บทความวิจัย

วิธีอย่างง่ายและมีประสิทธิภาพในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของไวรัสหัวเหลือง

วัชรายา มาศแจ้ง[1] ศิริขวัญ พลประทีป[2] และ ธิปชัย วัฒนวิจารณ์[3*]

ได้รับบทความ: 31 พฤษภาคม 2561
ได้รับบทความแก้ไข: 1 กรกฎาคม 2561
ยอมรับตีพิมพ์: 3 กรกฎาคม 2561

บทคัดย่อ

การทำให้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์บริสุทธิ์เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิจัยที่เกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัส ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการทำไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์จากเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อให้ง่ายและมีประสิทธิภาพ วิธีการทำให้บริสุทธิ์นี้ไม่จำเป็นต้องใช้การปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียนและเครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์ เริ่มจากนำเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองไปบดและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดเศษเซลล์ นำส่วนที่เป็นสารละลายใสจากเหงือกไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตรและปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บไวรัสหัวเหลือง ทำการตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ จีพี116, จีพี64 และ พี20 จากนั้นทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน หาปริมาณไวรัสโดยใช้เทคนิครีเวิร์สทรานสคริปชั่นเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time RT-PCR) พบว่ามีปริมาณ 6.53×10^7 ก๊อปปี้ต่อไมโครลิตร ประเมินความรุนแรงเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยกุ้งที่ฉีดไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3 วัน หลังจากได้รับเชื้อ นอกจากนี้การบ่มไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์กับเซลล์แมลง Sf9 พบการแสดงออกของยีนไวรัสจีพี64 ซึ่งแสดงถึงการติดเชื้อไวรัสของเซลล์ Sf9 ดังนั้นวิธีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำไปใช้ในงานวิจัยทางด้านโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

คำสำคัญ: ไวรัสหัวเหลือง, การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของไวรัส, กุ้งกุลาดำ

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ
[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: tipachai.va@kmitl.ac.th

A Simple and Efficient Method for Partial Purification of Yellow Head Virus

Watchalaya Matjank[1], Sirikwan Ponprateep[2], and Tipachai Vatanavicharn[3*]

Received: 31 May 2018
Revised: 1 July 2018
Accepted: 3 July 2018

ABSTRACT

Purification of mature viral particles is needed for the research involving in viral infections. Herein, a simple and efficient purification method for yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*-infected gill is developed. This purification method does not require the density gradient centrifugation and ultracentrifugation. The YHV-infected gills were homogenized and centrifuged to remove the cell debris. The gill lysate was filtered through 0.45 μm membrane filter and centrifuged to collect the YHV. The partial purified YHV was verified by SDS-PAGE technique. At least 3 viral structural proteins of GP116, GP64 and P20 were detected. The intact virion was also observed under a transmission electron microscope. The purified YHV was quantified using real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR) technique. The preparation was found to contain 6.53×10^7 copies per microliter. The virulence of purified YHV was evaluated. The shrimp injected with the purified YHV resulted in 100% mortality within three days. Moreover, the incubation of purified YHV with Sf9 insect cell line showed the expression of viral gene, *gp64,* indicating the viral infection of Sf9 cell. Thus, the partial purification method of YHV was efficient and convenient to be used for the research in YHV disease.

Keywords: Yellow head virus, Virus partial purification, *Penaeus monodon*

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok
[3]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok
[*]Corresponding author, e-mail: tipachai.va@kmitl.ac.th

บทนำ

โรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus disease, YHD) เป็นโรคติดเชื้อที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยและระบบเศรษฐกิจของประเทศอย่างมีนัยสำคัญเกิดจากไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus, YHV) ซึ่งก่อโรคได้ทั้งในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ กุ้งขาวแวนาไมด์ (*Peneaus vannamei*) เมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสจะมีอัตราการตายสูงและรวดเร็ว [1] ในประเทศไทยมีการพบการระบาดของไวรัสหัวเหลืองเมื่อปี พ.ศ. 2533 และต่อมาได้มีรายงานการแพร่กระจายในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งในทวีปเอเชีย [2] นอกจากนั้นมีการตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในกุ้งแช่แข็งที่ส่งออกจากประเทศในแถบเอเชียไปยังสหรัฐอเมริกา [3]

ไวรัสหัวเหลืองเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Single-strand RNA virus) จัดอยู่ในกลุ่มของ Retrovirus ซึ่งอยู่ในสกุล Okavirus วงศ์ Roniviridae และ อันดับ Nidovirales มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 ± 5 นาโมเมตร และมีความยาว 195 ± 5 นาโนเมตร พบอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ และช่องว่างระหว่างเซลล์ อวัยวะเป้าหมายของไวรัสหัวเหลือง ได้แก่ เนื้อเยื่อชั้นเอคโตเดิร์ม (Ectodermal) และมีโซเดิร์ม (Mesodermal) ได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ), เม็ดเลือด (haemocytes), เหงือก (gill) และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haematopoietic tissue) เป็นต้น [4–6] เมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองลำตัวกุ้งจะมีสีซีด ส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจากตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลือง การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสามารถติดต่อได้ทั้งทางตรง (Vertical transmission) ผ่านทางพ่อแม่สู่ลูกและทางอ้อม (Horizontal transmission) โดยการกินกันเองและผ่านทางน้ำซึ่งมีการเลี้ยงกุ้งปกติร่วมกับกุ้งป่วย [4, 7] ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่ใช้ในการรักษากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีประสิทธิภาพ มีเพียงการป้องกันไม่ให้กุ้งเกิดการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว การศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งจึงเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยงานวิจัยเหล่านี้ส่วนใหญ่มีการสกัดไวรัสที่บริสุทธิ์มาใช้ในการทดลอง ได้แก่ วิธีการปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียน (density gradient centrifugation) ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงที่ใช้ความเร็วรอบสูง โดยใช้เครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์ (Ultracentrifugation) [8, 9] ซึ่งวิธีดังกล่าวนั้นมีความซับซ้อน ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาสูง นอกจากนั้นผู้วิจัยต้องมีความชำนาญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงวิธีการสกัดไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอย่างง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยได้ปรับปรุงวิธีการทดลองจากงานวิจัยของ Xie et al. [9] ซึ่งเป็นการทำไวรัสตัวแดงดวงขาวให้บริสุทธิ์ ในงานวิจัยนี้ใช้ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงที่ต่ำกว่าสามารถใช้เครื่องเซนตริฟิวส์ทั่วไปในห้องปฏิบัติการได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์และการปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียน ไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของไวรัสด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) ตรวจสอบปริมาณไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค real time -PCR และทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคโดยใช้กุ้งกุลาดำและเซลล์แมลง sf9

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. กุ้งกุลาดำและการเพิ่มจำนวนไวรัสหัวเหลือง

ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์กุ้งกุลาดำสุขภาพดี ขนาด 15-20 กรัม จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง จ.สุราษฎร์ธานี ประเทศไทย โดยนำกุ้งกุลาดำมาทำการปรับสภาพโดยการเลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 20 พีพีที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

การเพิ่มปริมาณไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำโดยใช้น้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูชีววิทยาและจีโนมกุ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำน้ำเลือดกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองมาเจือจาง 10^{-7} เท่าด้วย 0.85% NaCl และฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำปริมาตร 100 ไมโครลิตร เฝ้าติดตามอาการของกุ้งกุลาดำที่มีอาการใกล้ตาย ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 3 วัน โดยทำการเก็บเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จนกระทั่งนำไปใช้ในการแยกไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์

2. การทำไวรัสให้บริสุทธิ์

การแยกไวรัสหัวเหลืองให้บริสุทธิ์ในการทดลองนี้ได้พัฒนาวิธีการมาจากการแยกไวรัสตัวแดงดวงขาวจากงานวิจัยของ Xie *et al.* [9] โดยนำเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจำนวน 1 กรัม ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร บดในบัฟเฟอร์ TNE (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA และ 1 mM PMSF) 200 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ TNE (เย็น) เพิ่มอีก 1 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษซากเซลล์จากเหงือกกุ้ง นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อ ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Milipore) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนไวรัสไปละลายในบัฟเฟอร์ TM (50 mM Tris-HCl pH 8.5 และ 10 mM $MgCl_2$) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเก็บส่วนตะกอนนี้ไว้บนน้ำแข็ง ในส่วนของสารละลายที่ได้หลังจากการแยกตะกอนไวรัสให้นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 16,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งจะได้ตะกอนขาว ปิเปตต์สารละลายบัฟเฟอร์ TM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอน จากนั้นนำตะกอนไวรัสทั้งสองครั้งมารวมกันและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองด้วย SDS-PAGE

นำไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากขั้นตอนข้างต้นมาตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสด้วยการนำไวรัสที่ได้มาผสมกับ 0.4% (v/v) Triton X-100 ด้วยสัดส่วน 1 ต่อ 1 (ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของ Polyacrylamide gel ที่ 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยวิธี Coomassie

4. การตรวจสอบความสมบูรณ์ของไวรัสหัวเหลืองด้วย Transmission electron microscopy (TEM)

นำไวรัสที่สกัดได้มาตรึงลงบนกริดคอปเปอร์ (copper grids, 200 mesh) และย้อมแบบ negative (2% uranyl acetate) จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้อง Transmission electron microscopy (JEM-2100) เพื่อตรวจสอบรูปร่างของไวรัสหัวเหลือง

5. การหาจำนวนของไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription PCR (realtime RT-PCR)

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลืองมาสร้างพลาสมิดลูกผสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณไวรัส โดยเก็บเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองน้ำหนัก 0.5 กรัม จากนั้นเติมสารละลาย TRI reagent (Molecular Research Center, USA) 200 ไมโครลิตร แล้วสกัดอาร์เอ็นเอตามคำแนะนำของคู่มือ สังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ oligo $(dT)_{18}$ เป็นไพร์เมอร์ร่วมกับชุด Revert Aid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) โดยปฏิบัติตามคู่มือ ทำการเพิ่มปริมาณยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้ *gp64*_YHV_Forward และ *gp64*_YHV_Reverse ดังตารางที่ 1 ในการเพิ่มปริมาณยีน ปริมาตรรวมของพีซีอาร์ 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 8 ไมโครลิตร 10x buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris–HCl pH 8.8, 50 มิลลิโมลาร์ $(NH_4)_2SO_4$, Triton X-100 0.1% (v/v), 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$) 20 ไมโครลิตร dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพร์เมอร์คู่ละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ RBC *Taq* DNA polymerase 10 ยูนิต โดยทำพีซีอาร์ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 2 ทั้งหมด 30 รอบ ขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นทำยีนให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel purification kit (Favorgen, Taiwan) นำชิ้นยีนที่ได้ไปเชื่อมต่อกับ TA cloning vector โดยทำตามคู่มือของชุดคิท RBC TA cloning vector (RBC Cloning system, Taiwan) โดยใช้ TA vector 50 นาโนกรัม และชิ้นยีน 200 นาโนกรัม นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1Blue โดยวิธีการ Heat Shock Transformation ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม (*gp64*-TA vector) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่มีแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร isopropyl-ß-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 100 ไมโครโมลาร์ และ X-gal 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมออกจากแบคทีเรียด้วยชุด Plasmid DNA Extraction kit (Favorgen, Taiwan) โดยปฏิบัติตามคู่มือ แล้วหาความเข้มข้นของพลาสมิดเพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในการหาจำนวนไวรัสหัวเหลือง

การสร้างกราฟมาตรฐานและการหาจำนวนไวรัสหัวเหลือง เริ่มจากเจือจางพลาสมิดลูกผสมที่ยีน *gp64* ให้มีความเข้มข้น 10^5-10^9 ก๊อปปี้ต่อไมโครลิตร เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสร้างกราฟมาตรฐาน ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ โดยใช้ชุด BioFACT™ Total RNA Prep Kit (Biofact, South Korea) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบในการหาจำนวนไวรัสหัวหลือง โดยใช้ชุดคิท iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step RT-qPCR (Bio-Rad, USA) โดยมีปริมาตรรวมของพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x iTaq universal SYBR reaction mix 5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ *gp64*_YHV_Forward และ *gp64*_YHV_Reverse (ตารางที่ 1) อย่างละ 0.1 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร และ iScript reverse transcriptase 1.25 ไมโครลิตร (สำหรับตัวอย่างที่ต้นแบบเป็นอาร์เอ็นเอ) จากนั้นทำพีซีอาร์ด้วยเครื่อง CFX96 touch™

real-time PCR detection system ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 Reverse Transcription Reaction ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ขั้นที่ 2 Polymerase Activation และ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ขั้นที่ 3 การเพิ่มปริมาณยีน *gp64* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 วินาที และ Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 3 ทั้งหมด 40 รอบ

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	วัตถุประสงค์	อ้างอิง
*gp64*_YHV_Forward	CATGGATCGTTTGGCTTTCGTTC	Real-time RT-PCR	Jatuyosporn et al.
*gp64*_YHV_Reverse	TCACTATTACTCCAGTTATCA	และ RT-PCR	[10]
EF1-α_Forward	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC	Internal control สำหรับ	Visetnan et al.
EF1-α_Reverse	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGA	RT-PCR	[11]
actin_Forward	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGA	Internal control สำหรับ	
actin_Reverse	GGAGGCGTGGGGCAGGGCRTA	real-time RT-PCR	

6. การทดสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

นำไวรัสหัวเหลืองไปทดสอบประสิทธิภาพการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ โดยนำกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนัก 3-5 กรัม แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มที่หนึ่งทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ทำการเจือจาง 10^{-7} (653 ก๊อปปี้ต่อตัวกุ้ง) เท่าด้วย 0.85% NaCl ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร และอีกกลุ่มหนึ่งทำการฉีดด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการฉีดไวรัสดังกล่าวบริเวณกล้ามเนื้อและทำการจดบันทึกอัตราการตายของกุ้งหลังจากการฉีดไวรัส แต่ละกลุ่มตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

7. การทดสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง sf9

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ sf9 (invitrogen) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ sf900 (gibco) จากนั้นถ่ายเซลล์ลงบนถาดหลุมขนาด 24 หลุม โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์ sf9 เกาะที่ก้นหลุม จากนั้นทำการเจือจางไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยมีความเข้มข้น 6.5×10^5 ก๊อปปี้ต่อไมโครลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ sf900 และปิเปตต์ไวรัสหัวเหลืองที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เลี้ยงเซลล์ (6.5×10^6 ก๊อปปี้ต่อหลุม) ทำการบ่มเซลล์ sf9 กับไวรัสหัวเหลืองที่ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ sf9 เพื่อนำมาสกัด total RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent (Molecular Research Center, สหรัฐอเมริกา) ด้วยวิธีตามคำแนะนำของคู่มือ จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ oligo $(dT)_{18}$ เป็นไพร์เมอร์ร่วมกับชุดคิท RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) โดยปฏิบัติตามคู่มือ นำ cDNA ที่ได้มาทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *gp64*_YHV_Forward และ

*gp64*_YHV_Reverse (ตารางที่ 1) ในการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสหัวเหลือง และไพรเมอร์ actin_Forward และ actin_Reverse ในการตรวจสอบยีน β-actin ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

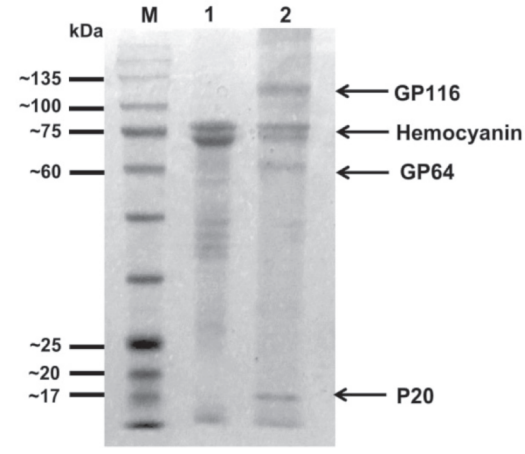
8. การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำการแบ่งตัวอย่างกุ้งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ทำการฉีดไวรัสหัวเหลืองที่ทำการเจือจาง 10^{-7} เท่าด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และอีกกลุ่มหนึ่งทำการฉีดด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเก็บเหงือกกุ้งที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการฉีดไวรัส นำเหงือกกุ้งที่ได้มาสกัด total RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent (Molecular Research Center, USA) ด้วยวิธีตามคำแนะนำของคู่มือ จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ oligo $(dT)_{18}$ เป็นไพร์เมอร์ร่วมกับชุดคิท RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) โดยปฏิบัติตามคู่มือที่ให้มา จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *gp64*_YHV_Forward และ *gp64*_YHV_Reverse ในการตรวจสอบยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง และใช้ไพรเมอร์ EF1-α_Forward และ EF1-α _Reverse ในการตรวจสอบยีน *EF1-α* ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ RBC *taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) ในการเพิ่มปริมาณยีน *gp64* และ *EF1-α* ปริมาตรรวมของพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร, 10 × buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 10 มิลลิโมลาร์ Tris–HCl pH 8.8, 50 มิลลิโมลาร์ $(NH_4)_2SO_4$, Triton X-100 0.1% (v/v), 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$) 2.5 ไมโครลิตร, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพร์เมอร์คู่ละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ RBC Taq DNA polymerase 1.25 ยูนิต โดยทำพีซีอาร์ ด้วยสภาวะดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยทำขั้นที่ 2 ทั้งหมด 30 รอบ ขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลที่ได้ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (w/v)

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

นำไวรัสหัวเหลืองที่ทำให้บริสุทธิ์ มาตรวจสอบโปรตีนโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนหลักอยู่ 3 ชนิด คือ P20 เป็นโปรตีนชนิดนิวคลีโอโปรตีน GP64 และ GP116 เป็นโปรตีนชนิดไกลโคโปรตีน ซึ่งโปรตีนมีขนาดประมาณ 20, 64 และ 116 กิโลดาลตันตามลำดับ และพบการปนเปื้อนของโปรตีนฮีโมไซยานินทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม ซึ่งมีขนาด 73 และ 75 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โปรตีนโครงสร้างของไวรัสหัวเหลืองที่วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% Acrylamide (lane M: prestained protein marker,lane 1: โปรตีนจากเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองก่อนทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลือง lane 2: โปรตีนที่สกัดจากไวรัสหัวเหลือง)

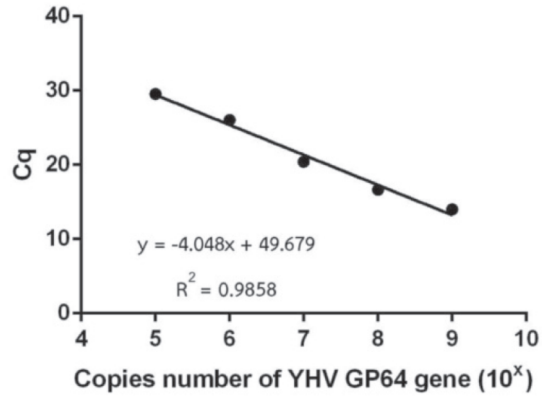
2. การตรวจสอบลักษณะของไวรัสหัวเหลืองด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน

เมื่อนำไวรัสหัวเหลืองที่ทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด TEM พบว่าไวรัสที่ได้มีรูปร่างเป็นท่อนมีขนาดกว้างประมาณ 50 นาโนเมตร และยาวประมาณ 180 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2 ผิวมีลักษณะขรุขระของเอนโดพลาสมิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสที่สกัดได้มีความสมบูรณ์

รูปที่ 2 การตรวจสอบรูปร่างของไวรัสหัวเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Transmission Electron Microscopy

3. การหาจำนวนของไวรัสหัวเหลือง

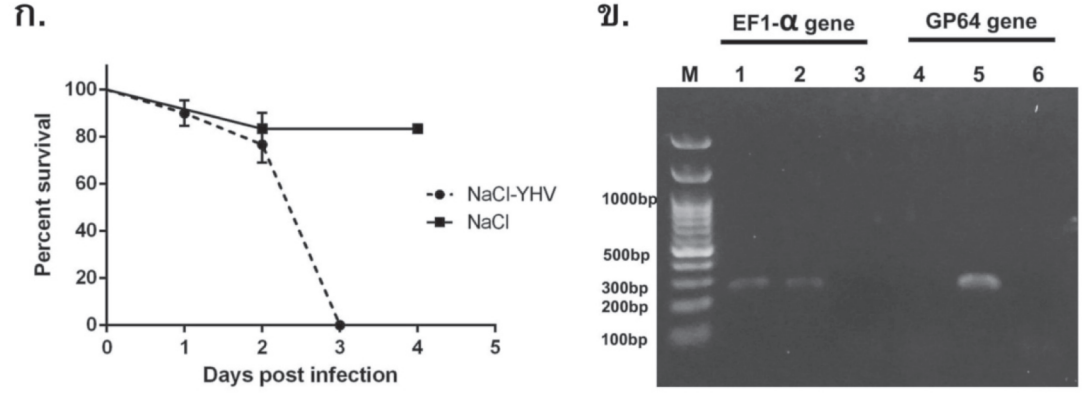
เมื่อนำไวรัสที่ผ่านวิธีการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาหาปริมาณไวรัสโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3) ที่สร้างจากพลาสมิดลูกผสมของยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง ($R^2 = 0.9858$) ด้วยวิธี RT-qPCR พบว่าไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนเท่ากับ 6.53×10^7 ก๊อปปี้ต่อไมโครลิตร



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่าง Cq และจำนวนก๊อปปี้ของยีน *gp64* ใช้ในการหาจำนวนไวรัสหัวเหลือง

4. การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

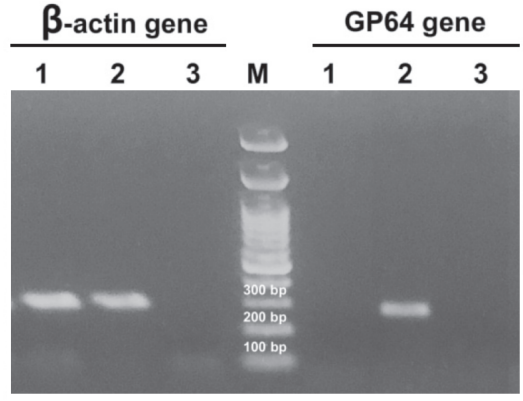
การทดสอบประสิทธิภาพของไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ เปรียบเทียบกับการฉีด 0.85% NaCl พบว่าไวรัสหัวเหลืองมีผลทำให้กุ้งกุลาดำตาย 100% ภายใน 3 วันหลังจากการฉีดเชื้อเข้าสู่กุ้ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ที่มีอัตราการตายเพียง 20% ดังแสดงในรูปที่ 4ก. จากนั้นเมื่อนำเหงือกของกุ้งกุลาดำมาสกัด RNA และสังเคราะห์สาย cDNA เพื่อนำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT-PCR พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่มีการฉีดไวรัสหัวเหลืองมีการแสดงออกของยีน *gp64* ซึ่งมีขนาดประมาณ 250 คู่เบสเมื่อทำการตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 4ข. ซึ่งแสดงถึงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง



รูปที่ 4 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ก.อัตราการตายของกุ้งกุลาดำหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ข. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gp64* ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิคพีซีอาร์เมื่อนำมาตรวจด้วย 1.2% (w/v) Agarose gel Electrophoresis (lane M: DNA ladder, lane 1 และ 4: cDNA จากกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ฉีด 0.85% NaCl, lane 2 และ 5: cDNA จากกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ฉีดไวรัสหัวเหลือง, lane 3 และ 6: negative control)

5. การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง sf9

ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเซลล์แมลง sf9 หลังจากทำการบ่มไวรัสหัวเหลืองกับเซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำเซลล์แมลง sf9 ในกลุ่มควบคุม (mock cell) และกลุ่มตัวอย่างมาทำการสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent และสร้างสาย cDNA เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าเซลล์ sf9 ที่บ่มกับไวรัสหัวเหลืองมีการพบการแสดงออกของยีน gp64 ดังรูปที่ 5 มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส ซึ่งไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าเซลล์แมลง sf9 สามารถติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้ได้



รูปที่ 5 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีพีซีอาร์ (lane M: DNA ladder, lane 1: cDNA จากเซลล์ sf9 (mock cell) , lane 2: cDNA จากเซลล์ sf9 ที่บ่มกับไวรัสหัวเหลือง, lane 3: negative control)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเตรียมเชื้อไวรัสสำหรับใช้ในงานวิจัยเป็นขั้นตอนที่สำคัญหนึ่งในกระบวนการวิจัย การเลือกสกัดไวรัสจากอวัยวะเป้าหมายจะทำให้ได้ไวรัสจำนวนมากและมีความสมบูรณ์ สำหรับเชื้อไวรัสหัวเหลืองมีอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญต่อการติดเชื้อในกุ้ง ได้แก่ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) และเหงือก (gill) [12] แต่เนื่องจากอวัยวะน้ำเหลืองมีขนาดเล็กและเก็บตัวอย่างยากกว่าเหงือกกุ้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกสกัดไวรัสจากเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสำหรับการทำบริสุทธิ์ไวรัสหัวเหลืองในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า Wongteerasupaya และคณะ [8] ได้ทำบริสุทธิ์เชื้อไวรัสหัวเหลืองจากน้ำเลือดโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงถึง 100,000 × g ด้วยการใช้เครื่องอัลตร้าเซนตริฟิวส์ร่วมกับ continuous gradient ของ urografin ซึ่งมีขั้นตอนที่ค่อนข้างซับซ้อน ต่อมา Xie และคณะ [9] ได้มีรายงานการทำบริสุทธิ์เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายขึ้นลดการใช้ density gradient และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์ แต่ยังคงใช้ความเร็วรอบสูงถึง 30,000 × g ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ นำวิธีของ Xie และคณะ [9] มาดัดแปลงเพื่อให้ง่ายต่อการสกัดไวรัส โดยลดการใช้เครื่องอัลตร้าเซนตริฟิวส์และใช้ตัวยับยั้งโปรตีเอส PMSF เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ในการทดลองนี้ได้มีการปรับความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงลงเพื่อให้สามารถใช้กับเครื่องเซนตริฟิวส์ชนิดควบคุมอุณหภูมิทั่วไปในห้องปฏิบัติการได้ จากผลการทดลองทำบริสุทธิ์ไวรัสหัว

เหลืองจากเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อด้วยวิธีนี้ พบโปรตีนโครงสร้างหลักทั้ง 3 ชนิด คือ P20, GP64 และ GP116 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [5, 13] แสดงให้เห็นว่าวิธีการทำบริสุทธิ์ไวรัสในงานวิจัยนี้สามารถแยกไวรัสหัวเหลืองออกมาได้ ผลการทดลองพบการปนเปื้อนของโปรตีนฮีโมไซยานินจากน้ำเลือดกุ้งมากับตัวอย่างไวรัสด้วย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการล้างตัวอย่างเหงือกกุ้งด้วยน้ำเกลือน้อยเกินไป การเพิ่มจำนวนการล้างเหงือกกุ้งหลังการเก็บตัวอย่างจะช่วยลดการปนเปื้อนฮีโมไซยานินได้ อย่างไรก็ตามภายในเหงือกกุ้งยังคงมีน้ำเลือดตกค้างอยู่ภายในส่งผลให้ไม่สามารถล้างออกได้หมดด้วยวิธีการล้างเพียงอย่างเดียว

เมื่อนำไวรัสหัวเหลืองไปทำการตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีรูปร่างเป็นแท่ง มีผิวขรุขระของเอนโดพลาสมิด และมีความกว้างประมาณ 50 นาโนเมตร และยาวประมาณ 180 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดและลักษณะเดียวกับไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวส์ร่วมกับ discontinuous sucrose gradient [14]

การหาจำนวนของไวรัสหัวเหลืองในงานวิจัยนี้ได้ใช้ยีน *gp64* ในการตรวจสอบ โดยทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *gp64*-TA cloning vector เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในการหาจำนวนของไวรัสหัวเหลือง ซึ่งพบว่าไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการทดลองนี้มีจำนวนเท่ากับ 6.53×10^7 ก๊อปปี้ต่อไมโครลิตร อย่างไรก็ตามการลดความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงสำหรับตะกอนไวรัสในงานวิจัยนี้อาจส่งผลต่อปริมาณของไวรัสที่สกัดได้ นอกจากนั้นความสามารถในการทนทานของกุ้งกุลาดำต่อไวรัสหัวเหลืองก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มจำนวนและความสมบูรณ์ของไวรัสในตัวกุ้งอีกด้วย

ไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการทดลองนี้ได้ถูกนำมาทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคต่อกุ้งกุลาดำและเซลล์แมลง sf9 สำหรับในกุ้งกุลาดำทดสอบด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลืองเข้าสู่กล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ พบว่าไวรัสหัวเหลือง 653 ก๊อปปี้ ทำให้เกิดอัตราการตายของกุ้งกุลาดำถึง 100% ในวันที่ 3 หลังจากการฉีดเชื้อไวรัส ซึ่งยืนยันการตายของกุ้งด้วยการเก็บเหงือกของกุ้งกุลาดำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่ากลุ่มที่ฉีดไวรัสหัวเหลืองมีการแสดงออกของยีน *gp64* ของไวรัสหัวเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตายของกุ้งกุลาดำเป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยยังได้ทดสอบประสิทธิภาพของไวรัสในการก่อโรคในเซลล์แมลง sf9 ซึ่งพบว่าเซลล์แมลงมีการแสดงออกของยีน *gp64* หลังจากการบ่มด้วยไวรัสหัวเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์นี้มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และได้รับความเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำวิจัยจากศูนย์เชี่ยวชาญอณูชีววิทยาและจีโนมกุ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., & Sithigorngul, P. (2014). Immunological-based assays for specific detection of shrimp viruses. *World Journal of Virology, 3*(1), 1-10.
2. Kanokudom, S., Prateeprat, T., Attasart, P., Roytrakul, S., Panyim, S., Smith, D.R., & Assavalapsakul, W. (2018). In vitro neutralization of yellow head virus infection in shrimp using recombinant *Pm*YRP65 Protein. *Aquaculture, 486,* 266–270.
3. Nunan, L. M., Poulos, B. T., & Lightner, D. V. (1997). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture, 160,* 19–30.
4. Comunidade Européia. (2008). Yellowhead disease. European community reference laboratory for crustacean diseases leaflet 2008.
5. Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratna, N., Hodgson, R. A. J., Cowley, J. A., Walker, P. J., Panyim, S., & Boonsaeng, V. (2003). Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of General Virology, 84*(4), 863–873.
6. Vatanavicharn, T., Pongsomboon, S., & Tassanakajon, A. (2012). Two plasmolipins from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* and their response to virus pathogens. *Developmental and Comparative Immunology, 38*(2), 389–94.
7. Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., & Flegel, T.W. (1995). A Non-occluded, Systemic Baculovirus that Occurs in Cells of Ectodermal and Mesodermal Origin and Causes High Mortality in the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms.* 21(1): 69–77.
8. Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., & Flegel, T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms, 21*(1), 69–77.
9. Xie, X., Li, H., Xu, L., & Yang, F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Research, 108*(1–2), 63–67.
10. Jatuyosporn, T., Supungul, P., Tassanakajon, A., & Kruson, K. (2014). The essential role of clathrin-mediated endocytosis in yellow head virus propagation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon. Developmental and Comparative Immunology, 44,* 100-110.

11. Visetnan, S., Donpudsa, S., Tassanakajon, A., & Rimphanitchayakit, V. (2018). Silencing of a Kazal-type serine proteinase inhibitor SPI*Pm2* from *Penaeus monodon* affects YHV susceptibility and hemocyte homeostasis. *Fish and Shellfish Immunology, 79,* 18-27.
12. Lu, Y., Tapay, L.M., Loh, P.C., Brock, J.A., & Gose, R.B. (1995). Distribution of Yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei. Diseases of Aquatic Organisms, 23,* 67–70.
13. Sittidilokratna, N., Chotwiwatthanakun, C., Km, P., Unajak, S., Boonnad, A., Wangnai, W., Jitrapakdee, S., Cowley, J. A., & Walker, P. J. (2009). A virulent isolate of yellow head nidovirus contains a deformed envelope glycoprotein gp116. *Virology, 384*(1), 192–200.
14. Nadala, E.C.B., Tapay, L.M., & Loh, P.C. (1997). Yellow-head virus: A rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms, 31,* 141-146.