ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

1.2 LB-$MgSO_4$

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ลิตร เติม agar 15 กรัมและ$MgSO_4.7H_2O$ 2.47 กรัม ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave นำไป pour plate เก็บที่ 4°C

1.3 LB-$MgSO_4$ top agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ลิตร เติม agar 0.7 กรัมและ$MgSO_4.7H_2O$ 2.47 กรัม ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเก็บที่ 4°C

1.4 LB-tetracyclin plate

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ลิตร เติม agar 15 กรัม ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุ่นที่ 55°C และเติม tetracyclin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป pour plate เก็บที่ 4°C

1.5 LB-ampicillin plate

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ลิตร เติม agar 15 กรัม ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุ่นที่ 55°C และเติม ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป pour plate เก็บที่ 4°C

1.6 LB-kanamycin plate

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ลิตร เติม agar 15 กรัม ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุ่นที่ 55°C และเติม kanamycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป pour plate เก็บที่ 4°C

1.7 SOBAG

Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	20	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
1 M $MgCl_2$	10	มิลลิลิตร
2 M Glucose	55.6	มิลลิลิตร
20 mg/ml Amplicillin	5	มิลลิลิตร

2. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (XL1-Blue MRF′)

นำ stock แบคทีเรีย มา streak บน LB agar ที่มี tetracyclin (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C ย้าย 1 โคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงใน 100 มิลลิลิตร ของ LB-tetracyclin broth ที่มีการเติม 10 mM $MgSO_4$ และ 0.2%(w/v) maltose นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 37°C นาน 4-6 ชั่วโมง จนกระทั่งได้ค่า OD_{600} ไม่เกิน 1.0 แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 xg นาน 10 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์แล้วค่อยๆ ละลายเซลล์ใน 10 mM $MgSO_4$ ที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเริ่มต้น เจือจางสารละลายเซลล์ให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ด้วย 10 mM $MgSO_4$ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3. การเตรียม Competent cell จาก *E.coli*

ทำการเขี่ยเชื้อ *E.coli* ลงบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วเทเชื้อทั้งหมดลงใน Flask ที่มี LB broth อยู่ 50 มิลลิลิตร เอาเข้าเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็นค่าอยู่ในช่วง 0.5-0.6 หลังจากนั้นดูดสารละลายแบ่งใส่ในหลอด microcentrifuge จำนวน 2 หลอด ตั้งในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปหมุน

เหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 xg เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาใช้โดยเติม 2.5 มิลลิลิตร ของ 0.1 M $CaCl_2$ ที่เย็นจัด เขย่าเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจาย วางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยง 4,000 xg นาน 10 นาที ที่ 4°C เก็บตะกอนเซลล์แล้วเติม 0.1 M $CaCl_2$ หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์มาเติม glycerol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% เก็บเซลล์ในตู้แช่แข็ง –70°C

4. การสกัดพลาสมิดลูกผสม

นำ colony transformant มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 16-24 ชั่วโมง ดูดสารละลายเซลล์มาหลอดละ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด ปั่นแยกเซลล์ เติมสารละลายที่หนึ่ง (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH8.0 และ 10 mM EDTA) ที่เก็บไว้ที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลายที่สอง (0.2 N NaOH, 1% SDS) ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที สารละลายจะหนืด หลังจากนั้นเติม 300 ไมโครลิตรของสารละลายที่สาม (5 M Potassium acetate ปริมาตร 60 ml, glacial acetic acid ปริมาตร 11.8 ml และน้ำกลั่น 28.5 ml) แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 15 นาที เก็บส่วนใส เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 15 นาที เก็บส่วนตะกอน ล้างตะกอนด้วย absolute ethanol 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอลูกผสมด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

5. การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I และ *Not* I

สารเคมี

10x PCR buffer

ดีเอ็นเอ (PCR product จากข้อ 2.3.2.1)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Sfi* I และ *Not* I

(เนื่องจากเป็น restriction enzyme ของพลาสมิด pCANTAB 5E)

วิธีทำ

ย่อยด้วยเอนไซม์ *Not* I

ใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลายตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น	7.5	ไมโครลิตร
10x buffer	2.0	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ	10.0	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Not* I	0.5	ไมโครลิตร
ปริมาณรวม	20.0	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายเหล่านี้ให้เข้ากันดี ปั่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่น้ำต้มเดือด 10 นาที

ย่อยด้วยเอนไซม์ *Sfi* I

เติมสารละลายตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น	11.0	ไมโครลิตร
10x buffer	3.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ (ย่อยด้วย*Not* I)	20.0	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Sfi* I	0.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	35.0	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายเหล่านี้ให้เข้ากัน ปั่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่น้ำต้มเดือด 10 นาที

6. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Lowry, *et al*., 1951)

เติมสารละลายโปรตีนปริมาตร 5 ไมโครลิตร ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร สำหรับโปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ Bovine serum albumin (BSA) ทำเป็น 4 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.05 , 0.1, 0.2 และ 0.3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เติมสาร A (Alkaline copper tartate solution ของ BIORAD, Hercules, CA) ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร และสาร B (Folin reagent ของ BIORAD, Hercules, CA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่า OD ที่ 750 นาโมเมตรที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน

7. การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

ดูดสารละลายโปรตีน 5 ไมโครลิตร เติม 2x sample buffer 1.0 เท่าของปริมาตรโปรตีน นำไปต้มใน water bath นาน 5 นาที นำไปแช่น้ำแข็งทันที นำสารละลายที่ได้มา load ที่ 15% SDS-PAGE จ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์จนกระทั่งแถบของ phenol red เคลื่อนที่ถึงขอบล่างของเจล จึงหยุดจ่ายกระแส หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาทำการย้อมสีด้วยซั่ง Coomassie brillient blue R250

7.1 การเตรียม 15% SDS-PAGE

7.1.1 Stacking gel

เติมสารประกอบตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น	4.1	มิลลิลิตร
30% acrylamide mix	1.0	มิลลิลิตร
10 M Tris (pH6.8)	0.75	มิลลิลิตร
10% SDS	0.06	มิลลิลิตร
10% ammonium persulphate	0.06	มิลลิลิตร
TEMED	0.006	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	6.0	มิลลิลิตร

7.1.2 Separating gel

เติมสารประกอบตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น	2.3	มิลลิลิตร
30% acrylamide mix	5.0	มิลลิลิตร
1.5 M Tris (pH8.8)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% ammonium persulphate	0.5	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	10.0	มิลลิลิตร

7.2 การเตรียม 15% Tricine SDS-PAGE (Schagger and Jagow, 1987)

7.2.1 Stacking gel

เติมสารประกอบตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น	2.0	มิลลิลิตร
48% acrylamide/1.5% bis mix	0.25	มิลลิลิตร
3 M Tris (pH8.45)/0.3% SDS	0.75	มิลลิลิตร
10% ammonium persulphate	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	3.0	มิลลิลิตร

7.2.2 Separating gel

เติมสารประกอบตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร
46.5% acrylamide/1.5% bis mix	2.0	มิลลิลิตร
3 M Tris (pH8.45)/0.3% SDS	2.0	มิลลิลิตร
100% glycerol	1.0	มิลลิลิตร
10% ammonium persulphate	0.075	มิลลิลิตร
TEMED	0.0075	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	6.0	มิลลิลิตร

8. การย้อมโปรตีน

ตรึงโปรตีนบนแผ่นเจลโดยแช่แผ่นเจลใน Fixing solution (40% methanol, 10% acetic acid) นาน 30 นาที ย้อมเจลด้วย staining solution (ชั่ง Coomassie brillient blue R250 0.2 กรัมละลายใน 50% methanol) นาน 1 ชั่วโมง ล้างสีออกด้วย destainign solution (40% methanol, 10% acetic acid) จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบของโปรตีน

9. การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับโดยวิธีติดฉลากด้วย DIG (Digoxigenin)(Boenringer Mannheim, MA, USA)

ใช้พลาสมิดลูกผสม (โคลน pC9) 60 ไมโครกรัม, 10x buffer D ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, *EcoR* I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1.5 ไมโครลิตร, *Xho* I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1.5 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 37°C นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบผลการย่อยดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ตัดเจลเฉพาะส่วน insert gene ขนาด 171 bp จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล นำดีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัมละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมสารเหล่านี้ในปฏิกิริยา

hexanucleotide mixture ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP-labelling mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP และ 0.35 mM DIG-dUTP, pH 7.5) ปริมาตร 2ไมโครลิตรและเติมเอนไซม์ Klenow 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 37°C นาน 16 ชั่วโมง (อย่างน้อย 2 ชั่วโมง) จากนั้นเติม 0.2 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วเติม 4 M LiCl ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรและ absolute ethanol 75 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ที่ -70°C นาน 30 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 xg นาน 15 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol แล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วย vacuum dry แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอ ตรวจจับด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 และ 1mM EDTA, pH 8.0)

10. การเตรียมเชื้อ WSSV เริ่มต้น

ตัดเอาเหงือก, หัวใจและลิมฟอยด์ออร์แกนของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มาบดให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 (1%(w/v) M-199, 1.88 M NaCl, 0.06 M $CaCl_2.2H_2O$, 0.1 M L-glutamine, 9.14 mM Hepes และ 10%(v/v) salt mixture ซึ่งประกอบด้วย 0.05 M KCl, 0.12 M $MgSO_4.7H_2O$, 0.16 M $MgCl_2.6H_2O$ และ 3.21 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$, pH 7.3-7.6) ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อกุ้ง : ปริมาตร) แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 xg นาน 10 นาที ทิ้งตะกอน นำส่วนใสมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 xg นาน 30 นาที เก็บส่วนใสที่มีไวรัสอยู่ที่ -70°C จนกว่าจะนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีนจากโคลนต่างๆกับ NCBI database ใน GenBank

Table 5 Homologies to NCBI database searches in Genbank

Clone	Size of clone (bp)	Gene	Size (amino acid)	% Homology
pCR47	800	amino acid starvation -induced protein (ASI)	184	64.1
pCR118 and 206	2,000	elongation1-α factor (EF1-α)	462	31.8
pCR136	800	ribosomal protein L23a	269	28.3
pCR154	500	ribosomal protein L26 (macrophage activator)	144	63.1
pCR190	400	ribosomal protein L30	111	74.7
pCR202	1,000	ribosomal protein L7a	266	45.9
pCR108, 121 and 241	1,300, 900 and 1,800	unmatchable gene (novel)	-	-