากโรคกุ้งตายด่วน (EMS) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแล้ว โรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งมีปริมาณมากถึง 60% เป็นอีกต้นเหตุหนึ่งที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรและสูญเสียรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก (Flegel, 2012) ยกตัวอย่างเช่น ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) เป็นต้น ซึ่งเป็นไวรัสที่สำคัญส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีการแพร่ระบาดรวดเร็ว ส่งผลให้กุ้งตายในระยะเวลาอันสั้น โดยทั่วไปการป้องกันการติดเชื้อไวรัส ทำได้โดยการปรับปรุงระบบการจัดการในบ่อเลี้ยงกุ้ง เช่น คุณภาพน้ำ การปล่อยกุ้งไม่มากหรือน้อยเกินไป พื้นบ่อไม่สกปรก การคัดเลือกลูกกุ้งที่สุขภาพแข็งแรงก่อนปล่อยลงสู่บ่อเลี้ยง เป็นต้น นอกจากการปรับปรุงระบบการจัดการบ่อเพาะเลี้ยงแล้ว การให้ผลิตภัณฑ์ที่เสริมการเจริญเติบโต อาทิเช่น การให้โพรไบโอติกที่ผสมกับอาหารให้กุ้งกินเพื่อทำให้กุ้งมีสุขภาพที่ดี สามารถป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น การผสม β-1,3-glucan ซึ่งเป็นสารที่เสริมประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในอาหารเลี้ยงกุ้ง เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสม β-1,3-glucan 0.1-2% ตามลำดับเป็นเวลา 24 วันและทำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) สู่กุ้งหลังจากให้อาหารผสมเป็นเวลา 20 วัน พบว่ากุ้งสามารถรอดชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ประมาณ 66-75% เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ ซึ่งไม่พบกุ้งที่รอดชีวิต (Chang และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์ Baculovirus ที่มีการแสดงออกของโปรตีนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (VP28) ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้ทั้งการฉีดและผสมกับอาหารกุ้ง จากนั้นทำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวสู่กุ้ง ผลการทดลองพบว่าการฉีดหรือการผสมรีคอมบิแนนท์ Baculovirus ในอาหารกุ้งสามารถทำให้กุ้งรอดชีวิตจากการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำได้ 68.4% และ 76.7% ตามลำดับ (Syed และ Kwang, 2011)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยามาใช้ในการป้องกันการติดไวรัสตัวอย่างเช่น การใช้ดีเอ็นเอวัคซีนที่ทำให้มีการสร้างโปรตีนเปลือกหุ้ม VP 28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวและทำการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนในกุ้ง พบว่ากุ้งมีอัตราการตายที่ลดลงประมาณ 23-30% (Rout และคณะ, 2007) ต่อมามีการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนด้วยการห่อหุ้มใน chitosan nanoparticles และใช้ในการป้องกันไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการผสมกับอาหารกุ้ง หลังจากนั้นทำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่กุ้ง ผลการทดลองพบว่าสามารถทำให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น 15-50% (Rajeshkumar และคณะ, 2009) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยี RNAi ในการป้องกันการติดไวรัสในกุ้ง เช่น การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อ Protease ของไวรัสหัวเหลือง จากนั้นฉีดเข้าสู่กุ้งและทำการติดไวรัสหัวเหลือง พบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีความจำเพาะต่อ Protease สามารถป้องกันการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งได้ โดยกุ้งมีอัตราการตายลดลงประมาณ 95% (Yodmuang และคณะ, 2006) ต่อมามีการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP28 และ VP281 เปรียบเทียบกับ non-structural protein (rr1 และ dnapol) ผลการทดลองพบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อ rr1 และ VP28 มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวมากกว่า VP281 และ dnapol (Sanjuktha และคณะ, 2012) แต่วิธีการดังกล่าวข้างต้นมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ข้อจำกัดในเรื่องของการนำไปใช้ ความเสถียรของอาร์เอ็นเอสายคู่ เป็นต้น ดังนั้นโครงการวิจัยชิ้นนี้ต้องการสร้างอนุภาคที่เหมือนไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV ร่วมกับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอสายคู่ในระบบการแสดงออกของโพรคาริโอตมาเป็นตัวกลางในการขนส่ง
อาร์เอ็นเอสายคู่เข้าสู่เซลล์กุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. โคลนและแสดงออกโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV ใน *Escherichia coli*
2. สร้างอนุภาคที่เหมือนไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV และทำการแสดงออกร่วมกันของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไวรัสหัวเหลือง เพื่อให้มีการห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไวรัสหัวเหลืองด้วยโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV และใช้เป็นตัวกลางในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่
3. ทดสอบประสิทธิภาพในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อไวรัสหัวเหลืองของอนุภาคที่เหมือนไวรัส ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อนุภาคที่เหมือนไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV สำหรับใช้เป็นตัวกลางในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าสู่เซลล์กุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 ไวรัสที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.1.1 ไวรัสหัวเหลือง

โรคหัวเหลือง (Yellow Head Disease) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในกุ้ง เนื่องจากมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วและส่งผลให้กุ้งมีอัตราการตายเป็นจำนวนมาก (Boonyaratpalin และคณะ, 1993; Flegel, 2006; Flegel, 2012) โดยทั่วไปจะเกิดการแพร่ระบาดสู่กุ้งตัวอื่นในบ่อเลี้ยงเดียวกันและทำให้กุ้งตายภายในระยะเวลาเพียง 3-5 วัน หลังจากที่เริ่มเกิดการติดเชื้อในกุ้ง (Boonyaratpalin และคณะ, 1993) สาเหตุของโรคหัวเหลืองคือไวรัสหัวเหลือง (Yellow Head virus) โดยไวรัสชนิดนี้มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ดังต่อไปนี้

Order *Nidovirales*

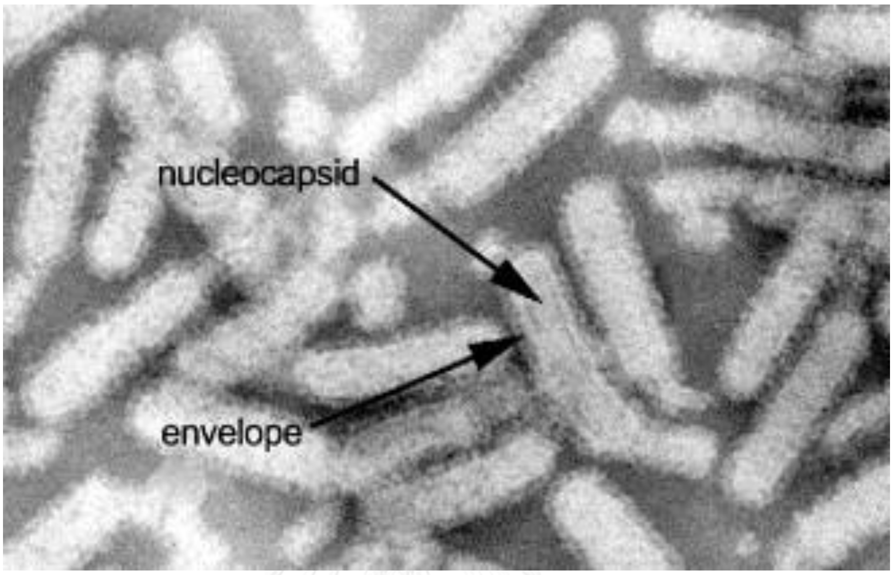
Family *Roniviridae*

Genus *Okavirus*

Species Yellow Head virus

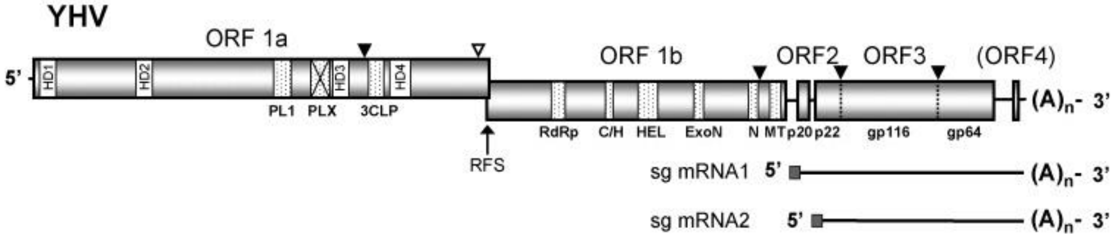
ไวรัสชนิดนี้พบในประเทศไทยครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1990 โดยช่วงแรกที่พบไวรัสชนิดนี้จัดให้อยู่ในกลุ่ม baculovirus ซึ่งเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแบบ ดีเอ็นเอ (Boonyaratpalin และคณะ, 1993) ต่อมาได้มีการทำไวรัสให้บริสุทธิ์และตรวจสอบรูปร่างและคุณสมบัติของไวรัส พบว่าไวรัสมีรูปร่างเป็นท่อน มีเปลือกหุ้ม (envelope) ขนาดประมาณ 150-200 นาโนเมตร x 40-50 นาโนเมตร (Lightner และคณะ, 2012) มีสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ (Wongteerasupaya และคณะ, 1995) ซึ่งจากการพิจารณาถึงรูปร่าง โครงสร้างของไวรัส พบว่ามีความแตกต่างจากไวรัสในกลุ่ม baculovirus จึงได้มีการจัดกลุ่มใหม่ให้อยู่ในกลุ่ม Okavirus นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างทั้งหมด 3 ชนิดคือ gp116 gp64 (envelope) และ nucleoprotein (p20) (Jitrapakdee และคณะ, 2003; Sittidilokratna และคณะ, 2008) ดังแสดงรูปที่ 2.1 สารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว สายบวก (+ssRNA) ขนาดประมาณ 26 กิโลเบส จีโนมของไวรัสสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ORFs แสดงดังรูปที่ 2.2 โดย ORF 1 จะแยกออกเป็น ORF 1a และ ORF 1b ซึ่ง ORF 1a จะทำหน้าที่ในการสร้าง polyprotein สายยาว (pp1a) ซึ่งประกอบด้วย 3C-like protease สำหรับ ORF 1b จะมีการสร้างจากเฟรมที่ต่างจาก ORF 1a (frame -1) ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์และองค์ประกอบต่าง ๆ สำหรับการจำลองตัวเอง ในขณะที่ ORF 2 และ 3 มีลักษณะ

เป็น sub-genomic mRNA ทำหน้าที่ในการถอดรหัสและแปลรหัสสำหรับสร้าง nucleoprotein (p20) และ envelope protein (gp116 และ gp64) ตามลำดับ (Sittidilokratna และคณะ, 2008)



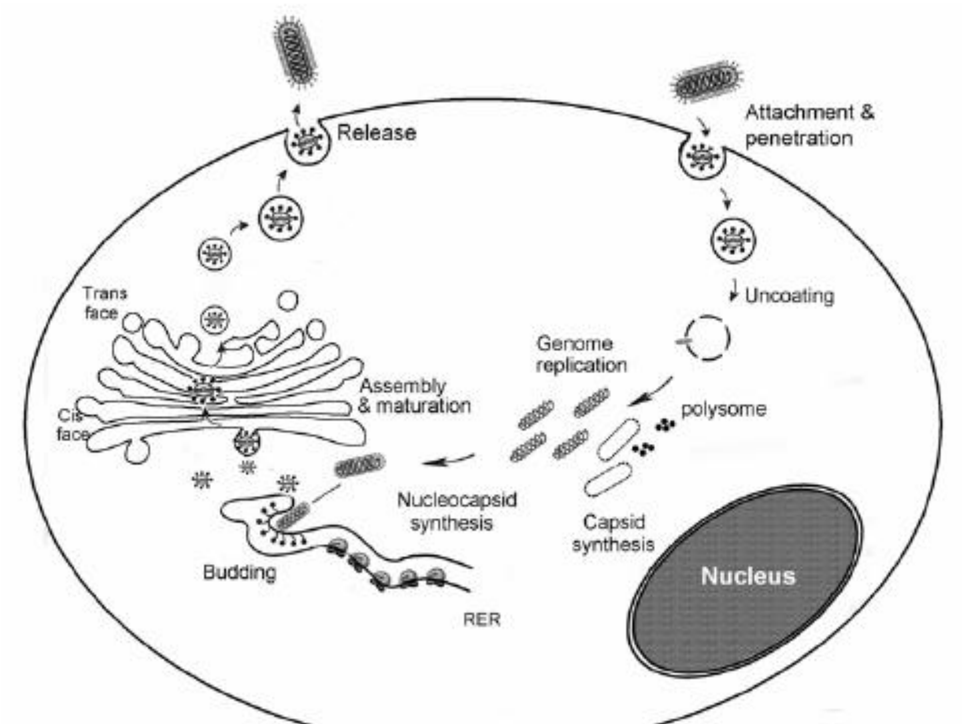
รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Flegel, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



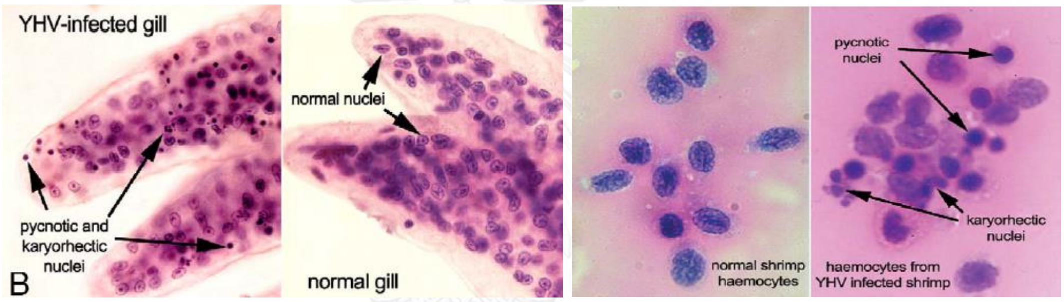
รูปที่ 2.2 แสดงจีโนมของไวรัสหัวเหลืองแบ่งออกเป็น 5 ORFs (Sittidilokratna และคณะ, 2008)

ขบวนการจำลองตัวเองของไวรัสหัวเหลืองเริ่มจากโปรตีนเปลือกหุ้ม (gp116 และ gp64) ของไวรัสเข้าจับกับ receptor บนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง receptor ดังกล่าวมีได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น *Pm*YRP65 (Assavalapsakul และคณะ, 2006) Shrimp laminin receptor (Busayarat และคณะ, 2011) จากนั้นไวรัสจะนำเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง receptor-mediated endocytosis ต่อมาจะเริ่มมีการปลดปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัสออกมาสู่ส่วนของไซโทพลาสซึมของเซลล์ เมื่อสารพันธุกรรมเข้าสู่ไซโทพลาสซึมแล้วอาร์เอ็นเอสายบวกจะถูกใช้เป็นต้นแบบสำหรับสร้างอาร์เอ็นเอสายลบ จากนั้นอาร์เอ็นเอสายลบจะถูกใช้เป็นต้นแบบเช่นเดียวกัน เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายบวก ซึ่งอาร์เอ็นเอสายบวกนี้จะใช้เป็นต้นแบบสำหรับการสร้างโปรตีนโครงสร้างต่าง ๆ ของไวรัสหรือใช้เป็นสารพันธุกรรมของอนุภาคไวรัสใหม่ต่อไป อนุภาคไวรัสใหม่จะเริ่มมีการประกอบเป็นโครงสร้างไวรัส เริ่มจากมีการสร้าง nucleocapsid ที่เข้าจับกับสารพันธุกรรมของไวรัส จากนั้นจะเคลื่อนเข้าสู่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบขรุขระ (RER) ต่อมาจะเคลื่อนเข้าสู่กอลจิบอดี (Golgibody) ท้ายที่สุดอนุภาคของไวรัสจะหลุดออกจากเซลล์เจ้าบ้านผ่านกระบวนการ exocytosis (Duangsuwan และคณะ, 2011) ซึ่งวงจรชีวิตของไวรัสแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงขบวนการจำลองตัวเองของไวรัสหัวเหลือง (Duangsuwan และคณะ, 2011)

โดยทั่วไปไวรัสหัวเหลืองสามารถติดได้ในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจาก ectodermal และ mesodermal (Boonyaratpalin และคณะ, 1993; Duangsuwan และคณะ, 2011; Assavalapsakul และคณะ, 2014) ซึ่งอวัยวะหลักที่เป็นเป้าหมายของไวรัสหัวเหลือง คือ ต่อมน้ำเหลืองของกุ้ง (lymphoid organ) (Boonyaratpalin และคณะ, 1993; Chantanachooklin และคณะ, 1993; Cowley และคณะ, 1999) นอกจากที่จะติดเชื้อตรงบริเวณต่อมน้ำเหลืองของกุ้งแล้ว ยังสามารถที่จะติดเชื้อได้ที่เหงือก (gill) และเม็ดเลือดของกุ้ง (hemocyte) โดยพบว่าเมื่อนำเหงือกและเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองมาย้อมสี H&E จะพบว่าเหงือกและเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดไวรัสจะมีโครงสร้างของ basophilic inclusions ในขณะที่กุ้งปกติจะไม่มีโครงสร้างนี้ (Flegel, 2006) แสดงดังรูปที่ 2.4 กุ้งที่มีการติดไวรัสชนิดนี้จะทำให้กุ้งมีสีเหลืองบริเวณตับและเหงือกกุ้ง จนทำให้บริเวณ cephalothorax มีสีเหลืองจึงเป็นที่มาของโรค ไวรัสหัวเหลือง แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.4 แสดงพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดไวรัสหัวเหลือง (Flegel, 2006)

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลือง **ด้านซ้าย** : กุ้งที่ไม่ติดไวรัสหัวเหลือง **ด้านขวา** : กุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลือง (Flegel, 2006)

2.1.2 ไวรัส *Pm*DNV

ไวรัส *Pm*DNV (*Penaeus monodon* densovirus) ชื่อเดิมเรียกว่า Hepatopancreatic parvovirus กุ้งที่ติดไวรัสชนิดนี้จะไม่มีการแสดงอาการที่เด่นชัด เพียงแต่มีการเจริญเติบโตที่ช้าลง หรือมีขนาดเล็กกว่ากุ้งที่ไม่ติดไวรัส (Dhar และคณะ, 2014) แสดงดังรูปที่ 2.6 แม้ว่าจะไม่มีการแพร่ระบาดที่รุนแรงหรือทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมาก แต่ทำให้ผลผลิตของกุ้งที่สามารถขายได้มีปริมาณลดลง ทำให้รายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งมีรายได้ลดลงเช่นเดียวกัน (Sukhumsirichart และคณะ, 2006; Safeena และคณะ, 2012; Dhar และคณะ, 2014) โดยไวรัสดังกล่าวมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ดังนี้

Family *Parvoviridae*

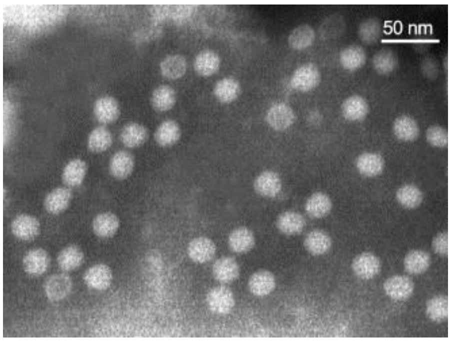
Sub-family *Densovirinae*

Genus *Brevidensovirus*

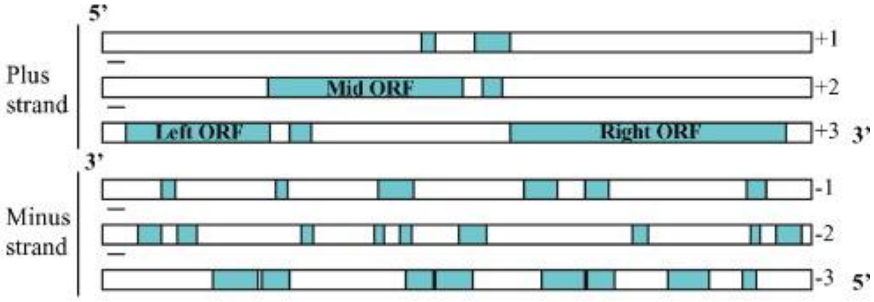
Species *Penaeus monodon* densovirus

มีรายงานในการพบไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี ค.ศ. 1992 ในกุ้ง *P.monodon* นอกจากนี้ยังสามารถติดในกุ้งสายพันธุ์อื่นได้เช่นเดียวกัน เช่น *P.chinensis* ประเทศเกาหลี *P.merguiensis* ประเทศสิงคโปร์ *P.semisulcatus* ประเทศคูเวต (Safeena และคณะ, 2012) รูปร่างลักษณะของไวรัสเป็น icosahedral ขนาดเล็กประมาณ 18-26 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 2.7 มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) ขนาดประมาณ 4-6 กิโลเบส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ORFs แบ่งเป็น ORF 1 ทำหน้าที่ในการสร้าง non-structural protein (NS 2) ส่วน ORF 2 ทำหน้าที่ในการสร้าง non-structural protein (NS 1) และ ORF 3 ทำหน้าที่ในการสร้าง capsid protein ของไวรัส (Sukhumsirichart และคณะ, 2006) แสดงดังรูปที่ 2.8

รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของกุ้งที่ติดไวรัส *Pm*DNV **ด้านซ้าย** : กุ้งที่ไม่ติดไวรัส **ด้านขวา** : กุ้งที่ติดไวรัส (Flegel, 2006; Dhar และคณะ, 2014)



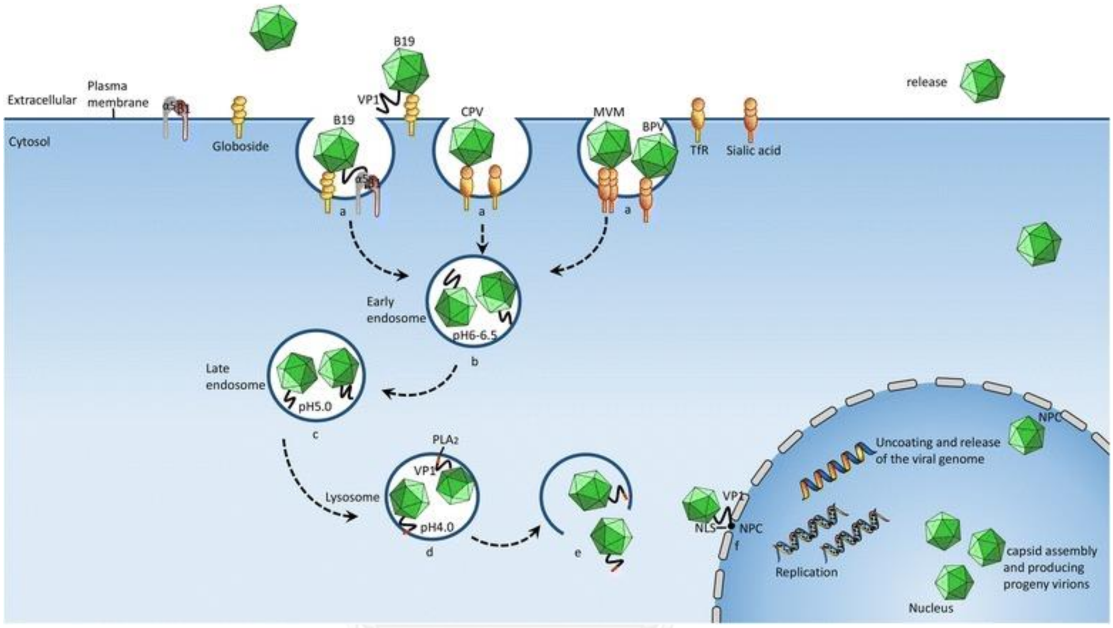
รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะรูปร่างของ *Pm*DNV (Flegel, 2006)



รูปที่ 2.8 แสดงจีโนมของไวรัส *Pm*DNV แบ่งออกเป็น 3 ORFs; Left ORF (ORF 1) Mid ORF (ORF 2) และ Right ORF (ORF 3) (Sukhumsirichart และคณะ, 2006)

สำหรับขบวนการจำลองตัวเองของไวรัส *Pm*DNV ยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะมีวงจรชีวิตที่คล้ายคลึงกับไวรัสในตระกูล Parvovirus โดยเริ่มจากไวรัสจะเข้าจับกับ receptor บนเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งในไวรัสแต่ละชนิดจะจำเพาะกับ receptor ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส ยกตัวอย่างเช่น *Human parvovirus* B19 จะจำเพาะกับ P antigen $\alpha 5\beta 1$ หรือ ku80 *Carcine parvovirus* จำเพาะกับ Transferrin receptor หรือ *Porcine parvovirus* จำเพาะกับ α-2,3 N- และ O-linked Sialic acid หลังจากที่ไวรัสเข้าจับกับ receptor ของเซลล์เจ้าบ้านแล้ว ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านผ่านกระบวนการ endocytosis โดยมีการจัดโครงสร้างเรียกว่า Early endosome ซึ่งภายในมีค่า pH ประมาณ 6-6.5 จากนั้น pH ภายใน Early endosome จะลดลงจนเหลือประมาณ pH 5 จะกลายเป็น Late endosome ต่อมา Late endosome จะมี pH ที่ลดลงจนเหลือ pH 4 เรียกว่า Lysosome ซึ่งเป็นสภาวะที่เกิดการกระตุ้นของเอนไซม์ phospholipase A_2 (PLA2) ซึ่ง

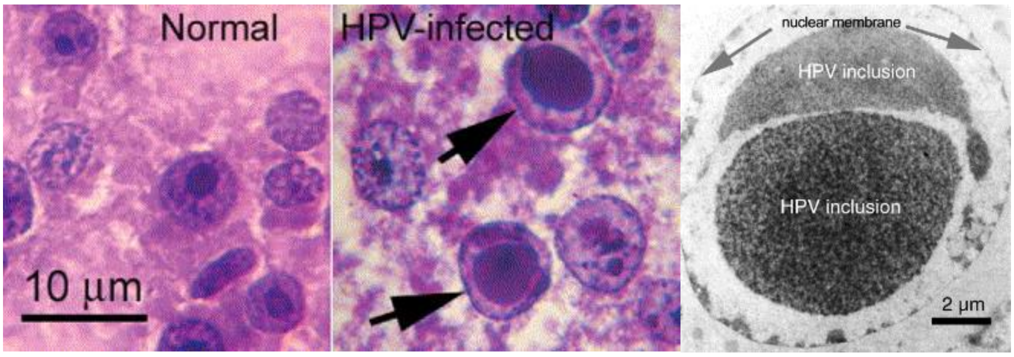
เอนไซม์ดังกล่าวจะทำลาย Lysosome membrane เพื่อปล่อยไวรัสออกสู่ cytosol จากนั้นไวรัสจะเคลื่อนเข้าสู่ peripheral nucleus สุดท้ายสารพันธุกรรมของไวรัสจะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อให้เกิดการจำลองตัวเองของไวรัสและการสร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส เพื่อให้เกิดการสร้างอนุภาคไวรัสและปลดปล่อยอนุภาคไวรัสสู่ภายนอกต่อไป วงจรชีวิตของไวรัสในตระกูล Parvovirus แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงขบวนการจำลองตัวเองของไวรัสในตระกูล Parvovirus (Tu และคณะ, 2015)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในส่วนของพยาธิสภาพของกุ้งที่ติดไวรัสชนิดนี้จะมีการติดเชื้อเฉพาะ epithelial cell ของตับอ่อนของกุ้งเท่านั้น เมื่อทำการทดสอบด้วย H&E staining ของตับอ่อนจากกุ้งที่ติดไวรัสจะเกิดโครงสร้างที่เรียกว่า intracellular inclusions เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.10 จากรูปจะเห็นได้ว่า inclusions ของเซลล์ตับอ่อนของกุ้งที่ติดไวรัส *Pm*DNV จะมีขนาดใหญ่ โดยจะพบ inclusions ในปริมาณมากตรงบริเวณ E-cell ของ hepatopancreatic tubules (Dhar และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของเซลล์ตับอ่อนที่ติดไวรัส *Pm*DNV (HPV) จะพบการสร้าง intracellular inclusions (Dhar และคณะ, 2014)

2.1.3 ไวรัส *Pst*DNV

ไวรัส *Pst*DNV (*Penaeus stylirostris* densovirus) ชื่อเดิมเรียกว่า Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) กุ้งที่ติดไวรัสโดยเฉพาะกุ้ง *P. stylirostris* ในระยะ postlarvae และระยะ juveniles จะมีอัตราการตายสูง นอกจากนี้ไวรัสชนิดนี้สามารถติดได้ในกุ้ง *P.vannamei* และ *P.monodon* โดยจะไม่ทำให้กุ้งตาย แต่จะทำให้กุ้งมีการเจริญลดลงหรือทำให้รูปร่างของกุ้งผิดปกติไป เรียกว่า runt deformity syndrome (RDS) (Flegel, 2006; Saksmerprome และคณะ, 2010; Rai และคณะ, 2012; Dhar และคณะ, 2014; Wei และคณะ, 2015) กุ้งที่ติดไวรัสแสดงดังรูปที่ 2.11 โดยไวรัสชนิดนี้มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ดังต่อไปนี้

Family *Parvoviridae*

Sub-family *Densovirinae*

Genus *Brevidensovirus*

Species *Penaeus stylirostris* densovirus

มีรายงานในการพบไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี ค.ศ. 2000 ไวรัสชนิดนี้สามารถติดได้ในกุ้ง *P.vannamei* *P.stylirostris* *P.occidentalis* *P.monodon* *P.semisulcatus* *P.californiensis* *P.schmitti* และ *P.japonicus* (Rai และคณะ, 2012) รูปร่างลักษณะของไวรัสเป็น icosahedral ขนาดเล็กประมาณ 22-23 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) ขนาดประมาณ 4.1 กิโลเบส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ORFs เช่นเดียวกับไวรัส *Pm*DNV แบ่งเป็น Left ORF สามารถแปลรหัสได้จำนวน 666 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุลประมาณ 75.77 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ในการสร้าง non-structural protein (NS 1-b) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับการ replication initiation NTP-binding และเอนไซม์ helicase ซึ่งเกี่ยวข้องกับ

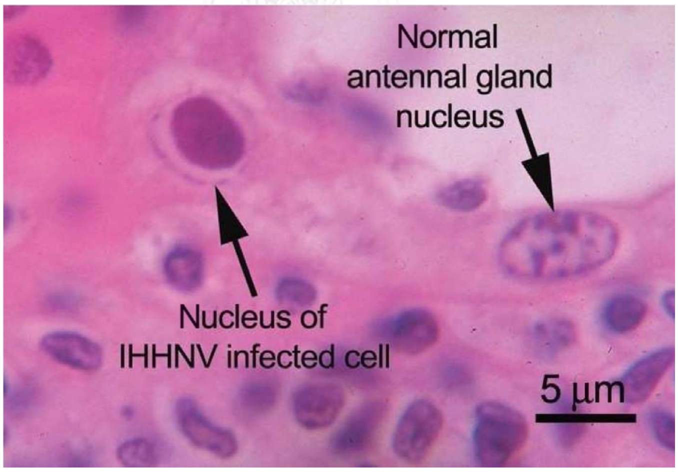
รูปที่ 2.11 แสดงกุ้งที่ติดไวรัส *Pst*DNV จะมีขนาดของตัวกุ้งที่แตกต่างกัน ในระยะเวลาการเลี้ยง 50 วัน (Rai และคณะ, 2012)

กระบวนการ replication โดยบริเวณปลาย 5’ ของ NS 1-b จะมีบริเวณ A1 A2 และ A3 ประกอบอยู่ด้วย นอกจากนี้บริเวณด้านหน้าของ Left ORF จะมี ORF ขนาดเล็กซึ่งสามารถแปลรหัสได้เป็น NS 1-a โดยจะมีตำแหน่งของ D1 เมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัสของ NS 1 จะเกิดกระบวนการ splicing เพื่อให้เกิด mRNA ของ NS 1 ที่สมบูรณ์ โดยจะมีการ splicing ตรงบริเวณ A1 ของ NS 1-b และบริเวณ D1 ของ NS 1-a ส่วน Middle ORF จะมีบางส่วนที่ซ้อนทับกับ Left ORF สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 363 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุลประมาณ 42.11 กิโลดาลตัน ในปัจจุบันหน้าที่ของโปรตีนที่แปลรหัสมาจาก Middle ORF ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน และ Right ORF จะมีบริเวณปลาย 5’ ที่ซ้อนทับกับ Left ORF สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 329 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุลประมาณ 37.5 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ในการสร้าง capsid protein ของไวรัส (Dhar และคณะ, 2014) จีโนมของไวรัส *Pst*DNV แสดงดังรูปที่ 2.12 ซึ่งจากรูปจะเห็นได้ว่า Middle ORF และ Right ORF จะถอดรหัสในเฟรมที่ต่างจาก Left ORF ในส่วนของวงจรชีวิตของไวรัส พบว่าไวรัส *Pst*DNV มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไวรัส *Pm*DNV ดังนั้นวงจรชีวิตของไวรัส *Pst*DNV คาดว่าน่าจะคล้ายคลึงกับวงจรชีวิตของ *Pm*DNV ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.9

รูปที่ 2.12 แสดงจีโนมของไวรัส *Pst*DNV แบ่งออกเป็น 3 ORFs: Left ORF (NS 1-b) Middle ORF (NS 2) และ Right ORF (capsid protein; VP) (Dhar และคณะ, 2014)

เมื่อพิจารณาลักษณะพยาธิสภาพของกุ้งที่ติดไวรัส *Pst*DNV จะพบว่าเกิดการสร้าง inclusions ภายในเซลล์ชนิด Cowdry type A ในเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจาก ectodermal เช่น epidermis hypodermal epithelium ของ fore- และ hindgut nerve cord และ nerve ganglia และเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจาก mesodermal เช่น hematopoietic antennal gland gonards lymphoid organ และ connective tissue เป็นต้น (Flegel, 2006; Rai และคณะ, 2012; Dhar และคณะ, 2014) แสดงดังรูปที่ 2.13 จากการย้อมสี H&E จะพบว่าโครงสร้างของ inclusion ที่เกิดขึ้นจากการติดไวรัส *Pst*DNV จะเกิดขึ้นใน hypertrophied nuclei ของเซลล์ลักษณะคล้าย eosinophilic ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ติดไวรัส *Pm*DNV อาจมีสาเหตุมาจากข้อมูลทางพันธุกรรม เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัส *Pst*DNV และ *Pm*DNV พบว่าตรงบริเวณ non-structural protein (NS) ของไวรัส *Pst*DNV จะมีส่วนของ nuclear localization sequence (NLS) แต่บริเวณ capsid protein จะไม่มีหน้าที่ของ NLS เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัส *Pm*DNV ที่มีทั้งส่วนของ NLS และหน้าที่ของ NLS ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าหน้าที่ของ NLS นั้นมีผลต่อลักษณะของ inclusion bodies และบริเวณที่มีการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสของไวรัสทั้งสองชนิด (Dhar และคณะ, 2014)

.



รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะของเซลล์ที่ติดไวรัส *Pst*DNV เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดไวรัส (Dhar และคณะ, 2014)

2.2 RNAi interference

2.2.1 กระบวนการ RNAi Pathway

กระบวนการ RNAi Pathway พบครั้งแรกใน Transgenic plants สกุล *Petunia* โดยมีชื่อเรียกว่า Co-suppression แต่ยังไม่ทราบกระบวนการที่ชัดเจน (Napoli และคณะ, 1990) ต่อมาจึงมีการศึกษาจนทราบกระบวนการที่ชัดเจนใน *Caenorhabditis elegans* (Fire และคณะ, 1998) เป็นกระบวนการ Post-transcriptional gene silencing ของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอทั้งหมด 4 รูปแบบ แสดงดังรูปที่ 2.14 ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi Pathway ได้ (Masiero และคณะ, 2007) ประกอบด้วย

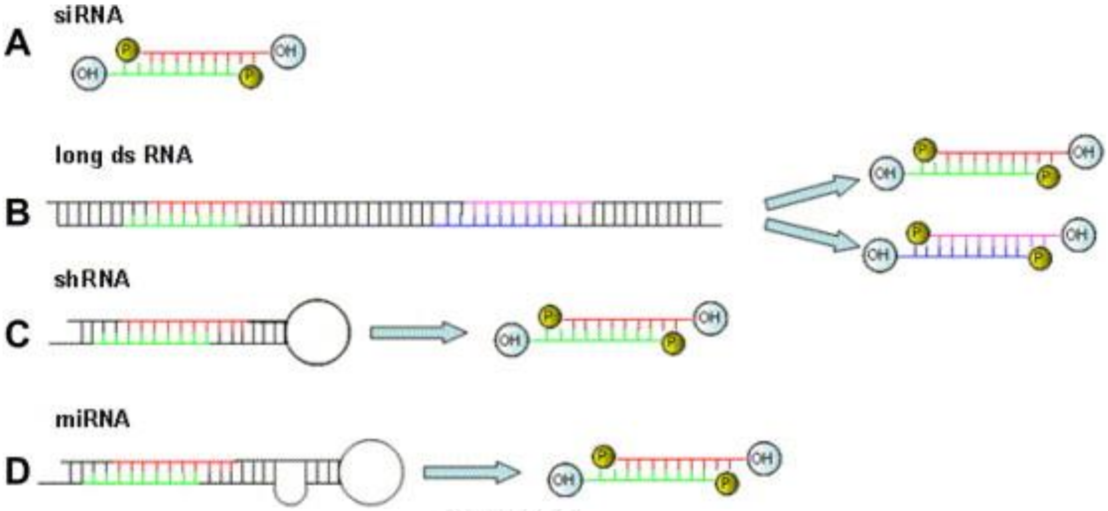
1. short interference RNA (siRNA) เป็น RNA ที่ผ่านการสังเคราะห์ขึ้นมา โดยมีความยาวประมาณ 19-23 คู่เบส เมื่อผ่านการนำเข้าไปในเซลล์แล้ว siRNA จะสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi Pathway ได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ Dicer (รูปที่ 2.14A)

2. long double-stranded RNA (dsRNA) ผลิตโดยการสร้างพลาสมิดที่สามารถถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ เมื่อพลาสมิดถูกนำเข้าสู่นิวเคลียสจะถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอสายยาวที่สามารถจับตัวกัน มีรูปร่างคล้ายกิ๊บหนีบผมหรือ stem loop ซึ่งบริเวณ stem คืออาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดยาวและส่งออกมายังไซโทพลาสซึม จากนั้นจะถูกตัดให้กลายเป็น siRNA โดยเอนไซม์ Dicer เพื่อให้เกิดกระบวนการ RNAi ต่อไป (รูปที่ 2.14B)

3. short hairpin RNA (shRNA) ผลิตโดยการสร้างพลาสมิดที่สามารถถอดรหัสเป็นส่วนของอาร์เอ็นเอสายคู่และส่วนของลูป (stem and loop) เมื่อเข้าสู่เซลล์จะถูกตัดให้กลายเป็น siRNA โดยเอนไซม์ Dicer เพื่อให้เกิดกระบวนการ RNAi ต่อไป (รูปที่ 2.14C) ซึ่งทั้งสามรูปแบบเป็นอาร์เอ็นเอที่ได้รับจากภายนอกเซลล์

4. microRNA (miRNA) เป็นอาร์เอ็นเอที่สร้างมาจากภายในเซลล์เองและถูกตัดด้วยเอนไซม์ Drosha RNaseIII endonuclease ภายในนิวเคลียสของเซลล์ จากนั้นส่งออกสู่ไซโทพลาสซึม เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ต่อไป (รูปที่ 2.14D)

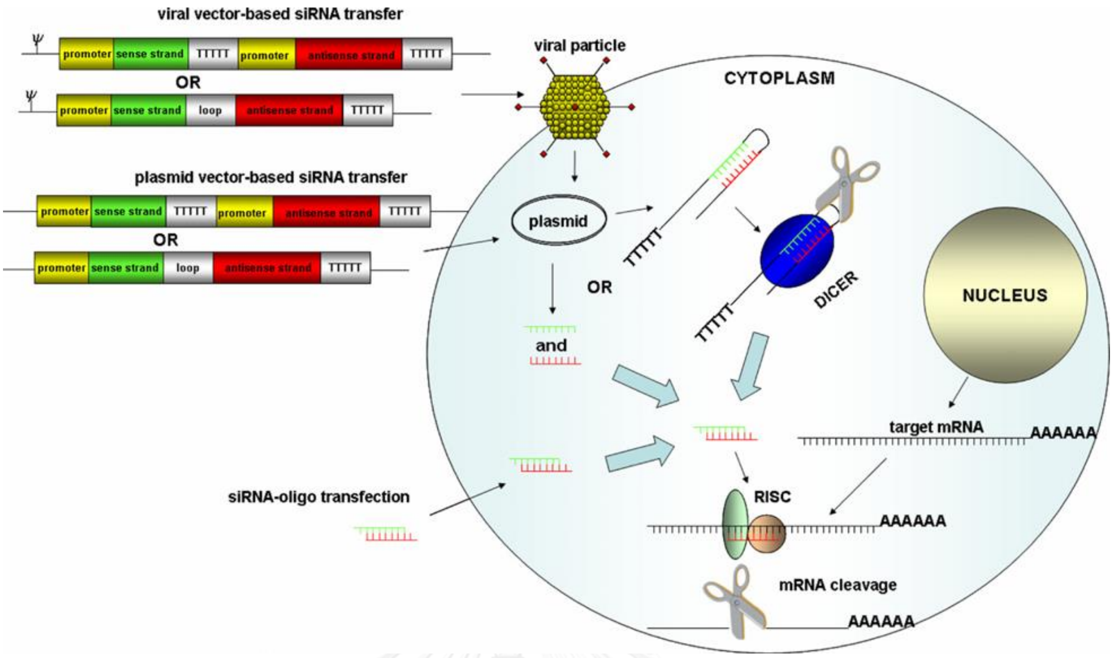
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.14 ลักษณะของ RNA ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi Pathway (Masiero และคณะ, 2007)

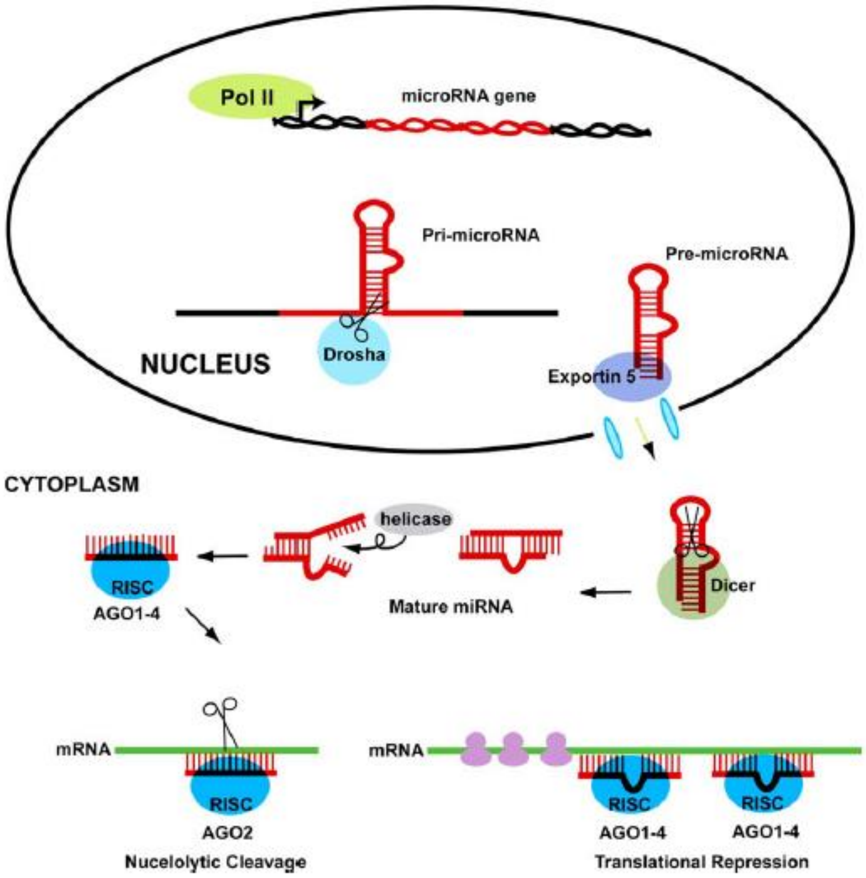
หลังจากที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอทั้ง 4 รูปแบบจะเกิดการกระตุ้นกระบวนการ RNAi โดยจะสามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ

1. เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ ในกรณีของ long dsRNA และ shRNA เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วจะเกิดการตัดด้วยเอนไซม์ Dicer กลายเป็นอาร์เอ็นเอสายสั้น ประมาณ 19-23 คู่เบส (siRNA) จากนั้น siRNA จะรวมเข้ากับมัลติโปรตีน เรียกว่า RNA induced silencing complex (RISC) ซึ่งจะแยกสาย siRNA ออกเป็นสายเดียว โดยจะเลือกเฉพาะส่วนของสาย anti-sense ที่สามารถเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายได้ ขั้นตอนสุดท้าย RISC จะเข้าจับแบบจำเพาะกับ mRNA เป้าหมาย โดยมี siRNA เป็นตัวนำไป ทำให้ mRNA นั้นไม่สามารถแปลรหัสกลายเป็นโปรตีนได้ ในส่วนกรณีของ siRNA จะไม่ผ่านกระบวนการตัดด้วยเอนไซม์ Dicer แต่จะสามารถรวมเข้ากับ RISC และเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายแบบจำเพาะ จากนั้นจึงเกิดการยับยั้งการแปลรหัสให้กลายเป็นโปรตีนได้ (Masiero และคณะ, 2007)กระบวนการ RNAi ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 กระบวนการ RNAi ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ (Masiero และคณะ, 2007)

2. เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาร์เอ็นเอที่สร้างจากภายในเซลล์เอง (miRNA) โดย miRNA จะถูกถอดรหัสด้วยเอนไซม์ RNA polymerase II กลายเป็น Primary miRNA (Pri-miRNA) โดยมีลักษณะเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่และมีส่วนของลูป (stem and loop) ซึ่งดีเอ็นเอต้นแบบที่สามารถถอดรหัสเป็น miRNA นั้น สามารถอยู่ได้ทั้งส่วนของอินทรอน (Intron) และเอ็กซอน (Exon) ของยีน จากนั้น Pri-miRNA จะถูกตัดให้กลายเป็น Precusor miRNA (Pre-miRNA) ด้วยเอนไซม์ Dorcha ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ RNase III ที่สามารถย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ได้ ต่อมา Pre-miRNA จะถูกส่งออกนอกนิวเคลียสเข้าสู่ไซโทพลาสซึมผ่านช่อง Exportin 5 ที่อยู่บนเยื่อหุ้มนิวเคลียส เมื่อ Pre-miRNA เคลื่อนเข้าสู่ไซโทพลาสซึมจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Dicer กลายเป็น mature miRNA หลังจากนั้น mature miRNA จะเข้าจับกับ RISC เช่นเดียวกับ siRNA และทำการแยกอาร์เอ็นเอสายคู่ออกและเลือกเฉพาะสายที่เป็น anti-sense เพื่อให้สามารถเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายได้ ส่งผลให้ mRNA ดังกล่าวไม่เกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Hammond, 2005) ซึ่งกระบวนการ RNAi ที่เหนี่ยวนำด้วย miRNA แสดงดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 กระบวนการ RNAi ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย miRNA ที่เกิดจากภายในเซลล์ (Hammond, 2005)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.2 การประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi ในการยับยั้งโรคที่เกิดจากไวรัส

ปัจจุบันการยับยั้งโรคที่เกิดจากไวรัสด้วยเทคนิคทาง RNAi มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งไวรัสที่ก่อโรคในคน พืชและสัตว์ สำหรับไวรัสในคน ยกตัวอย่างเช่น การสร้างเซลล์ MDCK ที่สามารถสร้าง shRNA ที่จำเพาะต่อ conserved sequence ของยีน nucleoprotein (NP) หลังจากนั้นทำการติดไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H7N1 H1N2 H3N2 H1N1 เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งพบว่า shRNA ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเพิ่ม
จำนวนของไวรัสได้ในทุกสายพันธุ์ของไวรัส (Stoppani และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีการนำ siRNA ที่จำเพาะกับยีน matrix และ nonstructural ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A ในเซลล์ MDCK พบว่า siRNA ดังกล่าวสามารถยับยั้งการติดไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ A ใน *in vitro* ได้ (McMillen และคณะ, 2016) และมีการนำเทคนิค RNAi มายับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส Japanese encephalitis โดย short hairpin RNA พบว่าประสบผลสำเร็จในการยับยั้งการเพิ่ม

จำนวนทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* (Shen และคณะ, 2014) นอกจากไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในคนแล้ว ยังได้มีการนำเทคนิคทาง RNAi มาใช้ในการยับยั้งการติดไวรัสในพืชได้อีกด้วย โดยมีการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีน intergenic region coat protein V2 และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication ของไวรัส *Tomato yellow leaf curl virus*-Oman (TYLCV-OM) และนำมายับยั้งไวรัสในมะเขือเทศ พบว่าสามารถยับยั้งการติดไวรัสในมะเขือเทศได้เป็นอย่างดี (Ammara และคณะ, 2015) รวมถึงไวรัสพืชสายพันธุ์อื่นๆ เช่น peper golden mosaic virus (Medina-Hernandez และคณะ, 2013) Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) (Ntui และคณะ, 2015) potato virus (Petrov และคณะ, 2015) tobacco mosaic virus (Konakalla และคณะ, 2016) cotton leaf curl kokhran virus (Yasmeen และคณะ, 2016) ล้วนแล้วแต่ประสบผลสำเร็จในการประยุกต์เทคนิค RNAi ในการยับยั้งการติดไวรัสในพืชเช่นเดียวกัน สำหรับไวรัสสัตว์จะเน้นไปที่ไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง โดยพบว่ามีการพัฒนานำเอาเทคนิค RNAi มาใช้ในการยับยั้งการติดไวรัสในกุ้ง เช่น ไวรัสหัวเหลือง จะพบทั้งแบบที่ใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับโครงสร้างของไวรัสเอง (Tirasophon และคณะ, 2005; Yodmuang และคณะ, 2006; Assavalapsakul และคณะ , 2009) แบบที่ใช้กับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนภายในตัวกุ้ง (Assavalapsakul และคณะ, 2014) โดยจะทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าสู่กุ้งโดยตรง นอกจากนี้ยังนำมาใช้ผสมกับอาหารของกุ้งได้อีกด้วย (Attasart และคณะ, 2013; Sanitt และคณะ, 2014; Chimwai และคณะ, 2016) จะเห็นได้ว่ามีการนำเทคนิคทาง RNAi มาใช้ในการยับยั้งการติดไวรัสได้อย่างหลากหลายทั้งแบบเข้าสู่เซลล์โดยตรงและผสมกับอาหาร ซึ่งทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อย่างดีเยี่ยม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 การใช้พาหะในการขนส่งยีนบำบัด

ปัจจุบันมีการศึกษาและวิจัยนำยีนมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคเป็นจำนวนมาก โดยในช่วงแรกของการศึกษาจะทำการส่งผ่านเซลล์โดยตรง แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นคือเกิดการย่อยสลายของยีนบำบัดจากเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์เอง ส่งผลให้ระยะเวลาในการรักษาด้วยยีนบำบัดนั้นสั้นลง ยิ่งไปกว่านั้นยีนบำบัดที่ใช้ในการรักษานั้นจะมีประจุเป็นประจุลบ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อกระบวนการนำยีนบำบัดเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากปัญหาดังกล่าวแล้วยังมีปัญหาที่เกี่ยวข้อง เมื่อนำยีนบำบัดส่งผ่านเซลล์โดยตรง แสดงดังตารางที่ 2.1 ดังนั้นการใช้พาหะในการขนส่งยีนบำบัด สามารถเป็นตัวช่วยให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคด้วยยีนบำบัดนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นโดยทั่วไปพาหะที่ใช้ในการขนส่งมีทั้งหมด 2 ชนิด ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงปัญหาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ยีนบำบัดในการรักษาโรค โดยทำการส่งผ่านเซลล์โดยตรง (Miele และคณะ, 2012)

Problems	Explanation	Solution
Short half life	Serum nuclease susceptibility Rapid renal clearance	Local or topical administration Chemical modification of the sugars or the bases of oligoribonucleotides for stabilization
Low level of cellular uptake	Phagocyte uptake Anionic nature (charge obstacle) Too large to pass membrane	Nanoparticle carriers Conjugation with nanoparticles
Transient effect	Dilution of siRNA concentration	shRNA for integration gene in cell genome
Toxic effect		
Saturation of RNAi machinery	Reduced accessibility to miRNA	Correct dosing and targeting
Immune response stimulation	TLR activation and type I IFN response	2’OH methylation modification use of nanoparticles
	Non TLR mediated innate immune response	Chemical modification (2’OH methylation modification)
Off target effect	miRNA like off target silencing	2’OH methylation-screening siRNA effect *in vitro*

Abbreviations : TLR, Toll-like receptor; IFN, Interferon

2.3.1 Non viral vector

พาหะที่ใช้ในการขนส่งยีนบำบัดแบบ Non viral vector ส่วนใหญ่จะเป็นสารเคมีสังเคราะห์ทั้งแบบที่สามารถย่อยสลายได้และย่อยสลายไม่ได้ แบ่งได้ทั้งหมด 3 ชนิดดังต่อไปนี้

2.3.1.1 lipids-based nanoparticles เริ่มต้นใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 ในการขนส่ง SV40 DNA เข้าสู่เซลล์ไตของลิง (Monkey kidney cells) (Yin และคณะ, 2014) โดยโครงสร้างของ liposomes จะประกอบไปด้วย cationic lipid กับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) หรือยีนบำบัด ทำให้เกิดโครงสร้างที่ซับซ้อนเกิดขึ้น โดยส่วนใหญ่ lipid ที่จะนำมาใช้ในการขนส่งกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัดนั้นจะมีประจุเป็นบวก เนื่องจากจะมีประสิทธิภาพในการเข้าจับหรือบรรจุกับกรดนิวคลีอิกได้ดีกว่า lipid ที่มีประจุเป็นกลาง เพราะกรดนิวคลีอิกมีประจุเป็นลบสามารถเข้าจับ

กับ lipid ที่มีประจุบวกได้ดี (Lee และคณะ, 2013) ปัจจุบันได้มีการนำ cationic lipids มาประยุกต์ใช้สำหรับการขนส่งกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัด โดยมีการนำ cationic cholesterol ในการขนส่ง siRNA ที่จำเพาะต่อ Notch 1 ในการยับยั้งมะเร็งรังไข่ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า cationic cholesterol สามารถห่อหุ้ม siRNA และ นำเข้าสู่เซลล์ SKOV3 และยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhao และคณะ, 2016) นอกจากนี้ยังได้มีการนำ cationic liposome ในการห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับไวรัสหัวเหลือง (YHV-Protease) พบว่าสามารถลดอัตราการตายถึง 50% หลังจากฉีดไวรัส 60 วัน ในขณะที่การฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับไวรัสหัวเหลืองเข้าสู่กุ้งโดยตรงจะมีอัตราการตายถึง 90% แสดงให้เห็นว่า cationic liposome สามารถป้องกันการย่อยสลายของอาร์เอ็นเอสายคู่จากเอนไซม์ภายในตัวกุ้ง (Sanitt และคณะ, 2016) จะเห็นได้ว่ามีการประยุกต์ใช้ cationic liposome ในการขนส่งกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัดเป็นอย่างมาก แต่ cationic lipids ยังมีข้อจำกัด คือโครงสร้างของ cationic lipids ที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัดจะมีความเสถียรค่อนข้างมาก เนื่องจากมีการจับกันระหว่างประจุบวกของ cationic lipids และประจุลบจากกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัด ส่งผลให้การปลดปล่อยกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัดในการรักษาโรคลดลง นอกจากนี้โครงสร้างของ cationic lipids อาจจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือก่อให้เกิดอาการอักเสบภายในเซลล์ได้ (Lee และคณะ, 2013; Yin และคณะ, 2014)

2.3.1.2 polymeric nanoparticles มีลักษณะเป็นของแข็งและคอลลอยด์ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายได้ โดยทั่วไปสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 ชนิด คือ natural polymers ตัวอย่างเช่น cyclodextrin chitosan และ atelocollagen อีกชนิดเป็น synthetic polymers เป็น polymer ที่ได้จากการสังเคราะห์ ตัวอย่างเช่น polyethyleneimine (PEI) poly(dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) และ dendrimers เป็นต้น ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ polymeric nanoparticles ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ เพื่อใช้ในการป้องกันการติดไวรัสในกุ้ง เช่น chitosan nanoparticles นำมาใช้ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสกุ้งทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* ด้วย โดยในปี ค.ศ. 2012 Theerawanitchpan และคณะ ได้ทำการศึกษาการขนส่ง long dsRNA ที่มีความจำเพาะกับไวรัสหัวเหลือง (YHV) ด้วย chitosan ในเซลล์ *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf 9) จากผลการทดลองพบว่า chitosan สามารถที่จะขนส่ง long dsRNA ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์ Sf 9 และสามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองได้ นอกจากนี้ยังมีการนำ chitosan มาพัฒนาโดยการเติมหมู่ dextrin sulfate เพื่อนำมาใช้ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัส Monodon baculovirus ในกุ้งกุลาดำ (*P.monodon*) โดยทำการผสมกับอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงกุ้งซึ่งสามารถยับยั้งการติดไวรัสดังกล่าวในกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ramesh Kumar และคณะ, 2016) แม้ว่า chitosan จะเป็นที่นิยมในการนำมาใช้เป็นพาหะในการขนส่งกรดนิวคลีอิกหรือ

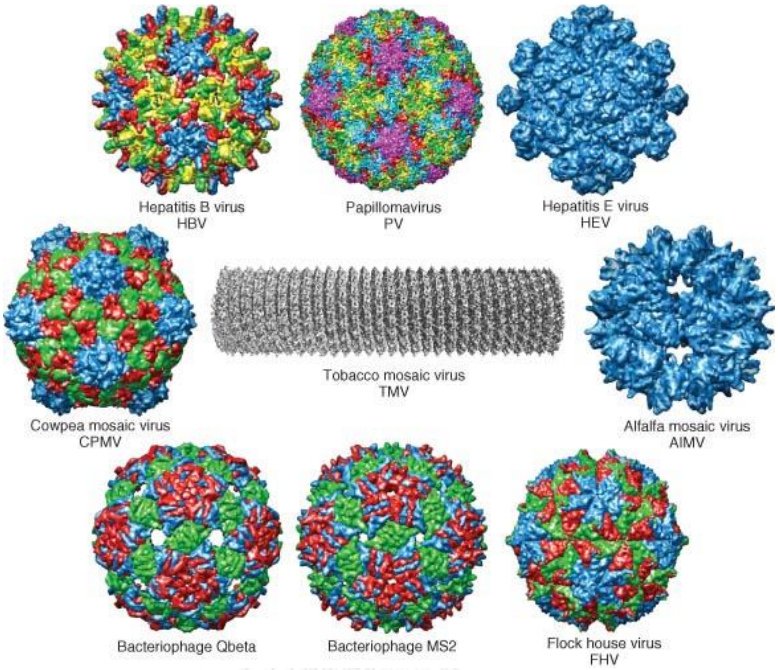
ยีนบำบัด แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดคือการใช้chitosan ที่มีมวลโมเลกุลสูง ส่วนใหญ่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์และขาด buffer capacity สำหรับ endosomolysis ซึ่งมีความสำคัญต่อการปลดปล่อย siRNA ออกจาก endosome (Wu และคณะ, 2012; Lee และคณะ, 2013)

2.3.1.3 inorganic nanoparticles เป็นสารอนินทรีย์ที่นิยมอย่างแพร่หลายในการขนส่งกรดนิวคลีอิก เนื่องด้วยคุณสมบัติบางประการของ inorganic nanoparticles เช่น มีคุณสมบัติพิเศษทางไฟฟ้าและคุณสมบัติในการมองเห็น มีความสามารถในการเข้ากับเซลล์ภายในเนื้อเยื่อได้ดีและความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ นอกจากนี้ยังเตรียมได้ง่ายอีกด้วย ตัวอย่างที่นิยมใช้ในการขนส่งกรดนิวคลีอิก ยกตัวอย่างเช่น อนุภาคทอง (gold) อนุภาคเงิน (silver) แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) แกรฟีนและแกรฟีนออกไซด์ (graphene oxide) ควอนตัมดอต (quantum dots) และอนุภาคนาโนแม่เหล็ก (magnetic nanomaterials) เช่น ไอรอนออกไซด์ (iron oxides) เป็นต้น (Riley และ Vermerris, 2017) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการนำ inorganic nanoparticles มาใช้ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ เพื่อป้องกันการติดไวรัสในกุ้ง

2.3.2 Viral vector

ไวรัสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการขนส่งกรดนิวคลีอิกหรือยีนบำบัดได้ โดยโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสบางชนิดมีความสามารถในการเกิดการรวมตัวกันให้กลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสได้ เรียกว่า อนุภาคเหมือนไวรัส (virus like particles; VLPs) ซึ่งอนุภาคเหมือนไวรัสจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไวรัสทุกประการ แต่ไม่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ เนื่องจากขาดจีโนมของไวรัส นอกจากนี้ยังสามารถเข้าจับกับตัวรับบนเซลล์เจ้าบ้านได้อย่างจำเพาะอีกด้วย (Zdanowicz และ Chroboczek, 2016) ในปัจจุบันไวรัสที่สามารถสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสได้ส่วนใหญ่เป็นไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (Naked virus) รูปร่างเป็น icosahedral หรือเส้นสาย (filamentous) ซึ่งตัวอย่างของไวรัสที่สามารถสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสได้ (รูปที่ 2.17) เนื่องจากอนุภาคเหมือนของไวรัสขาดจีโนมของไวรัส ทำให้สามารถใช้เป็นตัวขนส่งสารชีวโมเลกุลต่างๆ โดยการบรรจุภายในอนุภาคเหมือนไวรัส

ส่วนใหญ่อนุภาคเหมือนไวรัสจะผลิตจากเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ตามชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน โดยสามารถแบ่งได้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.17 แสดงโครงสร้างของไวรัสที่สามารถสร้างอนุภาคเหมือนของไวรัส (Plummer และ Manchester, 2011)

1. ผลิตในแบคทีเรีย อนุภาคเหมือนไวรัสที่ผลิตในแบคทีเรียส่วนใหญ่จะนิยมผลิตใน *E.coli* ซึ่งแบคทีเรีย *E.coli* จะใช้สำหรับผลิต heterologous protein โดยข้อดีของระบบการแสดงออกนี้คือ 1. สามารถรองรับเวกเตอร์ที่สามารถแสดงออกโปรตีนได้ในปริมาณสูงได้หลากหลายชนิด 2. สามารถขยายขนาดให้สามารถผลิตในถังหมักได้ง่าย 3. มีฐานข้อมูลทางพันธุกรรม ทำให้ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ 4. เจริญเติบโตได้รวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น 5. สามารถใช้อาหารที่มีราคาถูก และ 6. สามารถพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ได้ง่าย เนื่องจากมีฐานข้อมูลทางด้าน transcriptomics และ proteomics (Liew และคณะ, 2010) ตัวอย่างของอนุภาคเหมือนไวรัสที่ผลิตใน *E.coli* เช่น การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส rabbit hemorrhagic virus ผลการทดลองพบว่าโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส (VP60) สามารถเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายได้ (Guo และคณะ, 2016) การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ใน *E.coli* พบว่าสามารถสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสได้โดยที่ขนาดและรูปร่างของอนุภาคเหมือนไวรัสคล้ายคลึงกับไวรัสที่พบในธรรมชาติทุกประการและสามารถห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกได้ทั้ง DNA และ RNA (Hou และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังได้มีการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* (*Mr*NV) ได้เช่นเดียวกัน (Goh และคณะ,

2011) อนุภาคเหมือนไวรัส *Mr*NV สามารถใช้เป็นตัวพาหะในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวและสามารถลดอัตราการตายของกุ้งได้ถึง 75% (Jariyapong และคณะ, 2015) นอกจากนี้อนุภาคเหมือนไวรัส *Mr*NV ยังใช้เป็นต้นแบบสำหรับเปลี่ยนแปลงอีพิโทป (Epitope) โดยผลิตอนุภาคเหมือนไวรัส *Mr*NV ที่มีอีพิโทปของไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus) พบว่าสามารถเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบสารคัดหลั่ง (Humoral) และเซลล์ (Cell-mediated) และสามารถใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันโรคตับอักเสบบีได้ (Yong และคณะ, 2015) แม้ว่า *E.coli* จะเป็นที่นิยมในการผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสแต่ว่าวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจาก *E.coli* จะขาดกระบวนการ post-translation modification ทำให้เกิดเป็น inclusion bodies และอาจมีการปนเปื้อนของ endotoxin ในการเตรียมอนุภาคเหมือนไวรัสได้ (Zeltins, 2013)

2. ผลิตในยีสต์ เซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้สำหรับการแสดงออกของโปรตีน คือ *Saccharomyces* และ *Pichia* ซึ่งระบบการแสดงออกในยีสต์จะมีความซับซ้อนมากกว่าในแบคทีเรียมาก โดยเวกเตอร์ที่ใช้จะต้องมีลักษณะเป็น shuttle vector คือสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งในเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ นอกจากนี้จะต้องสามารถเชื่อมเข้ากับโครโมโซมของยีสต์ได้ สำหรับปริมาณโปรตีนที่แสดงออกเมื่อเปรียบเทียบกับ *E.coli* พบว่าระบบการแสดงออกในยีสต์จะสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่สูงกว่า ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของระบบการแสดงออกในยีสต์คือมีกระบวนการ post-translation modification เช่น glycosylation หรือ phosphorylation จะทำให้ลดผลกระทบจากการเกิด inclusion bodies ตัวอย่างของอนุภาคเหมือนไวรัสที่ผลิตในยีสต์ เช่น การผลิตอนุภาคเหมือนไวรัส enterovirus 71 ในยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อยับยั้งการติดไวรัส enterovirus 71 ผ่านการกินในหนูทดลอง (Zhang และคณะ, 2015) และนอกจากนี้ยังพบว่า enterovirus 71 VLPs ที่ผลิตในยีสต์สามารถกระตุ้นสารคัดหลั่ง (humoral) เพื่อป้องกันการติดไวรัส EV 71 ได้อีกด้วย (Wang และคณะ, 2016) และยังมีการผลิตอนุภาคเหมือนไวรัส nervous necrosis virus ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Wi และคณะ, 2015) และไวรัส coxsackievirus A6 ในยีสต์ *P.pastoris* (Zhou และคณะ, 2016) ซึ่งพบว่าประสบความสำเร็จในการผลิตอนุภาคเหมือนไวรัส สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันและป้องกันการติดไวรัสได้

3. ผลิตในเซลล์แมลง จากข้อดีของเซลล์แมลงที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถเลี้ยงในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ได้และความสามารถของเซลล์แมลงที่มีกระบวนการ post-translation modification ใกล้เคียงกับ mammalian cell วิธีการนี้จึงนิยมกันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังสามารถผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสที่ค่อนข้างจะมีความซับซ้อนหรือผลิตมาจาก polyprotein ก็สามารถที่จะเกิดการสร้างเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างของอนุภาคเหมือนไวรัสที่

ผลิตในเซลล์แมลง เช่น การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส Infectious bursal disease virus โดยใช้เซลล์ Sf9 และป้องกันการติดไวรัสในไก่ได้ (Lee และคณะ, 2015) การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส HPV16 L1 ในเซลล์ *Leishmania tarentolae* ซึ่งเป็นระบบการแสดงออกใหม่ที่ประสบผลสำเร็จในการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส (Bolhassani และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสกุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus ในเซลล์แมลง พบว่าประสบความสำเร็จในการผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสโดยที่มีปริมาณมากกว่าระบบการแสดงออกอื่นๆ (Hanapi และคณะ, 2017; Kueh และคณะ, 2017)

4. ผลิตในพืช พืชสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสได้ โดยที่สามารถผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสได้ในปริมาณมาก ราคาถูก มีกระบวนการ post-translation modification และปราศจากสิ่งก่อโรคในมนุษย์ แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากระบบการแสดงออกในพืชนั้นยังต้องมีการพัฒนา การแสดงออกของโปรตีนต้องใช้เวลานาน ผลผลิตของโปรตีนที่ได้ค่อนข้างต่ำ ทำให้วิธีการนี้จึงไม่ค่อยนิยมสักเท่าไหร่ ตัวอย่างของอนุภาคเหมือนไวรัสที่ผลิตในพืช เช่น การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส Polyomavirus ในใบของต้น *Nicotiana benthamiana* พบว่าสามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสและทำให้บริสุทธิ์ได้ (Catrice และ Sainsbury, 2015) การสร้างอนุภาคเหมือนไวรัส HIV ในต้น *N. benthamiana* และอนุภาคเหมือนไวรัสที่สร้างขึ้นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง (Kessans และคณะ, 2016) นอกจากนี้มีการนำต้นใบยาสูบ (tobacco plants) เพื่อนำมาใช้ในการสร้างอนุภาคเหมือนไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza) (Le Mauff และคณะ, 2015) และไวรัส HPV 6 L1 (Zahin และคณะ, 2016) ซึ่งประสบผลสำเร็จในการผลิตอนุภาคเหมือนไวรัสเช่นเดียวกัน

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียและจีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	จีโนไทป์
Escherichia coli DH5α	F^- Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA$^-$*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*$^-$1 *gyr*A96 *rel*A1
Escherichia coli Rosetta-gami	Δ(*ara–leu)7697* Δ*lacX74* Δ*phoA* *Pvu*II *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsL* F'[*lac*$^+$ *lacI*^{q} *pro*] *gor522*::Tn10 *trxB* pLysSRARE2 (Cam^R, Kan^R, Str^R, Tet^R)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 ไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2

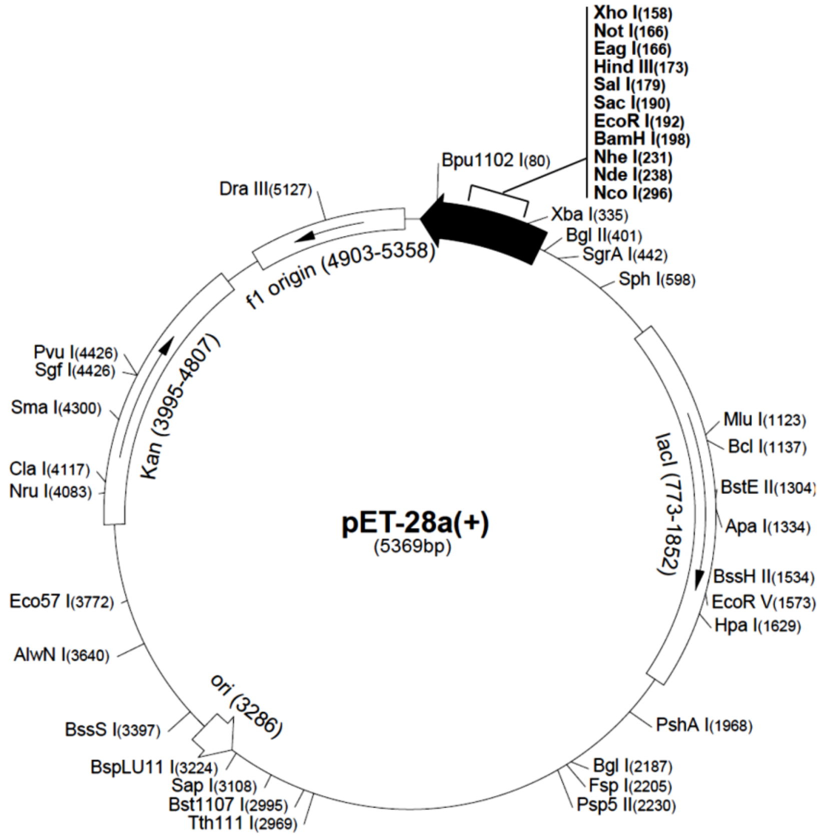
ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	T_m (°ซ)
cp*Pm*DNV Forward	5′- GCT AGC GCT GCT GCG GGC GGC GGC GG -3′ *Nhe* I	81
cp*Pm*DNV Reverse	5′- CTC GAG TTA TAC ATT AAC TCT ATA TTT CTT C -3′ *Xho* I	56
cp*Pst*DNV Forward	5′- CAT ATG TGC GCC GAT TCA ACA AGA G -3′ *Nde* I	68
cp*Pst*DNV Reverse	5′- CTC GAG TTA TTA GTT AGT ATG CAT AAT ATA ACA TTT G -3′ *Xho* I	65
YHV-Hel Forward	5′- CAA GGA CCA CCT GGT ACC GGT AAG AC -3′	72
YHV-Hel Reverse	5′- GCG GAA ACG ACT GAC GGC TAC ATT CAC -3′	76
Actin Forward	5′- ATG GCA TCT CGC AAG AAG ATT -3′	65
Actin Reverse	5′- TTA GCA AGA GCA TGC ATC CTG -3′	65

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 พลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 พลาสมิด pET-28a (+) (Novagen)

T7 terminator	26-72
His Tag coding sequence	140-157
Multiple cloning sites (*Bam*H I - *Xho* I)	158-203
T7 Tag coding sequence	207-239
His Tag coding sequence	270-287
T7 transcription start	369
T7 promoter	370-386
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง (Fermentas, USA)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	**บริเวณจดจำ (5′-3′)**	**บัฟเฟอร์**	**อุณหภูมิในการบ่ม (°ซ)**
Nde I	CAˇTATG	O	37
Nhe I	GˇCTAGC	1x Tango	37
Xho I	CˇTCGAG	R	37

O Buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Magnesium chloride, 100 mM Sodium chloride และ 0.1 mg/ml BSA

1x Tango Buffer : 33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM Magnesium acetate, 66 mM Potassium acetate และ 0.1 mg/ml BSA

R Buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM Magnesium chloride, 100 mM Potassium chloride และ 0.1 mg/ml BSA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

เลี้ยง *E. coli* หรือ Recombinant *E. coli* บนอาหารแข็ง LB ที่มีหรือไม่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมงและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.5.1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เลี้ยง *E. coli* หรือ Recombinant *E. coli* ในอาหารเหลว LB ที่มีหรือไม่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (ภาคผนวก ก) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอล ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 1:1 โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตรและความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 40% บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °ซ

3.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.6.1 การเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของไวรัส *Pm*DNV (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พงโสภี อัตศาสตร์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล) และ *Pst*DNV (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อภินันท์ อุดมกิจ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล) ใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV โดยผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้ 100 นาโนกรัม จีโนมิกดีเอ็นเอของไวรัส *Pm*DNV , 1x Thermopol Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 8.8), 0.2 mM dNTPs, 4 mM $MgSO_4$, 0.2 μM cp*Pm*DNV Forward and cp*Pm*DNV Reverse primers (ตารางที่ 3.2) และ 1 unit *Vent* DNA Polymerase (New England BioLabs, Massachusetts, USA) สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จะใช้องค์ประกอบเช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของ *Pm*DNV ต่างกันตรงที่จะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pst*DNV เป็นต้นแบบและใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV (cp*Pst*DNV Forward และ cp*Pst*DNV Reverse primers) (ตารางที่ 3.2) จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 3.4 และ 3.5 สำหรับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Pre-denaturation	94	3.00	-
Denaturation	94	0.45	
Annealing	55	0.30	30
Extension	72	2.00	
Final extension	72	10.00	-

ตารางที่ 3.5โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Pre-denaturation	94	3.00	-
Denaturation	94	0.45	
Annealing	55	0.30	35
Extension	72	1.30	
Final extension	72	10.00	-

3.6.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เติมบัฟเฟอร์ 1x TAE (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยความร้อน จากนั้นเทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจลรอจนกระทั่งเจลแข็ง นำเจลที่เตรียมไว้วางบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสและโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอลงไป โดยผสมกับ 6x loading Buffer (ภาคผนวก ก) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x และใช้ GeneRule^{TM} 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) หรือ Lambda/*Hin*d III (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ในเจลอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกและนำไปตรวจสอบภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad, Italy)

3.6.3 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid, Taiwan)

นำชิ้นอะกาโรสที่ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (น้ำหนักมากสุด 300 มิลลิกรัม) ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ เติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ โดยกลับหลอดไปมาทุก ๆ 1-2 นาที จนกระทั่งเจลอะกาโรสละลายหมด จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ (DF column) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วน

ใสที่ไหลผ่านคอลัมน์ทิ้ง ต่อมาเติมบัฟเฟอร์ Wash (เติมเอทานอลแล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ย้ายคอลัมน์ด้านบนใส่ในหลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 35-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะอยู่ในสารละลาย

3.6.4 การโคลนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV เข้าสู่พลาสมิดสำหรับการแสดงออก

3.6.4.1 การเชื่อมต่อยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV เข้ากับพลาสมิดสำหรับแสดงออก pET28a

นำยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Nhe* I และ *Xho* I หรือ *Nde* I และ *Xho* I เชื่อมเข้ากับพลาสมิดสำหรับการแสดงออก pET28a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Nhe* I และ *Xho* I หรือ *Nde* I และ *Xho* I ตามลำดับ โดยวิธีการคำนวณความเข้มข้นของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV และพลาสมิด pET28a ดังนี้

ng insert = (kb of insert x ng vector x 6) / (kb of vector x 1)

*molar ratio insert : vector = 6:1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการคำนวณพบว่าจะต้องใช้ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ความเข้มข้น 90 นาโนกรัม, พลาสมิดสำหรับการแสดงออก pET28a ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม จากนั้นผสมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้ 1x T_4 DNA ligase Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT และ 10 mM ATP), 3 unit T_4 DNA ligase และเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV คำนวณตามวิธีการดังกล่าว พบว่าจะต้องใช้ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ความเข้มข้น 56 นาโนกรัม, พลาสมิดสำหรับการแสดงออก pET28a ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม จากนั้นเติมส่วนประกอบให้มีปริมาตรสุดท้ายเช่นเดียวกับการเชื่อมต่อยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และนำไปบ่มภายในสภาวะเดียวกัน

3.6.4.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock

นำสารละลายจากข้อ 3.6.4.1 ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้ นำเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 150 ไมโครลิตรมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่สารละลายผสมจากข้อ 3.6.4.1 ลงในเซลล์คอมพีเทนต์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ต่อมานำเซลล์คอมพีเทนต์ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาทีแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 850 ไมโครลิตรและนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเซลล์คอมพีเทนต์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรทิ้ง จากนั้นผสมสารละลายที่เหลือในหลอดไมโครทิวป์เข้าด้วยกันและนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และนำไปตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่อไป

3.6.4.3 การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ด้วยวิธี Rapid Size Screening

นำโคโลนีของรีคอมบิแนนท์โคลนบนอาหารแข็ง LB จากข้อ 3.6.4.2 มาใส่ในสารละลาย pre-warmed lysis Buffer (100 mM NaOH, 60 mM KCl, 5 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.25% (w/v) SDS และ 0.05% (w/v) bromphenol blue) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 นาทีและนำไปบ่มในน้ำแข็งอีก 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

3.6.4.4 การสกัดพลาสมิดที่มียีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)

นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.4.3 มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Speed Plasmid Mini Kit โดยทำการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลนในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร พร้อมเขย่า

ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่หลอดไมโครทิวบ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้งและทำการปั่นเหวี่ยงจนครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อมากระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมาจนกระทั่งสารละลายผสมเข้ากันจึงเติมบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเช่นเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสใส่ลงในคอลัมน์ PD และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเทส่วนใสทิ้งแล้วเติมบัฟเฟอร์ Wash (เติมเอทานอลแล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่านคอลัมน์ทิ้งก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติดอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์หลอดใหม่ ทำการเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 35-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการจะอยู่ในสารละลาย จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer (1^{st} Base, Malaysia) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Vector NTI, Clustal X และ GeneDoc

3.7 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV

3.7.1 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E.coli* Rosetta-gami

นำสารละลายจากข้อ 3.6.4.4 ที่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์มาทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์ *E.coli* Rosetta-gami ด้วยวิธี Heat shock โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้ นำเซลล์คอมพีเทนต์ *E.coli* Rosetta-gami ปริมาตร 150 ไมโครลิตรมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่สารละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ที่ถูกต้องจากข้อ 3.6.4.4 ลงในเซลล์คอมพีเทนต์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ต่อมานำเซลล์คอมพีเทนต์ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาทีแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 850 ไมโครลิตรและนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1

ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเซลล์คอมพีเทนต์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรทิ้ง จากนั้นผสมสารละลายที่เหลือในหลอดไมโครทิวป์เข้าด้วยกันและนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โคลนที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ต่อไป

3.7.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV

นำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนจากข้อ 3.7.1 ลงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ต่อมานำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ใส่ลงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.4 และเติมสารละลาย IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์แบคทีเรียมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยปั่นเหวี่ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ในหลอดไมโครทิวป์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis

3.7.3 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV

3.7.3.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV

หลังจากทำการปั่นเก็บเซลล์แล้ว นำส่วนของตะกอนเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV จากข้อ 3.7.2 ผสมกับ β-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและ 4x SDS-PAGE Sample Buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PBS (ภาคผนวก ก) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE

3.7.3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.7.3.1 มาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีเตรียมดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 การเตรียม SDS-PAGE สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน

Solution	5% stacking gel (ml/10 ml)	10% separating gel (ml/20 ml)	12% separating gel (ml/20 ml)
H_2O	6.8	7.9	6.6
30% Acrylamide mix	1.7	6.7	8.0
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	5.0	5.0
1 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25	-	-
10% (w/v) SDS	0.1	0.2	0.2
10% (w/v) APS	0.1	0.2	0.2
TEMED	0.01	0.008	0.008

โดยใช้ 10% separating gel สำหรับวิเคราะห์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ 12% separating gel สำหรับโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วนำไปแช่ในสารละลาย Staining solution (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำไปล้างด้วยสารละลาย Destaining solution (ภาคผนวก ก) จนแผ่นเจลมีลักษณะใส จึงใส่สารละลาย Fixing solution (ภาคผนวก ก)

3.7.3.3 การโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF

หลังจากแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้วตัดส่วนของ stacking gel ออกและวัดขนาดของ separating gel และนำไปแช่ในสารละลาย Transfer Buffer (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าประมาณ 5 นาที ระหว่างนั้นตัดกระดาษกรองจำนวน 6 แผ่นและเมมเบรน PVDF 1 แผ่นให้มีขนาดเท่ากับขนาดของ separating gel นำแผ่นเมมเบรน PVDF แช่ใน Absolute methanol ให้ทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 1 ครั้ง จากนั้นนำทั้งแผ่นเมมเบรนและกระดาษกรองแช่ในสารละลาย Transfer Buffer แล้วนำกระดาษกรองจำนวน 3 แผ่นไปวางบนเครื่อง Semi-dry transfer apparatus ตามด้วยแผ่นเมมเบรน PVDF แผ่นเจล และกระดาษที่แช่ในสารละลาย Transfer Buffer อีก 3 แผ่นปิดทับส่วนบน ไล่ฟองอากาศออกโดยใช้หลอดแก้วกลิ้งบนกระดาษกรองเบา ๆ หยด Transfer Buffer ปริมาณเล็กน้อย ปิดฝาเครื่อง Semi-dry transfer apparatus เพื่อทำการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลไปยังเมมเบรน PVDF โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 70 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาทีต่อ 1 เจล

3.7.3.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blotting และการตรวจสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence

นำแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ได้รับการโอนถ่ายโปรตีนเสร็จแล้วมาแช่ในสารละลาย Blocking solution (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทสารละลาย Blocking solution ทิ้งและบ่มด้วยสารละลาย Blocking solution ที่ผสมแอนติบอดีต่อ Histidine (R&D System, USA) อัตราส่วน 1:5,000 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลาย Blocking solution ที่ผสมแอนติบอดีออกและล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้งและ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (Anti-mouse IgG conjugated with HRP) (Sigma, USA) ที่เจือจางในสารละลาย Blocking solution อัตราส่วน 1:5,000 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการล้างแผ่นเมมเบรนด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น และนำแผ่นเมมเบรนวางบนพลาสติกใสพร้อมกับซับ

สารละลายส่วนเกินออก ระหว่างนั้นเตรียมส่วนผสมซับสเตรทของเอนไซม์ Horse-radish peroxidase (ภาคผนวก ก) เทซับสเตรทลงบนแผ่นเมมเบรนและเกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาทำการซับสารละลายส่วนเกินออกและใช้ปากคีบหนีบแผ่นเมมเบรนวางลงบนแผ่นพลาสติกใส ปิดทับเมมเบรน ด้วยแผ่นพลาสติกใสเช่นเดียวกัน ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสโดยรอบแผ่นเมมเบรนและนำไปวางบนถาดประกบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดมุมทั้ง 4 มุม จากนั้นปิดฝาถาดและนำไปประกบฟิล์ม X-Ray ในห้องมืด

3.7.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV โดยการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG

นำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียจากข้อ 3.7.1 ลงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ต่อมานำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ใส่ลงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.4 และทำการเติมสารละลาย IPTG โดยแปรผันความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 0.1 0.4 0.5 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์แบคทีเรียมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยปั่นเหวี่ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ในหลอดไมโครทิวป์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์มาทดสอบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis ตามวิธีในข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4

3.8 การทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์

3.8.1 การตรวจสอบการละลายของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV

นำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV จากข้อ 3.7.2 มาทดสอบการละลายของโปรตีน โดยละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (1 OD) ด้วยสารละลาย STE เริ่มจากเติมสารละลาย STE (25 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8)) ที่ผสม lysozyme ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 450 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลาย STE ที่ผสม 10% Triton X-100 ต่อมานำไปทำให้เซลล์แตกด้วยกระบวนการ sonicate เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของน้ำใสออกจากตะกอนเซลล์ โดยใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ ส่วนตะกอนเซลล์ทำการล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์การละลายของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis เช่นเดียวกับข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4

สำหรับการตรวจสอบการละลายด้วยสารละลาย Enzhance Lysis Buffer (BioTech, NSTDA) นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก (1 OD) มาเติมสารละลาย Enzhance Lysis Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 0.1 unit DNase I (Fermentas, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกส่วนน้ำใสและส่วนตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ ส่วนตะกอนเซลล์ทำการล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์การละลายของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis เช่นเดียวกับข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4

3.8.2 การตรวจสอบการละลายของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV

นำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากข้อ 3.7.2 มาทดสอบการละลายของโปรตีน โดยละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (1 OD) ด้วยสารละลาย Enzhance Lysis Buffer (BioTech, NSTDA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 0.1 unit DNase I (Fermentas, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกส่วนน้ำใสและส่วนตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ ส่วนตะกอนเซลล์ทำการล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์การละลายของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis เช่นเดียวกับข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4

3.8.3 การเพิ่มปริมาณในการแสดงออกและการสกัดโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV

เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่แสดงออกโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นให้ได้เท่ากับ 10 และถ่ายโอนเข้าสู่อาหารเหลวดังกล่าวข้างต้น ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.4 จึงเติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ นำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีและนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวมาสกัดโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดยดัดแปลงจาก Schlager และคณะ (2012) ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (150 OD) ด้วยสารละลาย PCL (8 mM Na_2HPO_4, 286 mM NaCl, 1.4 mM KH_2PO_4, 2.6 mM KCl และ 1% (w/v) SDS) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 2 นาทีและแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที ต่อมาทำการแยกส่วนของน้ำใสและตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ และนำไปทำให้ปริมาตรลดลง โดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด MWCO 10 kDa (Merck Millipore, Germany) จนเหลือปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ต่อไป

สำหรับโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV สกัดโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (150 OD) ด้วยสารละลาย Enzhance Lysis Buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 10 unit DNase I (Fermentas, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกส่วนน้ำใสและส่วนตะกอนเซลล์ออกจากกัน โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสออกจากตะกอนเซลล์ เพื่อนำไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.8.4 การทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography

ทำการเตรียมคอลัมน์ เพื่อใช้สำหรับทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยนำคอลัมน์นิกเกิลมาใส่น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เพื่อให้คอลัมน์อิ่มตัวด้วยน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย $NiSO_4$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไปอีกปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลาย $NiSO_4$ กระจายไปทั่วคอลัมน์ หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าวจึงสามารถที่จะใช้คอลัมน์สำหรับทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

สำหรับการทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ให้บริสุทธิ์ (Schlager และคณะ, 2012) เริ่มจากทำคอลัมน์ให้อิ่มตัวด้วยสารละลาย PCW (8 mM Na_2HPO_4, 286 mM NaCl, 1.4 mM KH_2PO_4, 2.6 mM KCl และ 0.1% (w/v) sarkosyl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.3 ผ่านคอลัมน์แล้วเก็บส่วนที่ไหลผ่านออกมาจากคอลัมน์ (Flow through) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อมาเติมสารละลาย PCW ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อชะโปรตีนที่จับแบบไม่จำเพาะ จากนั้นเติมสารละลาย PCW ที่มีส่วนผสมของ Imidazole ที่มีความเข้มข้น 100 200 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ (PCE) ตามลำดับ เพื่อชะโปรตีนที่จับอย่างจำเพาะกับเม็ดบีท หลังจากที่ชะโปรตีนออกมาจนหมด จึงเติม Stripping Buffer (8 mM Na_2HPO_4, 286 mM NaCl, 1.4 mM KH_2PO_4, 2.6 mM KCl , 50 mM EDTA) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดโปรตีนที่ค้างอยู่ภายในคอลัมน์ออกมาทั้งหมด และล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ หลังจากนั้นนำส่วนโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย Stripping Buffer นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis ตามวิธีในข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4 จากนั้นนำส่วนโปรตีนบริสุทธิ์มาลดปริมาตรโดยผ่านคอลัมน์ขนาด 10 MWCO (Millipore 10 MWCO, Germany) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสที่ไหลออกจากคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย PCW เข้าไปในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงให้สุดท้ายปริมาตรส่วนใสที่อยู่ภายในคอลัมน์มีปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร

ในส่วนการทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ เริ่มจากเติมสารละลาย $ZnSO_4$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์และเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อกระจาย $ZnSO_4$ ให้ทั่วคอลัมน์ จากนั้นทำคอลัมน์ให้อิ่มตัวด้วยสารละลาย Binding Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 M NaCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้คอลัมน์ที่พร้อมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ในส่วนของตัวอย่างโปรตีนจะนำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่สกัดได้จากข้อ 3.8.3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Binding Buffer ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการกรองตัวอย่างโปรตีนด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตรและไหลเข้าสู่คอลัมน์ที่ทำให้อิ่มตัวแล้ว เก็บส่วนที่ไหลผ่านออกมาจากคอลัมน์ (Flow through) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Washing Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 M NaCl, 40 mM Imidazole) เข้าไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์แบบไม่จำเพาะ ต่อมาเติม Elution Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 M NaCl, 200 mM Imidazole) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยแบ่งเก็บโปรตีนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร หลังจากที่ชะโปรตีนที่จับอยู่ในคอลัมน์ออกมาแล้ว จึงเติม Stripping Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดโปรตีนที่ค้างอยู่ภายในคอลัมน์ออกมาทั้งหมด ทำการเก็บคอลัมน์ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและเก็บภายในอุณหภูมิ 4 °ซ ส่วนโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis ตามวิธีในข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4 ต่อมานำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาใส่คอลัมน์ขนาด 30 MWCO (Millipore 30 MWCO, Germany) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสที่ไหลออกจากคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม Binding Buffer เข้าไปในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงให้สุดท้ายปริมาตรส่วนใสที่อยู่ภายในคอลัมน์มีปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร

3.8.5 วัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay

ทำการเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 1x Binding Buffer ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม 1x Bradford Reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแล้วจึงเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น, ตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.8.3 และสารละลาย Binding Buffer ซึ่งใช้เป็น Blank ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ ผสมสารละลายให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (ELX800, Bio-Tek) แล้วนำผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ย OD_{595} ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA กับค่าเฉลี่ย OD_{595} ของ Blank (ΔOD_{595}) ไปสร้างกราฟมาตรฐานเส้นตรงเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่า ΔOD_{595} แล้วนำสมการเส้นตรงที่ได้ไปใช้คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

3.9 การตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV หรือ *Pst*DNV

3.9.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส

นำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดใส่คาร์บอนกริด ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที นำกระดาษกรองซับตัวอย่างส่วนเกินออกและทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยดสี 1% PTA (Phosphotungstic acid) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีและซับสีส่วนเกินออก ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 5 นาทีเช่นเดียวกันจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปส่องกล้อง TEM (Transmission electron microscope) (JEOL JEM-1400, USA) ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

3.10.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์สำหรับการแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถแสดงออกโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ได้จากข้อ 3.9.1 นำมาทำเป็นเซลล์คอมพีเทนต์ เพื่อให้เหมาะสมต่อการทรานสฟอร์มพลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออกอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง โดยนำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนข้างต้นมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยใช้แบคทีเรียดังกล่าวเป็นหัวเชื้อซึ่งมีปริมาณแบคทีเรีย OD_{600} เท่ากับ 1 ต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2$ (เย็นจัด) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จะละลายด้วย 100 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2$ (เย็นจัด) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ต่อมานำสารละลายของตะกอนเซลล์แบคทีเรียไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที เติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 7% (v/v) แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์ ปริมาตรหลอดละ 150 ไมโครลิตร นำเซลล์คอมพีเทนต์ไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อใช้ในการทรานสฟอร์มพลาสมิดต่อไป

3.10.2 การทรานสฟอร์มและแสดงออกพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ที่สามารถแสดงออกโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV

นำเซลล์คอมพีเทนต์ที่ได้จากข้อ 3.10.1 มาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการรับพลาสมิดที่แสดงออกอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นนำมาเกลี่ยลงบนอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนในอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเซลล์แบคทีเรียจำนวน 1 OD_{600} ลงในอาหารใหม่ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.4 เติม 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์แบคทีเรียที่ได้จะนำมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis ตามข้อ 3.7.3.1-3.7.3.4 และตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ตามข้อ 3.10.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.10.3 การเตรียมอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์

นำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของอาร์เอ็นเอสายคู่ (OD_{600} เท่ากับ 1) มาละลายใน 0.1% SDS-PBS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาทีและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 วินาที ต่อมาทำการเติม RNase A ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมที่ผสม 1x RNase A Buffer (300 mM sodium acetate, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA) ลงในสารละลายข้างต้น จากนั้นเติม Ribozol™ (Amresco®) ปริมาตร 160 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีจึงเติม Choloform ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่แล้วเติม Isopropanol ลงไปโดยใช้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่แยกได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีเช่นเดียวกัน ทำการล้างตะกอนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 75% Ethanol

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 150 mM NaCl และบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

3.10.4 การตรวจสอบสมบัติความเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่

นำอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้จากข้อ 3.10.3 มาตรวจสอบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่หรือไม่ โดยนำไปบ่มกับ RNase A (จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอสายเดี่ยว), DNase I (จำเพาะต่อดีเอ็นเอ) และ RNase III (จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอสายคู่) โดยมีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 องค์ประกอบของการตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่

DNase I	RNase A	RNase III
50 ng dsRNA	50 ng dsRNA	50 ng dsRNA
1x DNase I Buffer*	1x RNase A Buffer**	1x RNase III Buffer***
		1x $MnCl_2$
0.5 units DNase I	0.05 μg RNase A	0.5 units RNase III
DEPC water	DEPC water	DEPC water

*	1x DNase I Buffer	:	10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM $CaCl_2$
**	1x RNase A Buffer	:	2 mM Tris-HCl, pH 8, 60 mM Sodium acetate
***	1x RNase III Buffer	:	10 mM Tris-HCl, pH 8, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$

โดยปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่โดยการวิเคราะห์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีการเตรียมในตารางที่ 3.8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3.8 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส สำหรับวิเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่

Solution	ml/10 ml	ml/20 ml
1x TBE (ภาคผนวก ก)	8.56	17.12
30% Acrylamide mix	1.33	2.66
10% (w/v) APS	0.1	0.2
TEMED	0.01	0.02

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอสายคู่ผสมกับ 6x loading Buffer (ภาคผนวก ก) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x และใช้ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาทีและนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกและนำไปตรวจสอบภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad, Italy)

3.10.5 การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

รีคอมบิแนนท์โคลนที่ผ่านการทดสอบว่าสามารถแสดงออกทั้งโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับไวรัสหัวเหลือง จากข้อ 3.10.2 จะนำมาขยายขนาดในการแสดงออก ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยจะมีวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3 แต่เนื่องจากมีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอสายคู่จึงต้องมีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย จากนั้นเมื่อวัดค่า OD_{600} ได้เท่ากับ 0.4 จึงเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 มิลลิโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกทั้งโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัดโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 3.8.3 และ 3.8.4 ตามลำดับ นำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV บริสุทธิ์มาเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.9.1 เพื่อตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

นำตัวอย่างข้างต้นมาตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง โดยนำตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาเติมสารละลาย Ribozol™ (Amresco®) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีจึงเติม Choloform ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่แล้วเติม Isopropanol ลงไปโดยใช้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่แยกได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีเช่นเดียวกัน ทำการล้างตะกอนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 150 mM NaCl และบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 10 นาที และทำการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองด้วยพอลิอะคริลา-ไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.11 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

3.11.1 การหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เหมาะสมสำหรับการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง (Suppression Test)

นำกุ้งขาวขนาด 300 มิลลิกรัม จำนวน 60 ตัว เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 10 ppt ที่อุณหภูมิ 28 °ซ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 150 mM NaCl

กลุ่มที่ 2 6 ng dsYHV

กลุ่มที่ 3 30 ng dsYHV

กลุ่มที่ 4 300 ng dsYHV

โดยจะทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ความเข้มข้นต่างๆ ควบคู่ไปกับการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ (ความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้กุ้งตาย 100% ในระยะเวลา 3 วัน) ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการฉีดกุ้งเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อกุ้ง 1 ตัว จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง กุ้งในทุกกลุ่มจะถูกเก็บส่วนของเหงือกกุ้ง เพื่อนำมาตรวจสอบการติดไวรัสหัวเหลืองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.11.2 การยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองของอนุภาคเหมือนไวรัส (Suppression Test)

นำกุ้งขาวขนาด 300 มิลลิกรัม จำนวน 60 ตัว เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 10 ppt ที่อุณหภูมิ 28 °ซ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว ซึ่งจะทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ (ความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้กุ้งตาย 100% ในระยะเวลา 3 วัน) ควบคู่ไปกับการฉีดสารละลายดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 150 mM NaCl

กลุ่มที่ 2 Naked dsYHV

กลุ่มที่ 3 *Pst*DNV VLPs

กลุ่มที่ 4 *Pst*DNV-dsYHV VLPs

โดยกลุ่มที่ 2 และ 4 จะฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ความเข้มข้น 6 นาโนกรัม ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัสจะฉีดที่ปริมาณของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัม โดยปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการฉีดกุ้งเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อกุ้ง 1 ตัว จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง กุ้งในทุกกลุ่มจะถูกเก็บส่วนของเหงือกกุ้งเพื่อนำมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจสอบการติดไวรัสหัวเหลืองต่อไป

3.11.3 ตรวจสอบการติดไวรัสหัวเหลืองระดับ mRNA

3.11.3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากกุ้งที่ติดเชื้อด้วย Ribozol

ตัวอย่างเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ประมาณ 50 มิลลิกรัม มาบดใน Ribozol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตะกอนของอาร์เอ็นเอจะถูกล้างด้วย 75% (v/v) Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เทส่วนใสทิ้งและเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่ treat ด้วย DEPC ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 10 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และทำการตรวจวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้น โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{RNA concentration } (\mu g/ml) = 40 \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

3.11.3.2 การเตรียม Complementary DNA (cDNA) และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบการยับยั้งไวรัสหัวเหลือง

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.11.2 ปริมาณความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม มาผสมสารละลายประกอบด้วย ; Random primer (2 μM) และน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่ผสม DEPC ให้ได้ปริมาตรเป็น 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 5 นาทีและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายที่มีส่วนผสมของ 1x Improm-II ™ reaction Buffer, 0.5 mM dNTPs, 1 ไมโครลิตร Improm-II ™ Reverse transcriptase และน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่ผสม DEPC ในสารละลายก่อนหน้า โดยให้ปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาการสร้าง cDNA ต่อโดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ 25 °ซ 5 นาที, 42 °ซ 60 นาที และ 72 °ซ 15 นาที จากนั้นนำ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ YHV-Helicase และ Actin (ตารางที่ 3.2) โดยผสมสารละลายให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 μM Actin Forward ; Actin Reverse primers และ 0.03 μM YHV-Helicase Forward ; YHV-Helicase Reverse primers, 0.2 mM dNTPs, 1x Reaction Buffer (Apsalagen, Thailand), 2 mM $MgCl_2$ และ 1 unit *Taq* DNA Polymerase (Apsalagen, Thailand) และน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับตรวจสอบการติดไวรัสหัวเหลือง

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Pre-denaturation	94	2.00	-
Denaturation	94	0.10	20
Annealing	55	0.30	
Extension	72	1.00	
Final extension	72	5.00	-

ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

3.12 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะเวลา 10 วัน

3.12.1 การยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองของอนุภาคเหมือนไวรัสในระยะเวลา 10 วัน แบบฉีดไวรัสควบคู่กับอนุภาคเหมือนไวรัส

นำกุ้งขาวขนาด 300 มิลลิกรัม จำนวน 60 ตัว เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 10 ppt ที่อุณหภูมิ 28 °ซ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว ซึ่งจะทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ (ความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้กุ้งตาย 100% ในระยะเวลา 3 วัน) ควบคู่ไปกับการฉีดสารละลายดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 150 mM NaCl

กลุ่มที่ 2 Naked dsYHV

กลุ่มที่ 3 *Pst*DNV VLPs

กลุ่มที่ 4 *Pst*DNV-dsYHV VLPs

โดยกลุ่มที่ 2 และ 4 จะฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ความเข้มข้น 6 นาโนกรัม ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัสจะฉีดที่ปริมาณของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัม โดยปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการฉีดกุ้งเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อกุ้ง 1 ตัว จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน ติดตามอัตราการตายของกุ้งในแต่ละวันและวาดกราฟเปรียบเทียบอัตราการตายของกุ้งกับจำนวนวันหลังติดไวรัสหัวเหลือง เพื่อดูประสิทธิภาพในการติดไวรัสหัวเหลืองในระยะยาว ซึ่งสามารถเขียนเป็นแผนภาพการทดลองได้ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.12.2 การยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองของอนุภาคเหมือนไวรัสโดยการฉีดอนุภาคเหมือนไวรัสเป็นระยะเวลา 10 วัน ก่อนฉีดไวรัสหัวเหลือง

นำกุ้งขาวขนาด 300 มิลลิกรัม จำนวน 60 ตัว เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 10 ppt ที่อุณหภูมิ 28 °ซ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว ซึ่งจะทำการฉีดสารละลายดังต่อไปนี้

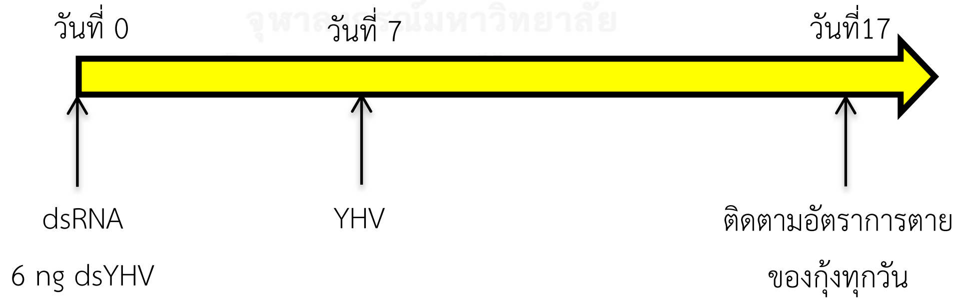
กลุ่มที่ 1 150 mM NaCl

กลุ่มที่ 2 Naked dsYHV

กลุ่มที่ 3 *Pst*DNV VLPs

กลุ่มที่ 4 *Pst*DNV-dsYHV VLPs

โดยกลุ่มที่ 2 และ 4 จะฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ความเข้มข้น 6 นาโนกรัม ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัสจะฉีดที่ปริมาณของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัม โดยปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการฉีดกุ้งเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อกุ้ง 1 ตัว จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 วัน และทำการติดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5\text{x}10^{-7}$ (ความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้กุ้งตาย 100% ในระยะเวลา 3 วัน) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน ทำการติดตามอัตราการตายของกุ้งในแต่ละวันและวาดกราฟเปรียบเทียบอัตราการตายของกุ้งกับจำนวนวันหลังติดไวรัสหัวเหลือง เพื่อดูประสิทธิภาพในการติดไวรัสหัวเหลืองในระยะยาว ซึ่งสามารถเขียนเป็นแผนภาพการทดลองได้ดังนี้

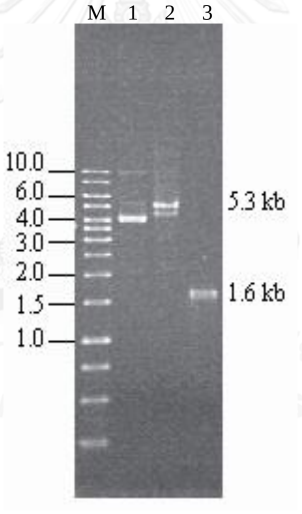


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV

จากการเพิ่มปริมาณของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV มีขนาดเท่ากับ 1,600 คู่เบส ต่อมานำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก (pET28a) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe* I และ *Xho* I (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และพลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออก (pET28a) ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe* I และ *Xho* I ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

เลน M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder

เลน 1 : พลาสมิด pET28a

เลน 2 : พลาสมิด pET28a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe* I และ *Xho* I

เลน 3 : ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe* I และ *Xho* I

จากนั้นทำการเชื่อมยีนโปรตีนเปลือกหุ้มกับพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกและเคลื่อนย้ายเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนจำนวน 5 โคลนมาทำการสกัดพลาสมิด เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาแปลเป็นกรดอะมิโนและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV (GenBank Accession No. DQ002873; gi_6797312) แสดงดังรูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่า ลำดับกรดอะมิโนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV แทรกอยู่ ส่วนใหญ่มีความเหมือนกับยีนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV (GenBank Accession No. DQ002873) ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่ใช้ในการโคลนนั้นจะมีเฉพาะส่วนของ Mature Polypeptide ที่พบในอนุภาคไวรัส ซึ่งจะพบว่าไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนต้นของโปรตีนเปลือกหุ้ม ต่อมาเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในแต่ละโคลนพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนลำดับที่ 615 และ 798 ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทุกโคลนโดยเปลี่ยนจากอะลานีน (A) เป็น วาลีน (V) และกลูตาเมต (E) เป็น ไกลซีน (K) ตามลำดับ ซึ่งการที่กรดอะมิโนดังกล่าวมีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส เพราะได้ใช้เชื้อไวรัสที่ติดเชื้ออยู่ในกุ้งเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV นอกจากนี้เมื่อพิจารณารีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 2 (HPV_cl_2) มีลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างไปจากรีคอมบิแนนท์โคลนอื่น ๆ ในลำดับที่ 803 อาจเนื่องมาจากความผิดพลาดในการนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้ามาเชื่อมกันในระหว่างการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แม้ว่าในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มจะใช้เอนไซม์ *Vent* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี Proof reading สามารถแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการนำใส่เข้าไปผิดในระหว่างการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วก็ตามหรืออาจเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตามธรรมชาติด้วยเช่นกัน

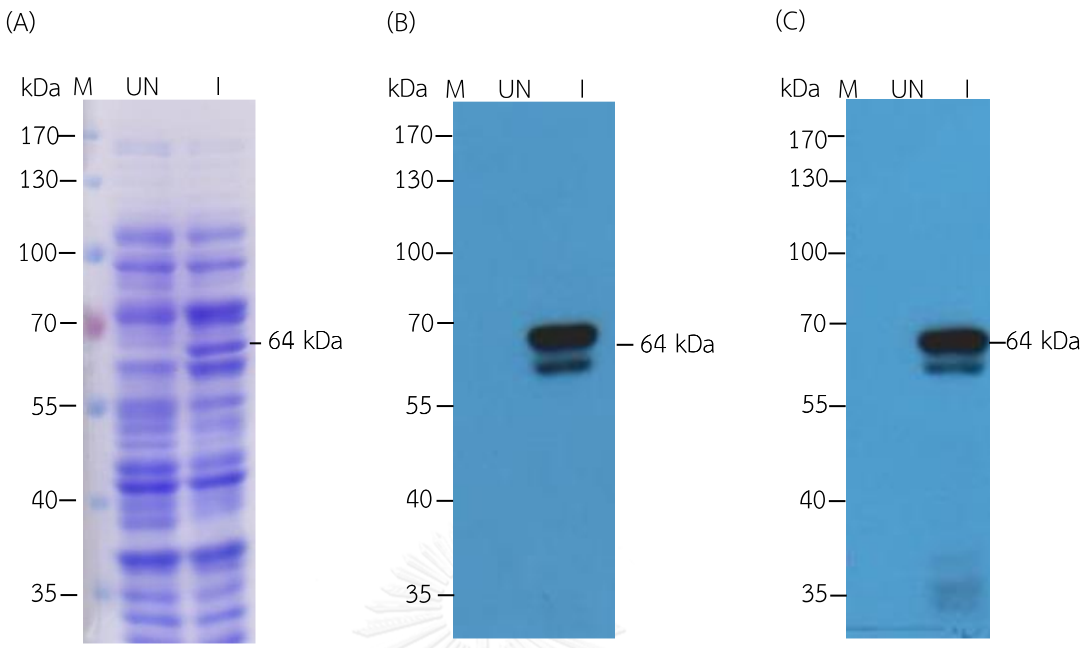
```
                      *        20         *        40         *        60         *        80
gi_6797312 : MSPTRKGGNYYASKHFQSKRKNKLARVKDLLASKKKERRFKGKGNTLSEKPSTSEWNDPVRQRFPELEQEERNTFAGLLA :  80
HPV_cl_14  : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_11  : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_8   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_5   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_2   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -

                      *       100         *       120         *       140         *       160
gi_6797312 : IEAAPDQRQLGRDNNNQLALVQRDTRVAVRQSTNRGEALEVVRAANEAIRSGGDRLAELVQAYASGFSDSTEIVEVRQED : 160
HPV_cl_14  : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_11  : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_8   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_5   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_2   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -

                      *       180         *       200         *       220         *       240
gi_6797312 : RVQRDIFQEEGQNLLAIEIALQEPSSVAQQLDQERTPAVKRALELTAEEERIERIENAKKYIEEVIEETNQELQEQERQE : 240
HPV_cl_14  : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_11  : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_8   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_5   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -
HPV_cl_2   : -------------------------------------------------------------------------------- :   -

                      *       260         *       280         *       300         *       320
gi_6797312 : VSAAAEDTMNTEAPVPMETSESGATAAPQQRAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY : 320
HPV_cl_14  : --------MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY :  72
HPV_cl_11  : --------MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY :  72
HPV_cl_8   : --------MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY :  72
HPV_cl_5   : --------MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY :  72
HPV_cl_2   : --------MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY :  72
                     MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHRNKPVDLKHIGDNVYVAQRVY

                      *       340         *       360         *       380         *       400
gi_6797312 : KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII : 400
HPV_cl_14  : KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII : 152
HPV_cl_11  : KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII : 152
HPV_cl_8   : KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII : 152
HPV_cl_5   : KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII : 152
HPV_cl_2   : KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII : 152
             KVEAECKLVGDKLSWSNTTNSKYLRRLLGINGNSNSGDIKHSFYTQLSGSIGLGNLALGNYINSWGMDNISKSEDSWAII

                      *       420         *       440         *       460         *       480
gi_6797312 : ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ : 480
HPV_cl_14  : ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ : 232
HPV_cl_11  : ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ : 232
HPV_cl_8   : ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ : 232
HPV_cl_5   : ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ : 232
HPV_cl_2   : ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ : 232
             ATRGKMNHLQAFEMVPQYQGETVVGYTSAPLQFGKLLGHVYYPDPKGEERIKIASKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQ

                      *       500         *       520         *       540         *       560
gi_6797312 : TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV : 560
HPV_cl_14  : TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV : 312
HPV_cl_11  : TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV : 312
HPV_cl_8   : TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV : 312
HPV_cl_5   : TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV : 312
HPV_cl_2   : TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV : 312
             TKVTSEHNHVFAFTDLRDSPVISEVAAYQTNDEPPKINGIGIEYQGFNLTSDTNAALIGLMPSNCIKRRKEIQSGMDNVV

                      *       580         *       600         *       620         *       640
gi_6797312 : LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYAEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN : 640
HPV_cl_14  : LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYVEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN : 392
HPV_cl_11  : LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYVEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN : 392
HPV_cl_8   : LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYVEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN : 392
HPV_cl_5   : LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYVEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN : 392
HPV_cl_2   : LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYVEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN : 392
             LWSMKSNRLIDKRFWKPEGWTKKSMNGMAKDKVNITPTTYDIYEEAHVTRTTDYvEWARNEIFYDANTSYGSVGPSDIGN

                      *       660         *       680         *       700         *       720
gi_6797312 : FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI : 720
HPV_cl_14  : FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI : 472
HPV_cl_11  : FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI : 472
HPV_cl_8   : FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI : 472
HPV_cl_5   : FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI : 472
HPV_cl_2   : FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI : 472
             FVQKYNLSDQYATDIFFMPYVHTQRGIIQDIVINFDLTMQIMVKRIPRQVYNDFYHINTRAMNPVKYDSAVERSFGYDEI

                      *       740         *       760         *       780         *       800
gi_6797312 : YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSEMD : 800
HPV_cl_14  : YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSKMD : 552
HPV_cl_11  : YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSKMD : 552
HPV_cl_8   : YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSKMD : 552
HPV_cl_5   : YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSKMD : 552
HPV_cl_2   : YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSKMD : 552
             YARSIKIHENISGTHGSKYADRGPISHMEATKRNSYQRAYAQRRIILDQGVSKMKTRSSAAAEDDIPEDCDDFLETSkMD

                      *
gi_6797312 : PPPQPQLPKKKKKYRVNV- : 818
HPV_cl_14  : PPPQPQLPKKKKKYRVNV- : 570
HPV_cl_11  : PPPQPQLPKKKKKYRVNV- : 570
HPV_cl_8   : PPPQPQLPKKKKKYRVNV- : 570
HPV_cl_5   : PPPQPQLPKKKKKYRVNV- : 570
HPV_cl_2   : PPRQPQLPKKKKKYRVNV- : 570
             PPpQPQLPKKKKKYRVNV
```

รูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดย gi_6797312 : *Penaeus monodon* hepandensovirus 1, complete sequence และ HPV_cl_2, 5, 8, 11 และ 14 : รีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 2 5 8 11 และ 14 ตามลำดับ

4.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV

จากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจึงได้ทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV โคลนที่ 5 (HPV_cl_5) มาเคลื่อนย้ายเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการแสดงออกโปรตีนด้วยวิธี Heat shock ต่อมาทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดยทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV โดยเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์และนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western Blotting Analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine และ *Pm*DNV (รูปที่ 4.3) จากผลการทดลองพบแถบโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV ขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตันและโปรตีนดังกล่าวสามารถจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine และ *Pm*DNV ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV สามารถที่จะแสดงออกได้ในระบบการแสดงออกของโพรคาริโอตและเป็นโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV จริง เนื่องจากสามารถที่จะเข้าจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส *Pm*DNV ได้ จึงทำการเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนดังกล่าวไปทำการทดลองขั้นต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) และ *Pm*DNV (C) ของ Total cell lysate จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

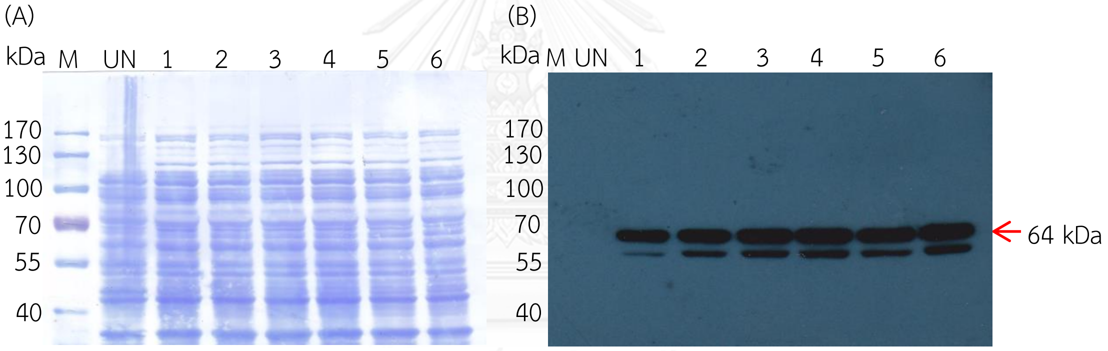
เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน UN : รีคอมบิแนนท์โคลนที่ไม่มีการชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน I : รีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ต่อมาทำการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดยแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ตั้งแต่ 0.05 0.1 0.4 0.5 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG พบว่าเริ่มมีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV เมื่อชักนำด้วย 0.05 มิลลิโมลาร์ IPTG และมีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV มากที่สุด เมื่อชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 0.5 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG จะไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV (รูปที่ 4.4) ดังนั้นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV คือ 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของของ Total cell lysate จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดยการแปรผันความเข้มข้น IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

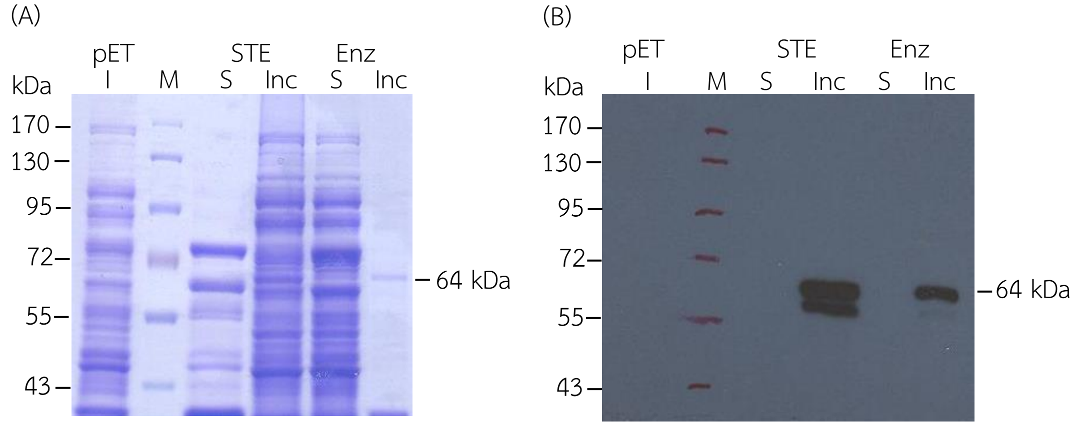
เลน UN : รีคอมบิแนนท์โคลน cp*Pm*DNV-pET28a ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

เลน 1-6 : รีคอมบิแนนท์โคลน cp*Pm*DNV-pET28a ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 0.1 0.4 0.5 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

4.3 การทดสอบการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV

จากผลการทดลองการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ในระบบการแสดงออกของโพรคาริโอต พบว่าสามารถแสดงออกโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ได้ มีขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตัน และโปรตีนดังกล่าวสามารถจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine และ *Pm*DNV ได้ (รูปที่ 4.3) จึงได้ทำการทดสอบการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV โดยนำเซลล์ที่ถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV มาทำให้แตกด้วยคลื่นเสียง (Sonicate) ในสารละลาย STE Buffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8 และ 1 mM EDTA) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส (Supernatant) และส่วนตะกอนเซลล์ (Inclusion) หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western Blotting Analysis นอกจากนี้ยังได้นำสาร Enzhance Lysis Buffer ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มาทดสอบความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV เช่นเดียวกัน ซึ่งได้มีการทดสอบว่าสารละลายดังกล่าวสามารถช่วยให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถละลายอยู่ในส่วนของน้ำใสได้มากขึ้น จึงได้นำมาทดสอบควบคู่กับการละลายด้วยคลื่นเสียง ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์การละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของ Total cell lysate จากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน pET : โปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มี pET เพียงอย่างเดียวที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG

เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน STE : รีคอมบิแนนท์โคลน *Pm*DNV ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกและนำมาศึกษาสมบัติด้วยวิธี Sonicate

เลน Enz : รีคอมบิแนนท์โคลน *Pm*DNV ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกและนำมาศึกษาสมบัติด้วยวิธี Enzhance Lysis Buffer

เลน S : ส่วนน้ำใส (Supernatant)

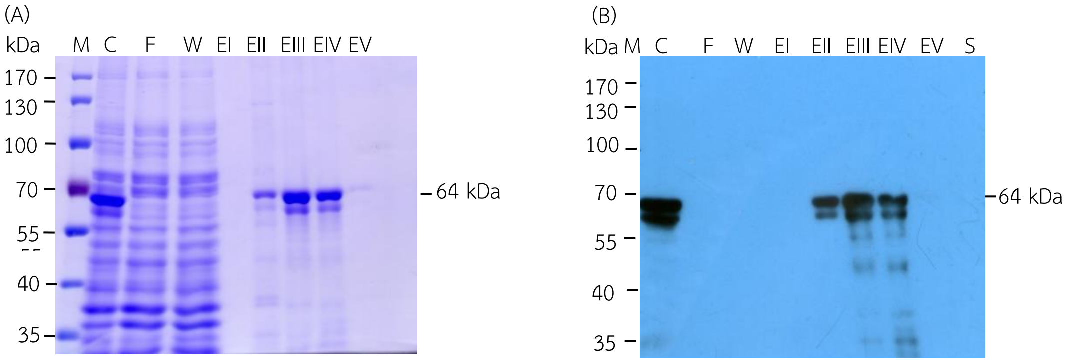
เลน Inc : ส่วนตะกอน (Inclusion)

จากผลการทดลองการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการละลายด้วยคลื่นเสียง ในสารละลาย STE Buffer และการใช้ Enzhance Lysis Buffer พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ (Inclusion; Inc) ดังนั้นอาจมีความจำเป็นที่จะต้องทำโปรตีนให้เสียสภาพก่อนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

4.4 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV ให้บริสุทธิ์

นำส่วนตะกอน (Inclusion, Inc) ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส *Pm*DNV จำนวน 150 OD มาละลายโปรตีนให้อยู่ในส่วนน้ำใส ในสารละลาย PCL Buffer จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) และทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนน้ำใสกับส่วนตะกอน จากนั้นทำการขจัดสิ่งสกปรกออกจากโปรตีนด้วยการผ่านเมมเบรน ต่อมานำสารละลายโปรตีนมาทำบริสุทธิ์ โดยผ่าน Nickle Affinity Chromatography หลังจากนั้นทำการเก็บโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งจะอยู่ในส่วนของ Flow through (F) และทำการล้างคอลัมน์ เพื่อชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์หรือจับกับคอลัมน์อย่างอ่อน ๆ ด้วยสารละลาย PCW Buffer แล้วเก็บส่วนของโปรตีนที่ถูกล้างออกจากคอลัมน์ ซึ่งจะอยู่ในส่วนของ Wash (W) ต่อมาทำการชะโปรตีนที่จับอยู่ภายในคอลัมน์ด้วยสารละลาย PCE [PCW Buffer ที่ผสมด้วย 40 100 200 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ Imidazole (Elution Buffer I-V)] ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นตามลำดับ สุดท้ายทำการชะโปรตีนที่อยู่ภายในคอลัมน์ทั้งหมดด้วยการชะด้วยสารละลาย Stripping Buffer (S) จากนั้นนำโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6

จากผลการทดลอง พบรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตันถูกชะออกมาในส่วนของ Elution Fraction ด้วย PCW Buffer ที่ผสม Imidazole ตั้งแต่ความเข้มข้น 100 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าโปรตีนเปลือกหุ้มถูกชะออกมาด้วย PCW Buffer ที่ผสม 200 มิลลิโมลาร์ Imidazole มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบแถบของโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 64 กิโลดาลตันเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากเซลล์เจ้าบ้าน และเมื่อทำการยืนยันด้วย western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine พบว่าเกิดแถบสัญญาณขึ้นในตัวอย่างที่ผ่านการชะด้วย PCW Buffer ที่ผสม Imidazole ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ และโปรตีนที่ถูกย่อยซึ่งมีขนาดของโปรตีนน้อยกว่า 64 กิโลดาลตันก็พบความเข้มของแถบสัญญาณมากที่สุดในตัวอย่างที่ถูกชะด้วย PCW Buffer ที่ผสม 200 มิลลิโมลาร์ Imidazole เช่นเดียวกับผลของ SDS-PAGE ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV สามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography โดยชะมากที่สุดด้วย สารละลาย PCW Buffer ที่มี Imidazole ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปทดสอบความสามารถในการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสต่อไป



รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย 10% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของตะกอนรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ที่ละลายขึ้นมาด้วย 1% SDS และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography

เลน C	:	ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส ก่อนทำบริสุทธิ์
เลน F	:	ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส ในสารละลาย Binding Buffer
เลน W	:	ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส ในสารละลาย Washing Buffer
เลน EI-EV	:	ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส ในสารละลาย Elution Buffer ที่มี Imidazole ความเข้มข้น 40 100 200 300 และ 500 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
เลน S	:	ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส ในสารละลาย Stripping Buffer

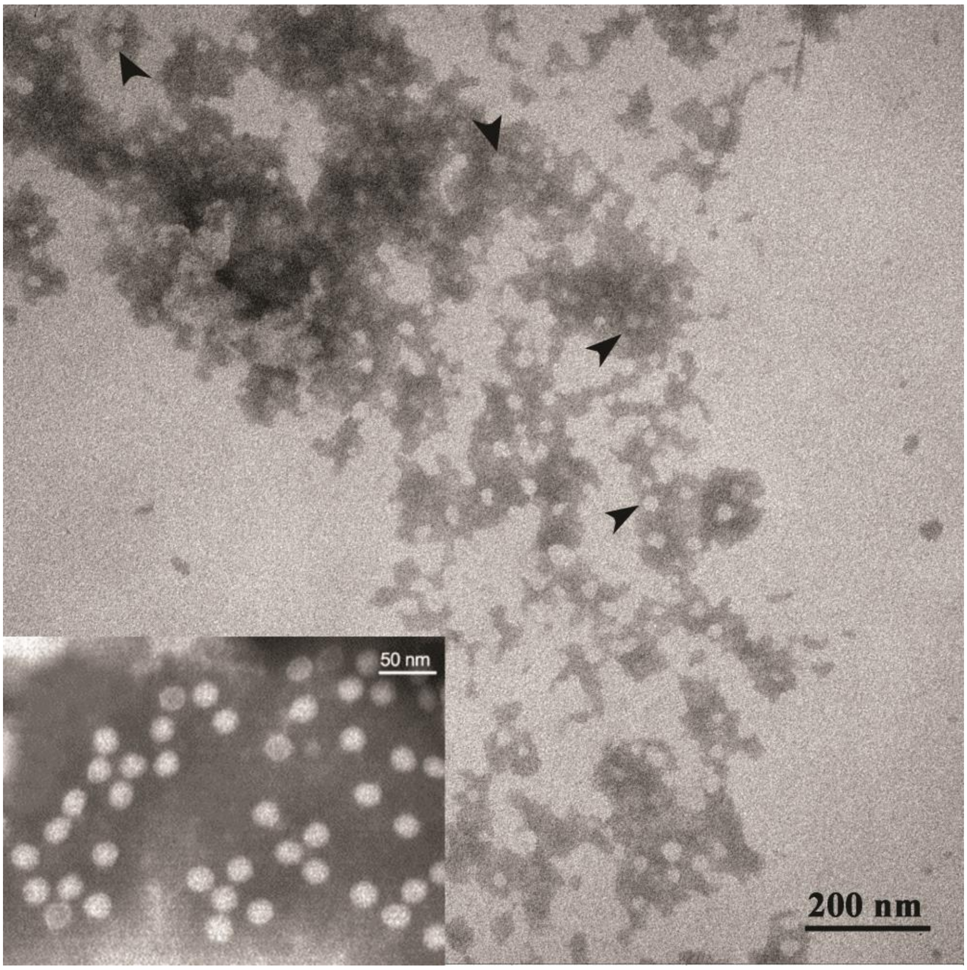
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.5 การตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV

หลังจากที่ผ่านการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มไวรัส *Pm*DNV ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Nickel Affinity Chromatography ด้วยสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัส โดยเริ่มจากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาขจัด Imidazole ออกด้วยการใช้คอลัมน์ขนาด 10 MWCO (Amicon 10 MWCO) จากนั้นทำการเติมสารละลาย Binding Buffer เข้าไปในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยง จนกระทั่งสารละลาย Binding Buffer ปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตรและสารละลายที่อยู่ภายในคอลัมน์เหลือ 2 มิลลิลิตร เมื่อนำไปวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 482 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนดังกล่าวไปตรวจสอบการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส โดยทำการหยดตัวอย่างลงบนคาร์บอนกริดและย้อมด้วย

สารละลาย 1% PTA แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

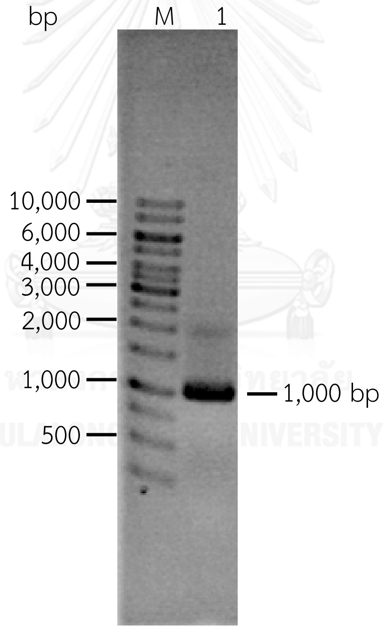
จากผลการทดลองพบอนุภาคเหมือนไวรัส (รูปที่ 4.7) มีลักษณะเป็น icosahedral ขนาดประมาณ 22 นาโนเมตร เมื่อพิจารณารูปร่างและขนาดของอนุภาคเหมือนของไวรัส พบว่าอนุภาคเหมือนของไวรัสที่ได้มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับไวรัสที่พบในธรรมชาติ (Flegel, 2006) อย่างไรก็ดี เนื่องจากมีการแสดงออกอยู่ในส่วนตะกอนเซลล์และต้องทำโปรตีนให้เสียสภาพก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ส่งผลให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้



รูปที่ 4.7 อนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 100000X เปรียบเทียบกับอนุภาคของไวรัส *Pm*DNV ที่พบในธรรมชาติ (รูปเล็ก) (Flegel, 2006) (ลูกศรแสดงอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV)

4.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของไวรัส *Pst*DNV ที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส (ตามวิธีในข้อ 3.6.1) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.8) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด Gel/PCR Fragment Extraction kit นำยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่ได้มาเติมส่วนปลายด้วยเบส Adenosine (A overhang) และเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy vector และทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* DH5α และคัดเลือกโคลน 18 19 และ 20 มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด High-Speed Plasmid Mini kit และนำพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

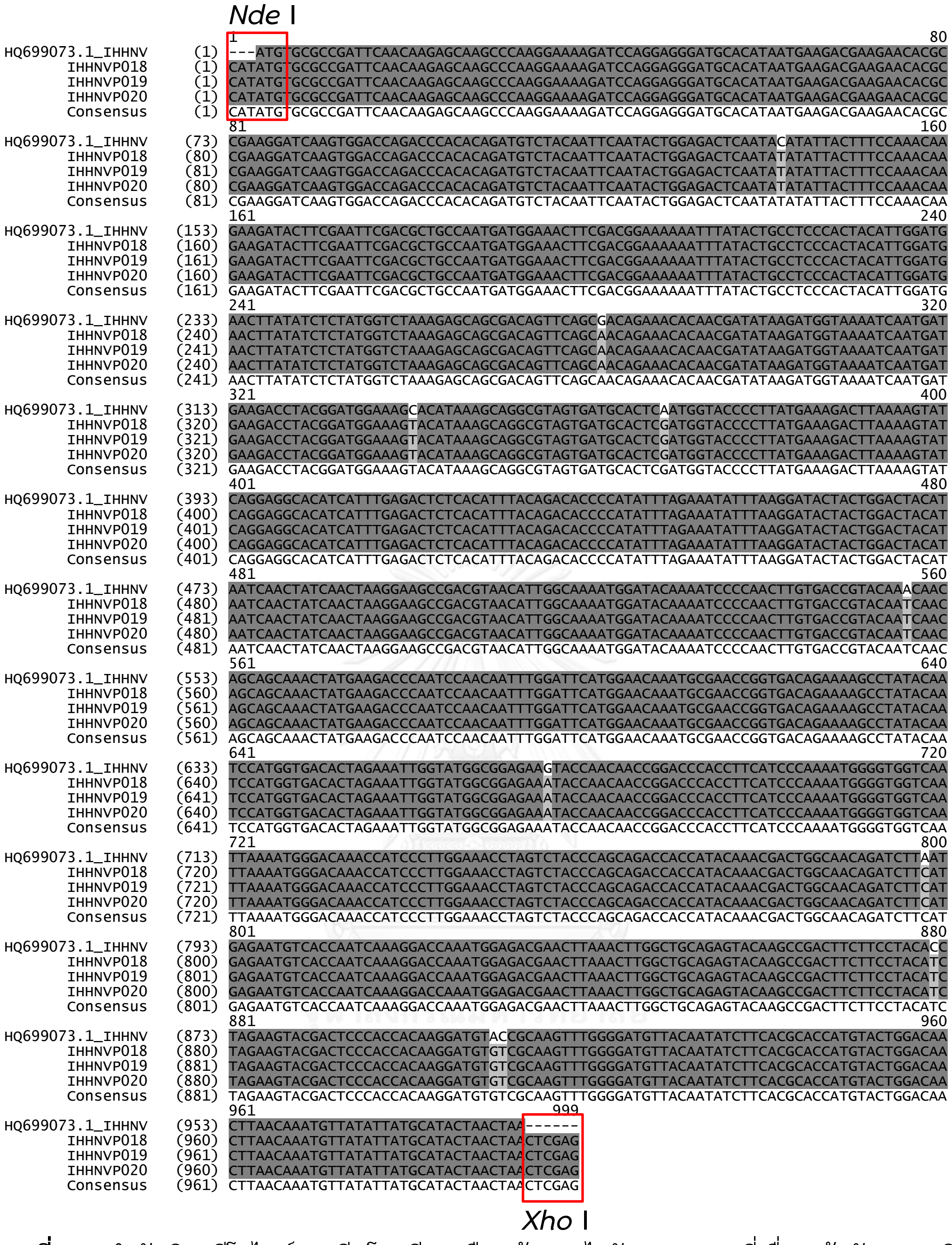
เลน M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder (Fermentas, USA)

เลน 1 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์โคลนจำนวน 3 โคลน ได้แก่ รีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 18 19 และ 20 เปรียบเทียบกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล (GenBank Accession No. HQ699073) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.9) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 10 ตำแหน่งที่มีลำดับเบสเปลี่ยนไปจากยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่มีการรายงานในฐานข้อมูล ดังนี้

ตำแหน่งที่ 142	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	C เป็น T
ตำแหน่งที่ 282	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	G เป็น A
ตำแหน่งที่ 341	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	C เป็น T
ตำแหน่งที่ 369	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	A เป็น G
ตำแหน่งที่ 556	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	A เป็น T
ตำแหน่งที่ 676	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	G เป็น A
ตำแหน่งที่ 798	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	A เป็น C
ตำแหน่งที่ 879	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	C เป็น T
ตำแหน่งที่ 910	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	A เป็น G
ตำแหน่งที่ 911	เปลี่ยนลำดับเบสจาก	C เป็น T

ซึ่งการเปลี่ยนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กล่าวมาข้างต้น อาจมีสาเหตุมาจากความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส ดังนั้นจึงควรพิจารณาลำดับของกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนเปรียบเทียบกับโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV (GenBank Accession No. YP_003572962.1) ที่อยู่ในฐานข้อมูลควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็นการยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปรเปลี่ยนไปไม่ส่งผลต่อลำดับกรดอะมิโน ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนแสดงดังรูปที่ 4.10 เมื่อพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจะเห็นได้ว่า มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 47 มีการเปลี่ยนจากกรดอะมิโนฮีสติดีน (Histidine, H) เป็นไทโรซีน (Tyrosine, Y) เพียงตำแหน่งเดียวในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งอื่น ๆ เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ในฐานข้อมูล ดังนั้นมีการแปรเปลี่ยนไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นผลมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วยังคงให้ลำดับกรดอะมิโนเหมือนเดิม จากผลการทดลองนี้จึงได้ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV เพื่อนำไปเชื่อมกับพลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออกของโปรตีนต่อไป

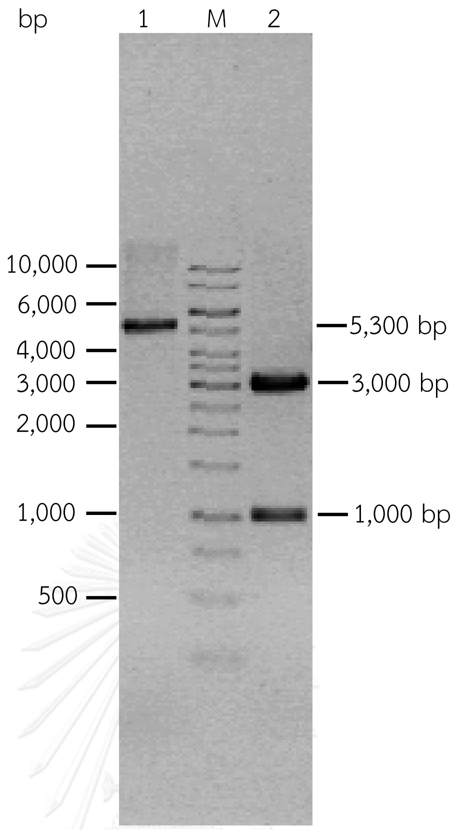


รูปที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEMT-Easy vector เปรียบเทียบกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากฐานข้อมูล (GenBank Accession No. HQ699073) โดยบริเวณ ▭ เป็นบริเวณสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I และ IHHNVP018, 19, 20 : พลาสมิด pGEM-T easy ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 18 19 และ 20 ตามลำดับ

```
                                1                                                                              80
YP_003572962.1_IHHNV     (1)   MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIHITFQTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMN
           IHHNVP018     (1)   MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMN
           IHHNVP019     (1)   MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMN
           IHHNVP020     (1)   MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMN
           Consensus     (1)   MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMN
                                81                                                                            160
YP_003572962.1_IHHNV    (79)   LYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETLTFTDTPYLEIFKDTTGLHN
           IHHNVP018    (81)   LYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETLTFTDTPYLEIFKDTTGLHN
           IHHNVP019    (81)   LYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETLTFTDTPYLEIFKDTTGLHN
           IHHNVP020    (81)   LYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETLTFTDTPYLEIFKDTTGLHN
           Consensus    (81)   LYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETLTFTDTPYLEIFKDTTGLHN
                                161                                                                           240
YP_003572962.1_IHHNV   (159)   QLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWYGGEIPTTGPTFIPKWGGQL
           IHHNVP018   (161)   QLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWYGGEIPTTGPTFIPKWGGQL
           IHHNVP019   (161)   QLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWYGGEIPTTGPTFIPKWGGQL
           IHHNVP020   (161)   QLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWYGGEIPTTGPTFIPKWGGQL
           Consensus   (161)   QLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWYGGEIPTTGPTFIPKWGGQL
                                241                                                                           320
YP_003572962.1_IHHNV   (239)   KWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQGCVASLGMLQYLHAPCTGQL
           IHHNVP018   (241)   KWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQGCVASLGMLQYLHAPCTGQL
           IHHNVP019   (241)   KWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQGCVASLGMLQYLHAPCTGQL
           IHHNVP020   (241)   KWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQGCVASLGMLQYLHAPCTGQL
           Consensus   (241)   KWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQGCVASLGMLQYLHAPCTGQL
                                321   329
YP_003572962.1_IHHNV   (319)   NKCYIMHTN*
           IHHNVP018   (321)   NKCYIMHTN*
           IHHNVP019   (321)   NKCYIMHTN*
           IHHNVP020   (321)   NKCYIMHTN*
           Consensus   (321)   NKCYIMHTN*
```

รูปที่ 4.10 ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากฐานข้อมูล (GenBank Accession No. YP_003572962.1) โดย IHHNVP018, 19, 20 : พลาสมิด pGEM-T easy ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 18 19 และ 20 ตามลำดับ

จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้จากรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แถบ โดยแถบแรกมีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของพลาสมิด pGEM-T Easy vector ส่วนดีเอ็นเอแถบที่ 2 มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส นั่นคือยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (รูปที่ 4.11) และทำการตัดชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ออกจากเจลด้วยชุดสกัด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit เพื่อนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก ในส่วนของพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก pET28a(+) จะทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* DH5α จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini kit และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I เช่นเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 5,300 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิด (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก pET28a และยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nde* I และ *Xho* I

เลน 1 : พลาสมิด pET28a ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

เลน M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder

เลน 2 : รีคอมบิแนนท์โคลน pGEM-cp*Pst*DNV หมายเลข 19 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

ต่อมาทำการเชื่อมยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV เข้ากับพลาสมิด pET28a และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* DH5α หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดและนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลน pGEM-cp*Pst*DNV หมายเลข 19 ที่ใช้เป็นต้นแบบสำหรับเชื่อมกับพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังรูปที่ 4.12

```
                  1                                                                              80
   IHHNVP019  (1) ---------------------------------------------------------------ATGTGCGCCGATTCAACAAG
 IHHNVPET001  (1) ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTGCGCCGATTCAACAAG
 IHHNVPET002  (1) ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTGCGCCGATTCAACAAG
 IHHNVPET003  (1) ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTGCGCCGATTCAACAAG
IHHNVPET0015  (1) ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTGCGCCGATTCAACAAG
IHHNVPET0016  (1) ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTGCGCCGATTCAACAAG
   Consensus  (1) ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTGCGCCGATTCAACAAG
                  81                                                                            160
   IHHNVP019 (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
 IHHNVPET001 (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
 IHHNVPET002 (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
 IHHNVPET003 (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
IHHNVPET0015 (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
IHHNVPET0016 (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
   Consensus (81) AGCAAGCCCAAGGAAAAGATCCAGGAGGGATGCACATAATGAAGACGAAGAACACGCCGAAGGATCAAGTGGACCAGACC
                  161                                                                           240
   IHHNVP019 (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
 IHHNVPET001 (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
 IHHNVPET002 (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
 IHHNVPET003 (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
IHHNVPET0015 (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
IHHNVPET0016 (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
   Consensus (161) CACACAGATGTCTACAATTCAATACTGGAGACTCAATATATATTACTTTCCAAACAAGAAGATACTTCGAATTCGACGCT
                   241                                                                           320
   IHHNVP019 (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
 IHHNVPET001 (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
 IHHNVPET002 (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
 IHHNVPET003 (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
IHHNVPET0015 (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
IHHNVPET0016 (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
   Consensus (241) GCCAATGATGGAAACTTCGACGGAAAAAATTTATACTGCCTCCCACTACATTGGATGAACTTATATCTCTATGGTCTAAA
                   321                                                                           400
   IHHNVP019 (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
 IHHNVPET001 (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
 IHHNVPET002 (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
 IHHNVPET003 (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
IHHNVPET0015 (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
IHHNVPET0016 (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
   Consensus (321) GAGCAGCGACAGTTCAGCAACAGAAACACAACGATATAAGATGGTAAAATCAATGATGAAGACCTACGGATGGAAAGTAC
                   401                                                                           480
   IHHNVP019 (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
 IHHNVPET001 (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
 IHHNVPET002 (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
 IHHNVPET003 (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
IHHNVPET0015 (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
IHHNVPET0016 (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
   Consensus (401) ATAAAGCAGGCGTAGTGATGCACTCGATGGTACCCCTTATGAAAGACTTAAAAGTATCAGGAGGCACATCATTTGAGACT
                   481                                                                           560
   IHHNVP019 (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
 IHHNVPET001 (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
 IHHNVPET002 (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
 IHHNVPET003 (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
IHHNVPET0015 (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
IHHNVPET0016 (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
   Consensus (481) CTCACATTTACAGACACCCCATATTTAGAAATATTTAAGGATACTACTGGACTACATAATCAACTATCAACTAAGGAAGC
                   561                                                                           640
   IHHNVP019 (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
 IHHNVPET001 (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
 IHHNVPET002 (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
 IHHNVPET003 (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
IHHNVPET0015 (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
IHHNVPET0016 (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
   Consensus (561) CGACGTAACATTGGCAAAATGGATACAAAATCCCCAACTTGTGACCGTACAATCAACAGCAGCAAACTATGAAGACCCAA
                   641                                                                           720
   IHHNVP019 (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAAAGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTGG
 IHHNVPET001 (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAATGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTGG
 IHHNVPET002 (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAAAGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTGG
 IHHNVPET003 (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAAAGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTGG
IHHNVPET0015 (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAAAGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTGG
IHHNVPET0016 (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAAAGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTGG
   Consensus (641) TCCAACAATTTGGATTCATGGAACAAATGCGAACCGGTGACAGAAAAGCCTATACAATCCATGGTGACACTAGAAATTG
                   721                                                                           800
   IHHNVP019 (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
 IHHNVPET001 (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
 IHHNVPET002 (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
 IHHNVPET003 (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
IHHNVPET0015 (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
IHHNVPET0016 (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
   Consensus (721) TATGGCGGAGAAATACCAACAACCGGACCCACCTTCATCCCAAAATGGGGTGGTCAATTAAAATGGGACAAACCATCCCT
```

รูปที่ 4.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลน หมายเลข 19 (pGEM-cp*Pst*DNV หมายเลข 19) โดย IHHNVP019 : พลาสมิด pGEM-T easy ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 19 และ IHHNVPET001, 002, 003, 0015, 0016 : พลาสมิด pET28a ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 1 2 3 15 และ 16 ตามลำดับ

```
                                  801                                                                            880
      IHHNVP019    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
    IHHNVPET001    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
    IHHNVPET002    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
    IHHNVPET003    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
   IHHNVPET0015    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
   IHHNVPET0016    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
      Consensus    (801) TGGAAACCTAGTCTACCCAGCAGACCACCATACAAACGACTGGCAACAGATCTTCATGAGAATGTCACCAATCAAAGGAC
                         881                                                                            960
      IHHNVP019    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
    IHHNVPET001    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
    IHHNVPET002    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
    IHHNVPET003    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
   IHHNVPET0015    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
   IHHNVPET0016    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
      Consensus    (881) CAAATGGAGACGAACTTAAACTTGGCTGCAGAGTACAAGCCGACTTCTTCCTACATCTAGAAGTACGACTCCCACCACAA
                         961                                                                           1040
      IHHNVP019    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
    IHHNVPET001    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
    IHHNVPET002    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
    IHHNVPET003    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
   IHHNVPET0015    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
   IHHNVPET0016    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
      Consensus    (961) GGATGTGTCGCAAGTTTGGGGATGTTACAATATCTTCACGCACCATGTACTGGACAACTTAACAAATGTTATATTATGCA
                         1041           1059
      IHHNVP019   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
    IHHNVPET001   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
    IHHNVPET002   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
    IHHNVPET003   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
   IHHNVPET0015   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
   IHHNVPET0016   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
      Consensus   (1041) TACTAACTAATAACTCGAG
```

รูปที่ 4.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลน หมายเลข 19 (pGEM-cp*Pst*DNV หมายเลข 19) โดย IHHNVP019 : พลาสมิด pGEM-T easy ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 19 และ IHHNVPET001, 002, 003, 0015, 0016 : พลาสมิด pET28a ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 1 2 3 15 และ 16 ตามลำดับ (ต่อเนื่อง)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่มาจากพลาสมิด pET28a ที่ใช้ในการแสดงออก ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่เหมือนกับรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 ยกเว้นรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 1 (pET28a-cp*Pst*DNV หมายเลข 1) พบว่าในตำแหน่งที่ 687 มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก A เป็น T เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของแต่ละรีคอมบิแนนท์โคลนเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 (pGEM-cp*Pst*DNV หมายเลข 19) ที่ใช้เป็นต้นแบบ (รูปที่ 4.13) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนโดยส่วนใหญ่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 และมีส่วนของ Hexa-Histidine อยู่ทางด้านปลาย 5′ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน) ซึ่งเป็นส่วนที่ได้มาจากพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก pET28a เพื่อใช้ในการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ยกเว้นรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 1 ที่มีลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 228 เปลี่ยนไปจากไลซีน (Lysine, K) เป็นแอสพาราจีน (Asparagine, N) ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์จึงได้ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 16 (pET28a-cp*Pst*DNV หมายเลข 16) ไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

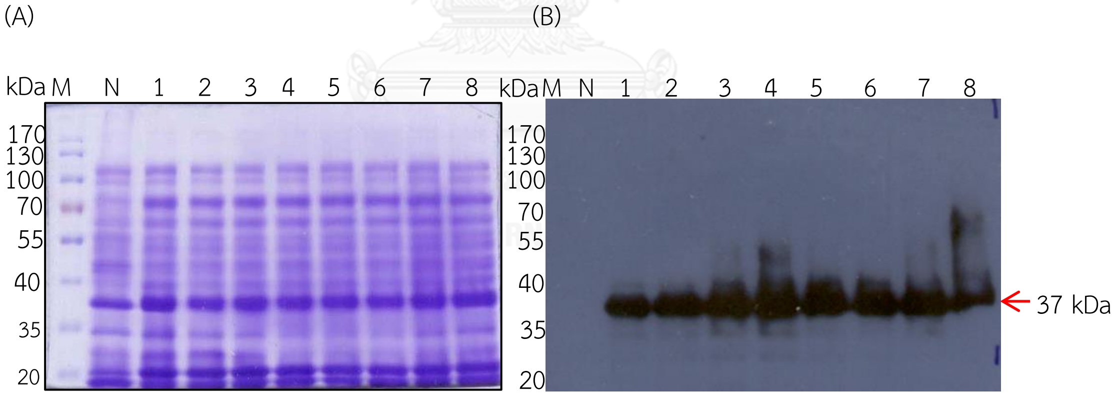
```
                                1                                                                              80
      IHHNVP019     (1)  -------------------MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
    IHHNVPET001     (1)  MGSSHHHHHHSGLVPRGSHMCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
    IHHNVPET002     (1)  MGSSHHHHHHSGLVPRGSHMCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
    IHHNVPET003     (1)  MGSSHHHHHHSGLVPRGSHMCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
   IHHNVPET0015     (1)  MGSSHHHHHHSGLVPRGSHMCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
   IHHNVPET0016     (1)  MGSSHHHHHHSGLVPRGSHMCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
      Consensus     (1)  MGSSHHHHHHSGLVPRGSHMCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIYITFQTRRYFEFDAA
                         81                                                                            160
      IHHNVP019    (81)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
    IHHNVPET001    (79)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
    IHHNVPET002    (79)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
    IHHNVPET003    (79)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
   IHHNVPET0015    (79)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
   IHHNVPET0016    (79)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
      Consensus    (81)  NDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMVKSMMKTYGWKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVSGGTSFETL
                         161                                                                           240
      IHHNVP019   (161)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWY
    IHHNVPET001   (159)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRNAYTIHGDTRNWY
    IHHNVPET002   (159)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWY
    IHHNVPET003   (159)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWY
   IHHNVPET0015   (159)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWY
   IHHNVPET0016   (159)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWY
      Consensus   (161)  TFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWY
                         241                                                                           320
      IHHNVP019   (241)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
    IHHNVPET001   (239)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
    IHHNVPET002   (239)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
    IHHNVPET003   (239)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
   IHHNVPET0015   (239)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
   IHHNVPET0016   (239)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
      Consensus   (241)  GGEIPTTGPTFIPKWGGQLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
                         321                        348
      IHHNVP019   (321)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
    IHHNVPET001   (319)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
    IHHNVPET002   (319)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
    IHHNVPET003   (319)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
   IHHNVPET0015   (319)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
   IHHNVPET0016   (319)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
      Consensus   (321)  CVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN*
```

รูปที่ 4.13 ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โคลนเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 19 ที่ใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม โดย IHHNVP019 : รีคอมบิแนนท์โคลนที่มีพลาสมิด pGEM-T easy ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 19 และ IHHNVPET001, 002, 003, 0015, 0016 : รีคอมบิแนนท์โคลนที่มีพลาสมิด pET28a ที่มีชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โคลนที่ 1 2 3 15 และ 16 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.7 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ใน *E.coli*

จากผลการทดลองข้างต้นได้คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 16 (cp*Pst*DNV-pET28a) มาทดสอบการแสดงออก โดยทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Rosetta-gami ด้วยวิธี heat shock จากนั้นคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมาทั้งหมด 8 โคลน เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเซลล์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน เพื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine จากผลการทดลองพบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV มีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน และสามารถถูกจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine ได้ในรีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 8 โคลน ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โคลนที่มีเฉพาะพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก (pET28a) เมื่อถูกชักนำด้วย IPTG พบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV แสดงดังรูปที่ 4.14 ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 8 โคลน มีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และมีระดับการแสดงออกที่เท่ากันด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการคัดเลือก รีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 1 ไปทดลองหาความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อไป



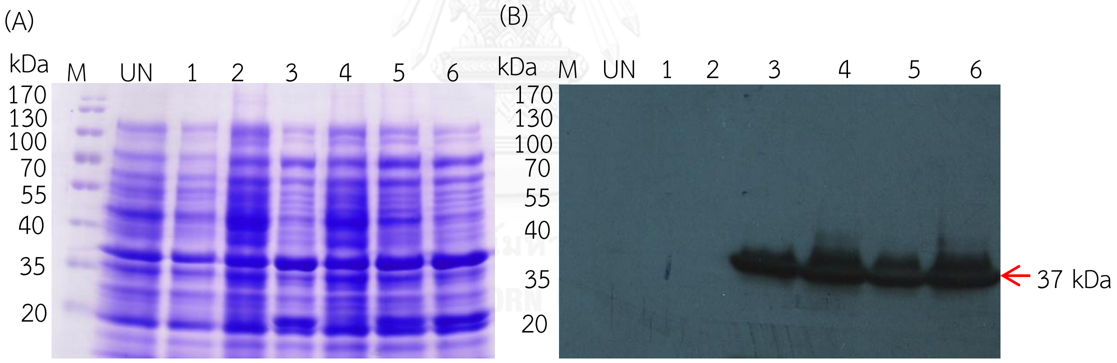
รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน N : รีคอมบิแนนท์โคลน pET28a ที่มีการชักนำด้วย IPTG

เลน 1-8: รีคอมบิแนนท์โคลน cp*Pst*DNV-pET28a โคลนที่ 1-8 ตามลำดับ

ต่อมาทำการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยนำรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 1 มาทดสอบความเข้มข้นของ IPTG โดยแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ตั้งแต่ 0.05 0.1 0.4 0.5 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลนหมายเลข 1 ที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG จากผลการทดลองพบว่าไม่พบการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของ *Pst*DNV ที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 4.15 เลน UN) และเมื่อพิจารณาตัวอย่างที่ชักนำด้วย IPTG พบว่าไม่พบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อชักนำด้วย 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ IPTG เช่นเดียวกันและเริ่มมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีการแสดงออกปริมาณมากที่สุดและมีการแสดงออกในปริมาณที่เท่ากันเมื่อชักนำด้วยความเข้มข้นที่สูงขึ้น (รูปที่ 4.15) ดังนั้นความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV คือ 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงใช้ความเข้มข้นของ IPTG ดังกล่าวในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ต่อไป



รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์การชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยการแปรผันความเข้มข้น IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B)

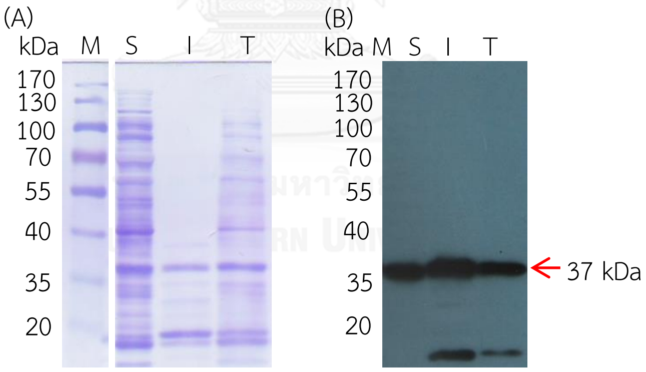
เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน UN : รีคอมบิแนนท์โคลน cp*Pst*DNV-pET28a โคลนหมายเลข 1 ที่ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG

เลน 1-6 : รีคอมบิแนนท์โคลน cp*Pst*DNV-pET28a โคลนหมายเลข 1 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 0.1 0.4 0.5 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

4.8 การทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการละลายของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยใช้สารละลาย Enzhance lysis Buffer (NSTDA, Thailand) จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.16) เมื่อพิจารณาส่วนของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ (Total cell lysate) (เลน T) พบแถบของโปรตีนขนาด 37 กิโลดาลตันและแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถถูกจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine ได้ แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV เมื่อนำตัวอย่างเดียวกันมาทดสอบการละลายของโปรตีนด้วยสารละลาย Enzhance lysis Buffer พบว่าโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียโดยส่วนใหญ่และรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV บางส่วน สามารถละลายอยู่ในส่วนน้ำใสเมื่อสกัดโปรตีนด้วย Enzhance lysis Buffer (Supernatant) (เลน S) ในขณะที่พบรีคอมบิแนนท์โปรตีนบางส่วนยังคงอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ (Inclusion) (เลน I) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV สามารถละลายอยู่ในส่วนน้ำใสของสารละลาย Enzhance lysis Buffer ได้ จึงนำวิธีการสกัดโปรตีนดังกล่าวไปใช้สำหรับสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์เพื่อให้ละลายอยู่ในส่วนน้ำใสและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography ต่อไป



รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์การละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและนำมาทดสอบด้วย Enzhance lysis Buffer ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B)

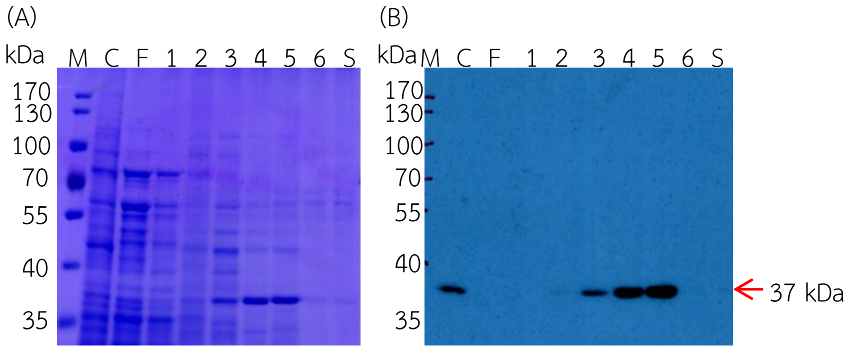
เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน S : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส (Supernatant)

เลน I : ส่วนของตะกอนเซลล์ (Inclusion bodies)

เลน T : ส่วนของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ (Total cell lysate)

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณในการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจำนวน 100 OD มาใส่สารละลาย Enzhance lysis Buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและนำสารละลายน้ำใสเข้าสู่ Nickel Affinity Chromatography เก็บโปรตีนในส่วนต่าง ๆ มาวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.17) พบว่าโปรตีนเกือบทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียรวมถึงโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV สามารถละลายโปรตีนให้อยู่ในส่วนสารละลายน้ำใสได้ (เลน C) และหลังการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้วพบว่ามีโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียส่วนมากถูกชะออกมาจากคอลัมน์โดยที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ยังคงอยู่ภายในคอลัมน์ (เลน F) เมื่อทำการล้างคอลัมน์ด้วย Washing Buffer ที่มีส่วนผสมของ 40 มิลลิโมลาร์ Imidazole จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนบางส่วนสามารถถูกชะออกมาในครั้งสุดท้ายของการชะโปรตีนที่ปนเปื้อน (รูปที่ 4.17 เลน 3) เมื่อพิจารณาถึงตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย Elution Buffer เป็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าสารละลายดังกล่าวสามารถชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV (แถบโปรตีนขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน) ออกมาจากคอลัมน์ได้และแถบโปรตีนดังกล่าวยังคงสามารถถูกจับได้กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine ได้ แต่ยังคงปนเปื้อนโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย (เลน 4-6) โดยมีปริมาณของโปรตีนหลังทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้วประมาณ 767 มิลลิกรัมต่อลิตร สุดท้ายจึงทำการชะโปรตีนทั้งหมดที่ยังคงอยู่ภายในคอลัมน์ด้วย Stripping Buffer (Binding Buffer ที่ผสม 50 mM EDTA) (เลนที่ S) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ทั้งหมดเมื่อชะด้วย Elution Buffer เป็นจำนวน 3 ครั้ง ดังนั้นจึงใช้สภาวะดังกล่าวในการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ เพื่อที่จะตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัสต่อไป



รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B)

เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน C : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส ก่อนโหลดเข้าสู่คอลัมน์

เลน F : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Binding Buffer

เลน 1-3: ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Washing Buffer

เลน 4-6: ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Elution Buffer

เลน S : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Stripping Buffer

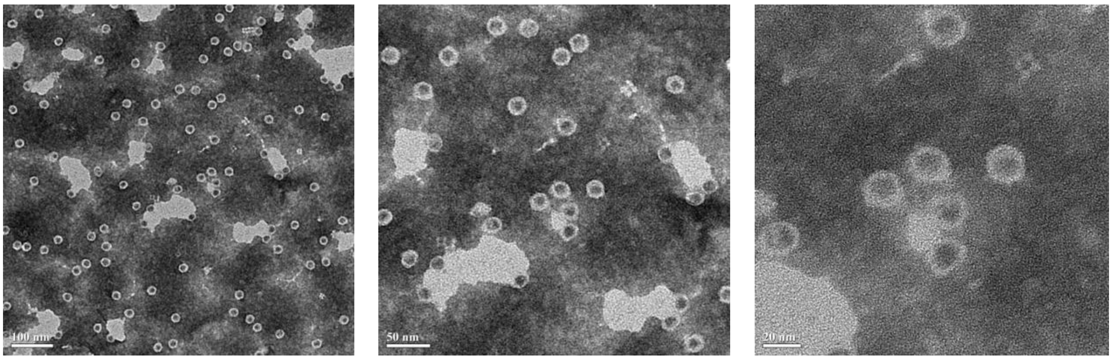
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.9 การตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV

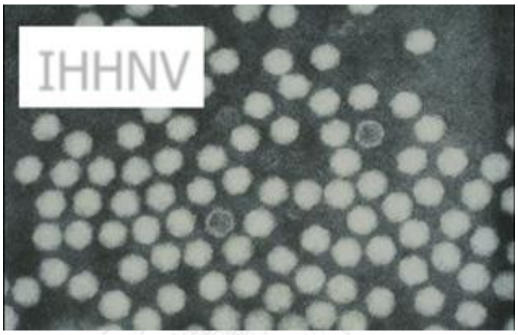
หลังจากที่ผ่านการทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ (เลน 4-5) จึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าวมาตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส เริ่มจากนำโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มากำจัด Imidazole ออกโดยใช้คอลัมน์ขนาด 30 MWCO (Amicon 30 MWCO) โดยการทำการเติม Binding Buffer และนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนที่อยู่ภายในคอลัมน์และทิ้งส่วนใสด้านนอกไป นำสารละลายที่อยู่ภายในคอลัมน์ไปตรวจสอบการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.18 พบอนุภาคเหมือนไวรัสมีรูปร่างเป็น icosahedral ขนาดของอนุภาคมีขนาดประมาณ 20 นาโนเมตร (รูปที่ 4.18A) โดยเทียบกับมาตรวัดขนาด (ด้านล่างซ้าย) และเมื่อพิจารณาจากรูปร่างของไวรัสเปรียบเทียบกับไวรัส *Pst*DNV ที่พบในธรรมชาติ (รูปที่ 4.18B) พบว่าขนาดและรูปร่างของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV มีความคล้ายคลึงกับไวรัส *Pst*DNV ที่พบในธรรมชาติ ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV สามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV โดยที่มีขนาดและรูปร่างของไวรัสคล้ายคลึงกับไวรัส *Pst*DNV ที่พบในธรรมชาติ ในการทดลองนี้วัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และผ่านการกำจัด Imidazole โดยเมมเบรนขนาด 30 MWCO ด้วยวิธี Bradford protein assay โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ทราบความเข้มข้น พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 460 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตรต่อรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย 600 OD

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(A)



(B)

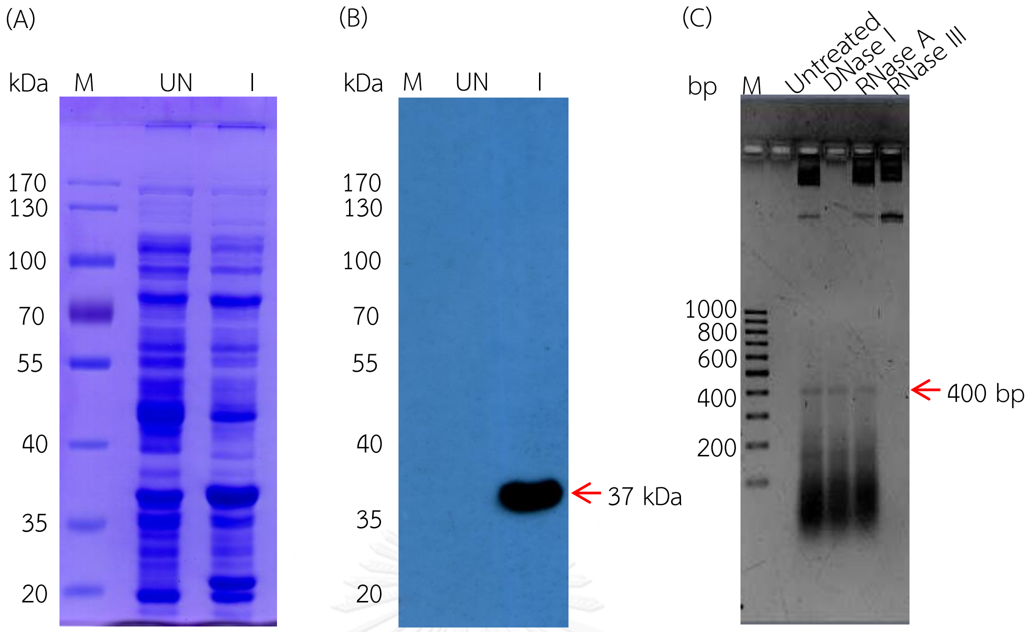


รูปที่ 4.18 อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยายต่าง ๆ (150,000X 200,000X และ 300,000X ตามลำดับ) (A) อนุภาคไวรัส *Pst*DNV ที่พบในธรรมชาติ (Lightner และคณะ, 2012) (B)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.10 การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

หลังจากที่ทำการตรวจสอบการรวมกลุ่มกันของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าสามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ได้ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โคลนดังกล่าวมาเตรียมเป็นเซลล์คอมพีเทนต์และทรานสฟอร์มพลาสมิดที่สามารถผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis ส่วนอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองตรวจสอบด้วยการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย Ribozol จากนั้นนำมาย่อยด้วย DNase I RNase A และ RNase III เพื่อตรวจสอบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่จริงแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.19 จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาถึงการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV พบว่ามีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV โดยมีขนาดของโปรตีนประมาณ 37 กิโลดาลตันและโปรตีนดังกล่าวสามารถถูกจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (รูปที่ 4.19A และ 4.19B) ในส่วนของอาร์เอ็นเอสายคู่ พบว่ามีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเช่นเดียวกัน โดยพบอาร์เอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 400 คู่เบสและอาร์เอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 400 คู่เบส เมื่อทำการตรวจสอบว่าอาร์เอ็นเอดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่หรือไม่ โดยบ่มอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย DNase I และ RNase A ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะสามารถย่อยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถย่อยอาร์เอ็นเอดังกล่าวได้ (รูปที่ 4.19C) ในขณะที่เมื่อบ่มอาร์เอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ RNase III ที่สามารถย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ พบว่าเอนไซม์ RNase III สามารถย่อยอาร์เอ็นเอดังกล่าวได้ (รูปที่ 4.19C) แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเมื่อแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกทั้งในส่วนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ดังนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนดังกล่าวไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และตรวจสอบอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ต่อไป



รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงด้วย 12% SDS-PAGE (A) western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B) และอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (C)

<u>รูปที่ 4.19A และ 4.19B</u>

เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน UN : รีคอมบิแนนท์โคลนที่ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG

เลน I : รีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย IPTG

<u>รูปที่ 4.19C</u>

เลน M : 100 bp DNA Marker (Fermentas, USA)

เลน Untreated : อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์โคลนและไม่ได้บ่มด้วยเอนไซม์

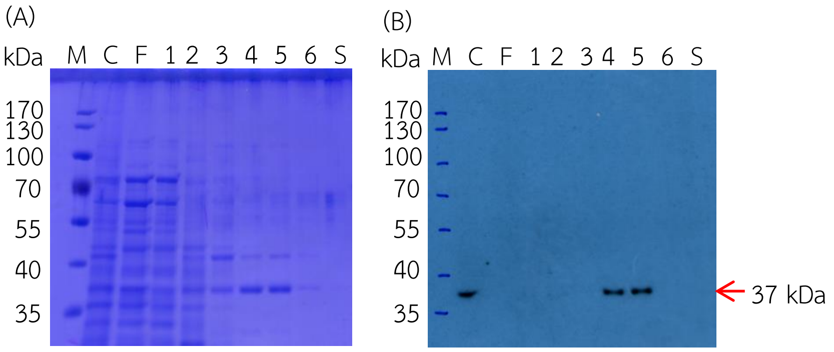
เลน DNase I : อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์โคลนและบ่มด้วยเอนไซม์ DNase I

เลน RNase A : อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์โคลนและบ่มด้วยเอนไซม์ RNase A

เลน RNase III : อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์โคลนและบ่มด้วยเอนไซม์ RNase III

4.11 การทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

จากการตรวจสอบพบว่ารีคอมบิแนนท์ที่คัดเลือกมาสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณในการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง จากนั้นสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์เช่นเดียวกับวิธีการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มในข้อ 3.8.3 แล้วนำสารละลายผ่าน Nickel Affinity Chromatography ที่อิ่มตัวด้วย $ZnSO_4$ ในสารละลาย Binding Buffer จากนั้นทำการชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วย Washing Buffer และชะโปรตีนที่จับอยู่ภายในคอลัมน์ด้วย Elution Buffer จำนวน 3 รอบ เก็บโปรตีนในส่วนต่าง ๆ มาวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ western blotting analysis โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.20 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อสกัดโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ด้วย Enzhance lysis Buffer สามารถละลายโปรตีนให้อยู่ในส่วนสารละลายน้ำใสได้ (เลน C) และเมื่อโหลดส่วนของสารละลายน้ำใสเข้าสู่คอลัมน์ พบว่ามีโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียบางส่วนถูกชะออกมาจากคอลัมน์ (เลน F) เมื่อทำการล้างคอลัมน์ด้วย Washing Buffer จำนวน 3 ครั้ง (เลน 1-3) พบว่าสามารถชะโปรตีนส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ออกมาจากคอลัมน์ได้ เมื่อพิจารณาถึงตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย Elution Buffer เป็นจำนวน 3 ครั้ง (เลน 4-6) จะเห็นได้ว่าสารละลายดังกล่าวสามารถชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ออกมาจากคอลัมน์ได้ (แถบโปรตีนขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน) และแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถถูกจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮีสติดีนได้เช่นเดียวกัน สุดท้ายจึงทำการชะโปรตีนทั้งหมดที่ยังคงอยู่ภายในคอลัมน์ด้วย Stripping Buffer (Binding Buffer ที่ผสม 50 มิลลิโมลาร์ EDTA) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ทั้งหมดเมื่อชะด้วย Elution Buffer เป็นจำนวน 3 ครั้ง (เลน S) ดังนั้นจึงใช้สภาวะดังกล่าวในการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์และนำไปตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสต่อไป



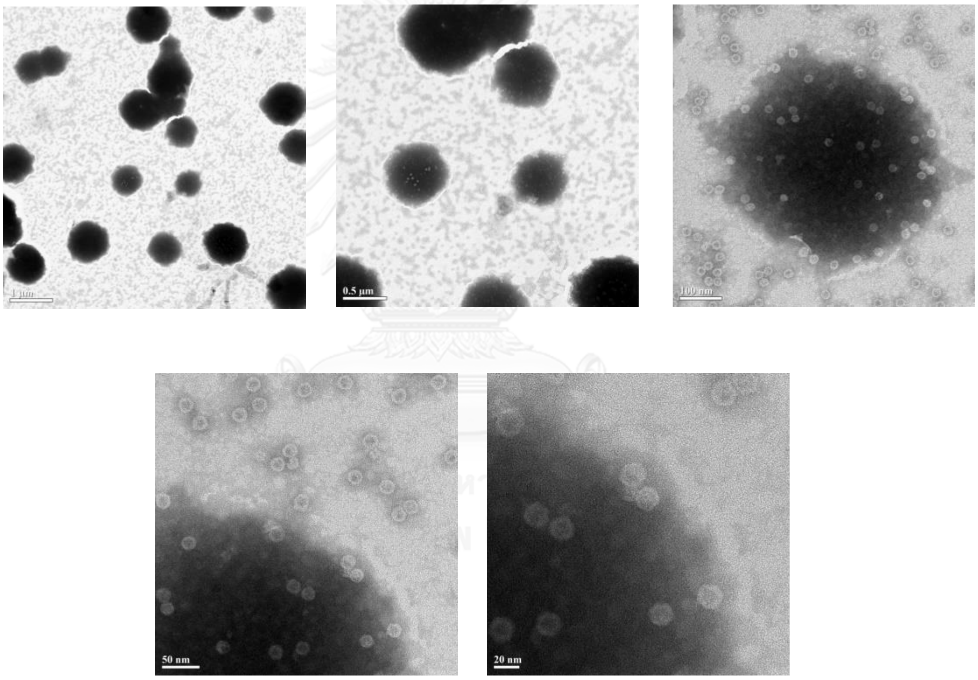
รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและผ่านการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography ด้วย 12% SDS-PAGE (A) และ western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (B)

เลน M : Prestained Protein Marker (Fermentas, USA)
เลน C : ส่วนของโปรตีนที่ละลาย ก่อนโหลดเข้าสู่คอลัมน์
เลน F : ส่วนของโปรตีนที่ละลาย หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Binding Buffer
เลน 1-3: ส่วนของโปรตีนที่ละลาย หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Washing Buffer
เลน 4-6: ส่วนของโปรตีนที่ละลาย หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Elution Buffer
เลน S : ส่วนของโปรตีนที่ละลาย หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Stripping Buffer

4.12 การตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัสของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

เมื่อทำโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Nickel Affinity Chromatography โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบการเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสเช่นเดียวกับข้อ 3.8.4 และ 3.9 นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.21) พบว่าเมื่อมีการแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส

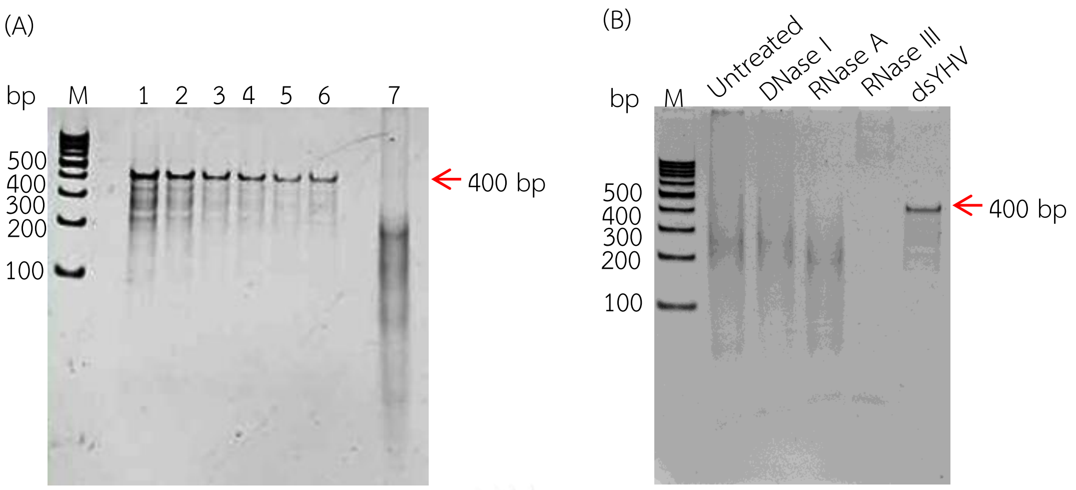
*Pst*DNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองจะมีการรวมกลุ่มกันของอนุภาคไวรัสเป็นขนาดใหญ่ มีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดประมาณ 500 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับมาตรวัดความยาว (ด้านล่างซ้าย) นอกจากนี้ยังพบส่วนของอนุภาคเหมือนไวรัสที่ไม่ได้เกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ (Free *Pst*DNV VLPs) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV แต่ละอนุภาคเกิดการรวมกลุ่มกัน ในการทดลองนี้วัดความเข้มข้นของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่แสดงออกร่วมกับอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยวิธี Bradford protein assay โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ทราบความเข้มข้น พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 405 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตรต่อรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย 600 OD



รูปที่ 4.21 อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยายต่าง ๆ (10,000X 50,000X 150,000X 200,000X และ 300,000X ตามลำดับ)

4.13 ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่จากอนุภาคเหมือนไวรัสของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและการตรวจสอบคุณสมบัติของอาร์เอ็นเอสายคู่

จากการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่แสดงออกร่วมกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง พบว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV เกิดการรวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ จึงนำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจสอบว่ามีอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองอยู่หรือไม่ โดยการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ด้วย Ribozol (ตามวิธีข้อ 3.10.5) และนำมาวิเคราะห์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 4% จากผลการทดลองพบอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้จากอนุภาคเหมือนไวรัส เมื่อพิจารณาขนาดของอาร์เอ็นเอสายคู่พบว่าขนาดของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ได้มีขนาดเล็กกว่า 400 คู่เบส และมีขนาดประมาณ 50 ถึง 200 คู่เบส (ดังรูปที่ 4.22A เลน 7) ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวมีอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองอยู่ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ โดยย่อยด้วย DNase I RNase A และ RNase III แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 4% เช่นเดียวกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.22B จะเห็นได้ว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดังกล่าวสามารถถูกย่อยได้ด้วย RNase III ซึ่งเป็นเอนไซม์จำเพาะต่อการย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ ในขณะที่เมื่อบ่มด้วยเอนไซม์ DNase I และ RNase A ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการย่อยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวตามลำดับ พบว่าไม่สามารถย่อยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้ ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่และอนุภาคเหมือนไวรัสที่ได้จากรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง อาจมีอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าไปในอนุภาคเหมือนไวรัสหรืออาร์เอ็นเอสายคู่ถูกล้อมรอบด้วยอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการทดลองนี้เมื่อตรวจวัดปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ถูกห่อหุ้มด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV พบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย 600 OD



รูปที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้จากอนุภาคเหมือนไวรัสของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 4% (A) การตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่ เมื่อบ่มด้วยเอนไซม์ DNase I RNase A และ RNase III (B)

<u>รูปที่ 4.22A</u>

เลน M	:	100 bp DNA Marker (Fermentas, USA)
เลน 1-6	:	อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองสกัดจาก Rosetta dsYHV ความเข้มข้น 46 23 15.3 11.5 และ 9.2 นาโนกรัมต่อเลนตามลำดับ
เลน 7	:	อาร์เอ็นเอที่สกัดจากอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV

<u>รูปที่ 4.22B</u>

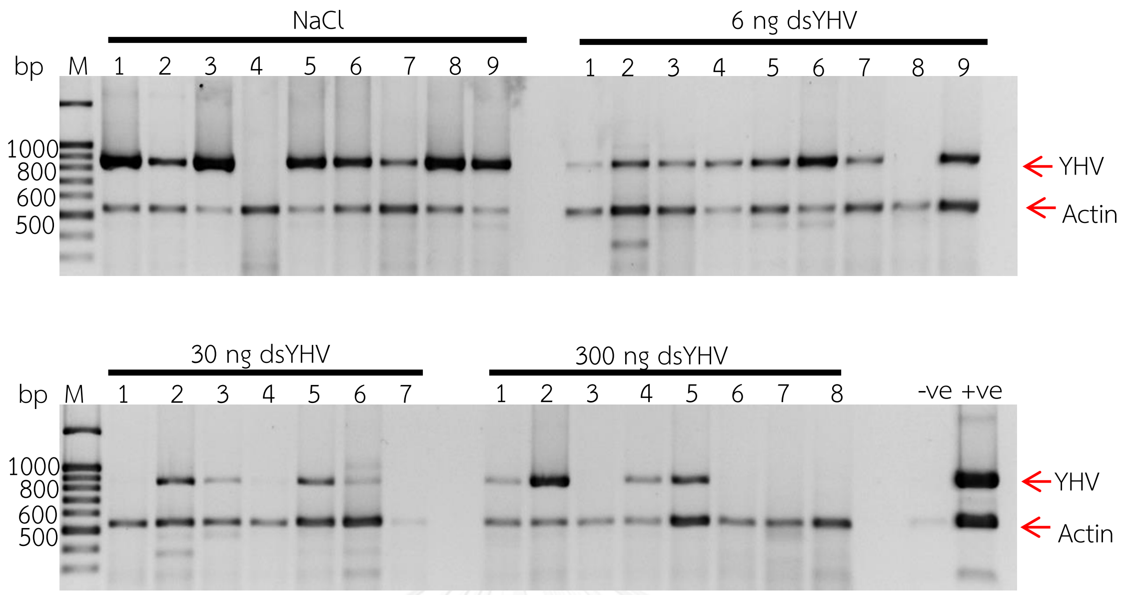
เลน M	:	100 bp DNA Marker (Fermentas, USA)
เลน Untreated	:	อาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างที่ทำบริสุทธิ์และไม่ได้บ่มด้วยเอนไซม์
เลน DNase I	:	อาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างที่ทำบริสุทธิ์และบ่มด้วยเอนไซม์ DNase I
เลน RNase A	:	อาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างที่ทำบริสุทธิ์และบ่มด้วยเอนไซม์ RNase A
เลน RNase III	:	อาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างที่ทำบริสุทธิ์และบ่มด้วยเอนไซม์ RNase III
เลน dsYHV	:	อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองสกัดจาก Rosetta dsYHV ความเข้มข้น 23 นาโนกรัม

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.14 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ถูกห่อหุ้มหรือล้อมรอบด้วยอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV มีความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิกรัมของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้ม *Pst*DNV (ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.4 นาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตรของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและปริมาตรสุทธิที่ใช้ในการฉีดกุ้งขนาด 300 มิลลิกรัมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ดังนั้นปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่มากที่สุดที่สามารถใช้ในการฉีดกุ้งได้เท่ากับ 6 นาโนกรัม โดยมีปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ประมาณ 6 ไมโครกรัม และทำการเติมไวรัสหัวเหลือง (ที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$) เพิ่มเข้าไปภายหลัง

ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ดังกล่าว (6 นาโนกรัม) สามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองได้หรือไม่ โดยใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่สกัดจาก *E.coli* HT115 เป็นตัวแทนในการทดสอบและทำการแปรผันปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อน้ำหนักของกุ้ง (ตามวิธีข้อ 3.11.1) จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.23) เมื่อพิจารณาในกุ้งกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือควบคู่ไปกับการฉีดไวรัสหัวเหลือง หลังติดเชื้อ 48 ชั่วโมงพบว่ากุ้งโดยส่วนใหญ่จะมีการติดไวรัสหัวเหลืองประมาณ 88% (จำนวน 8 ตัว จากกุ้งทั้งหมด 9 ตัว) ในขณะที่เมื่อตรวจสอบการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกลุ่มที่มีการแปรผันปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ พบว่าทุกกลุ่มสามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองได้ โดยในกลุ่มที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 300 นาโนกรัม ให้ผลการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองประมาณ 50% (จำนวน 4 ตัว จากกุ้งทั้งหมด 8 ตัว) ในส่วนของกลุ่มที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 30 นาโนกรัม ให้ผลการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองประมาณ 42% (จำนวน 3 ตัว จากกุ้งทั้งหมด 7 ตัว) และเมื่อทดสอบปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ต่อน้ำหนักตัวกุ้งเท่ากับ 6 นาโนกรัม พบว่าในกุ้งทุกตัวมีการติดไวรัสหัวเหลือง อย่างไรก็ดีพบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ฉีดเข้าไปในตัวกุ้งนั้น สามารถลดปริมาณไวรัสหัวเหลืองได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่เท่ากับ 6 นาโนกรัม สามารถทำให้พบการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งทุกตัวและยังคงเห็นความสามารถในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองของอาร์เอ็นเอสายคู่ จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่าในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองจะต้องใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง ปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองต่อน้ำหนักตัวกุ้งเป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งการติดไวรัส ดังนั้นจากผลการทดลองนี้พบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 6 นาโนกรัม สามารถนำไปใช้ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ต่อไป

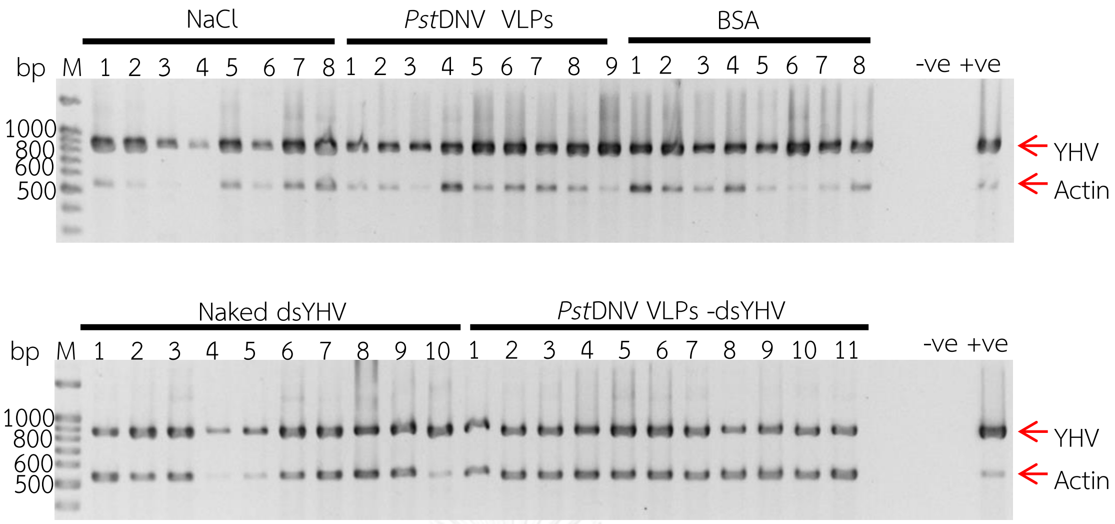


รูปที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดจาก *E.coli* HT115 ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง หลังการติดไวรัสหัวเหลืองเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

เลน M	:	100 bp DNA Marker (Fermentas, USA)
NaCl	:	กลุ่มที่ฉีดน้ำเกลือ (150 mM NaCl) ควบคู่กับการฉีดไวรัสหัวเหลือง ตัวที่ 1-9 ตามลำดับ
6 ng dsYHV	:	กลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 6 นาโนกรัม ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง ตัวที่ 1-9 ตามลำดับ
30 ng dsYHV	:	กลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 30 นาโนกรัม ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง ตัวที่ 1-7 ตามลำดับ
300 ng dsYHV	:	กลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 300 นาโนกรัม ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง ตัวที่ 1-8 ตามลำดับ
เลน –ve	:	กลุ่มควบคุมลบของปฏิกิริยา PCR (ไม่ใส่ cDNA template)
เลน +ve	:	กลุ่มควบคุมบวกของปฏิกิริยา PCR (ใส่ cDNA ของกุ้งที่ติด YHV)
เลน 1-9	:	กุ้งแต่ละตัวของแต่ละกลุ่มการทดลอง (กุ้งขนาด 300 มิลลิกรัม)

เมื่อได้ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง พบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 6 นาโนกรัม (ปริมาณโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ประมาณ 6 ไมโครกรัม) สามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่และพบการติดไวรัสหัวเหลืองด้วยเช่นกัน ในการทดลองต่อไป เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองจะควบคุมปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ให้ได้ปริมาณที่เท่ากัน คือ 6 นาโนกรัมทุกตัว ควบคู่กับการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ (รูปที่ 4.24) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากุ้งทุกตัวในทุกกลุ่มการทดลองติดไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของไวรัสหัวเหลืองได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

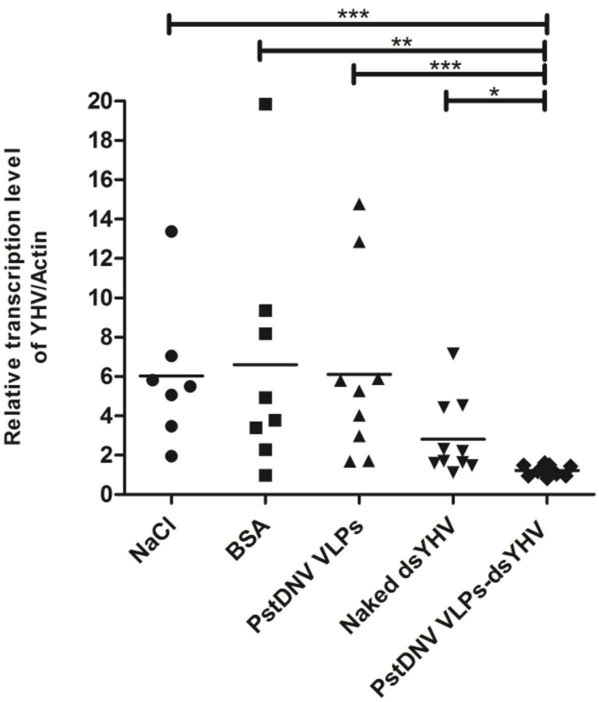


รูปที่ 4.24 ผลการวิเคราะห์ความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง หลังจากฉีดเข้าสู่กุ้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เลน M	:	100 bp DNA Marker (Fermentas, USA)
NaCl	:	กลุ่มที่ฉีดน้ำเกลือ (150 mM NaCl) ควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-8 ตามลำดับ
*Pst*DNV VLPs	:	กลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-9 ตามลำดับ
BSA	:	กลุ่มที่ฉีดโปรตีน BSA ควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-8 ตามลำดับ
Naked dsYHV (สกัดจาก *E.coli* HT115)	:	กลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-10 ตามลำดับ
*Pst*DNV VLPs-dsYHV	:	กลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่มีอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-11 ตามลำดับ
เลน –ve	:	กลุ่มควบคุมลบของปฏิกิริยา PCR (ไม่ใส่ cDNA template)
เลน +ve	:	กลุ่มควบคุมบวกของปฏิกิริยา PCR (ใส่ cDNA ของกุ้งที่ติด YHV
เลน 1-11	:	กุ้งแต่ละตัวของแต่ละกลุ่มการทดลอง (กุ้งขนาด 300 มิลลิกรัม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ดังนั้นจึงเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งไวรัสหัวเหลืองโดยหาค่า Relative expression ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนการแสดงออกของยีนไวรัสหัวเหลืองต่อยีนแอกติน ค่าดังกล่าวจะสามารถบอกประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองได้ ถ้าค่า Relative expression ระหว่างยีนของไวรัสหัวเหลืองและแอกตินมีค่าต่ำ แปรผลการทดลองได้ว่าความสามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งสูง ในทางตรงกันข้ามถ้าค่า Relative expression ระหว่างยีนของไวรัสหัวเหลืองและแอกตินมีค่าสูง แปรผลการทดลองได้ว่าความสามารถยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองต่ำ จากรูปที่ 4.24 ได้นำรูปดังกล่าวมาพิจารณาโดยใช้โปรแกรม Scion Image เพื่อหาความเข้มของแถบดีเอ็นเอระหว่างยีนของไวรัสหัวเหลืองและแอกติน เพื่อหาค่า Relative expression และนำมาวาดกราฟ โดยให้อยู่ในแกน y และ แกน x เป็นกลุ่มการทดลอง ซึ่งผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.25 จากกราฟจะเห็นได้ว่าในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ (NaCl *Pst*DNV และ BSA) ร่วมกับการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ พบว่าค่า Relative expression ในตัวอย่างกุ้งแต่ละตัวของทั้งสามกลุ่มมีค่าระหว่าง 2-10 เป็นส่วนใหญ่ และยังพบว่ากุ้งบางตัวอย่างจะมีค่า Relative expression สูงกว่า 12 และมีเพียง 1 ตัวอย่างที่มีค่าต่ำกว่า 2 (ประมาณ 1) ในขณะที่กลุ่มของกุ้งที่ได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองปริมาณ 6 นาโนกรัมต่อกุ้ง 300 มิลลิกรัม (Naked dsYHV และ *Pst*DNV VLPs-dsYHV) ร่วมกับการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ พบว่าทั้งสองกลุ่มมีค่า Relative expression อยู่ในช่วง 1-6 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่ไม่ได้ทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ นอกจากนี้เมื่อทำการพิจารณาเฉพาะกลุ่มที่มีการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (กลุ่ม Naked dsYHV) และกลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (กลุ่ม *Pst*DNV VLPs -dsYHV) จะพบว่ากลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองจะมีค่า Relative expression ต่ำกว่ากลุ่มที่ฉีดเฉพาะอาร์เอ็นเอสายคู่ (กลุ่ม Naked dsYHV) อย่างมีนัยสำคัญ (<0.05) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่จะมีค่า Relative expression สูง ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการติดไวรัสหัวเหลืองและไม่มีการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสจากการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ และในกลุ่มที่มีการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองมีการติดไวรัสหัวเหลืองและพบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยการทำงานของอาร์เอ็นเอสายคู่เช่นเดียวกัน นอกจากนี้อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองให้ผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองได้ดีกว่าการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4.25 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีนไวรัสหัวเหลืองต่อยีนแอกตินของกลุ่มการทดลองในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง (* แสดงค่า $p < 0.05$ ** แสดงค่า $p < 0.01$ *** แสดงค่า $p < 0.001$)

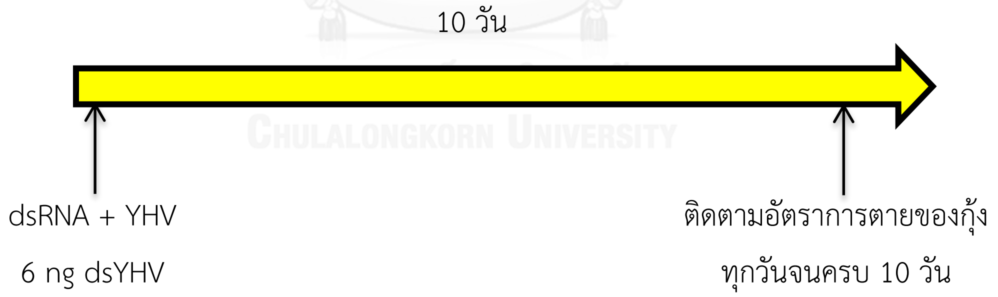
NaCl	:	กลุ่มที่ฉีดน้ำเกลือ (150 mM NaCl) ควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-8 ตามลำดับ
BSA	:	กลุ่มที่ฉีดโปรตีน BSA ควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-8 ตามลำดับ
*Pst*DNV VLPs	:	กลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-9 ตามลำดับ
Naked dsYHV (สกัดจาก *E.coli* HT115)	:	กลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-10 ตามลำดับ
*Pst*DNV VLPs-dsYHV	:	กลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่มีอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองควบคู่กับ การฉีดไวรัสหัวเหลืองตัวที่ 1-11 ตามลำดับ

4.15 การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะเวลา 10 วัน

จากการทดสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลือง พบว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV อาจช่วยในการขนส่งและอาจทำงานเป็นตัวช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในระยะเวลา 10 วัน โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองดังต่อไปนี้

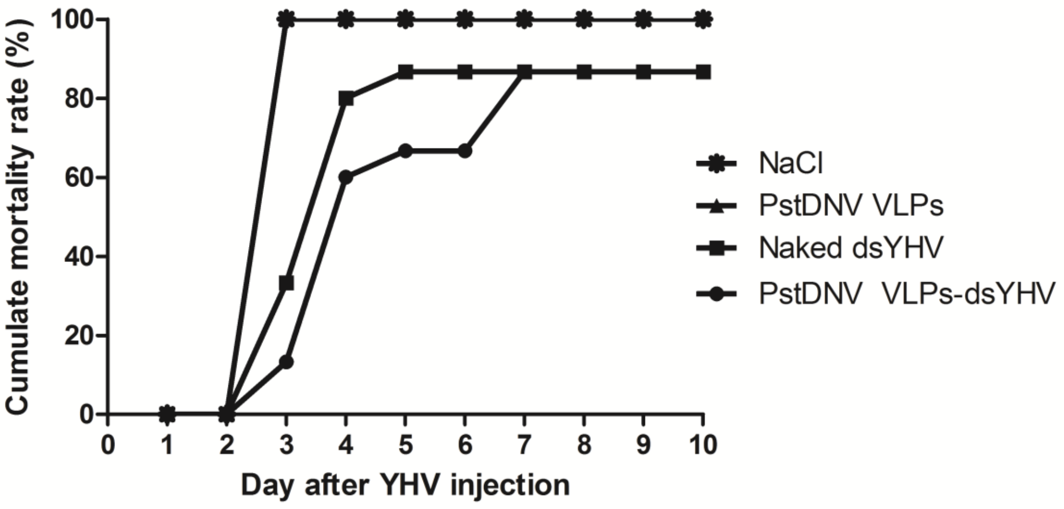
4.15.1 การตรวจสอบอัตราการตายของกุ้งโดยการฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV VLPs-dsYHV ร่วมกับไวรัสหัวเหลือง

ในส่วนของการทดลองนี้จะทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่รวมถึงอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ร่วมกับการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5\text{x}10^{-7}$ ซึ่งกลุ่มที่มีการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองจะฉีดให้มีปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่เท่ากับ 6 นาโนกรัมต่อกุ้ง 300 มิลลิกรัม จากนั้นเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน และติดตามอัตราการตายของกุ้งโดยนับจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละวัน โดยมีแผนภาพการทดลองดังนี้



นำค่าที่ได้มารวมกันเพื่อคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Cumulative mortality) ของกุ้งในแต่ละวันและนำมาวาดกราฟโดยให้แกน x แทนจำนวนวันหลังจากฉีดไวรัสหัวเหลืองส่วนแกน y แทนค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.26 จากผลการทดลองพบว่ากลุ่ม NaCl และกลุ่ม *Pst*DNV VLPs ในช่วงสองวันแรกหลังจากฉีดไวรัสหัวเหลือง ยังไม่พบการตายของกุ้ง หลังจากฉีดไวรัสวันที่ 3 พบว่ากุ้งตาย 100% จากผลการทดลองพบว่าเมื่อฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5\text{x}10^{-7}$ จะทำให้กุ้งตาย 100% ภายในระยะเวลา 3 วันหลังจากได้รับไวรัส ในขณะที่กลุ่ม Naked dsYHV และ กลุ่ม *Pst*DNV VLPs-dsYHV พบว่าเริ่มมีการตายของกุ้งใน

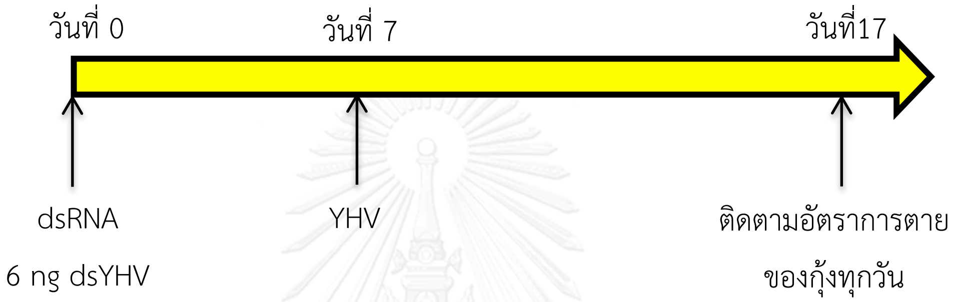
วันที่ 3 หลังจากได้รับไวรัสและมีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมต่ำกว่ากลุ่ม NaCl และกลุ่ม *Pst*DNV VLPs (ประมาณ 15-35%) ทั้งนี้เนื่องจากการทำงานของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองที่กระตุ้นกระบวนการ RNAi ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ทำให้อัตราการตายของกุ้งลดลงและมีค่าอัตราการตายสูงสุดเท่ากับ 80% นอกจากนี้เมื่อทำการพิจารณาเฉพาะ กลุ่ม Naked dsYHV และกลุ่ม *Pst*DNV VLPs - dsYHV พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งลดลงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉีด Naked dsYHV อย่างไรก็ดีเมื่อติดตามจนครบ 10 วัน พบว่ากลุ่ม *Pst*DNV VLPs - dsYHV จะมีอัตราการตายเท่ากับกลุ่มที่ฉีด Naked dsYHV (ประมาณ 80%) ในวันที่ 7 หลังจากได้รับไวรัสหัวเหลือง ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง เมื่อทำการฉีดร่วมกับไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง 5×10^{-7} จะช่วยในการชะลอระยะเวลาการตายของกุ้งให้ช้าลงได้ 20% หลังจากได้รับไวรัสเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ฉีด Naked dsYHV



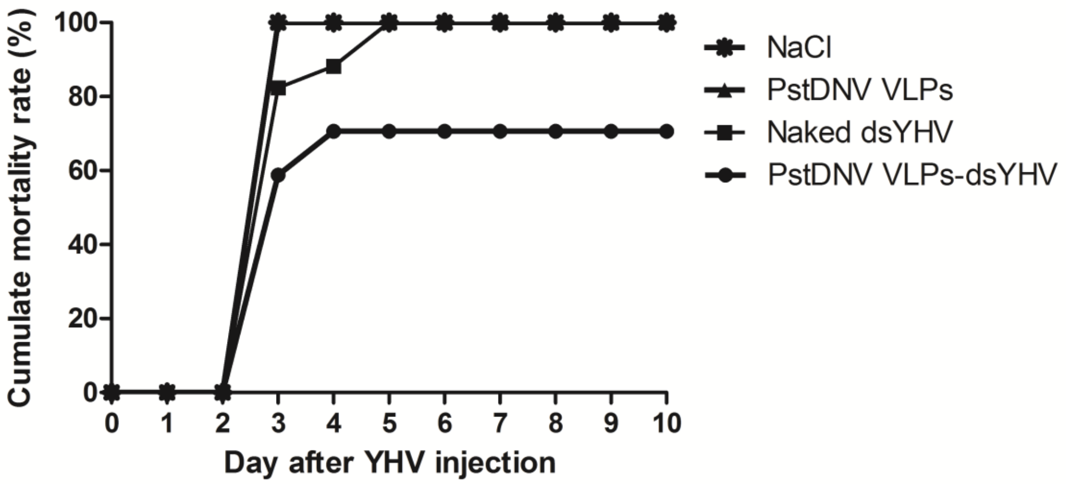
รูปที่ 4.26 กราฟแสดงอัตราการตายสะสมของกุ้งเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะยาวแบบฉีดร่วมกับอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV VLPs-dsYHV คู่กับไวรัสหัวเหลือง

4.15.2 การตรวจสอบอัตราการตายของกุ้งโดยการฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV VLPs-dsYHV ก่อน 7 วันแล้วตามด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลือง

จากการทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองในระยะยาวแบบฉีดร่วมกับไวรัสหัวเหลือง พบว่าไม่สามารถลดอัตราการตายและยืดระยะเวลาการตายของกุ้งให้ช้าลงได้ จึงได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองโดยฉีด Naked dsYHV หรือ *Pst*DNV VLPs-dsYHV ก่อนเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน โดยติดตามอัตราการตายของกุ้งในแต่ละวัน โดยมีแผนภาพการทดลองดังนี้



นำค่าที่ได้มารวมกันเพื่อคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Cumulative mortality) ของกุ้งในแต่ละวันและนำมาวาดกราฟโดยให้แกน x แทนจำนวนวันหลังจากฉีดไวรัสหัวเหลืองส่วนแกน y แทนค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.27 พบว่า กลุ่ม NaCl และกลุ่ม *Pst*DNV VLP ในช่วง 2 วันแรกหลังจากฉีดไวรัสหัวเหลืองยังไม่พบการตายของกุ้ง เมื่อพิจารณาหลังจากฉีดไวรัส เป็นเวลา 3 วัน พบว่ากุ้งตาย 100% ในขณะที่กลุ่ม Naked dsYHV พบการตายของกุ้งในวันที่ 3 หลังจากได้รับไวรัส โดยอัตราการตายอยู่ที่ประมาณ 80% และตาย 100% ในวันที่ 5 หลังจากได้รับไวรัสหัวเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม *Pst*DNV VLPs -dsYHV พบว่าในกลุ่มนี้กุ้งจะมีอัตราการตายประมาณ 65% ในวันที่ 4 หลังจากได้รับไวรัสหัวเหลืองและจะมีอัตราการตายคงที่จนจบการทดลอง ซึ่งจากผลการทดลองทำให้สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ช่วยให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง โดยอาจเนื่องมาจากป้องกันการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองในระยะยาวโดยผ่านกระบวนการ RNAi ซึ่งอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV คงช่วยป้องกันการย่อยสลายของอาร์เอ็นเอสายคู่จากเอนไซม์จากกุ้งและสามารถทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ได้



รูปที่ 4.27 กราฟแสดงอัตราการตายสะสมของกุ้งในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะยาวแบบฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV VLPs - dsYHV ก่อนเป็นเวลา 7 วันตามด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลือง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV มาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว พบแถบดีเอ็นเอประมาณ 1,600 และ 1,000 คู่เบสตามลำดับ สำหรับไวรัส *Pm*DNV สายพันธุ์จากประเทศไทย ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มจะมีขนาดประมาณ 2,454 คู่เบส เมื่อแปรเป็นลำดับกรดอะมิโนจะได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 92 กิโลดาลตัน แต่เมื่อนำไวรัสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 57 และ 54 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจจะเกิดการตัดด้วยเอนไซม์ protease ตรงบริเวณอาร์จินีน (R) ด้านหน้า glycine-rich region ส่งผลให้โปรตีนเปลือกหุ้มมีขนาดประมาณ 57 กิโลดาลตัน (Sukhumsirichart และคณะ, 2006) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้นำส่วนของ mature capsid protein มาใช้ในการเชื่อมเข้าสู่พลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออกของโปรตีน ในขณะที่ไวรัส *Pst*DNV ขนาดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดใกล้เคียงกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอจะมีขนาดประมาณ 990-1,000 คู่เบส (Tang และคณะ, 2003; Robles-Sikisaka และคณะ, 2010; Rai และคณะ, 2012) เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่เปลี่ยนแปลงไปจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่มีการรายงานในฐานข้อมูล (GenBank Accession No. HQ699073) อาจเกิดมาจากการแปรผันทางพันธุกรรมของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่ใช้เป็นแม่แบบ แต่เมื่อพิจารณาถึงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV พบว่ามีเพียงตำแหน่งเดียวที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่แยกได้จากประเทศไทยกับประเทศอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าการแปรผันทางพันธุกรรมของไวรัส *Pst*DNV นั้นค่อนข้างต่ำ (Hsia และคณะ, 2003; Tang และคณะ, 2003) นอกจากนี้ไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม Densovirus พบว่าบริเวณนี้จะมีการแปรผันทางพันธุกรรมน้อยกว่า ORF อื่น ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่ม Densovirus เช่นเดียวกัน จะพบว่ายีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสจะมีความแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่า (Tang และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตามในปีค.ศ. 2010 Robles-Sikisaka และคณะ

ได้ทำการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ในบริเวณทางตอนเหนือ ตอนกลางและตอนใต้ของอ่าวแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ให้ผลตรงข้ามจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าไวรัส *Pst*DNV นั้นมีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ โดยการศึกษาพบว่าไวรัสที่พบในอ่าวแคลิฟอร์เนียนั้นมีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง พบว่ามีอัตราการแปรผันของลำดับเบสประมาณ 1.39×10^{-4} substitution / site / year ซึ่งเป็นอัตราการแปรผันที่สูงมากในไวรัสกลุ่มของ ssDNA เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในกลุ่ม RNA ที่มีอัตราการแปรผันเพียง 10^{-3} substitution / site / year ซึ่งปัจจัยที่มีผลอย่างมากที่ทำให้ผลการศึกษามีความแตกต่างกันเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง

2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV

เมื่อทำการโคลนยีนรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV เข้าสู่พลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออก pET28a และมีส่วนของ Histidine อยู่ในส่วน N-terminal ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Rosetta-gammi โดยการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 mM บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบแถบโปรตีนขนาด 64 และ 37 กิโลดาลตันตามลำดับ ทั้งใน SDS-PAGE และ western blotting analysis ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV เมื่อเกิดการชักนำด้วย IPTG สำหรับโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้โคลนและแสดงออก mature capsid protein ของไวรัสชนิดนี้ ส่วนการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV พบว่าประสบความสำเร็จในการโคลนและแสดงออกเช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการโคลนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV (full length) ที่แยกได้จากประเทศจีน (Hou และคณะ, 2009)

3. การทำให้บริสุทธิ์และการทดสอบการรวมกลุ่มกันของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV เป็นอนุภาคเหมือนของไวรัส

จากผลการทดลองการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 64 กิโลดาลตันและสามารถถูกจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine ได้ จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV ด้วยสารละลาย PCL พบว่าสามารถละลายโปรตีนเปลือกหุ้มในสารละลาย PCL ซึ่งมีองค์ประกอบของ 1% (w/v) SDS ทำหน้าที่เป็นตัวที่ทำโปรตีนให้เสียสภาพและมี 0.1% sarkosyl เป็นตัวช่วยในการพับม้วนของโปรตีนให้มีความถูกต้อง (Schlager และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และตรวจสอบการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัส พบว่าสามารถเกิดการรวมกลุ่มกัน

เป็นอนุภาค เหมือนของไวรัส *Pm*DNV ได้ ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกที่สามารถสร้างอนุภาคเหมือนของไวรัส *Pm*DNV ในระบบการแสดงออกของโปรคาริโอตได้ แม้ว่าจะสามารถทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสได้ อย่างไรก็ตามการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ดังกล่าวเกิดในสภาวะที่ทำโปรตีนให้เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถใช้เป็นตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ได้ จึงได้เปลี่ยนระบบการแสดงออกเป็นโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ซึ่งพบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตันและสามารถถูกจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine เช่นเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบการละลายด้วยสารละลาย ENZhance Lysis Buffer พบว่าสามารถละลายโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ได้บางส่วน ในขณะที่ส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนที่อยู่ในรูปตะกอนเซลล์ (Inclusion bodies) อาจเกิดจากระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณมาก ทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนจนกลายเป็น inclusion bodies (Peternel และ Komel, 2011; Dagar และ Khasa, 2017) นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่ *E.coli* ไม่มีกระบวนการ post-translation modification ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะทำให้โปรตีนมีการพับม้วนที่ถูกต้อง เมื่อขาดกระบวนการดังกล่าว ทำให้โปรตีนเกิดการพับม้วนที่ไม่ถูกต้องและสะสมกันจนกลายเป็น inclusion bodies อยู่ในส่วนตะกอนเซลล์ (Peternel และ Komel, 2011) จึงเกิดผลเสียต่อการวิเคราะห์คุณสมบัติของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ โดยวิธีการที่จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวมีหลายวิธีเช่น 1. การลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น การเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Heme-oxygenase 1 (HO-1) ใน *E. coli* พบว่าเมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลนที่อุณหภูมิ 20 °ซ รีคอมบิแนนท์โปรตีนจะอยู่ในส่วนของน้ำใสมากกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Papaneophytou และ Kontopidis, 2016) 2. การเพิ่มส่วนที่ช่วยในการละลายของโปรตีน ตัวอย่างเช่น การเพิ่มส่วนของ small ubiquitin-like modifier (SUMO) หรือ maltose binding protein (MBP) ในรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพื่อเป็นตัวช่วยในการละลายโปรตีน (Saez และ Vincentelli, 2014) เป็นต้น

การใช้สารละลายที่ช่วยในการละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากตะกอนเซลล์ โดยสารละลาย ENZhance Lysis Buffer เป็นสารละลายที่ได้รับการพัฒนาให้มีความสามารถในการละลายโปรตีนทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์และรา อาศัยหลักการการทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกตัวด้วยสารเคมีในกลุ่มสารลดแรงตึงผิว โดยที่ยังคงมีคุณสมบัติของโปรตีนอยู่ได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารละลาย ENZhance Lysis Buffer สามารถช่วยในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ได้บางส่วน (ประมาณ 40%) แม้ว่าโปรตีนโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ก็ตาม หลังจากทำการทดสอบความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ในสารละลาย ENZhance Lysis Buffer พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถละลายอยู่ในส่วนน้ำใสได้ จึงนำโปรตีนที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography พบว่าสามารถทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ให้บริสุทธิ์ได้

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ได้ โดยที่โครงสร้างของอนุภาคเหมือนไวรัสนั้นคล้ายคลึงกับไวรัสที่พบในธรรมชาติ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเติมส่วนของ Histidine เข้าไปไม่ส่งผลต่อการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hou และคณะ (2009) ที่ทำการเติมส่วนของ Histidine ในบริเวณส่วนของ N-terminal ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV พบว่าไม่ส่งผลต่อการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัสเช่นเดียวกัน การเติมส่วนของ Histidine เป็นเพียงกรดอะมิโนต่อกันเพียง 6 กรดอะมิโนที่มีขนาดเล็ก และไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนนั้น (Loughran และ Walls, 2011) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัสอาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยอาจหันส่วนที่เป็น Histidine ที่อยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีนเปลือกหุ้มออกด้านนอก ซึ่งเหตุการณ์นี้พบได้ในไวรัสกลุ่ม Parvovirus ชนิดอื่นด้วย (Parrish, 2010; Tu และคณะ, 2015) ทำให้สามารถเข้าจับกับ Nickel Affinity Chromatography ได้ ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้จะทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์และใช้เวลาน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ

4. การแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส IHHNV และอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

โดยทั่วไปการขนส่งหรือห่อหุ้มยีนบำบัด (Gene therapy) ด้วยอนุภาคเหมือนของไวรัส โดยส่วนใหญ่จะใช้วิธี *in vitro* กล่าวคือจะต้องมีการ disassembly และ reassembly อนุภาคเหมือนของไวรัส ด้วยวิธีการต่าง ๆ อย่างเช่นการใช้สารเคมี EGTA ผสมกับ DTT เป็นสารที่ทำให้เกิดกระบวนการ disassembly ในอนุภาคเหมือนของไวรัส *Mr*NV แล้วจึงเติมพลาสมิดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว และทำการเติม $CaCl_2$ เข้าไป เนื่องจากไวรัสชนิดนี้ต้องการ Ca^{2+} ในการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัส (Jariyapong และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีไวรัสในกลุ่มของ Polyomaviruses ที่ใช้สารเคมีดังกล่าวในการ disassembly และ re-assembly เช่นเดียวกัน (Teunissen และคณะ, 2013) หรืออาจใช้คุณสมบัติของไวรัสในการถอดเปลือกหุ้มของไวรัส โดยทำการเปลี่ยนค่า pH ที่สามารถทำให้เกิดสภาวะ disassembly โดย cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)-like particle ซึ่งเป็นไวรัสพืช อาศัยการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในการเกิดสภาวะ disassembly ที่ค่า pH 7.5 และมี $CaCl_2$ ในระบบ นอกจากนี้ยังสามารถเกิดกระบวนการ re-assembly โดยเปลี่ยนสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 5 จะทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัสดังเดิม (Ma และคณะ, 2012) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีความยุ่งยาก หลาย

ขั้นตอนและต้องหาวิธีการที่เหมาะสมต่อการ disassembly และ reassembly ถ้าใช้วิธีการที่ไม่เหมาะสมโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสจะถูกทำลายจนเสียสภาพ ส่งผลให้ไม่เกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนของไวรัส

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV จะพบว่ามีโครงสร้างที่เป็นแบบ antiparallel β-barrel จำนวน 8 เส้น เรียกว่า jellyroll ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไวรัสในกลุ่ม Parvovirus และจะพบพันธะ inter-disulfide ไม่พบพันธะ intra-disulfide (Hou และคณะ, 2009) ทำให้การค้นหาสารเคมีที่เหมาะสมต่อการ disassembly โดยที่ไม่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลือกหุ้มเสียสภาพนั้นจึงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีการแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV กับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองภายในเซลล์แบคทีเรียเดียวกัน ซึ่งมีการศึกษาพบว่าการแสดงออกร่วมกันระหว่างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสและพลาสมิดที่ผลิตยีนบำบัดสามารถห่อหุ้มยีนบำบัดได้ ยกตัวอย่างเช่น อนุภาคเหมือนไวรัสในกลุ่ม Polyomaviruses สามารถใช้วิธีการนี้ในการห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (Chen และคณะ, 2010; Teunissen และคณะ, 2013; Fang และคณะ, 2015; Chao และคณะ, 2016)

การสร้างเซลล์คอมพีเทนต์จากรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มและทรานสฟอร์มพลาสมิดที่สร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเข้าไปเป็นการแสดงออกทั้งในส่วนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มและอาร์เอ็นเอสายคู่ จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และตรวจสอบการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสและอาร์เอ็นเอสายคู่ จากผลการทดลองการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าสามารถทำโปรตีนเปลือกหุ้มให้บริสุทธิ์ได้และเกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคเหมือนไวรัสและเมื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่จากกลุ่มของอนุภาคเหมือนของไวรัส พบอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (แต่ไม่มีขนาด 400 คู่เบส) ได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของกลุ่มของอนุภาคเหมือนไวรัสแล้วพบว่าเกิดจากการรวมกลุ่มกันของอนุภาคเหมือนไวรัสแต่ละอนุภาคมารวมตัวกัน อาจมีอาร์เอ็นเอสายคู่เป็นตัวประสาน ซึ่งอาจเกิดจากการที่โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสหันส่วนของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกออกด้านนอก เพื่อให้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่เป็นประจุลบสามารถเข้าจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสได้ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นกับอนุภาคเหมือนไวรัสพืช CCMV (Cowpea Chlorotic Mottle virus) พบว่าเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ โดยเกิดจากอนุภาคเหมือนของไวรัสแต่ละอนุภาคมารวมกลุ่มกันและมีอาร์เอ็นเอเป็นตัวประสาน (Cadena-Nava และคณะ, 2012) จากเหตุผลดังกล่าวอาจมีความเป็นไปได้ว่าอนุภาคเหมือนของไวรัส *Pst*DNV นี้น่าจะเกิดเหตุการณ์แบบเดียวกันในการห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง

5. การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนของไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

ก่อนที่ทำการทดสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนของไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ต้องทำการทดสอบปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เหมาะสมในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ใช้ในการทดลองนี้ ($5x10^{-7}$) พบว่าเมื่อใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง 300 นาโนกรัมต่อกุ้ง 300 มิลลิกรัม ให้ผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสประมาณ 50% ในขณะที่เมื่อลดปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองให้เหลือ 30 นาโนกรัมต่อกุ้ง 300 มิลลิกรัม พบว่าให้ผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสประมาณ 42% แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองนั้น ปัจจัยที่มีผลสำคัญในการยับยั้งคือปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ โดยมีการศึกษาการยับยั้งไวรัสในกุ้งด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ พบว่าการยับยั้งจะเป็นแบบ Dose-dependent (Robalino และคณะ, 2005) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yodmuang และคณะ (2006) ที่ทำศึกษาการลดปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองลง การยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะลดลงเช่นกัน และจากผลการทดลองพบว่าการใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ปริมาณ 6 นาโนกรัมต่อกุ้ง 300 มิลลิกรัม เมื่อฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ เป็นปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เหมาะสมในการทำให้กุ้งเกิดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในขณะเดียวกันยังเห็นการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ดังนั้นปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่นี้เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

เมื่อได้ปริมาณของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เหมาะสมต่อการฉีดกุ้งแล้ว จึงได้ทำการฉีดกุ้งเพื่อทำการทดสอบความสามารถในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (กลุ่ม NaCl, *Pst*DNV VLPs และ BSA) และกลุ่ม Naked dsYHV ควบคู่ไปกับการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง $5x10^{-7}$ ซึ่งพบว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองให้ผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมลบและ Naked dsYHV จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้อนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ควบคู่กับอาร์เอ็นเอสายคู่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เพียงอย่างเดียวในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า (ตารางที่ 5.1) ที่พบว่าการใช้ตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่สามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในกุ้งได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เพียงอย่างเดียว จากนั้นจึงนำอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองมาใช้ในการศึกษาการตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะยาวต่อไป

ตารางที่ 5.1 แสดงชนิดของพาหะที่ใช้ในการขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ในการป้องกันการติดไวรัสในกุ้ง

ชนิดของตัวขนส่ง	ไวรัสที่จำเพาะ	อาร์เอ็นเอสายคู่ที่ใช้ในการขนส่ง	อ้างอิง
Non-viral vectors			
Chitosan	YHV	dsRNA YHV-RdRp	(Theerawanitchpan และคณะ, 2012)
Chitosan-dextran sulfate nanocapsule	Monodon baculovirus	dsRNA	(Ramesh Kumar และคณะ, 2016)
Cationic liposome	YHV	dsRNA-YHV protease	(Apiratikul และคณะ, 2013)
Cholesterol-based cationic liposome	YHV	dsRNA-YHV protease	(Sanitt และคณะ, 2016)
Viral vectors			
*Mr*NV-like particle	WSSV	dsRNA-VP28	(Jariyapong และคณะ, 2015)
Baculovirus	WSSV	dsRNA-rr2	(Rattanarojpong และคณะ, 2016)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6. การตรวจสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะเวลา 10 วัน

หลังจากที่ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งแล้ว พบว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เพียงอย่างเดียว (แบบ Co-injection) ต่อมาจึงได้ทำการทดสอบความสามารถของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระยะยาว โดยทำการทดสอบทั้งแบบที่เป็นการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ควบคู่ไปกับการฉีดไวรัสหัวเหลือง (Co-injection) และแบบที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าไปก่อนเป็นเวลา 7 วัน ตามด้วยฉีดไวรัสหัวเหลือง ในกรณีที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ควบคู่ไปกับการฉีดไวรัสหัวเหลือง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมลบ (กลุ่ม NaCl, *Pst*DNV VLPs) และกลุ่มของ Naked dsYHV และกลุ่ม *Pst*DNV-dsYHV VLPs ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มควบคุมลบ (กลุ่ม NaCl, *Pst*DNV VLPs) กุ้งจะมีอัตราการตาย 100% ตั้งแต่วันที่ 3 จนกระทั่งครบจำนวนวันที่ทำการทดลอง ในขณะที่กลุ่ม Naked dsYHV จะมีอัตราการตายของกุ้งประมาณ 80% เมื่อครบ 4 วัน หลังจากฉีดไวรัสหัวเหลือง เมื่อพิจารณาในกลุ่มของอนุภาคเหมือนของไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ พบว่าให้ผลอัตราการตายของกุ้งประมาณ 60% ในวันที่ 4 และมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นจนมีอัตราการตายเท่ากับ 80% เมื่อเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 วัน การยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่มีลักษณะเป็น delay inhibition

จากการศึกษาของ Yodmuang และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง โดยฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเข้าไปก่อน เป็นเวลา 1-5 วัน ตามด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลืองและทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT-PCR พบว่าเมื่อทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองเข้าไปในกุ้งก่อนเป็นเวลา 5 วันตามด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลือง เริ่มพบการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลือง ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาร์เอ็นเอสายคู่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ภายในตัวกุ้ง ดังนั้นในการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคเหมือนไวรัสในการป้องกันการทำลายของอาร์เอ็นเอสายคู่จากเอนไซม์ภายในตัวกุ้ง จึงทำการฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่เข้าไปก่อนเป็นเวลา 7 วัน ตามด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเจือจาง 5×10^{-7} เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (กลุ่ม NaCl, กลุ่ม *Pst*DNV VLPs) และกลุ่ม Naked dsYHV พบว่าในกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ฉีด Naked dsYHV พบว่าเมื่อเลี้ยงต่อหลังจากฉีดไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 10 วัน กุ้งมีอัตราการตาย 100% ในขณะที่กลุ่มที่ฉีดอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง พบว่ากุ้งมีอัตราการตายเพียงแค่ประมาณ 65% แสดงให้เห็นว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV สามารถป้องกันอาร์เอ็นเอสายคู่จากการทำลายของเอนไซม์

ภายในตัวกุ้งได้ ทำให้การทำงานของอาร์เอ็นเอสายคู่ในการยับยั้งไวรัสหัวเหลืองมีประสิทธิภาพและอยู่ได้นานกว่าการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับคุณสมบัติของอนุภาคเหมือนไวรัสในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาอาร์เอ็นเอสายคู่ เนื่องจากมีการนำเข้าแบบจำเพาะและสามารถป้องกันของ nucleic acid ที่ห่อหุ้มภายในอนุภาคเหมือนไวรัสจากเอนไซม์ nuclease จาก host cell ได้ (Teunissen และคณะ, 2013; Chang และคณะ, 2016) ดังนั้นจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV อาจสามารถใช้เป็นตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองและป้องกันอาร์เอ็นเอสายคู่จากการทำลายของเอนไซม์ nuclease เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในตัวกุ้งได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV และ *Pst*DNV สามารถโคลนเข้าสู่ pET28aและแสดงออกในระบบการแสดงออกโพรคาริโอต ด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV มีขนาดประมาณ 64 กิโลดาลตันและส่วนใหญ่มีการแสดงออกอยู่ในส่วนตะกอนเซลล์ เมื่อนำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pm*DNV มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography พบว่าสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ และสามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pm*DNV แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากมีการแสดงออกภายในส่วนของตะกอนเซลล์ ซึ่งต้องทำโปรตีนให้เสียสภาพก่อนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้

3. รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV มีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตันและโปรตีนดังกล่าวสามารถละลายอยู่ในส่วนน้ำใส เมื่อละลายในสารละลาย Enzhance lysis Buffer และมีบางส่วนที่ยังคงมีการแสดงออกภายในตะกอนเซลล์ รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV สามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography และสามารถเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV

4.รีคอมบิแนนท์โคลนที่แสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน *Pst*DNV สามารถแสดงออกร่วมกับพลาสมิดที่แสดงออกอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองได้ ภายในรีคอมบิแนนท์โคลนเดียวกัน

5. รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส *Pst*DNV ที่มีการแสดงออกร่วมกับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง สามารถทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Affinity Chromatography พบว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV เกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็นกลุ่มของอนุภาคเหมือนไวรัสขนาดใหญ่ประมาณ 500 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6. กลุ่มของอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV ขนาดใหญ่ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งไวรัสหัวเหลืองได้ตามสภาวะที่ทดลองในงานวิจัยนี้ โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 6 นาโนกรัมต่อกุ้ง 300 มิลลิกรัมและสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดไวรัสหัวเหลือง นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการย่อยสลายของอาร์เอ็นเอสายคู่จากเอนไซม์จากกุ้ง ทำให้การทำงานของอาร์เอ็นเอสายคู่อยู่ได้นานกว่าการใช้อาร์เอ็นเอสายคู่เพียงอย่างเดียว สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคเหมือนไวรัส *Pst*DNV สามารถใช้เป็นตัวขนส่งอาร์เอ็นเอสายคู่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองภายในกุ้งได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Ammara U., Mansoor S., Saeed M., Amin I., Briddon R. W. and Al-Sadi A. M. (2015) RNA interference-based resistance in transgenic tomato plants against Tomato yellow leaf curl virus-Oman (TYLCV-OM) and its associated betasatellite. *Virology Journal* **12**: 38.

Apiratikul N., Yingyongnarongkul B. and Assavalapsakul W. (2013) Highly efficient double-stranded RNA transfection of penaeid shrimp using cationic liposomes. *Aquaculture Research* **45**: 106-112.

Assavalapsakul W., Smith D. R. and Panyim S. (2006) Identification and characterization of a *Penaeus monodon* lymphoid cell-expressed receptor for the yellow head virus. *Journal of Virology* **80**: 262-269.

Assavalapsakul W., Chinnirunvong W. and Panyim S. (2009) Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* **84**: 167-171.

Assavalapsakul W., Kiem H. K., Smith D. R. and Panyim S. (2014) Silencing of *Pm*YPR65 receptor prevents yellow head virus infection in *Penaeus monodon*. *Virus Research* **189**: 133-135.

Attasart P., Namramoon O., Kongphom U., Chimwai C. and Panyim S. (2013) Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. *Virus Research* **171**: 252-256.

Bolhassani A., Shirbaghaee Z., Agi E. and Davoudi N. (2015) VLP production in *Leishmania tarentolae*: A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. *Protein Expression and Purification* **116**: 7-11.

Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J., Direkbusarakom S., Aekpanithanpong U. and Chantanachooklin C. (1993) Non-occluded Baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) *Gyobyo Kenkyu* **28**: 103-109.

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**: 66-72.

Cadena-Nava R. D., Comas-Garcia M., Garmann R. F., Rao A. L. N., Knobler C. M. and Gelbart W. M. (2012) Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *Journal of Virology* **86**: 3318-3326.

Catrice E. V. B. and Sainsbury F. (2015) Assembly and purification of polyomavirus-like particles from plants. *Molecular Biotechnology* **57**: 904-913.

Chang C. F., Su M. S., Chen H. Y. and Liao I. C. (2003) Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* **15**: 297-310.

Chang L., Wang G., Jia T., Zhang L., Li Y., Han Y., Zhang K., Lin G., Zhang R. and Li J. (2016) Armored long non-coding RNA MEG3 targeting EGFR based on recombinant MS2 bacteriophage virus-like particles against hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**: 23988-24004.

Chantanachooklin C., Boonyaratpalin S., Kasornchandra J., Direkbusarakom S., Ekpanithanpong U., Supamattaya K., Sriurairatana S. and Flegel T. W. (1993) Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head disease. *Diseases of Aquatic Organisms* **17**: 145-157.

Chao C. N., Lin M. C., Fang C. Y., Chen P. L., Chang D., Shen C. H. and Wang M. (2016) Gene therapy for human lung adenocarcinoma using a suicide gene driven by a lung-specific promoter delivered by JC virus-like particles. *PloS one* **11**: e0157865.

Chen L. S., Wang M., Ou W. C., Fung C. Y., Chen P. L., Chang C. F., Huang W. S., Wang J. Y., Lin P. Y. and Chang D. (2010) Efficient gene transfer using the human JC virus-like particle that inhibits human colon adenocarcinoma growth in a nude mouse model. *Gene Therapy* **17**: 1033-1041.

Chimwai C., Tongboonsong P., Namramoon O., Panyim S. and Attasart P. (2016) A formulated double-stranded RNA diet for reducing *Penaeus monodon* densovirus infection in black tiger shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* **134**: 23-26.

Cowley J. A., Dimmock C. M., Wongteerasupaya C., Boonsaeng V., Panyim S. and Walker P. J. (1999) Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**: 153-157.

Dagar V. K. and Khasa Y. P. (2017) High-level expression and efficient refolding of therapeutically important recombinant human Interleukin-3 (hIL-3) in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* **131**: 51-59.

Dhar A. K., Robles-Sikisaka R., Saksmerprome V. and Lakshman D. K. (2014) Biology, genome organization, and evolution of parvoviruses in marine shrimp. *Advances in Virus Research* **89**: 85-139.

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 electron microscopy. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **33**: 121-127.

Fang C. Y., Tsai Y. D., Lin M. C., Wang M., Chen P. L., Chao C. N., Huang Y. L., Chang D. and Shen C. H. (2015) Inhibition of human bladder cancer growth by a suicide gene delivered by JC polyomavirus virus-like particles in a mouse model. *The Journal of Urology* **193**: 2100-2106.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Flegel T. W. (2006) Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* **258**: 1-33.

Flegel T. W. (2012) Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**: 166-173.

Goh Z. H., Tan S. G., Bhassu S. and Tan W. S. (2011) Virus-like particles of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus produced in bacteria. *Journal of Virological Methods* **175**: 74-79.

Guo H., Zhu J., Tan Y., Li C., Chen Z., Sun S. and Liu G. (2016) Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Research* **131**: 85-91.

Hammond S. M. (2005) Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters* **579**: 5822-5829.

Hanapi U. F., Yong C. Y., Goh Z. H., Alitheen N. B., Yeap S. K. and Tan W. S. (2017) Tracking the virus-like particles of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in insect cells. *PeerJ* **5**: e2947.

Hou L., Wu H., Xu L. and Yang F. (2009) Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Archives of Virology* **154**: 547-553.

Hsia H. L., Chen L. L., Peng S. E., Yu H. T., Lo C. F. and Kou G. H. (2003) Comparison of genomic sequence of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) between Taiwan and other geographical isolates. *Fish Pathology* **38**: 177-179.

Jariyapong P., Chotwiwatthanakun C., Direkbusarakom S., Hirono I., Wuthisuthimethavee S. and Weerachatyanukul W. (2015) Delivery of double stranded RNA by *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus-like particles to protect shrimp from white spot syndrome virus. *Aquaculture* **435**: 86-91.

Jitrapakdee S., Unajak S., Sittidilokratna N., Hodgson R. A., 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**: 863-873.

Kessans S. A., Linhart M. D., Meador L. R., Kilbourne J., Hogue B. G., Fromme P., Matoba N. and Mor T. S. (2016) Immunological Characterization of Plant-Based HIV-1 Gag/Dgp41 Virus-Like Particles. *PloS one* **11**: e0151842.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Konakalla N. C., Kaldis A., Berbati M., Masarapu H. and Voloudakis A. E. (2016) Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco. *Planta* **244**: 961-969.

Kueh C. L., Yong C. Y., Masoomi Dezfooli S., Bhassu S., Tan S. G. and Tan W. S. (2017) Virus-like particle of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus produced in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells is distinctive from that produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **33**: 549-557.

Le Mauff F., Mercier G., Chan P., Burel C., Vaudry D., Bardor M., Vézina L. P., Couture M., Lerouge P. and Landry N. (2015) Biochemical composition of haemagglutinin-based influenza virus-like particle vaccine produced by transient expression in tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal* **13**: 717-725.

Lee H. J., Kim J. Y., Kye S. J., Seul H. J., Jung S. C. and Choi K. S. (2015) Efficient self-assembly and protective efficacy of infectious bursal disease virus-like particles by a recombinant baculovirus co-expressing precursor polyprotein and VP4. *Virology Journal* **12**: 177.

Lee J. M., Yoon T. J. and Cho Y. S. (2013) Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy. *BioMed Research International* **2013**: 10.

Liew M. W., Rajendran A. and Middelberg A. P. (2010) Microbial production of virus-like particle vaccine protein at gram-per-litre levels. *Journal of Biotechnology* **150**: 224-231.

Lightner D. V., Redman R. M., Pantoja C. R., Tang K. F., Noble B. L., Schofield P., Mohney L. L., Nunan L. M. and Navarro S. A. (2012) Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**: 174-183.

Loughran S. T. and Walls D. (2011) *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. Humana Press.

Ma Y., Nolte R. J. M. and Cornelissen J. J. L. M. (2012) Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**: 811-825.

Masiero M., Nardo G., Indraccolo S. and Favaro E. (2007) RNA interference: Implications for cancer treatment. *Molecular Aspects of Medicine* **28**: 143-166.

McMillen C. M., Beezhold D. H., Blachere F. M., Othumpangat S., Kashon M. L. and Noti J. D. (2016) Inhibition of influenza A virus matrix and nonstructural gene expression using RNA interference. *Virology* **497**: 171-184.

Medina-Hernandez D., Rivera-Bustamante R. F., Tenllado F. and Holguin-Pena R. J. (2013) Effects and effectiveness of two RNAi constructs for resistance to Pepper golden mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Viruses* **5**: 2931-2945.

Miele E., Spinelli G. P., Miele E., Di Fabrizio E., Ferretti E., Tomao S. and Gulino A. (2012) Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine* **7**: 3637-3657.

Napoli C., Lemieux C. and Jorgensen R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. *The Plant Cell* **2**: 279-289.

Ntui V. O., Kong K., Khan R. S., Igawa T., Janavi G. J., Rabindran R., Nakamura I. and Mii M. (2015) Resistance to Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in genetically engineered cassava cv. KU50 through RNA silencing. *PloS one* **10**: e0120551.

Papaneophytou C. and Kontopidis G. (2016) A comparison of statistical approaches used for the optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **120**: 126-137.

Parrish C. R. (2010) Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **343**: 149-176.

Peternel Š. and Komel R. (2011) Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 8275-8287.

Petrov N., Stoyanova M., Andonova R. and Teneva A. (2015) Induction of resistance to potato virus Y strain NTN in potato plants through RNAi. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **29**: 21-26.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Plummer E. M. and Manchester M. (2011) Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology* **3**: 174-196.

Rai P., Safeena M. P., Krabsetsve K., La Fauce K., Owens L. and Karunasagar I. (2012) Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Indian Journal of Virology* **23**: 203-214.

Rajeshkumar S., Venkatesan C., Sarathi M., Sarathbabu V., Thomas J., Anver Basha K. and Sahul Hameed A. S. (2009) Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish and Shellfish Immunology* **26**: 429-437.

Ramesh Kumar D., Elumalai R., Raichur A. M., Sanjuktha M., Rajan J. J., Alavandi S. V., Vijayan K. K., Poornima M. and Santiago T. C. (2016) Development of antiviral gene therapy for Monodon baculovirus using dsRNA loaded chitosan-dextran sulfate nanocapsule delivery system in *Penaeus monodon* post-larvae. *Antiviral Research* **131**: 124-130.

Rattanarojpong T., Khankaew S., Khunrae P., Vanichviriyakit R. and Poomputsa K. (2016) Recombinant baculovirus mediates dsRNA specific to rr2 delivery and its protective efficacy against WSSV infection. *Journal of Biotechnology* **229**: 44-52.

Riley M. K. and Vermerris W. (2017) Recent advances in nanomaterials for gene delivery—a review. *Nanomaterials* **7**: 94.

Robalino J., Bartlett T., Shepard E., Prior S., Jaramillo G., Scura E., Chapman R. W., Gross P. S., Browdy C. L. and Warr G. W. (2005) Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *Journal of Virology* **79**: 13561-13571.

Robles-Sikisaka R., Bohonak A. J., McClenaghan Jr L. R. and Dhar A. K. (2010) Genetic signature of rapid IHHNV (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild Penaeus shrimp populations. *PloS one* **5**: e11799.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Rout N., Kumar S., Jaganmohan S. and Murugan V. (2007) DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* **25**: 2778-2786.

Saez N. J. and Vincentelli R. (2014) High-throughput expression screening and purification of recombinant proteins in *E. coli*. *Structural Genomics: General Applications,*(Chen YW, ed.) p.^pp. 33-53. Humana Press, Totowa, NJ.

Safeena M. P., Rai P. and Karunasagar I. (2012) Molecular biology and epidemiology of Hepatopancreatic parvovirus of Penaeid shrimp. *Indian Journal of Virology* **23**: 191-202.

Saksmerprome V., Puiprom O., Noonin C. and Flegel T. W. (2010) Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture* **298**: 190-193.

Sanitt P., Attasart P. and Panyim S. (2014) Protection of yellow head virus infection in shrimp by feeding of bacteria expressing dsRNAs. *Journal of Biotechnology* **179**: 26-31.

Sanitt P., Apiratikul N., Niyomtham N., Yingyongnarongkul B. E., Assavalapsakul W., Panyim S. and Udomkit A. (2016) Cholesterol-based cationic liposome increases dsRNA protection of yellow head virus infection in *Penaeus vannamei*. *Journal of Biotechnology* **228**: 95-102.

Sanjuktha M., Stalin Raj V., Aravindan K., Alavandi S. V., Poornima M. and Santiago T. C. (2012) Comparative efficacy of double-stranded RNAs targeting WSSV structural and nonstructural genes in controlling viral multiplication in *Penaeus monodon*. *Archives of Virology* **157**: 993-998.

Schlager B., Straessle A. and Hafen E. (2012) Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnology* **12**: 95.

Shen T., Liu K., Miao D., Cao R. and Chen P. (2014) Effective inhibition of Japanese encephalitis virus replication by shRNAs targeting various viral genes *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **454**: 48-59.

Sittidilokratna N., Dangtip S., Cowley J. A. and Walker P. J. (2008) RNA transcription analysis and completion of the genome sequence of yellow head nidovirus. *Virus Research* **136**: 157-165.

Stoppani E., Bassi I., Dotti S., Lizier M., Ferrari M. and Lucchini F. (2015) Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits in vitro replication of different Influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral Research* **120**: 16-22.

Sukhumsirichart W., Attasart P., Boonsaeng V. and Panyim S. (2006) Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. *Virology* **346**: 266-277.

Syed M. S. and Kwang J. (2011) Oral vaccination of baculovirus-expressed VP28 displays enhanced protection against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *PloS one* **6**: e26428.

Tang K. F. J., Poulos B. T., Wang J., Redman R. M., Shih H. H. and Lightner D. V. (2003) Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of Aquatic Organisms* **53**: 91-99.

Teunissen E. A., de Raad M. and Mastrobattista E. (2013) Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *Journal of Controlled Release* **172**: 305-321.

Theerawanitchpan G., Saengkrit N., Sajomsang W., Gonil P., Ruktanonchai U., Saesoo S., Flegel T. W. and Saksmerprome V. (2012) Chitosan and its quaternized derivative as effective long dsRNA carriers targeting shrimp virus in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Journal of Biotechnology* **160**: 97-104.

Tirasophon W., Roshorm Y. and Panyim S. (2005) Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochemical Biophysical Research Communications* **334**: 102-107.

Tu M., Liu F., Chen S., Wang M. and Cheng A. (2015) Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology journal* **12**: 114.

Wang X., Xiao X., Zhao M., *et al.* (2016) EV71 virus-like particles produced by co-expression of capsid proteins in yeast cells elicit humoral protective response against EV71 lethal challenge. *BMC Research Notes* **9**: 42.

Wei Y. W., Fan D. D. and Chen J. (2015) Development of an overlapping PCR method to clone the full genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *Journal of Virological Methods* **224**: 16-19.

Wi G. R., Hwang J. Y., Kwon M. G., Kim H. J., Kang H. A. and Kim H. J. (2015) Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Veterinary Microbiology* **177**: 214-218.

Wongteerasupaya C., Sriurairatana S., Vickers J. E., Akrajamorn A., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajorn A., Withyachumnarnkul B. and Flegel T. W. (1995) Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus *Diseases of Aquatic Organisms* **22**: 45-50.

Wu Z. W., Chien C. T., Liu C. Y., Yan J. Y. and Lin S. Y. (2012) Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. *Journal of Drug Targeting* **20**: 551-560.

Yasmeen A., Kiani S., Butt A., *et al.* (2016) Amplicon-based RNA interference targeting V2 gene of cotton leaf curl kokhran virus-Burewala strain can provide resistance in transgenic cotton plants. *Molecular Biotechnology* **58**: 807-820.

Yin H., Kanasty R. L., Eltoukhy A. A., Vegas A. J., Dorkin J. R. and Anderson D. G. (2014) Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics* **15**: 541-555.

Yodmuang S., Tirasophon W., Roshorm Y., Chinnirunvong W. and Panyim S. (2006) YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**: 351-356.

Yong C. Y., Yeap S. K., Goh Z. H., Ho K. L., Omar A. R. and Tan W. S. (2015) Induction of humoral and cell-mediated immune responses by hepatitis B virus epitope displayed on the virus-like particles of prawn nodavirus. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 882-889.

Zahin M., Joh J., Khanal S., Husk A., Mason H., Warzecha H., Ghim S. J., Miller D. M., Matoba N. and Jenson A. B. (2016) Scalable production of HPV16 L1 protein and VLPs from tobacco leaves. *PloS one* **11**: e0160995.

Zdanowicz M. and Chroboczek J. (2016) Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochemica Polonica* **63**: 469-473.

Zeltins A. (2013) Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular Biotechnology* **53**: 92-107.

Zhang C., Ku Z., Liu Q., Wang X., Chen T., Ye X., Li D., Jin X. and Huang Z. (2015) High-yield production of recombinant virus-like particles of enterovirus 71 in *Pichia pastoris* and their protective efficacy against oral viral challenge in mice. *Vaccine* **33**: 2335-2341.

Zhao Y. C., Zhang L., Feng S. S.*, et al.* (2016) Efficient delivery of Notch1 siRNA to SKOV3 cells by cationic cholesterol derivative-based liposome. *International Journal of Nanomedicine* **11**: 5485-5496.

Zhou Y., Shen C., Zhang C., Zhang W., Wang L., Lan K., Liu Q. and Huang Z. (2016) Yeast-produced recombinant virus-like particles of coxsackievirus A6 elicited protective antibodies in mice. *Antiviral Research* **132**: 165-169.

เอนกพร เกษมสุข (2558) การส่งออกกุ้งสด แช่เย็น แช่แข็งและแปรรูป (ไม่รวมกุ้งกระป๋อง). กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB Broth)

ทริปโตน (Tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.2 จากนั้นเติมน้ำกรองให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. บัฟเฟอร์ 50x Tris-acetate (TAE)

Trisma base	121	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

4. 6x DNA Loading dye

Bromphenolblue	0.25	%
Glycerol	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

5. 4x SDS Sample Buffer

Glycerol (87%)	2.29	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl, pH 6.8	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มิลลิลิตร
Bromphenolblue	0.001	กรัม
10% (w/v) SDS	4	มิลลิลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-mercaptone ในอัตราส่วนสารละลาย 950 ไมโครลิตรต่อ 50 ไมโครลิตร 2-mercaptone

6. บัฟเฟอร์ 1x PBS

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.44	กรัม
KH_2PO_4	0.24	กรัม

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกรอง 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7. Staining solution

Comassie brilliant blue R250	2	กรัม
เอทานอล	450	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. Destaining solution

เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. Fixing solution

เมทานอล	10	%
กรดอะซิติก	10	%
กลีเซอรอล	5	%

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

10. Transfer Buffer

Trisma base	5.08	กรัม
ไกลซีน	2.9	กรัม
SDS	0.37	กรัม

เติมน้ำกรองให้ครบ 800 มิลลิลิตร ก่อนใช้เติมเมทานอล 200 มิลลิลิตร

11. Blocking solution

PBST	100	มิลลิลิตร
Skim milk	5	กรัม

12. PBST

1x PBS	500	มิลลิลิตร
Tween 20	0.05	%

13. สับสเตรทสำหรับเอนไซม์ Horse-radish peroxidase

Solution A

100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.5	2.5	มิลลิลิตร
90 มิลลิโมลาร์ Coumaric acid	11	ไมโครลิตร
250 มิลลิโมลาร์ Luminal	25	ไมโครลิตร

Solution B

100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.5	2.5	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	1.5	ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

14. 0.1% SDS-PBS

SDS	0.1	กรัม
1x PBS	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายรพี สินเนืองนอง เกิดเมื่อวันที่ 28 มีนาคม 2528 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2549 หลังจากนั้นเข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุล-ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ต่อมาสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 จากนั้นเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

Sinnuengnong R., Attasart P., Smith D.R., Panyim S. and Assavalapsakul W.(2017). In vitro assembly of Penaeus monodon densovirus (PmDNV)-like particles produced in a prokaryote expression system. Aquaculture Research: 1-7.

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในหัวข้อ “ In vitro assembly of Penaeus monodon densovirus (PmDNV)-like particles to deliver double-stranded RNA” งานประชุมวิชาการ 15th IUBMB 24thFAOBMB-TSBMB เมื่อวันที่ 21-26 ตุลาคม 2557 ณ เมืองไทเป ประเทศไต้หวัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University