การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นางสาววรัณณา ชโยวรรณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2163-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I22142186

DIAGNOSIS OF YELLOW HEAD VIRUS (YHV) IN GRAPSID CRABS USING MONOCLONAL ANTIBODIES

Miss Vranna Chayovan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Department of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-2163-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี
โดย	นางสาววรัณณา ชโยวรรณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศุภิชัย ตั้งใจตรง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรัณณา ชโยวรรณ : การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี. (DIAGNOSIS OF YELLOW HEAD VIRUS (YHV) IN GRAPSID CRABS USING MONOCLONAL ANTIBODIES) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต , อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล , 106 หน้า. ISBN 974-17-2163-3.

ปู 5 ชนิดในวงศ์ Grapsidae รวบรวมจากบริเวณน้ำกร่อยใกล้เคียงกับบริเวณพื้นที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ณ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัด สมุทรปราการ ได้แก่ ปู ชนิด *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma moeschii* , *Sesarma polita* และ *Sesarma bocourti* นำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus,YHV) จากการจับจากธรรมชาติ , การเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลือง และการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัส ได้แก่ โปรตีนขนาด 135 , 67 และ 22 กิโลดาลตัน จากนั้นทำการยืนยันผลการตรวจสอบด้วย one step RT-PCR จากปูที่จับจากธรรมชาติและฉีดด้วยไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน ผลการตรวจไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูทั้ง 5 ชนิด สำหรับกุ้งกุลาดำที่นำมาฉีดไวรัสหัวเหลืองเพื่อเป็นตัวควบคุมของการทดลอง ให้ผลบวกในทั้ง 2 วิธีการตรวจสอบ และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 กิโลดาลตันให้ผลที่ชัดเจนที่สุด จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า ปูทั้ง 5 ชนิดนี้ ไม่มีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลืองในสัตว์ที่คาดว่าอาจเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลืองนี้ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ	ลายมือนิสิต.....วรัณณา ชโยวรรณ.....
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272387023 :MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: GRAPSIDAE / IMMUNOHISTOCHEMISTRY / *Penaeus monodon* / YELLOW HEAD VIRUS / YHV

VRANNA CHAYOVAN : DIAGNOSIS OF YELLOW HEAD VIRUS (YHV) IN GRAPSID CRABS USING MONOCLONAL ANTIBODIES. THESIS ADVISOR : PROF. PIAMSAK MENASVETA,Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PAISARN SITHIGORNGUL,Ph.D., 106 pp. ISBN 974-17-2163-3.

Five suspected crab carriers of yellow head virus (YHV) were commonly found in shrimp farming areas in Prasamutjedi District , Samutprakarn Province. These were *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma moeschii* , *Sesarma polita* and *Sesarma bocourti* . Two possible routes of infection were investigated test with YHV infected haemolymph from *Penaeus monodon* and feeding with YHV infected muscle from *Penaeus monodon.* Three days after the infection, the crabs were monitored by immunohistochemistry using monoclonal antibodies specific to 135 , 67 and 22 kDa proteins of YHV and then were confirmed results by one step RT-PCR . Natural infection with YHV in wild crabs was also investigated. Evidences of YHV infection was not observed in both detection methods in all crab species. By contrast, YHV-injected *Penaeus monodon* in control experiments were clearly detected with both methods after infection for 3 days. The antibodies specific to the 22 kDa protein gave the best immunohistochemistry results in terms of intensity. The results indicated that these five species of Grapsidae were not carrier of yellow head virus as previous expectation. The application of these monoclonal antibodies were efficiently use for development of detection test for YHV carriers.

Department Biotechnology
Field of study Biotechnology
Acedemic year 2002

Student's signature Vranna Chayovan
Advisor's signature
Co-advisor's signature Paisarn Sithigorngul

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของท่านศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ให้การดูแลตักเตือน และให้โอกาสที่ดีอย่างสม่ำเสมอมาโดยตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัย รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ผู้วิจัยของกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศุภิชัย ตั้งใจตรง ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุรินทร์ มัจฉาชีพ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาตรวจสอบลักษณะอนุกรมวิธานของปูทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ที่ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้การช่วยเหลือในการบันทึกภาพประกอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณสมบัติ รักประทานพร คุณพอจิต วิโนทพรรษ์ คุณนันทิกา ปานจันทร์ ที่ช่วยสอนด้านเทคนิคต่าง ๆ ของงานวิจัยและให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด ขอขอบคุณ คุณสุณีรัตน์ ศรัทธามั่น คุณวิลาวรรณ รักษาธรรม ที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ จนทำให้วันนี้เกิดขึ้นได้

ขอขอบคุณ คุณจรัสพร ตั้งขบวนบุตร คุณดวงใจ งามสม และคุณสุรีย์ วิเศษสมบัติ ในความมีน้ำใจ และมิตรภาพที่แสนดีอันมีค่ายิ่ง

สุดท้ายนี้ใคร่ขอกราบขอบคุณพระคุณบิดาที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษา และมารดาที่ให้ความรัก น้องชายที่ให้การเอาใจใส่ในตลอดระยะเวลาของการเรียนรู้ รวมทั้งขอขอบคุณ คุณ Leo Wu ที่เป็นแรงผลักดันเป็นกำลังใจให้ต่อสู้จนทุกอย่างสำเร็จลงด้วยดี และขอขอบคุณผู้ที่มีพระคุณที่ช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ในที่นี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....4

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....6

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....6

2.2 โรคหัวเหลือง.....7

2.2.1 ชื่อและเชื้อที่ก่อโรค.....7

2.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา.....7

2.2.3 ลักษณะอาการ.....8

2.2.4 การรักษาและป้องกัน.....9

2.3 ลักษณะและชนิดของปูกลุ่มตัวอย่าง.....9

2.3.1 ลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae.....9

2.3.2 ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae.....10

2.3.2.1 *Varuna literata*.....10

2.3.2.2 *Sesarma mederi*.....12

2.3.2.3 *Sesarma moeschii*.....14

2.3.2.4 *Sesarma polita*.....16

2.3.2.5 *Sesarma bocourti*.....18

2.4 Indirect peroxidase immunohistochemistry.....20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.5 One step RT – PCR.....21
2.6 การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสหัวเหลือง.....22
2.7 การศึกษาที่เกี่ยวกับพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลือง.....37
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....42
3.1 สัตว์ทดลอง.....42
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....42
3.2.1 อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry.....42
3.2.2 อุปกรณ์สำหรับ RT- PCR.....43
3.2.3 สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry.....44
3.2.4 สารเคมีสำหรับ RT- PCR.....46
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....47
3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู.....48
3.3.2 การพิสูจน์ทราบชนิด.....48
3.3.3 การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....48
3.3.4 การทดลองทำให้ติดเชื้อไวรัส.....48
3.3.5 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วย immunohistochemistry.....49
3.3.6 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one step RT- PCR.....60
4 ผลการวิจัย.....68
4.1 การพิสูจน์ทราบชนิดของกลุ่มปูตัวอย่าง.....68
4.2 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วย immunohistochemistry.....75
4.3 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one step RT- PCR.....84
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....86
5.1 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย.....86
5.2 ข้อเสนอแนะ.....89
รายการอ้างอิง.....90
ภาคผนวก.....96
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....97
ภาคผนวก ข ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปู.....101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....106

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

3.1 แสดง อุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงาน RT-PCR.....63

4.1 จำนวนปูที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองต่อทั้งหมดในปูแต่ละชนิด และแบบของการทดลองเมื่อตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemistry.....75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
3.1	ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางhistology	52
3.2	แสดงการหยดแอนติบอดีที่ 1 ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลือง	54
3.3	ขั้นตอนการทำ immunohistochemistry และสไลด์ถาวร	59
3.4	ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง	62
3.5	แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis	65
3.6	ขั้นตอน one step RT-PCR และ gel agarose electrophoresis	67
4.1	แสดงลักษณะปูชนิด *Varuna literata*	70
4.2	แสดงลักษณะปูชนิด *Sesarma mederi*	71
4.3	แสดงลักษณะปูชนิด *Sesarma polita*	72
4.4	แสดงลักษณะปูชนิด *Sesarma moeschii*	73
4.5	แสดงลักษณะปูชนิด *Sesarma bocourti*	74
4.6	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เป็นตัวควบคุมโดยฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน	77
4.7	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เป็นตัวควบคุมโดยฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจ สอบด้วยแอนติบอดี Y19	78
4.8	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Varuna literata* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19	79
4.9	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Sesarma mederi* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19	80
4.10	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Sesarma polita* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19	81
4.11	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Sesarma moeschii* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19	82
4.12	แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Sesarma bocourti* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19	83
4.13	RT-PCR ของปู 4 ชนิด	85