ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง (ดัดแปลงจาก Sambrook และ Russel, 2001)

แยกหัวใจ ต่อมน้ำเหลือง และกล้ามเนื้อกุ้งทดลองใส่หลอดพลาสติกที่อบฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 100-200 มิลลิกรัม เติมสารละลาย Proteinase-K-SDS buffer (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร proteinase K, 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร SDS) ที่เตรียมใหม่ 0.3 มิลลิลิตร บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม TE-buffer (เย็น) 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่านาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 8,497x*g* นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform-Isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน 1 นาที หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยความเร็ว 8,497x*g* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม 3M ammonium acetate 30 ไมโครลิตร และ 100 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์ 0.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 8,497x*g* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE-buffer ที่ผสม Rnase A 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติมสารละลาย PEG (20 เปอร์เซ็นต์ PEG ใน 2.5M NaCl) 0.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน 5 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยความเร็ว 8,497x*g* นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องทิ้งสารละลายส่วนใส และล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับวางตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำ deionized เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้วิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งโดยใช้สารละลาย Isogen (Molecular Research Center Inc., Japan)

แยกหัวใจ ต่อมน้ำเหลือง เหงือก และกล้ามเนื้อกุ้งทดลองใส่หลอดพลาสติกที่อบฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 30-50 มิลลิกรัม สกัดอาร์เอ็นเอไวรัสโดยเติมสารละลาย Isogen หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม chloroform (เย็น) 0.1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเศษเซลล์ ที่ความเร็ว 8,497x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสประมาณ 0.4 มิลลิลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย Isopropanal (เย็น) 0.25 มิลลิลิตร และหมุน

เหวี่ยงเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ทั้งหมดที่ความเร็ว 8,497x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วยแอลกอฮอล์ 70 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วางให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที และละลายด้วยน้ำที่เติม DEPC และวิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไปทันที

3. การตรวจหาเชื้อ WSSV โดยวิธี PCR

ตรวจหาเชื้อ WSSV ในดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามรายงานของ Takahashi *et al.* (1996) ไพรเมอร์ คู่แรก (P1,P4) ผลผลิต PCR ขนาด 643 คู่เบส (first step PCR) และคู่ที่สอง (P2,P3) ผลผลิตขนาด 330 คู่เบส (nested PCR) ตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อ WSSV ในหลอดที่มีส่วนผสมของสารสำหรับทำปฏิกิริยาตามรายละเอียดในตารางผนวก ข ที่ 1 และนำไปเพิ่มดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (MJ Research, PTC 100) ตามโปรแกรมอุณหภูมิในตารางผนวก ข ที่ 2 แล้วแยกหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วย electrophoresis ใน agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 15 นาที ตรวจผลแถบดีเอ็นเอของไวรัสด้วยเครื่อง UV-visualizer

ตารางผนวก ข ที่ 1 ส่วนผสมของสารสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ WSSV ในหลอดทดลอง

Table (Appendix) B1 Reaction mixture for *in vitro* WSSV-DNA synthesis.

Reagents	Final concentration
10XPCR buffer	10 mM
$MgCl_2$	50 mM
dNTPs mixed (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	200 µM
Primers (P1/P4 or P2/P3)	1 µM
DNA Taq polymerase (5Unit/µl)	2.5 Unit
DNA template	1 µl

ตารางผนวก ข ที่ 2 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ WSSV ในหลอดทดลอง

Table (Appendix) B2 Temperature program for *in vitro* WSSV-DNA synthesis.

Programs	Temperatures (^{o}C)	Time
Hot start	95	5 min
Step 1	95	30 sec
Step 2	56	30 sec
Step 3	72	30 sec
Step 4 Repeated from step 1-3	-	29 cycle
Step 5	72	10 min
Step 6	4	-----

4. การตรวจหาเชื้อ YHV โดยวิธี RT-PCR

ทำให้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 2 เสียสภาพที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วใช้สารละลายดังกล่าว 1 ไมโครลิตร นำมาเตรียม cDNA ในสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชั่น ตามรายละเอียดในตารางผนวก ข ที่ 3โดยใช้ รีเวอร์สไพรเมอร์ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน Tang และ Lightner (1999) นำไปผลิตเป็น cDNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งโปรแกรมไว้ตามตารางที่ 4 และนำ cDNA ทั้งหมดที่เตรียมไว้ใส่ในสารละลายที่มีส่วนผสมในตารางผนวก ข ที่ 5 โดยใช้ฟอร์เวอร์สไพรเมอร์ แล้วนำไปเพิ่ม ดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งไว้ตามโปรแกรมในตารางผนวก ข ที่ 6 จึงนำไปแยกหา ดีเอ็นเอของเชื้อ YHV จากแม่แบบที่เป็น cDNA ด้วย electrophoresis ใน agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 15 นาที ตรวจผลแถบ ดีเอ็นเอของไวรัสด้วยเครื่อง UV-visualizer

ตารางผนวก ข ที่ 3 ส่วนผสมของสารสำหรับสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อ YHV ในหลอดทดลอง

Table (Appendix) B3 Reaction mixture for *in vitro* YHV-cDNA synthesis.

Reagents	Final concentration
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM
KCl	50 mM
$MgCl_2$	5 mM
dNTPs mixed (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 mM
YHV 273 Reverse primer	1 pmol
Reverse transcription enzyme (M-MLV)	25 Unit
Rnase A inhibitor	10 unit

ตารางผนวก ข ที่ 4 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อ YHV ในหลอดทดลอง

Table (Appendix) B4 Temperature program for *in vitro* YHV cDNA synthesis.

Programs	Temperatures (^{o}C)	Time (min)
Step 1	42	30
Step 2	99	10
Step 3	4	-----

ตารางผนวก ข ที่ 5 ส่วนผสมของสารสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ YHV ในหลอดทดลองจากต้นแบบ cDNA

Table (Appendix) B5 Reaction mixture for *in vitro* YHV-synthesis using a cDNA template.

Reagents	Final concentration
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM
KCl	50 mM
$MgCl_2$	2 mM
YHV 273 F forverse primer	1 pmol
Taq DNA polymerase	1.25 U

ตารางผนวก ข ที่ 6 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ YHV ในหลอดทดลองจากต้นแบบ cDNA

Table (Appendix) B6 Temperature program for YHV synthesis using a cDNA template.

Programs	Temperatures (^{o}C)	Time (min)
Step 1	72	10
Step 2	95	6
Step 3	95	1
Step 4	57	1
Step 5	72	1
Step 6 Repeated from step 3-5	-	39
Step 7	72	5
Step 8	4	----

5. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

5.1 การเก็บตัวอย่าง

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เข็มฉีดยาขนาด 23 G ยาว 12 มิลลิเมตร ฉีดสารละลาย Davidson's fixative เข้าบริเวณที่ต้องการโดยเฉพาะส่วนตับและตับอ่อน (hepatopancreas) แล้วใช้มีดผ่าตัด ตัดแบ่งส่วนหัวของกุ้งเป็น 2 ส่วนตามแนวยาว ฉีดสารละลายเข้าในตับและตับอ่อนให้ทั่วแล้วแช่ชิ้นเนื้อในขวดซึ่งบรรจุน้ำยา Davidson's fixative ให้ท่วมตัวอย่างนาน 72 ชั่วโมง

5.2 การขจัดน้ำและนำพาราฟินเข้าตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างที่ดองในสารละลาย Davidson's fixative เปลี่ยนลงแช่ในแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรรไกรและมีดผ่าตัดแต่ง (trim) เนื้อเยื่อส่วนหัวกุ้งและตัดส่วนที่ต้องการศึกษาให้ได้ขนาด แล้วนำใส่กล่อง (cassette) เพื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor ตามขั้นตอนในตารางผนวก ข ที่ 7

ตารางผนวก ข ที่ 7 ขั้นตอนการขจัดน้ำและนำพาราฟินเข้าตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อ

Table (Appendix) B7 Dehydration and infiltration processes for histological study.

Steps	Reagents	Time (h)
1	50% ethyl alcohol	1
2	70% ethyl alcohol	1
3	70% ethyl alcohol	1
4	95% ethyl alcohol	1
5	95% ethyl alcohol	1
6	100% ethyl alcohol	1
7	Isopropyl alcohol	1
8	Isopropyl alcohol	1
9	Xylene	1
10	Xylene	1
11	Paraplast	1
12	Paraplast	1

5.3 การฝังตัวอย่างในพาราฟิน (embed) และตัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 5.2 ไปฝังในพาราฟิน และทิ้งไว้จนพาราฟินแข็ง ใช้ใบมีดตัดแต่งพาราฟินที่อยู่รอบตัวอย่างให้มีขนาดเท่าหรือเล็กกว่าแผ่นสไลด์เล็กน้อย จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่อง microtome ให้หนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำไปลอยในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส และใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่างที่สมบูรณ์ขึ้น วางให้แห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ดีขึ้น

5.4 การย้อมสี และ mount slide

นำตัวอย่างซึ่งติดแน่นอยู่บนแผ่นสไลด์ (paraffin section) ไปผ่านกระบวนการย้อมสีโดยมีขั้นตอนดังตารางผนวก ข ที่ 8 แล้ว mount slide ด้วยน้ำยา Eukitt (per mount) และตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางผนวก ข ที่ 8 ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาท็อกไซลิน และอีโอซิน (H&E) ตัวอย่าง paraffin section

Table (Appendix) B8 Hematoxylin and Eosin (H&E) staining processes of paraffin section sample.

Steps	Reagents	Time (min)
1	Xylene	5
2	Xylene	5
3	100% ethyl alcohol	1
4	100% ethyl alcohol	1
5	95% ethyl alcohol	1
6	70% ethyl alcohol	1
7	50% ethyl alcohol	1
8	Distilled water	3
9	Hematoxylin	1-2
10	Tap water	10
11	Distilled water	1
12	Eosin	3
13	70% ethyl alcohol	1
14	95% ethyl alcohol	1
15	95% ethyl alcohol	1
16	100% ethyl alcohol	1
17	100% ethyl alcohol	1
18	Xylene	1
19	Xylene	1