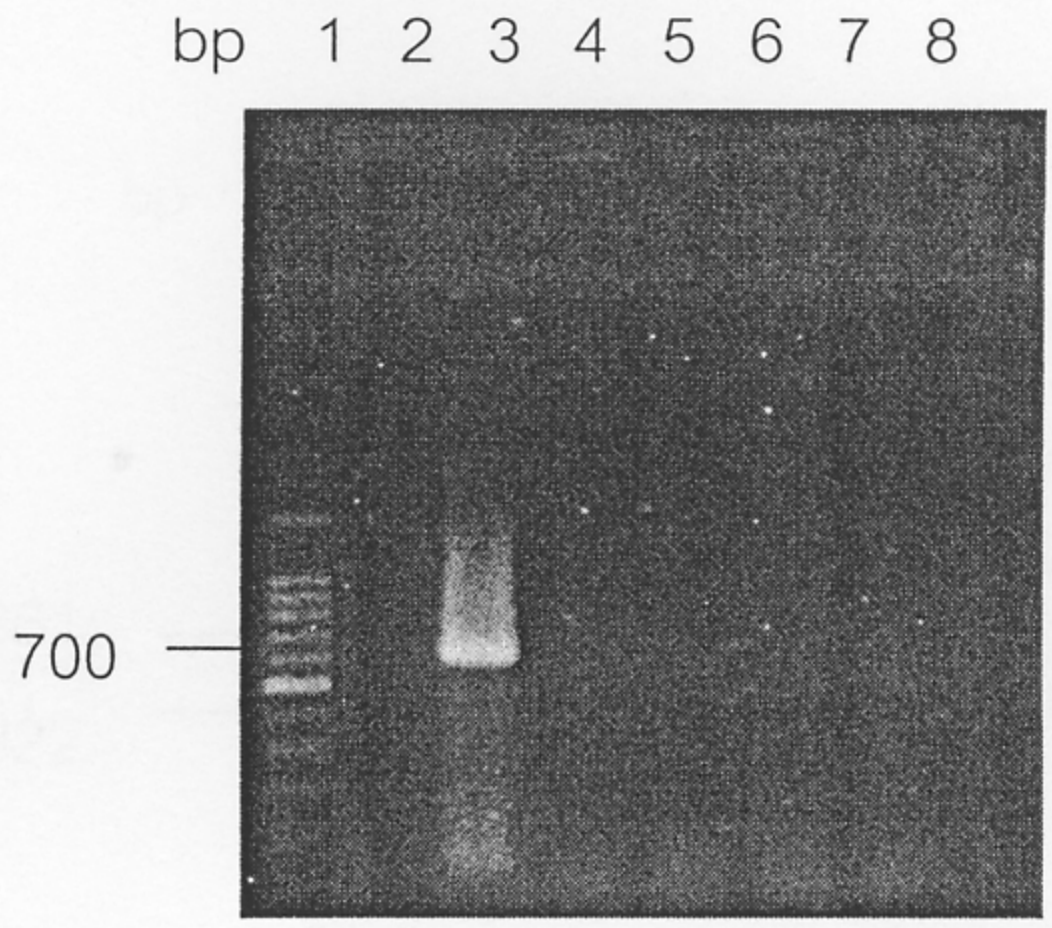
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเตรียม cDNA library ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV ใน pZAP

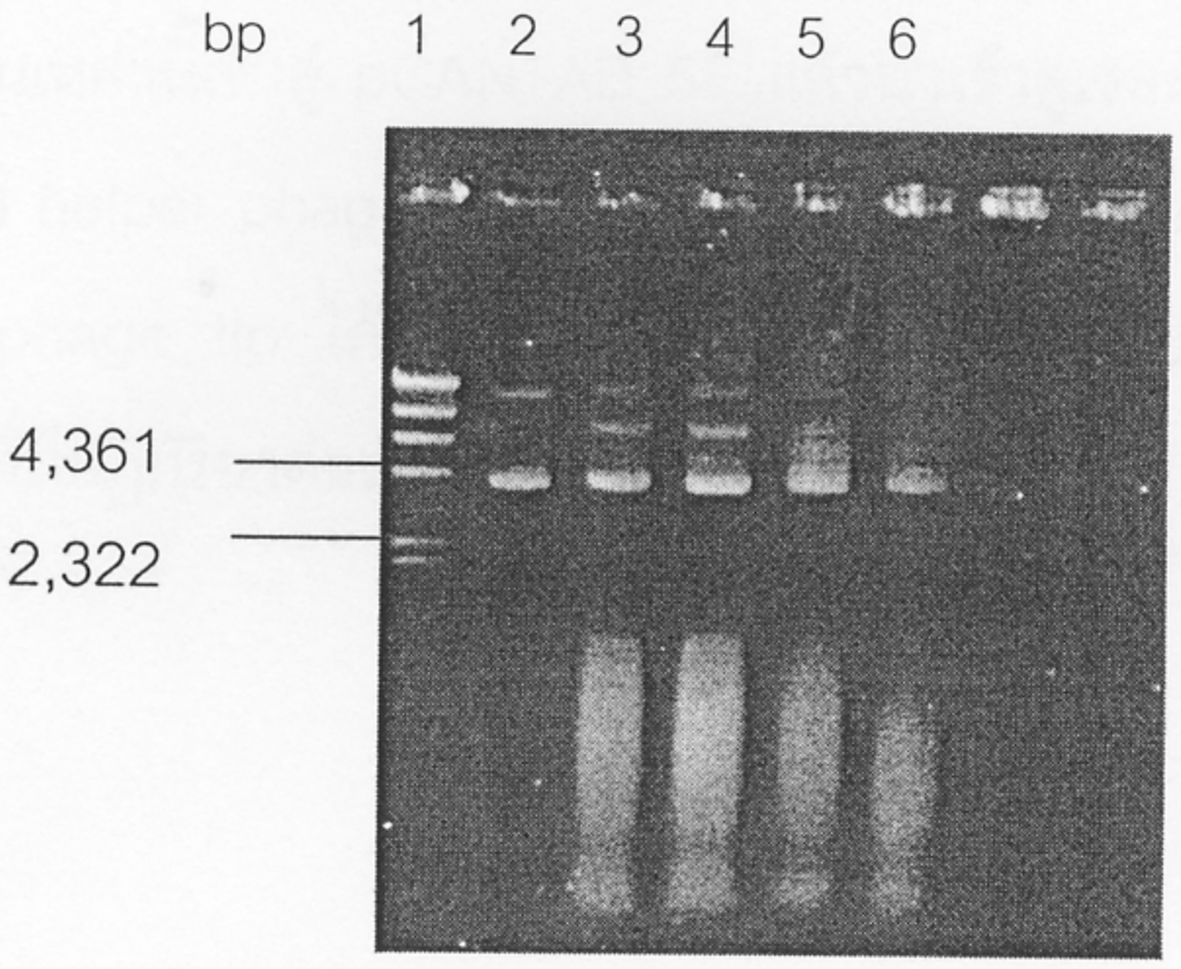
เมื่อนำกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนัก 12-15 กรัม มาทำการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองโดยเทคนิค PCR ด้วย primer ที่มีความจำเพาะต่อ WSSV (Takahashi *et al*., 1996) พบว่าไม่มีการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งปกติที่สุ่มมาทำการทดลองทั้ง 5 ตัว (รูปที่ 4) แบ่งการทดลองเป็นสองชุด ใช้กุ้งชุดละ 25 ตัว คือ ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม (ชุดที่ฉีด PBS) และชุดที่ 2 เป็นชุดที่ฉีดเชื้อ WSSV เข้ากล้ามเนื้อส่วนท่อนหาง เก็บเลือดกุ้งตามช่วงเวลาต่างๆคือ 0.5, 1, 2, 3 และ 6 ชั่วโมง นำเลือดที่เก็บได้ไปทำการสกัด RNA (Promega, Madison , USA) โดยชุดที่ 1 และ 2 มีปริมาณ mRNA เท่ากับ 0.204 และ 0.196 มิลลิกรัมตามลำดับ นำ 10 ไมโครกรัมของ mRNA ทั้งสองชุดไปใช้ในการเตรียม cDNA library (Stratagene, California, USA) ตัดต่อชิ้น cDNA ที่ได้ทั้งหมดเข้าสู่ฟาจมิด pBK-CMV ทำการ transformation เข้าสู่เซลล์ *E.coli* XL1-blue strain แล้วทำการ packaging ให้ได้เป็นฟาจลูกผสม นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง LB-$MgSO_4$ พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีปริมาณฟาจลูกผสมเท่ากับ 2.2×10^4 และ 2.5×10^4 pfu/ml ตามลำดับ เพิ่มจำนวนฟาจ (amplification) ให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นในชุดที่ 1 และ 2 เท่ากับ 8.83×10^7 และ 1.14×10^7 pfu/ml ตามลำดับ เมื่อทำให้ฟาจมิดอยู่ในรูปพลาสมิดลูกผสม โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของฟาจลูกผสม 3.8×10^6 pfu, เซลล์ *E.coli* XL1-blue 3×10^7 cells และ helper- phage 3×10^8 pfu นำเอา excised pBK-CMV vector มา transform เข้า เซลล์ *E.coli* XLOLR strain สกัด พลาสมิดรวม วิเคราะห์ขนาดบน 1.2% agarose gel พบว่ามีความแตกต่างกันของพลาสมิดลูกผสมระหว่าง

ชุดการทดลองทั้งสอง โดยชุดที่ติดเชื้อไวรัสมีความหลากหลายของขนาดมากกว่าในชุดควบคุม (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อตัวแดงดวงขาว (WSSV) ด้วยเทคนิค PCR วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis; แถบที่ 1 100 bp DNA ladder marker (Promega, Madison, USA) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน, แถบที่ 2 negative control (ไม่มี DNA ของกุ้ง), แถบที่ 3 positive (มี DNA กุ้งติดเชื้อ WSSV), แถบที่ 4-8 ดีเอ็นเอของกุ้งปกติที่สุ่มมาทดสอบจำนวน 5 ตัว

Figure 4 WSSV diagnosis by PCR technique,PCR products were separated on 1.5% agarose gel electrophoresis; lane 1: 100 bp DNA ladder marker (Promega, Madison, USA), lane 2: negative control, lane 3: positive control (DNA of WSSV),lane 4-8: DNAof 5 randomly tested shrimps

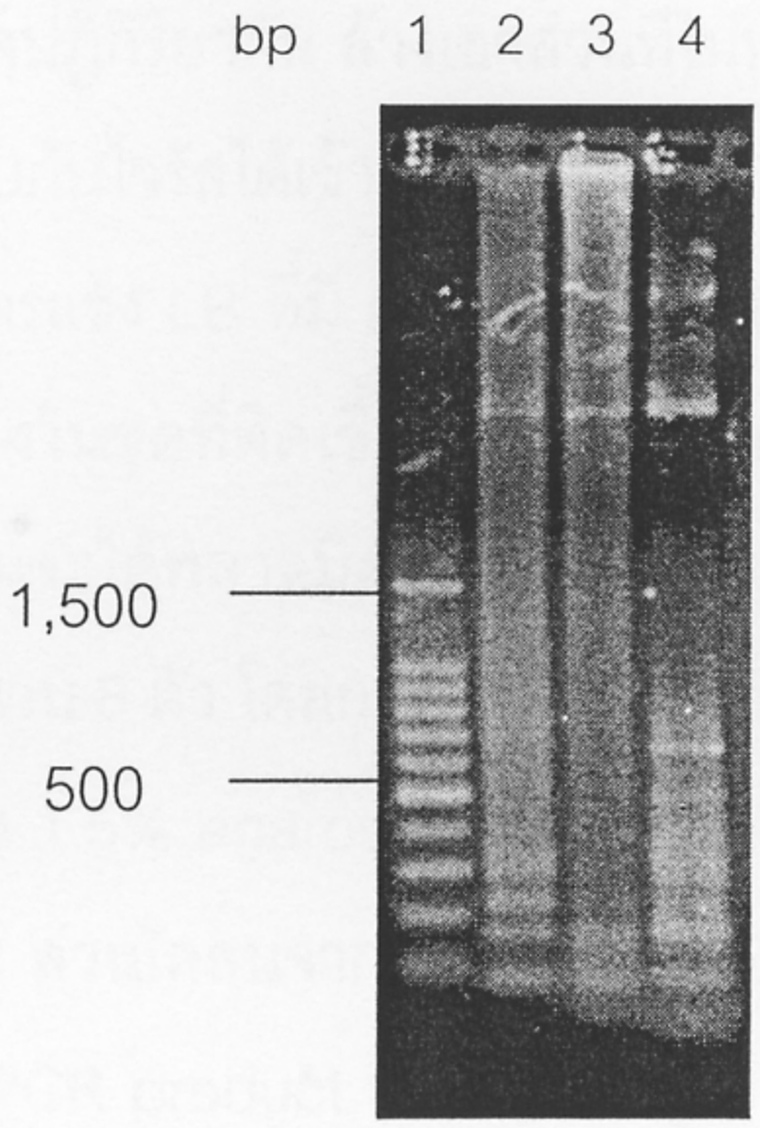


รูปที่ 5 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมรวมของ cDNA library; แถบที่ 1 λ*Hind* III เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน, แถบที่ 2 pBK-CMV, แถบที่ 3 และ 4 recombinant plasmid mixture ของกุ้งปกติ, แถบที่ 5 และ 6 recombinant plasmid mixture ของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV

Figure 5 Recombinant plasmid mixture of cDNA library; lane 1: λ*Hind* III marker, lane 2: pBK-CMV, lane 3 and 4: recombinant plasmid mixture of cDNA library from normal shrimps, lane 5 and 6: recombinant plasmid mixture of cDNA library from WSSV-infected shrimps

3.2 การเตรียม Phage Display library ใน pCANTAB 5E

นำพลาสมิดลูกผสมของ pZAP ทั้งหมดมาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิด นอกจากนั้นในการทำ PCR ที่ใช้ V1 และ RV1 primer ที่มีการออกแบบให้มีส่วน cloning site ของ pCANTAB 5E vector โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนจะมีขนาดที่หลากหลายและมีความแตกต่างกันระหว่างสองชุดการทดลอง (รูปที่ 6) ต่อมาจึงทำการตัดต่อยีนเหล่านี้เข้าสู่ pCANTAB 5E แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E.coli* TG1 strain ซึ่งเมื่อทำงานร่วมกับ helper phage M13K07 จะทำให้เกิดการ packaging และมีการผลิตโปรตีนออกมาที่ phage tip ได้ ซึ่งจะนำเอาฟาจลูกผสมที่ได้ไปใช้ในการทำการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมที่มีปฏิกิริยาต่อเชื้อตัวแดงดวงขาวต่อไป

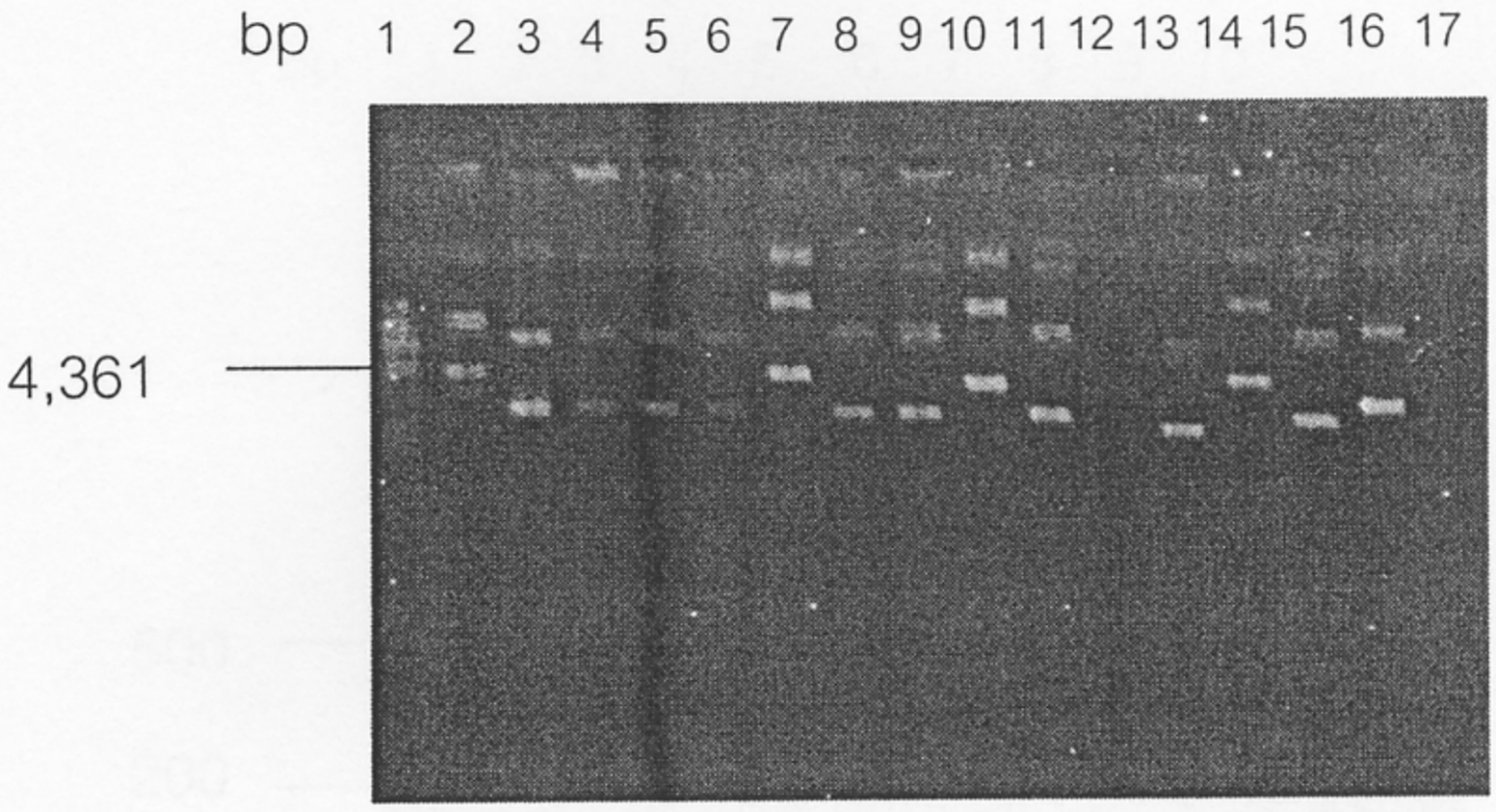


รูปที่ 6 ผล PCR product ของ cDNA library ที่มีส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I และ *Not* I; แถบที่ 1 ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega, Madison, USA) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน, แถบที่ 2 cDNA จากเลือดกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, แถบที่ 3 และ 4 cDNA จากเลือดกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ

Figure 6 Electrophoresis of PCR products from cDNA library containing restriction site *Sfi* I and *Not* I; lane 1: 100 bp DNA ladder (Promega, Madison, USA), lane 2: cDNA of WSSV-infected shrimp, lane 3 and 4: cDNA of PBS injected shrimp

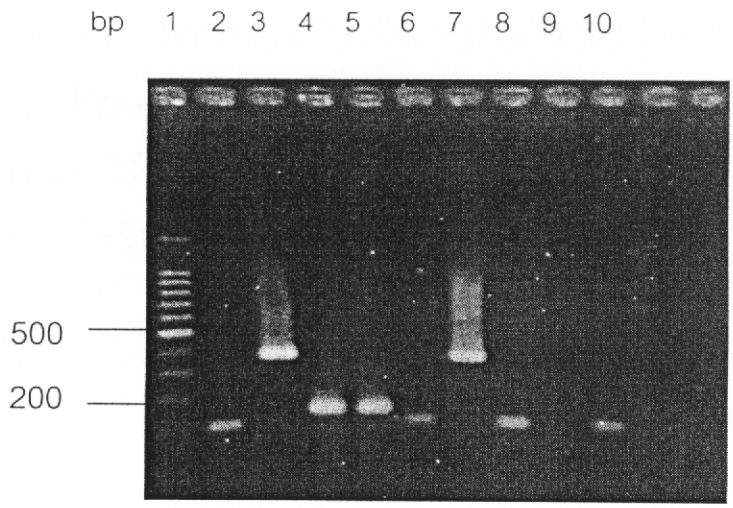
3.3 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมที่มีปฏิกิริยากับเชื้อตัวแดงดวงขาว

โดยทำการเคลือบไวรัส WSSV เข้ากับหลุมของ plate โดยมีปริมาณไวรัสต่อหลุมเท่ากับ 10 ไมโครกรัมโปรตีน แล้วใส่ฟาจลูกผสมที่เตรียมไว้ลงในหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากัน ล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสออกแล้วทำการ reinfect ฟาจลูกผสมที่จับกับไวรัสได้เข้าสู่เซลล์ *E.coli* TG1 strain แล้วนำสารละลายเซลล์มาเกลี่ยให้เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin อยู่ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดที่ได้ซึ่งในชุดที่ติดเชื้อไวรัสจะได้พลาสมิดขนาดต่างๆกันหลายขนาด (รูปที่ 7) แต่ในชุดควบคุมจะได้พลาสมิดเพียงขนาดเดียว จากนั้นทำการคัดเลือกพลาสมิดที่มีขนาดแตกต่างกันจำนวน 8 ตัว โดยการทำ PCR ด้วย S1 และ S6 primer แล้ววิเคราะห์ขนาด PCR product บน 1.5% agarose gel ซึ่งโคลนจาก pCANTAB5E ที่ได้จากกุ้งติดเชื้อใช้สัญลักษณ์เป็น pC ส่วนโคลนจาก pCANTAB5E ที่ได้จากกุ้งปกติใช้สัญลักษณ์เป็น pCT ซึ่งจะได้ขนาดของ PCR product ที่น่าสนใจอยู่ 3 ขนาดคือ 200, 300 และ 400 bp ซึ่งได้จากโคลน pC37 และ pC55, pC93 และ pC9 ตามลำดับ ส่วนโคลน pCT1 ซึ่งได้จากชุดควบคุมนั้นมีขนาดเล็กมากขนาดประมาณ 100 bp (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 พลาสมิดลูกผสมของชุดที่ติดเชื้อ WSSV จากการทำคัดเลือกโดยจับกับไวรัส WSSV ได้; แถบที่ 1 λ*Hind* III เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน, แถบที่ 2-16 คือโคลน pC2, pC4, pC6, pC7, pC8, pC9, pC11, pC21, pC37, pC48, pC55, pC58, pC75, pC79 และ pC93 ตามลำดับ

Figure 7 Recombinant plasmid of WSSV-infected shrimps which interacted with WSSV; lane 1: λ*Hind* III marker, lane 2-16: clone of pC2, pC4, pC6, pC7, pC8, pC9, pC11, pC21, pC37, pC48, pC55, pC58, pC75, pC79 and pC93, respectively



รูปที่ 8 ผล PCR product ที่ได้มาจากพลาสมิดลูกผสมของ cDNA library ที่ทำการคัดเลือกด้วยเชื้อ WSSV; แถบที่ 1 ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega, Madison, USA) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน, แถบที่ 2-10 ชิ้นดีเอ็นเอของโคลน pC4, pC9, pC37, pC55, pC58, pC75, pC93, negative control และ pCT1 ตามลำดับ

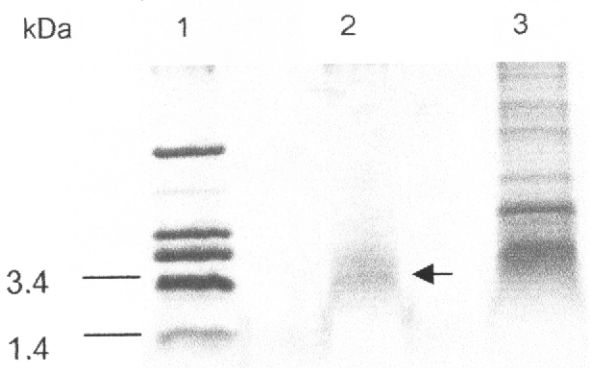
Figure 8 Analysis of PCR product of selected clonesfrom panning with WSSV on 1.5% agarose gel electrophoresis; lane 1 100 bp DNA ladder marker, lane 2-10: DNA of clone pC4, pC9, pC37, pC55, pC58, pC75, pC93, negative control and pCT1, respectively

3.3 การศึกษาลำดับเบส

จากการคัดเลือกโคลนที่น่าสนใจจำนวน 3 โคลนคือ โคลน pC37, pC93 และ pC9 ผลที่ได้จากการศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ 37 คือได้ส่วนของเวกเตอร์ที่ใช้ในการ cloning โดยไม่มีส่วนของชิ้น insert อยู่ ซึ่งคาดว่าขนาดของ PCR product ที่ได้ในคัดเลือกน่าจะเป็นส่วนของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR นั่นเอง ส่วนโคลน pC93 และ pC9 มีลำดับเบสของยีนที่เหมือนกันโดยโคลน pC9 มีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์มากกว่า เมื่อลบส่วนของเวกเตอร์ออกแล้วทำให้ได้ยีนขนาด 171 bp แล้วเมื่อทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในธนาคารยีนพบว่าได้ยีนตัวใหม่ซึ่งไม่มีส่วนที่เหมือนกับยีนใดๆเลย

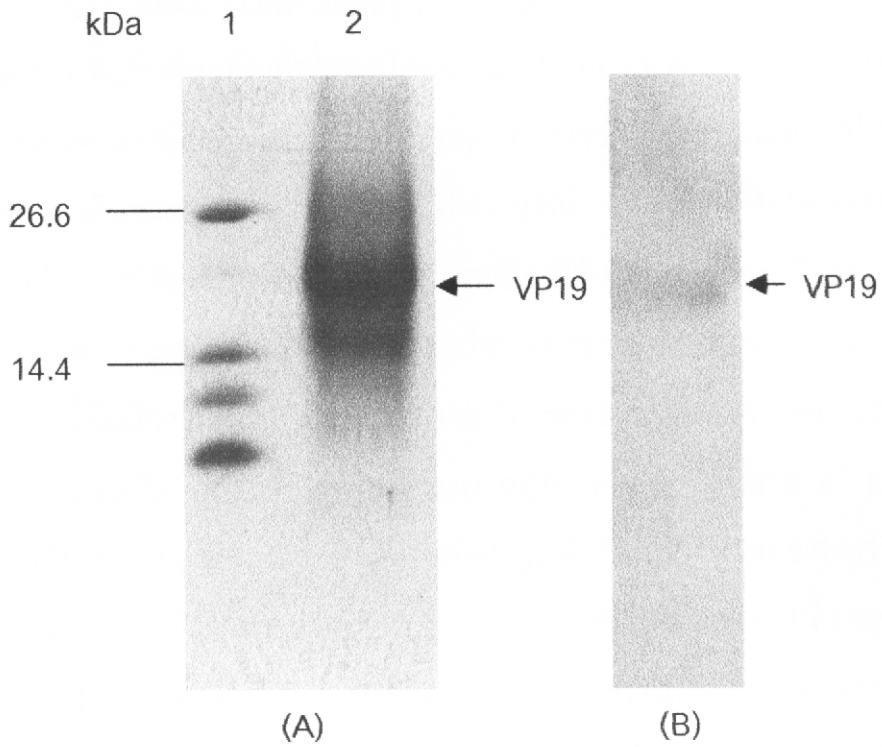
3.4 **การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีนที่ผลิตจากโคลน** pC9 **ใน** *E.coli* HB2151 cells **กับโปรตีนของไวรัส** WSSV

จากการทดลองที่ทำการแยกโปรตีนที่ผลิตจากโคลน pC9 ใน *E.coli* HB2151 cells ซึ่งให้ชื่อว่า HB9 บน 15% Tricine SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนที่ผลิตจากโคลนที่ไม่มีชิ้น insert พบว่าโปรตีน HB9 ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,000-3,000 Da แต่ไม่พบโปรตีนขนาดนี้ที่ผลิตจากโคลนที่ไม่มีชิ้น insert (รูปที่ 9) ดังนั้นโปรตีน HB9 จึงเป็นโปรตีนที่เกิดจากการแสดงออกของยีนจากโคลน pC9 จึงทำการติดฉลากโปรตีน HB9 ด้วย biotin-conjugated เพื่อใช้ในการทดสอบการจับกับโปรตีนของ WSSV ที่แยกอยู่บน 15% SDS-PAGE โดยการทำ western blotting ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า เกิดสีม่วงบนแถบของโปรตีน VP19 ซึ่งเป็น envelope glycoprotein ของไวรัส แต่ไม่เกิดแถบสีม่วงบนแถบของโปรตีน VP15 ซึ่งเป็น nucleocapsid ของไวรัส (Hulten *et al.*, 2000) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน HB9 สามารถจับกับโปรตีน VP19 อย่างจำเพาะ (รูปที่ 10)



รูปที่ 9 ผลการแยกโปรตีนที่ผลิตจากโคลน pC9 บน 15% Tricine gel electrophoresis; แถบที่ 1 โปรตีนขนาดมาตรฐาน (BioRad, USA), แถบที่ 2 โปรตีนที่ผลิตจากโคลน pC9 ใน *E.coli* HB2151 cells, แถบที่ 3 โปรตีนที่ผลิตจาก *E.coli* HB2151 cells ที่ไม่มีชิ้น insert

Figure 9 Coomassie brilliant blue R250-stained expressed proteins from a 2 recombinant pC9 clone separated on 15% tricine gel electrophoresis; lane 1: standard polypeptide marker (BioRad, USA), lane 2: recombinant protein of pC9 clone, lane 3: control protein from *E.coli* HB2151 cells

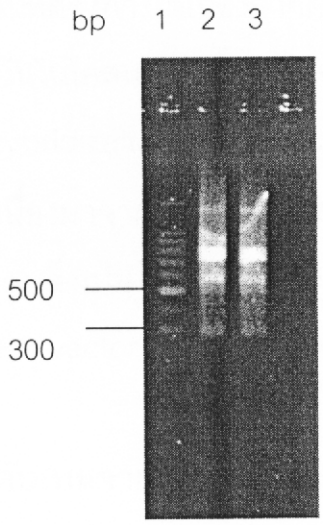


รูปที่ 10 (A) ผลการแยกโปรตีนของ WSSV บน 15% SDS-PAGE electrophoresis; แถบที่ 1 โปรตีนขนาดมาตรฐาน (BioRad, USA), แถบที่ 2 โปรตีนแอนติเจนของไวรัส WSSV; (B) ผลการทำ Western blotting โปรตีนของไวรัสด้วยโปรตีนที่ผลิตจากโคลน pC9 ใน *E.coli* HB2151 cells, envelope protein ของ WSSV (VP19) แสดงตามลูกศรชี้

Figure 10 (A) Coomassie brilliant blue R250-stained WSSV proteins separated on 15% SDS-PAGE; lane 1: molecular weight standard proteins, lane 2: electroeluted WSSV antigenic proteins; (B) Detection of WSSV antigenic protein (VP19) by a biotin-conjugated recombinant protein of pC9 clone performed by western blotting, WSSV antigenic protein (VP19) was indicated by arrow.

3.5 การเตรียม cDNA library (Invitrogen, California, USA)

เนื่องจากชิ้นยีนที่ถูกคัดเลือกจากโคลน (pC9) ใน pCANTAB 5E ที่ได้มีขนาดสั้น และจากการศึกษาลำดับเบสของยีนไม่พบ poly (A) tail ที่อยู่บริเวณปลาย 3′ ของ mRNA ทำให้คาดว่าลำดับเบสของยีนที่ได้อาจยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงได้มีการเตรียม cDNA library ของเลือดกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ขึ้นใหม่โดยเลือกใช้ GeneRacer™ Kit (Invitrogen, California, USA) โดยหลักการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase และคุณสมบัติพิเศษของ kit นี้คือมีการเติม adaptor ที่ปลาย 5′ ของสาย mRNA ที่สมบูรณ์ แล้วสร้างสาย DNA โดยเทคนิค PCR ที่มีการออกแบบ PCR primer ทั้งปลาย 5′ และ 3′ ของ mRNA ทำให้มีโอกาสสูงที่จะได้สายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ซึ่งผลการทดลองพบว่าได้ cDNA ขนาดต่างๆ (รูปที่ 11) ทำการ cloning เข้าสู่ pCR4-TOPO vector จากนั้น transform เข้าสู่ เซลล์ *E.coli* Top 10F′ ซึ่งเมื่อนำสารละลายเซลล์มาเลี้ยงให้เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin อยู่ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง ซึ่งผลจากการทดลองจะได้ cDNA library จำนวน 324 โคลน



รูปที่ 11 ผล PCR product ในการสังเคราะห์ cDNA ของเลือดกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis; แถบที่ 1 ใช้ 100 bp DNA ladder เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (Promega, Madison, USA), แถบที่ 2 และ 3 cDNA library

Figure 11 Analysis of PCR product of cDNA synthesis from the hemolymph of WSSV–infected shrimp (*P. monodon*) on 1.5% agarose gel electrophoresis; lane 1: 100 bp DNA ladder marker (Promega, Madison, USA), lane 2 and 3: cDNA library

3.6 การทำ Hybridization เพื่อหายีนเต็มของยีนจากโคลน pC9

โดยทำการคัดเลือกยีนที่ต้องการจาก 324 โคลนจาก library โดยการทำ hybridization ซึ่งใช้ชิ้นดีเอ็นเอจากโคลน pC9 มาใช้เป็นตัวตรวจจับ (probe) ซึ่งผลจากการทดลองไม่สามารถหาชิ้นยีนที่ต้องการได้เนื่องจากตัวตรวจจับจากโคลน pC9 ที่ใช้ในการทำ hybridization จับกับยีนในโคลนต่างๆอย่างไม่จำเพาะ นั่นคือมีโคลนมากมายที่ติดสีม่วงเมื่อทำการ detection hybridization ถึงแม้ว่าจะทำ hybridization ที่อุณหภูมิสูงถึง 75°C แล้วก็ตาม ซึ่งอาจเนื่องมาจากการลำดับเบสของชิ้นยีน pC9 มีความเหมือนกับส่วนของ pCR4-TOPO vector ซึ่งเป็น cloning vector ที่ใช้ในการทำ library ครั้งนี้ถึง 52% ซึ่งโคลนจาก pCR4-TOPO vector ที่ได้จากกุ้งติดเชื้อใช้สัญลักษณ์เป็น pCR

3.7 การศึกษาลำดับเบสจาก cDNA library ของเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาว (WSSV)

ทำการสุ่มคัดเลือกยีนที่ต้องการจาก 324 โคลนจาก library โดยพิจารณาจากลำดับเวลาและความเข้มของการติดสีในการทำ hybridization ข้างต้นโดยเลือกโคลนที่มีสีม่วงเข้มและติดสีม่วงเร็วเนื่องจากโคลนเหล่านั้นน่าจะมีลำดับของยีนที่มีลำดับความสัมพันธ์กับยีนที่มีปฏิกิริยากับไวรัสมากกว่าโคลนอื่นๆ ซึ่งสุ่มมาได้จำนวน 83 โคลน จากนั้นทำการย่อยพลาสมิดลูกผสมของทั้ง 83 โคลนด้วยเอนไซม์ *EcoR* I เพื่อตรวจหาขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ซึ่งมีความหลากหลายแบ่งเป็น 10 ขนาดด้วยกันซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 500 bp ขึ้นไป คัดเลือกโคลนที่เป็นตัวแทนของแต่ละขนาดมา 10 โคลน (pCR47, pCR108, pCR118, pCR121, pCR136, pCR154, pCR190, pCR202, pCR206 และ pCR241) แล้วทำการศึกษาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer และทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีน หลังจากทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่ได้กับข้อมูลของยีนต่างๆในสิ่งมีชีวิตพบว่ามี 7 โคลนที่มีลำดับยีนเหมือนกับส่วนของยีนต่างๆในธนาคารยีน (ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข)