# โครงการ
# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การทดสอบสมบัติของอนุภาคเสมือนไวรัส Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)

**ชื่อนิสิต** นายมนัส จันทะแจ่ม รหัสประจำตัว 6032344923

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา
**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|---|---|
| หัวข้อโครงการ | การทดสอบสมบัติของอนุภาคเสมือนไวรัส Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) |
| โดย | นายมนัส จันทะแจ่ม |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ | รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภลกุล |
| ปีการศึกษา | 2563 |

---

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

# การทดสอบสมบัติของอนุภาคเสมือนไวรัส Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)


อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

นิสิตในโครงการ

นายมนัส จันทะแจ่ม เลขประจำตัว 6032344923


โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2563

**โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์**

**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**ชื่อโครงการ** : การทดสอบสมบัติของอนุภาคเสมือนไวรัส Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)

**นิสิตในโครงการ** : นายมนัส จันทะแจ่ม เลขประจำตัว 6032344923

**อาจารย์ที่ปรึกษา** : รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

---

## บทคัดย่อ

Viral nervous necrosis (VNN) เป็นโรคที่เกิดจากไวรัสตระกูล Betanodavirus ซึ่งก่อความเสียหายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาทั่วโลก Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) เป็นไวรัสสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในการก่อโรคดังกล่าว อนุภาคเสมือนไวรัส (Virus-like particle; VLP) เป็นหนึ่งในวัคซีนทางเลือกสำหรับป้องกันโรคในปลา เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ งานวิจัยนี้ศึกษารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) ที่ผลิตจาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Zinc affinity chromatography แล้วนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทำให้แห้งหรือเคลือบบนผิวอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10, 23 และ 36 วัน พบว่าการบ่มโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทำให้แห้งหรือเคลือบบนผิวอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โปรตีนดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้ 36 หรือ 23 วัน ตามลำดับ สำหรับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โปรตีนบริสุทธิ์ที่ทำให้แห้งสามารถคงอยู่ได้ในระยะเวลา 23 วัน แต่โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารไม่สามารถคงอยู่ได้ และโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทำให้แห้งและเคลือบบนผิวอาหารไม่สามารถคงสภาพอยู่ได้ในการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

**Project title** : Production and stability of recombinant RGNNV capsid protein

**Investigator** : Mr. Manas Chanthacham ID 6032344923

**Advisor** : Associate Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.

---

**Abstract**

Viral nervous necrosis (VNN) is caused by viruses in genus Betanodavirus which is a devastating disease in global fish farming. Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) is the most common pathogenic strain. Virus-like particle (VLP) is an alternative vaccine because it is an effective immune booster and non-infection. In this study, VLPs from recombinant capsid protein of RGNNV are produced by *Escherichia coli* Rosetta-gami and purified by Zinc affinity chromatography. Dried purified recombinant capsid protein or purified recombinant capsid coated on fish food were incubated at 4, 25 and 37-degree Celsius for 10, 23 and 36 days. The results showed that dried purified recombinant capsid protein or purified recombinant capsid coated on fish food at 4-degree could be remained for 36 or 23 days, respectively. At 25-degree Celsius incubation, dried purified recombinant capsid protein could be lasted for 23 days while purified recombinant capsid coated on fish food were not found. However, dried purified recombinant capsid protein or purified recombinant capsid coated on fish food were not found at 37-degree Celsius incubation.

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณายิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ตลอดจนความอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและต่อตัววิจัยเองในอนาคต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในงานวิจัย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณนายรพี สินเนืองนอง (พี่เบล) นางสาวสุชารัตน์ สุขใส (พี่นุ่น) นายกิติพงศ์ อังศุจินดา (พี่ปาล์ม) นางสาวจารุวรรณ วรวิทยธาดา (พี่โม) นางสาววิรยธิดา บุบผาสุก (พี่เนปจูน) รวมทั้งพี่ ๆ เพื่อน ๆ สมาชิกห้องวิจัย 2014 ทุกคนที่คอยแนะนำและสอนเทคนิคต่าง ๆ

ขอบคุณพี่ ๆ เจแปน เนเจอร์ มายด์ พิกพลอย นุคน์ สุภัค โอ๊ต กาย และเพื่อน ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณมารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดเป็นกำลังใจที่สำคัญให้วิจัยเสมอมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

มนัส จันทะแจ่ม

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญรูป | จ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง | 8 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง | 9 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล | 13 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง | 20 |
| เอกสารอ้างอิง | 21 |
| ภาคผนวก ก | 23 |
| ภาคผนวก ข | 24 |

# สารบัญรูป

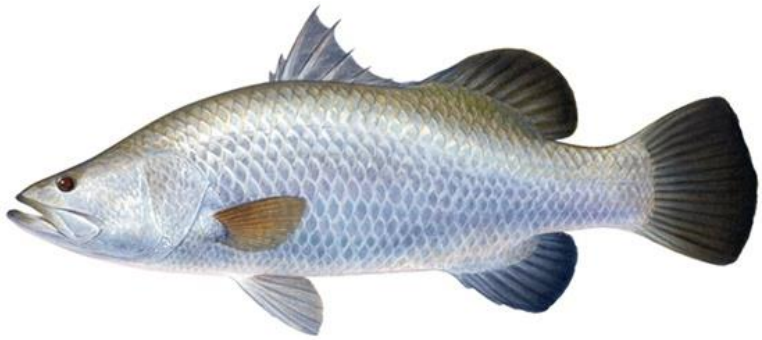

| | หน้า |
|---|---|
| รูปที่ 1.1 ปลากะพงขาว | 1 |
| รูปที่ 1.2 จำนวนฟาร์มและเนื้อที่เพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ปี 2553 – 2563 | 2 |
| รูปที่ 1.3 ปริมาณและมูลค่าปลากะพงขาวจากการเพาะเลี้ยง ปี 2553 – 2563 | 2 |
| รูปที่ 1.4 ลักษณะอนุภาคไวรัส RGNNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน | 3 |
| รูปที่ 1.5 แผนผังต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ NNV | 4 |
| รูปที่ 1.6 วงจรการจำลองตัวของไวรัสสกุล Betanodavirus | 4 |
| รูปที่ 1.7 ลักษณะทางกายภาพของปลากะพงขาวที่ติดโรค VNN; ช่องท้องโป่งพองและตาโปน [A] และมีจุดดำกระจายตามลำตัว [B] | 5 |
| รูปที่ 1.8 ลักษณะของอนุภาคเสมือนไวรัส | 6 |
| รูปที่ 4.1 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ด้วย 0.3 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง | 13 |
| รูปที่ 4.2 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผ่านการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Zinc affinity chromatography | 15 |
| รูปที่ 4.3 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน | 17 |
| รูปที่ 4.4 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 23 วัน | 18 |
| รูปที่ 4.5 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 36 วัน | 19 |

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1. ปลากะพงขาว

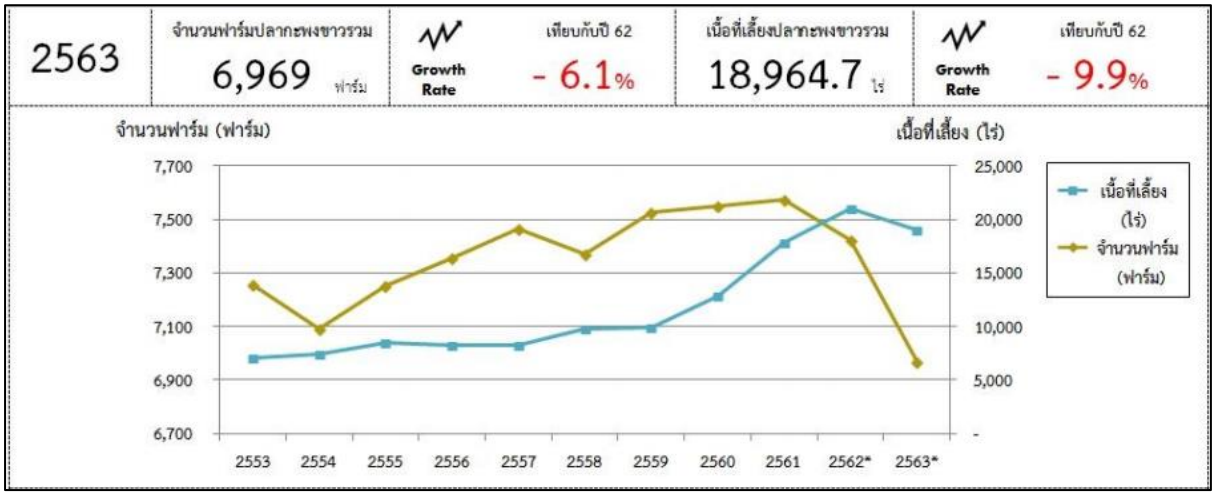
ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจซึ่งอาศัยอยู่บริเวณน้ำกร่อย ปลากะพงขาวมีรสชาติดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* และมีชื่อสามัญว่า Giant Perch ลักษณะรูปร่างแบน และยาว หัวมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับลำตัว และค่อยโค้งมนขึ้นตามบริเวณไหล่และส่วนหลัง ส่วนปากกว้าง มีปากล่างยื่นยาวมากกว่าปากบน มีขอบปากบน และล่างมน ส่วนช่องปากมีลักษณะเฉียงลงด้านล่าง ภายในปากตามขากรรไกรบน และล่างมีฟันขนาดเล็ก จำนวนมาก ส่วนตาของปลากะพงมีขนาดปานกลาง ไม่มีเยื่อหุ้ม ถัดมาเป็นแผ่นแก้มปิดเหงือกขนาดใหญ่ ปลากะพงมีครีบหลัง ครีบก้น ครีบหาง ที่ออกสีเทาปนดำ โดยครีบหลังแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ครีบหลังส่วนแรกเป็นหนามแหลมขนาดใหญ่ 5-7 อัน โดยหนามแลมอันแรกมีขนาดสั้น ถัดมามีความยาวมากที่สุด และค่อย ๆ สั้นลงตามลำดับ โดยแต่ละอันมีแผ่นหนังเชื่อมติดกันเป็นครีบหลังที่แยกออกจากครีบส่วนแรกอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นครีบหลังอ่อนเชื่อมติดด้วยแผ่นหนัง (รูปที่ 1.1)



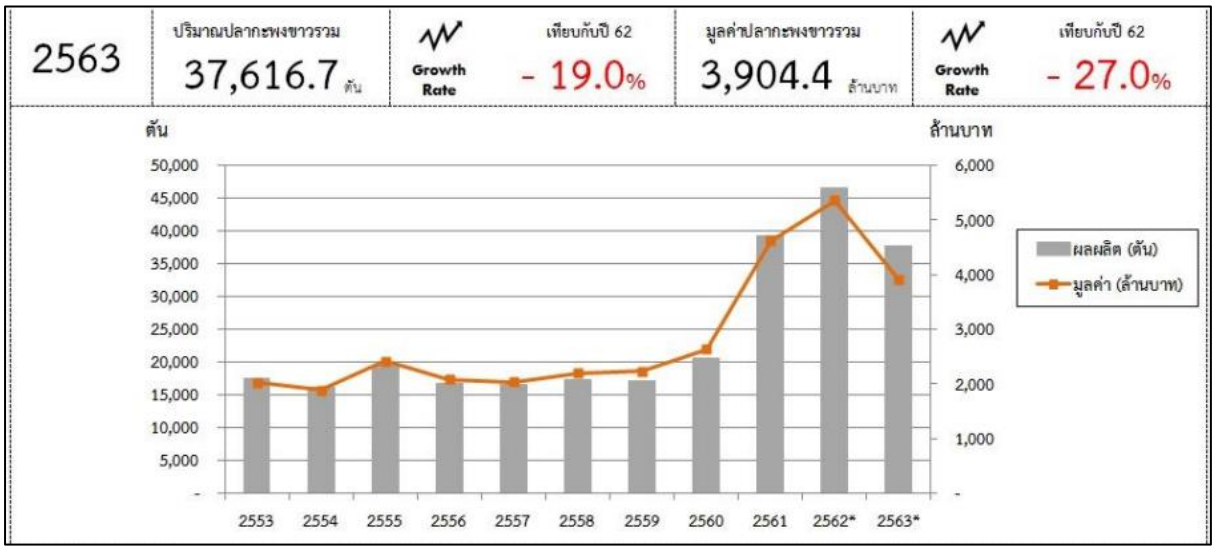
**รูปที่ 1.1** ปลากะพงขาว (ไทยเกษตรศาสตร์, 2555)

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวที่สำคัญอยู่ในบริเวณพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี และสงขลา ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 77.2 ของปริมาณผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวทั้งหมด ปี 2561 ผลผลิตของฟาร์มเลี้ยงปลาน้ำกร่อย มีปริมาณรวมทั้งสิ้น 41,108 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2560 คิดเป็นร้อยละ 83.1 โดยร้อยละ 95.5 เป็นผลผลิตจาก ปลากะพง จำนวน 39,278 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2560 คิดเป็นร้อยละ 92.0 แบ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยง ในบ่อ ร้อยละ 82.3 และผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงในกระชัง ร้อยละ 17.7 ของผลผลิตปลากะพงทั้งหมด

ในปี 2562 ผลผลิตปลากะพงขาวจากการเพาะเลี้ยง มีปริมาณ 46,451 ตัน และมูลค่า 5,350 ล้านบาท และผลผลิตคาดการณ์ ปี 2563 มีปริมาณ 37,617 ตัน และมูลค่า 3,904 ล้านบาท ลดลงร้อยละ 19 และ 27 ตามลำดับ โดยมีจำนวนฟาร์มที่เพาะเลี้ยงปลากะพงขาวทั้งหมด 6,969 ฟาร์ม เนื้อที่เพาะเลี้ยงรวม 18,964.7 ไร่ โดยเนื้อที่เพาะเลี้ยงลดลงร้อยละ 9.9 และมีผลผลิตเฉลี่ย 2 ตันต่อไร่ หดตัวลงร้อยละ 10.2 เมื่อเทียบกับปีก่อน (ฐิติมา, 2563) ดังรูปที่ 1.2 และรูปที่ 1.3



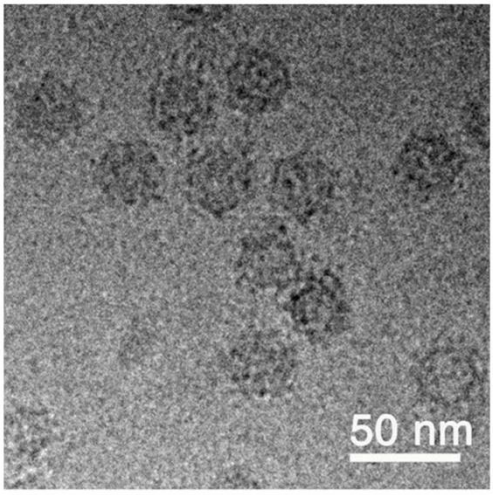

**รูปที่ 1.2** จำนวนฟาร์มและเนื้อที่เพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ปี 2553 – 2563 (ฐิติมา, 2563)



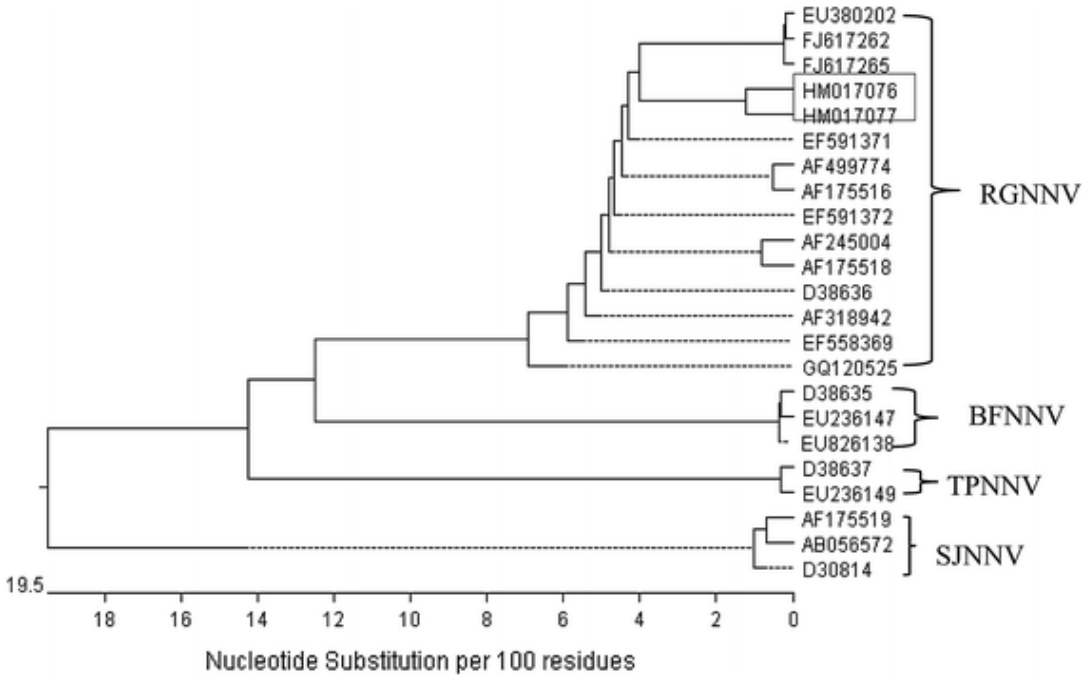

**รูปที่ 1.3** ปริมาณและมูลค่าปลากะพงขาวจากการเพาะเลี้ยง ปี 2553 – 2563 (ฐิติมา, 2563)

**2. โรค Viral nervous necrosis**

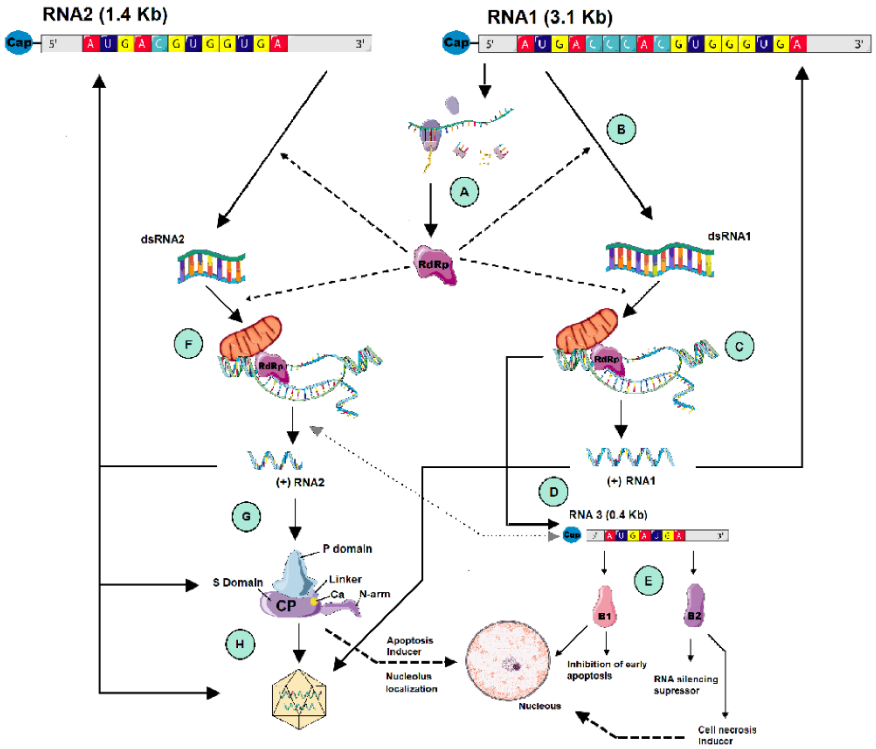
Viral nervous necrosis (VNN) เป็นโรคในปลาที่เกิดจากการติดไวรัสซึ่งส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (Eirini et al., 2020) โดยมีสาเหตุมาจากไวรัส Nervous necrosis virus (NNV) จัดอยู่ในสกุล Betanodavirus (Mori et al., 1992) แบ่งออกเป็น 4 จีโนไทป์ คือ Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) and Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) (Nishizawa et al., 1997) (รูปที่ 1.5) ไวรัสมีขนาดอนุภาคประมาณ 25 – 30 นาโนเมตร (รูปที่ 1.4) จีโนมประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายบวก (Positive-sense RNA) จำนวน 2 สาย คือ RNA1 และ RNA2 ซึ่ง RNA1 มีขนาดประมาณ 3.1 กิโลเบส สามารถแปลรหัสได้เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase มีขนาด 102 กิโลดาลตัน มีบทบาทสำคัญในกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส และ RNA2 มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส สามารถแปลรหัสได้เป็นแคปซิดโปรตีน มีขนาดประมาณ 43 กิโลดาลตัน (รูปที่ 1.6)




**รูปที่ 1.4** ลักษณะอนุภาคไวรัส RGNNV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Barsøe et al., 2021)




**รูปที่ 1.5** แผนผังต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ NNV (Shetty et al., 2012)



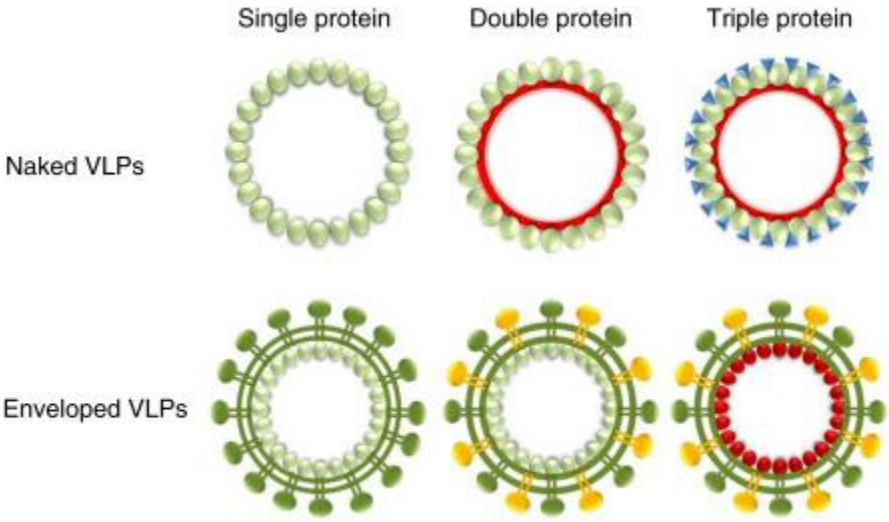

**รูปที่ 1.6** วงจรการจำลองตัวของไวรัสสกุล Betanodavirus (Bandin และ Souto, 2020)

โรคนี้ส่วนมากส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนของปลาเป็นหลัก โดยอาการของโรคคือมีพฤติกรรมการว่ายน้ำที่ผิดปกติและเกิดช่องว่างภายในเซลล์ประสาทของปลา (Nakai et al., 2009) นอกจากนี้ปลาอาจมีความปกติบริเวณกระดูกสันหลัง ครีบมีการกุดขาด (Ariff et al., 2019) ตาโปน ช่องท้องโป่งพอง และมีจุดสีดำกระจายทั่วลำตัว (Ziarati et al., 2020) (รูปที่ 1.7) ซึ่งอาการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับระบบประสาทปลาจึงสามารถสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการติดไวรัสชนิดนี้ โรค VNN พบมากในปลาเศรษฐกิจหลายชนิด โดยปลากะพงขาวมีการรายงานอัตราการตายที่สูงถึง 60% ในระยะตัวอ่อน (Le Breton et al., 1997) ซึ่งการแพร่เชื้อไวรัสที่ไปก่อโรคนั้นสามารถแพร่กระจายได้ทั้งแบบ Horizontally transmission และ Vertically transmission (Nishi et al., 2016)

**รูปที่ 1.7** ลักษณะทางกายภาพของปลากะพงขาวที่ติดโรค VNN; ช่องท้องโป่งพองและตาโปน [A] และมีจุดดำกระจายตามลำตัว [B] (Ziarati et al., 2020)

**3. อนุภาคเสมือนไวรัส**

อนุภาคเสมือนไวรัส (Virus-like particle; VLP) เป็นโครงสร้างโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกับไวรัสในธรรมชาติ แต่ไม่ปรากฏจีโนมของไวรัส (Zeltins, 2013) (รูปที่ 1.8) ทำให้ไม่ก่อโรค อีกทั้งยังสามารถก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันได้คล้ายกับไวรัสเจ้าบ้าน และได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยกว่าการไวรัสในธรรมชาติ (Lan et al., 2018) VLPs อาจถูกสังเคราะห์โดยใช้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, พืช, แมลง, ยีสต์ หรือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเซลล์โพรคาริโอตจึงเป็นที่นิยมในการใช้ผลิต VLPs เนื่องจากมีเวกเตอร์ที่ใช้แสดงออกโปรตีนที่หลากหลาย, สะดวกในการขยายฐานการผลิตโดยใช้ถังหมัก, มีข้อมูลทางพันธุกรรมและชีวเคมีครบถ้วน, ใช้เวลาในการผลิตสั้นแต่ได้ปริมาณผลผลิตสูง, ใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงราคาถูก และมีฐานข้อมูลทางด้าน Transciptomics และ proteomics ทำให้ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ (Liew et al., 2010) VLPs จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันการก่อโรคจากไวรัส อย่างไรก็ตามวัคซีนจำเป็นต้องใช้ระบบ cool chain ในการเก็บรักษาคุณภาพของวัคซีนเพื่อให้คงประสิทธิภาพขณะขนส่ง จึงมีการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาให้ง่ายและใช้ต้นทุนต่ำในการเก็บรักษา (Lan et al., 2018)




**รูปที่ 1.8** ลักษณะของอนุภาคเสมือนไวรัส (Tagliamonte et al., 2017)

จากรายงานการวิจัยของวิรยธิดา บุบผาสุข ระบุสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกและทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนและยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถรวมกลุ่มกันเป็น VLPs จริง งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการทดสอบสมบัติของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus ที่ผลิตด้วย *Escherichia coli* เพื่อนำไปประยุกต์ในการผลิตวัคซีนส่งผ่านให้ปลาในระดับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงต่อไป

**วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

เพื่อทดสอบสมบัติของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus ที่ผลิตด้วย *Escherichia coli* ที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกัน

# บทที่ 2
# อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

## 1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ฮิสแทรปสำหรับสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ บริษัท GE Healthcare, USA
2. แผ่นกรองสารละลายขนาด 0.45 ไมครอน บริษัท Alwscl, China
3. แอมมิคอนเซนตริฟูลคอนฟิลเตอร์ (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter 50k) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บริษัท Merck, Germany

## 2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อิมมิดาโซล (Imidazole) บริษัท ITW Reagent, USA
2. แอนติฮีสทิดีน (Anti-Histidine) บริษัท R&D Systems, USA
3. แอนติ-เมาส์ ไอจีจี คอนจูเกต เฮชอาร์พี (Anti-mouse IgG conjugated HRP) บริษัท Sigma-Aldric, USA

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการทดลอง

## 1. แสดงออกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน

1.1 คัดเลือกและชักนำรีคอมบิแนนท์โคลนที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน

แยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คัดเลือกไว้ โดยการ streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่ประกอบไปด้วยยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 1 โคลน เพื่อเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นโดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่ประกอบไปด้วยยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$) จากนั้นถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น จำนวน 14 $OD_{600}$ ลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่ง $OD_{600}$ เท่ากับ 0.3-0.4 แล้วจึงชักนำให้โปรตีนมีการแสดงออกด้วยการเติมสาร isopropyl-β-D-1-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์ในหลอดเซนติฟิวก์ใหม่ หลอดละ 50 $OD_{600}$ โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่เก็บได้ไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis

1.2 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis

1.2.1 เตรียมตัวอย่างโปรตีนจากตะกอนเซลล์

เติมสารละลายผสมสำหรับเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากตะกอนเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย 4X sample buffer ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร, สาร β-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อเซลล์ 1 $OD_{600}$ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

1.2.2 วิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

ดูดส่วนน้ำใสที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างโปรตีน (ข้อ 1.2.1) ลงในหลุม 12% SDS-polyacrylamide จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที แล้วนำเจลแผ่นที่หนึ่งไปย้อมสีด้วยการแช่ในสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกจากเจลด้วยการแช่ใน destaining solution ทำการเขย่าจนพื้นหลังแผ่นเจลใส จากนั้นทำให้เจลคงสภาพด้วยการแช่ใน fix solution ส่วนเจลอีกแผ่นนำไปตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis

1.2.3 ตรวจติดตามโปรตีนโดยวิธี Western blotting analysis

1.2.3.1 โอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane

นำแผ่นเจลที่ได้รับการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งไม่ผ่านการย้อมสี นำมาตัดส่วนของ stacking gel ออก จากนั้นจึงนำไปแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเตรียม PVDF membrane และ thick blot paper จำนวน 2 แผ่น ตามขนาดของ separating gel จากนั้นนำไปแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 15 นาที โดยก่อนแช่ PVDF membrane ใน transfer buffer จะต้องแช่ PVDF membrane ใน absolute methanol ให้ทั่วทั้งแผ่น เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำทั้งแผ่นเจล, PVDF membrane และ thick blot paper วางบนเครื่อง semi-dry transfer cell โดยจัดวางดังนี้ นำ thick blot paper แผ่นที่หนึ่งวางด้านล่างสุด จากนั้นตามด้วย PVDF membrane และแผ่นเจล ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วย thick blot paper แผ่นที่สอง แล้วจึงเท transfer buffer ให้ชุ่มจากนั้นไล่ฟองอากาศโดยใช้หลอดแก้วกลิ้งบน thick blot paper ด้านบนสุดเบา ๆ ก่อนปิดฝาเครื่อง แล้วให้กระไฟฟ้าคงที่ 100 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 120 นาที

1.2.3.2 ตรวจติดตามสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้รับการถ่ายโอนโปรตีนแล้ว (ข้อ 1.2.3.1) แช่ใน blocking buffer (5% skim milk ในสารละลาย PBST) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำ PVDF membrane บ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิคือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine ในอัตราส่วน 1:8,000 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาทีแล้วล้างด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 ครั้งและ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง ตามลำดับ จากนั้นจึงบ่ม PVDF membrane ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิคือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ mouse IgG conjugated HRP ในอัตราส่วน

1:5,000 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วยสารละลาย PBST เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายซับสเตรท (5 mL 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 11 µL 90 mM p-Coumaric acid, 25 µL 250 mM Luminol, 1.5 µL 30% $H_2O_2$) ลงบน PVDF membrane เขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปตรวจติดตามสัญญาณด้วยเครื่อง chemiluminescence

**2. ทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนให้บริสุทธิ์**

2.1 ละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำตะกอนเซลล์ที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน มาเติม 1.8 มิลลิลิตร PBS buffer (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 100 mM $Na_2HPO_4$, และ 18 mM $KH_2PO_4$) ที่มี 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไลโซไซม์ เป็นส่วนประกอบ บ่มบนน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นเติม 10% (v/v) Triton X-100 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที ต่อมาเติม 900 ไมโครลิตร PBS buffer ที่มี 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไลโซไซม์เป็นส่วนประกอบ และเติม 10% Triton X-100 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติม 1.8 มิลลิลิตร PBS buffer ที่มี 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไลโซไซม์ เป็นส่วนประกอบ บ่มบนน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นเติม 10% Triton X-100 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงดูดส่วนน้ำใสใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายโปรตีนด้วย PVDF low-binding syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.2 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอมลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารละลายโปรตีนที่กรองแล้ว (ข้อ 2.1) ปริมาตร 5 มิลลิมิตร ผ่านคอลัมน์ Zinc affinity chromatography (ที่ผ่านการเติมประจุและทำให้อิ่มด้วย PBS buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) แล้วเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็น flow through fraction ในขั้นตอนต่อมาผ่านคอลัมน์ด้วย PBS buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 ครั้ง เพื่อชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์แบบไม่จำเพาะ (wash fraction) จากนั้นผ่านคอมลัมน์ด้วย PBS elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ imidazole เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 1 ครั้ง ตามด้วย PBS elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ imidazole เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 ครั้ง และผ่านด้วยความเข้มข้นของ imidazole เท่ากับ 60 และ 80 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรละ 5 มิลลิลิตร

ตามลำดับ จากนั้นชะโปรตีนที่ยังคงอยู่ในคอลัมน์ออกมาด้วย stripping buffer (50 mM EDTA ในสารละลาย PBS buffer) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยเก็บแต่ละส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทั้งหมดในทุก ๆ fraction แล้วนำแต่ละ fraction มาตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติม TCA ที่บ่มบนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 1.2 แล้วจึงวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแต่ละ fraction จากผล SDS-PAGE และ Western blotting analysis

**3. ทดสอบสมบัติของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน**

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาปั่นเหวี่ยงผ่าน Ultra-4 centrifugal filter unit 50k ที่ความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วย PBS buffer แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม PBS buffer 400 ไมโครลิตร ลงบนคอลัมน์แล้วดูดโปรตีนที่ติดอยู่บริเวณฟิลเตอร์ไปวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

3.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน

นำโปรตีนที่ผ่านการกรองและวัดความเข้มข้นมาแบ่งใส่หลอดจำนวน 9 หลอด ๆ ละ 10 ไมโครลิตร แล้วระเหย PBS buffer ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 10, 23 และ 36 วัน แล้วนำไปดูการสลายของโปรตีน โดยวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis

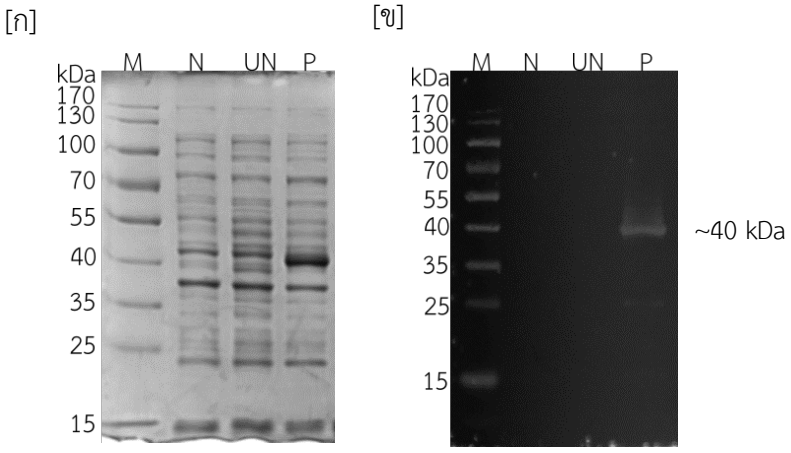
3.2 ทดสอบสภาวะการสลายตัวของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา

นำโปรตีนที่ผ่านการกรองและวัดความเข้มข้นมาหยดลงบนอาหารปลาจำนวน 9 หลอด ๆ ละ 10 ไมโครลิตร (1 หลอดต่อ 1 เม็ดอาหารปลา) แล้วระเหยที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 10, 23 และ 36 วัน แล้วนำไปดูการสลายของโปรตีน โดยวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

## 1. แสดงออกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน

จากการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami ที่มีพลาสมิดของยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัสของไวรัส RGNNV มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV โดยเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์และนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine จากผลการทดลองพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.1) แสดงว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวสามารถแสดงออกได้ในระบบการแสดงออกของโพรคาริโอต และเมื่อทดสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าวด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine พบว่าโปรตีนขนาด 40 กิโลดาลตัน สามารถถูกจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine ได้ แสดงว่ารีคอมบิแนนท์ขนาด 40 กิโลดาลตัน ดังกล่าวคาดว่าเป็นโปรตีนของแคปซิดโปรตีน RGNNV จริง จึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนนี้ไปทำการทดลองขั้นต่อไป




**รูปที่ 4.1** 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ด้วย 0.3 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 อาศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน M : Prestained Protein Marker บริษัท Thermo Fisher Scienctific, USA

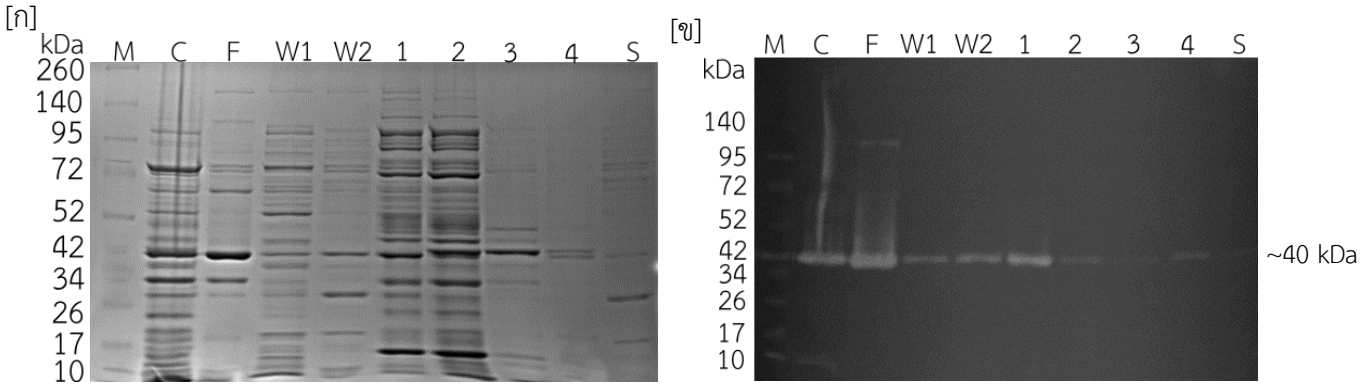
เลน N : รีคอมบิแนนท์โคลน ที่ไม่มีพลาสมิด pET28a-cpNNV

เลน UN : รีคอมบิแนนท์โคลน pET28a-cpNNV ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

เลน P : รีคอมบิแนนท์โคลน pET28a-cpNNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG

**2. การทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน**

จากการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ใน E.coli พบว่าสามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนไวรัส RGNNV ได้ โดยมีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน และสามารถจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine ได้ จึงได้นำมาทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยนำเซลล์ที่ถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV จำนวน 50 $OD_{600}$ มาละลายในสารละลาย PBS buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีไลโซไซม์ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นส่วนประกอบ จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) และทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนน้ำใสมาทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยผ่าน Zinc affinity chromatography และชะด้วย PBS buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 มิลลิโมลาร์ ละลายอยู่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สุดท้ายชะโปรตีนที่อยู่ภายในคอลัมน์ทั้งหมดด้วย สารละลาย stripping buffer จากนั้นนำโปรตีนแต่ละส่วนมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine จากผลการทดลองในรูป 4.2 พบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาในส่วนของ elution fraction ด้วย PBS buffer ที่มี imidazole ตั้งแต่ความเข้มข้น 20 ถึง 80 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแคปซิดโปรตีนถูกชะออกมามากที่ 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ imidazole ในสารละลาย PBS buffer รวมถึงมีแถบโปรตีนอื่นปนอยู่ด้วย เมื่อยืนยันด้วย Western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine พบว่าเกิดแถบโปรตีนขึ้นในตัวอย่างที่ผ่านการชะด้วย imidazole ความเข้มข้นตั้งแต่ 20 ถึง 80 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย PBS buffer และพบว่าความเข้มของแถบโปรตีนที่มากที่สุดในตัวอย่างที่ถูกชะด้วย 20 มิลลิโมลาร์ imidazole ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV สามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Zinc affinity chromatography จึงนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ไปทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนต่อไป




**รูปที่ 4.2** 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผ่านการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Zinc affinity chromatography

เลน M : Prestained Protein Marker บริษัท Thermo Fisher Scienctific, USA

เลน C : Crude extraction protein

เลน F : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนของน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย binding buffer

เลน W1 : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนของน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย washing buffer ครั้งที่ 1

เลน W2 : ส่วนของโปรตีนที่ละลายในส่วนของน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย washing buffer ครั้งที่ 2

เลน 1 : ส่วนของโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ imidazole ในสารละลาย PBS elution buffer

เลน 2 : ส่วนของโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 40 มิลลิโมลาร์ imidazole ในสารละลาย PBS elution buffer

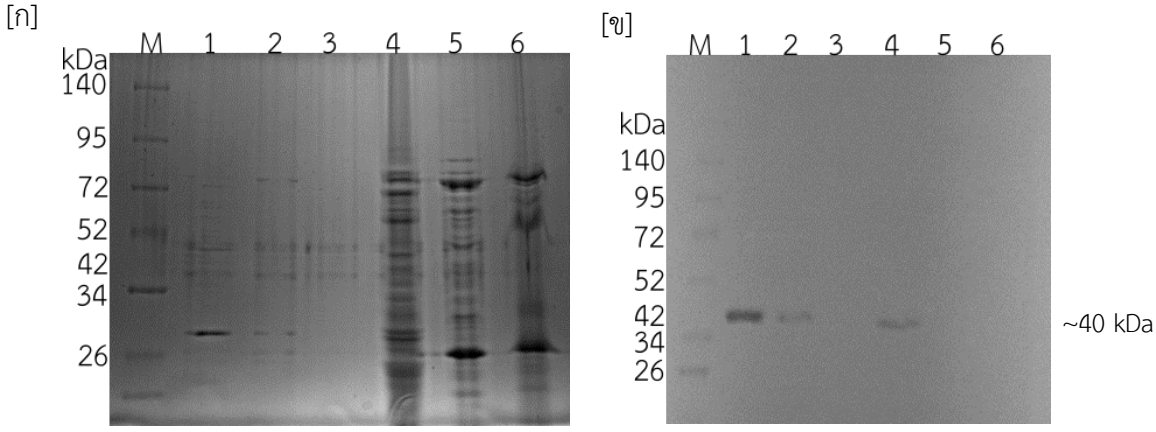
เลน 3 : ส่วนของโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 60 มิลลิโมลาร์ imidazole ในสารละลาย PBS elution buffer

เลน 4 : ส่วนของโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 80 มิลลิโมลาร์ imidazole ในสารละลาย PBS elution buffer

เลน S : ส่วนของโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนน้ำใส หลังถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย stripping buffer

**3. การทดสอบสมบัติของการรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน**

หลังจากที่ผ่านการทำให้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Zinc affinity chromatography ด้วยสภาวะที่เหมาะสม จึงนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาและสภาวะการสลายตัวเมื่อเคลือบบนผิวอาหารปลา โดยนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้มาขจัด imidazole ออกด้วยสารละลาย PBS buffer ผ่าน Centrifugal Filter Unit 50k จากนั้นเติม PBS buffer เข้าไปในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนที่อยู่ภายในคอลัมน์และทิ้งส่วนใสด้านนอกทิ้งไป จากนั้นเติม PBS buffer และปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม จนกระทั่ง PBS buffer มีปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วใช้สารละลาย PBS buffer ชะบนเมมเบรน ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บส่วนดังกล่าวไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นแบ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์และนำไปเคลือบบนผิวอาหารปลา หลอดละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มมาวัดการสลายตัวของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine เป็นระยะเวลา 10, 23 และ 36 วัน พบว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 วัน มีการสลายโครงสร้างของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา สลายโครงสร้างโปรตีนอย่างสมบูรณ์ เมื่อระยะเวลา 23 และ 36 วัน ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลาสามารถคงสภาพได้ที่ระยะเวลา 36 และ 23 วัน ตามลำดับ




**รูปที่ 4.3** 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน

เลน M : Prestained Protein Marker บริษัท Thermo Fisher Scienctific, USA

เลน 1 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

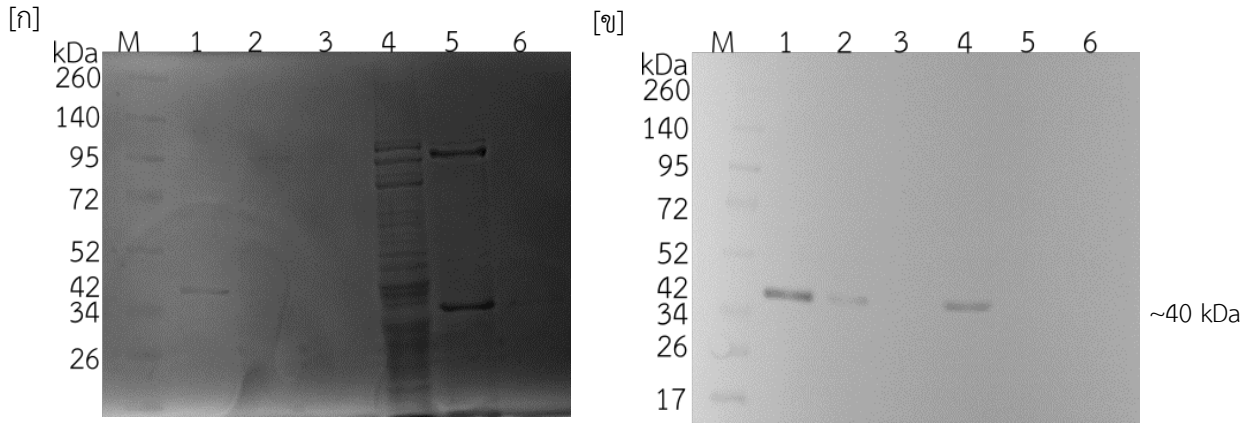
เลน 2 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เลน 3 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เลน 4 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เลน 5 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เลน 6 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส




**รูปที่ 4.4** 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 23 วัน

เลน M : Prestained Protein Marker บริษัท Thermo Fisher Scienctific, USA

เลน 1 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เลน 2 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

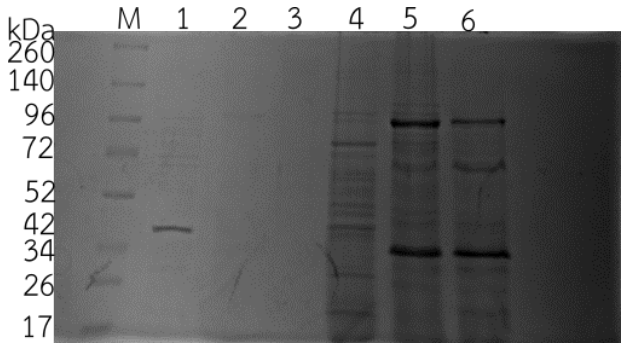
เลน 3 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เลน 4 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

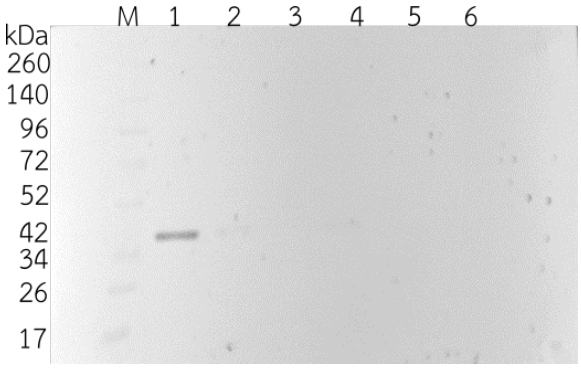
เลน 5 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เลน 6 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

[ก]




[ข]




**รูปที่ 4.5** 12% SDS-PAGE [ก] และ Western blotting analysis ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Hexa-histidine [ข] ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 36 วัน

เลน M : Prestained Protein Marker บริษัท Thermo Fisher Scienctific, USA

เลน 1 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เลน 2 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เลน 3 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เก็บแบบแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เลน 4 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เลน 5 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เลน 6 : รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

# บทที่ 5
# สรุปการผลการทดลอง

การทำให้แสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน พบว่าโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์แคปซิด เมื่อถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน และทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Zinc affinity chromatography และนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาขจัด imidazole ด้วยสารละลาย PBS buffer โดยผ่าน Centrifugal Filter Unit 50k หลังจากนั้นแบ่งรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเก็บแบบแห้งและเคลือบบนผิวอาหารปลา พบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์ รีคอมบิแนนท์ที่เก็บแบบแห้ง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการสลายโครงสร้างของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส ยังสามารถคงสภาพของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ได้ ส่วนรีคอมบิแนนท์ที่เคลือบบนผิวอาหารปลา หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส มีการสลายโครงสร้างของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังสามารถคงสภาพของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส RGNNV ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lan และคณะ ในปี 2018 ที่ระบุว่ารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในสารสารละลายบัฟเฟอร์เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส สามารถคงสภาพอยู่ได้ในระยะเวลา 4 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ยังคงสภาพจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blot จำเป็นต้องตรวจสอบการรวมกลุ่มกันเป็น VLPs เพื่อนำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่เก็บรักษาแล้วยังคงสภาพของแคปซิดโปรตีนอยู่ไปทดสอบความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาว และในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวจากรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่เคลือบบนผิวอาหารปลา อาจมีการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริเวณผิวอาหารในสิ่งแวดล้อมสามารถตรวจสอบ โดยนำอาหารปลาที่เคลือบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนใส่ในน้ำตัวอย่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับสิ่งแวดล้อมแล้วตรวจการละลายของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในน้ำตัวอย่าง ในรายงานปี 1999 ของ Guillaume และคณะ ระบุว่าอาจจำเป็นต้องมีการยึดเหนี่ยวรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนให้ติดบริเวณผิวอาหารปลาก่อน โดยการเคลือบสารประเภทไขมันหลังจากเคลือบผิวอาหารปลาด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเพื่อชะลอการละลายของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนในสิ่งแวดล้อมและอาจเพิ่มการเคลือบสารที่ดึงดูดต่อการบริโภคอาหารของปลาก่อนนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวต่อไป

# เอกสารอ้างอิง


ฐิติมา เอียดแก้ว. (2563). *สถานการณ์สินค้าปลากะพงขาวและผลิตภัณฑ์ของไทยในในช่วง 9 เดือนแรกของปี* 2563. สืบค้น 18 พฤษภาคม 2564 จาก www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/

ไทยเกษตรศาสตร์. (2555). *การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง*. สืบค้นวันที่ 18 พฤษภาคม 2564 จาก https://www.thaikasetsart.com/

Ariff, N., Abdullah, A., Azmai, M.N.A., Musa, N. & Zainathan, S.C. (2019). Risk factors associated with viral nervous necrosis in hybrid groupers in Malaysia and the high similarity of its causative agent nervous necrosis virus to reassortant red-spotted grouper nervous necrosis virus / striped jack nervous necrosis virus strains. *Veterinary World*, 12, 1273-1284. doi: 10.14202/vetworld.2019.1273-1284

Bandin, I., & Souto, S. (2020) . Betanodavirus and VER disease: a 30- year research review. *Pathogens*, 9, 106.

Barsøe, S., Toffan, A., Pascoli, F., Stratmann, A., Pretto, T., Marsella, A., Er-Rafik, M., Vendramin, N., Olesen, N.J., Sepúlveda, D. & Lorenzen, N. (2021). Long-term protection and serologic response of european sea bass vaccinated with a betanodavirus virus-like particle produced in pichia pastoris. *Vaccines*, 9, 447. doi: 10.3390/vaccines9050447

Eirini, L., Chrysostomos, D., Maritsa, M., Taxiachis, C., Ioannis S.P., Eleni, D., Evdokia, K., Fotini, A., Dimitrios, K. & Konstantina, B. (2020). Investigation of routes of entry and dispersal pattern of RGNNV in tissues of european sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases*, 43, 1363-1371. doi: 10.1111/jfd.13215

Guillaume, J., Khaushik, S., Bergot, P. & Metailler, R. (1999). Nutrition and feeding of fish and crustaceans. pp. 490.

Lan, N.T., Kim, H.J., Han, H.J., lee, D.C., Kang, B.K., Han, S.Y., Moon, H. & Kim, H.J. (2018). Stability of virus-like particles of red-spotted grouper nervous necrosis virus in the aqueous state, and the vaccine potential of lyophilized particles. *Biologicals,* 51, 25-31. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.11.002

Le Breton, A., Grisez, L. Sweentman, J. & Ollevier, F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). Journal of Fish Diseases, 20, 145-151 doi: 10.1046/j.1365-2761.1997.00284.x

Liew, M.W.O., Rajendran, A. & Middelberg, A.P.J. (2010). Microbial production of virus-like particle vaccine protein at gram-per-litre levels. Journal of Biotechnology, 150, 224-231. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.08.010

Mori, K.I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. & Furusawa, I. (1992). Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187, 368-371.

Nakai, T., Mori, K., Sugaya, T., Nishioka, T., Mushiake, K. & Yamashita, H. (2009). Current knowledge on viral nervous necrosis (VNN) and its causative betanodaviruses. Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 61, 198-207.

Nishi, S., Yamashita, H., Kawato, Y. & Nakai, T. (2016). Cell culture isolation of piscine nodavirus (betanodavirus) in fish-rearing seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 2537-2544. doi: 10.1128/AEM.03834-15

Nishizawa, T., Furuhashi, T., Nagai, T., Nakai, T. & Muroga, K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and Environmental Microbiology,* 64, 1633-1636.

Shetty, M., Maiti, B., Shivakumar Santhosh, K., Venugopal, M.N., & Karunasagar, I. (2012). Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian journal of virology*, 23, 114-123. doi: 10.1007/s13337-012-0088-x

Tagliamonte, M., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M. & Buonaguro, L. (2017). Chapter Eleven -Virus-Like Particles. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*, 205-219.

Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particle: a review. *Molecular Biotechnol*ogy, 53, 92-107. doi: 10.1007/s12033-012-9598-4

Ziarati, M., Zorriehzahra, M.J., Kafilzadeh, F., Karger, M. & Ghasemi, F. (2020). An overview of betanodavirus and perspective of viral nervous necrosis (VNN) disease in Iranian southern waters. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19, 2214-2233. doi: 10.22092/ijfs.2020.122274

# ภาคผนวก ก
# สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

**1. อาหาร Luria-Bertani broth**

| | |
|---|---|
| เพปโทน (Peptone) | 10.00 กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) | 10.00 กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 5.00 กรัม |

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดแล้วละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นแล้วเติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินและคลอแรมฟินิคอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 และ 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**หมายเหตุ** Luria-Bertani Agar คือ เติมผงวุ้น 15 กรัม ใน LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

# ภาคผนวก ข
# สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

**1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate-Buffered Saline, PBS)**

| | |
|---|---|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 8.00 กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.20 กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 1.44 กรัม |
| ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) | 0.24 กรัม |

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดแล้วละลายในน้ำปลอดประจุ ปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**หมายเหตุ** PBS-Tween 20, PBST คือ นำ PBS มาเติม Tween-20 ให้ได้ 0.5% (v/v)

**2. สารละลาย 10 เท่าของทรานเฟอร์บัฟเฟอร์ (10X Transfer buffer)**

| | |
|---|---|
| ไกลซีน (Glycine) | 290.00 กรัม |
| ทริสเบส (Tris-base) | 37.00 กรัม |
| โซเดียมโดดิลซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) | 580.00 กรัม |

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดแล้วละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสุดท้ายเติมแอ็บโซลูทเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20% (v/v)

**3. สารละลายบล็อกกิ้ง (Blocking solution)**

ชั่งเตรียมสกิมมิลค์ (Skim milk) จากนั้นละลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลีน-ทวีน 20 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% (w/v)