



การผลิตและการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ที่จำเพาะต่อเชื้อ nervous necrosis virus (NNV)
GENERATION AND CHARACTERIZATION
OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC
TO NERVOUS NECROSIS VIRUS (NNV)

สุพัตรา คำสमान

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

การผลิตและการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ที่จำเพาะต่อเชื้อ nervous necrosis virus (NNV)



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

GENERATION AND CHARACTERIZATION
OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC
TO NERVOUS NECROSIS VIRUS (NNV)



SUPHATTRA KAMSAMARN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตและการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ที่จำเพาะต่อเชื้อ nervous necrosis virus (NNV)

ของ

สุพัตรา คำสมาน

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์) (รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริ)

ชื่อเรื่อง	การผลิตและการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อเชื้อ nervous necrosis virus (NNV)
ผู้วิจัย	สุพัตรา คำสมาน
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส nervous necrosis virus (NNV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค viral nervous necrosis (VNN) ส่งผลให้เกิดความสูญเสียอย่างมากในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการตรวจจับและควบคุมการติดเชื้อ NNV เพื่อลดผลกระทบต่อเกษตรกร ยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนแคปซิดของเชื้อ red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) ได้ถูกนำมาโคลนเข้าสู่พลาสมิดและนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* ภายหลังจากขั้นตอนการแสดงออก พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดที่ผลิตขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63 กิโลดาลตัน จากการนำแคปซิดโปรตีนไปผสมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์ พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ RGNNV ได้ 5 โคลน ได้แก่ 5C1, 5C4, 14E6, 15E10 และ 9D1 ซึ่งสามารถตรวจจับการติดเชื้อ RGNNV ในตัวอย่างปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเทคนิค dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), scale drop disease virus (SDDV), tilapia lake virus (TiLV) หรือแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ทั่วไปในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่า 5C1, 5C4 และ 9D1 เป็น IgG โดยมี subclass คือ IgG2a, IgG2a และ IgG2b ตามลำดับ ส่วน 14E6 และ 15E10 เป็น IgA โดยทั้งหมดมี light chain เป็น kappa (K) และสามารถแบ่งตามความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ 5C1 และ 5C4 กลุ่มอีพิโทปที่ 2 คือ 14E6, 15E10 และ 9D1 เมื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่า 9D1 และ 5C4 มีความไวสูงในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดเท่ากับ 0.274 และ 0.547 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และตรวจหาเชื้อ NNV จากสารสกัดเนื้อเยื่อของปลาติดเชื้อที่เจือจาง 1:256 และ 1:128 ตามลำดับ และพบว่าเมื่อรวมแอนติบอดีทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ทำให้ความไวในการตรวจการติดเชื้อ RGNNV เพิ่มขึ้น แต่ยังคงต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR สองเท่า นอกจากนี้ยังสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจสอบการติดเชื้อ RGNNV จากตัวอย่างปลาติดเชื้อได้ 14/15 ตัวอย่าง ซึ่งใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR ที่สามารถตรวจได้ 15/15 ตัวอย่าง ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ RGNNV จากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อตามธรรมชาติโดยใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่ใช้หลักการของแอนติบอดี เช่น dot blotting ได้

คำสำคัญ : nervous necrosis virus, NNV, แคปซิดโปรตีน, โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Title	GENERATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO NERVOUS NECROSIS VIRUS (NNV)
Author	SUPHATTRA KAMSAMARN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Professor Dr. Parin Chaivisuthangkura
Co Advisor	Associate Professor Dr. Siwaporn Longyant

The outbreaks of the nervous necrosis virus (NNV), which causes viral nervous necrosis (VNN), have resulted in huge losses in the aquaculture industry. Therefore, it is essential to develop effective tools to detect and control NNV infection in order to minimize the impact on farmers. The gene encoding the major capsid protein (MCP) of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) was cloned into a plasmid and transformed into *E. coli*. These recombinant capsid proteins were produced and had an approximate molecular weight of 63 kilodaltons (kDa). This protein was purified and mixed with the culture fluid of RGNNV-infected E11 cells for immunization of Swiss mice to generate MAbs specific to RGNNV. A total of five clones, namely 5C1, 5C4, 14E6, 15E10, and 9D1, were obtained. These MAbs can effectively detect RGNNV infection in fish samples using dot blotting, Western blotting, and immunohistochemistry without exhibiting cross-reactivity with the recombinant capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), scale drop disease virus (SDDV), tilapia lake virus (TiLV), or common bacterial pathogens in the aquaculture industry. The class and subclass of the MAbs were examined, revealing that 5C1, 5C4, and 9D1 belonged to the IgG class, with subclass IgG2a, IgG2a, and IgG2b, respectively. Meanwhile, 14E6 and 15E10 belonged to the IgA class, with kappa (K) as the light chain. All of these antibodies target different epitopes and divided into two groups: the first group consisted of 5C1 and 5C4, and the second group consisted of 14E6, 15E10, and 9D1. By dot blot assay, the sensitivity of MAbs using purified recombinant capsid protein, 9D1 and 5C4 demonstrated the high sensitivity and binding capacity to the recombinant capsid protein of 0.274 and 0.547 micrograms/milliliter, respectively. and detected the homogenate of NNV-infected fish at dilutions of 1:256 and 1:128, respectively. Combination of both antibodies, the sensitivity for the detection of RGNNV infection increased but was two times lower than that of RT-PCR. In addition, MAbs could be used to detect RGNNV infection in 14/15 fish samples, which was close to the detection rate of 15/15 by RT-PCR. Therefore, the generated MAbs can be applied to detect RGNNV infection from naturally infected fish samples using an antibody-based assay such as dot blotting.

Keyword : Red-spotted grouper nervous necrosis virus RGNNV Capsid protein Monoclonal antibodies

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ไม่มีทางสำเร็จลุล่วงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่ง จาก ศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ผู้ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ทั้งในด้านวิชาการและ จริยธรรม และให้คำแนะนำการแก้ปัญหาต่าง ๆ ในงานวิจัยเป็นอย่างดีทำให้ปริญญาานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งษิรุจิ ที่รับเป็นกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ และ ช่วยแก้ไขปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์ และ อาจารย์ ดร.สุทามาศ นิยมพานิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบเค้าโครงปริญญา นิพนธ์ อีกทั้งให้ข้อคิดเห็นและความรู้ที่เป็นประโยชน์ ในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร ที่กรุณาปรับและสละเวลามาเป็น ประธานกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญาานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและเป็นที่ยอมรับใน เชิงวิชาการมากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับนำ เลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัส RGNNV ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร.อรรคพล วณิกสัมบัน นางสาวอรพรพรรณ มานะจิตต์ และดร.ประดิษฐ์ หวังมาน เปรียบเสมือนเป็นอาจารย์และเป็นพี่ ที่ได้ถ่ายทอดเทคนิคต่าง ๆ คอยให้คำแนะนำตลอดจนให้ความ ช่วยเหลือในทุก ๆ ปัญหา ดูแลและอยู่เคียงข้างข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบคุณรุ่นพี่ และเพื่อนทุกคนที่ให้กำลังใจ มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวอันเป็นที่รัก ที่เชื่อมั่นในตัว ข้าพเจ้า สนับสนุน และเป็นแรงผลักดันให้สามารถผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ไปได้จนปริญญาานิพนธ์สำเร็จลุล่วง ด้วยดี และขอระลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยให้ช่วยนำเอาส่วนบุญส่วนกุศลทั้งหมดที่เกิดจากประโยชน์ของ ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ให้ถึงแก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่เกี่ยวข้องในการทำปริญญาานิพนธ์ของข้าพเจ้า

สุพัตรา คำสมาน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย.....	4
สมมติฐานงานวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. โรค viral nervous necrosis (VNN) หรือ โรค viral encephalopathy and retinopathy (VER).....	5
2. Nervous necrosis virus (NNV).....	6
3. การแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (viral transmission).....	8
4. การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และโฮสต์ (geographical distribution and hosts).....	9
5. อาการแสดงออกของโรค (clinical signs).....	11
6. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology).....	12
7. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ NNV.....	14

7.1. การเพาะแยกเชื้อไวรัส (virus isolation)	14
7.2. Enzyme-linked immunosorbent assay	15
7.3. Immunofluorescence antibody test (IFT)	16
7.4. การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular diagnostic techniques)	17
8. การศึกษาเกี่ยวกับ viral structural protein ของเชื้อ NNV.....	19
9. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: MAb)	22
9.1. หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	22
9.2. การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma)	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
อุปกรณ์และสารเคมี.....	28
1. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง	28
2. แบคทีเรียและพลาสมิด	28
3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	28
4 เคมีภัณฑ์.....	30
5 แบคทีเรีย	32
วิธีดำเนินการทดลอง	34
1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV	35
2. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV.....	35
3. การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ให้บริสุทธิ์.....	36
4. การเตรียมเชื้อไวรัส RGNNV จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และการตรวจสอบเชื้อ RGNNV.....	36
5. การเตรียมตัวอย่างปลากระพงขาวที่ติดเชื้อ NNV	37
5.1 การสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลา.....	37

5.2 การตรวจการติดเชื้อกลุ่ม NNV ด้วยวิธี RT-PCR.....	37
5.3 การตรวจการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV ด้วยวิธี nested RT-PCR.....	39
6. การหาลำดับ DNA	41
6.1 การโคลนผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR เข้าสู่ pCR™8/GW/TOPO™ vector และการ transformation เข้าสู่ competent cells	41
6.2 การคัดเลือกโคลน <i>E. coli</i> ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	43
6.3 การเตรียมโปรตีนเสียสภาพของตัวอย่างปลากะพงขาว	44
7. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน แคปซิดของเชื้อ RGNNV.....	44
7.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว	44
7.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	45
7.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา.....	45
7.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting	45
7.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี dot blotting	46
7.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting.....	47
7.3.4 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี immunohistochemistry	47
8. การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution	51
9. การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา	51
10. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	51
10.1 การตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	52
10.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	53
10.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ ก่อโรคในปลาด้วยวิธี immunohistochemistry.....	56

10.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน ของเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลาด้วยวิธี dot blotting.....	56
10.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting.....	57
10.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting.....	57
10.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบตัวอย่างปลา ติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับ วิธี RT-PCR.....	57
10.8 การตรวจการติดเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลาด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบ กับวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR	58
บทที่ 4 ผลการทดลอง	59
1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV.....	59
2. การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ให้บริสุทธิ์	59
3. การเตรียมเชื้อไวรัส RGNNV จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และการตรวจสอบเชื้อ RGNNV	61
4. การตรวจการติดเชื้อกลุ่ม NNV ในปลากระพงขาวด้วยวิธี RT-PCR และวิธี nested RT-PCR	63
5. การหาลำดับ DNA.....	64
6. การผลิตและการคัดเลือกริคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV.....	66
7. การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry...	71
8. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	76
8.1 การตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA.....	76
8.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	77

8.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคใน ปลาด้วยวิธี immunohistochemistry.....	77
8.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ ไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลาด้วยวิธี dot blotting.....	79
8.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting	80
8.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting.....	81
8.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ ด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับ วิธี RT-PCR	86
8.8 การตรวจหาเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลาด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT- PCR และ nested RT-PCR.....	87
บทที่ 5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	90
บรรณานุกรม.....	95
ภาคผนวก.....	105
ภาคผนวก ก.....	106
ภาคผนวก ข.....	108
ภาคผนวก ค	111
ภาคผนวก ง.....	114
ภาคผนวก จ.....	118
ภาคผนวก ฉ.....	120
ภาคผนวก ช.....	122
ภาคผนวก ซ.....	124
ภาคผนวก ฌ.....	130
ประวัติผู้เขียน.....	132



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	29
ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
ตาราง 3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม.....	32
ตาราง 4 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR.....	38
ตาราง 5 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับการตรวจสอบยีนโปรตีนแคปซิดด้วยวิธี RT-PCR....	39
ตาราง 6 ส่วนผสมของการทำ nested RT-PCR.....	40
ตาราง 7 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนแคปซิด ด้วยวิธี nested RT-PCR.....	41
ตาราง 8 ส่วนผสมของการเชื่อมกัน (ligation) ระหว่างผลผลิต PCR ที่ได้กับ pCR™8/GW/TOPO™ vector	42
ตาราง 9 ส่วนผสมของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	43
ตาราง 10 สรุปลสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ NNV ที่ผลิตได้.....	89

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 แผนผังภาพรวมวงจรการจำลองตัวเองของไวรัสในสกุล <i>Betanodavirus</i>	7
ภาพประกอบ 2 การกระจายตัวของเชื้อ nervous necrosis virus (NNV) จีโนไทป์ต่าง ๆ	10
ภาพประกอบ 3 ลักษณะอาการว่ายน้ำหงายท้องที่ผิวน้ำ (inverted swimming) ของปลา European sea bass ที่ติดเชื้อ nervous necrosis virus (NNV)	11
ภาพประกอบ 4 อาการแสดงออกของโรค VNN ในปลา <i>Liza aurata</i> ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในทะเลแคสเปียน.....	12
ภาพประกอบ 5 การเกิดช่องว่าง (vacuolation) ที่เกิดจากการตายของเซลล์ในส่วนของสมองและเรตินาของลูกปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ <i>Betanodavirus</i>	13
ภาพประกอบ 6 การเกิดช่องว่าง (vacuolation) (ลูกศร) ในสมองของปลา golden grey mullet (<i>Liza aurata</i>) ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในแถบทะเลแคสเปียน.....	14
ภาพประกอบ 7 การตรวจสอบการติดเชื้อ <i>Betanodavirus</i> ใน SSN-1 cell line ด้วยเทคนิค immunofluorescence antibody test.....	16
ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบ viral structural protein ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ ผลการทดลองของ <i>in vitro</i> translation ของ SJNNV (A) การตรวจสอบ viral structural protein ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel Lane 1: standard marker Lane 2: structural protein (B) ผลการทดลองของ <i>in vitro</i> translation Lane1: total viral RNA Lane 2: RNA1 และ Lane 3: RNA2.....	20
ภาพประกอบ 9 ผลการตรวจสอบโปรตีนของไวรัสด้วยเทคนิค SDS-PAGE	21
ภาพประกอบ 10 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	24
ภาพประกอบ 11 แนวทางการสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธี <i>de novo</i> และวิธี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิธี <i>de novo</i>	25
ภาพประกอบ 12 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อปลาสำหรับวิธี immunohistochemistry (IHC).....	49
ภาพประกอบ 13 แผนผังกระบวนการย้อมโดยวิธี immunohistochemistry.....	50

ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบอิมูโนโกลบูลินแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน แคปซิดของ RGNNV.....	53
ภาพประกอบ 15 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	56
ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV....	60
ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบการแยกเชื้อ RGNNV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ให้บริสุทธิ์จากการตะกอน	62
ภาพประกอบ 18 การตรวจการติดเชื้อกลุ่ม NNV ในปลากระพงขาวด้วยวิธี (A) RT-PCR และวิธี (B) nested RT-PCR.....	63
ภาพประกอบ 19 การตรวจสอบ recombinant DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (A) และ ภาพแสดงผลพัทธ์จากฐานข้อมูล NCBI (B)	65
ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting	67
ภาพประกอบ 21 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่สองด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting	69
ภาพประกอบ 22 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแคปซิดของ เชื้อ RGNNV ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting	70
ภาพประกอบ 23 การตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อตาของ ปลาติดเชื้อ	72
ภาพประกอบ 24 การตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อเหงือก ของปลาติดเชื้อ.....	73
ภาพประกอบ 25 การตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อประสาท ของปลาติดเชื้อ.....	74
ภาพประกอบ 26 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามในเนื้อเยื่อปลาปกติ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อไวรัส NNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry.....	75

ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบอิพิโทปที่จับของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ด้วยวิธี indirect ELISA.....	76
ภาพประกอบ 28 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส RGNNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry กับเนื้อเยื่อของปลาติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ	78
ภาพประกอบ 29 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส RGNNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี dot blotting	79
ภาพประกอบ 30 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ด้วยวิธี dot blotting	80
ภาพประกอบ 31 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแคปซิดของไวรัส RGNNV ด้วยวิธี dot blotting.....	83
ภาพประกอบ 32 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting ในการตรวจไวรัสในสารสกัดจากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ.....	84
ภาพประกอบ 33 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ต่อและที่ปะปนอยู่กับแอนติเจนที่ใช้ปลูกภูมิคุ้มกันหมู ด้วยวิธี dot blotting	85
ภาพประกอบ 34 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ NNV ด้วยวิธี dot blotting	86
ภาพประกอบ 35 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ NNV ด้วยวิธี RT-PCR.....	87
ภาพประกอบ 36 การตรวจการติดเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลาติดเชื้อ โดยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR	88

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเพื่อทดแทนผลผลิตสัตว์น้ำที่ได้จากธรรมชาติ จากข้อมูลขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of United Nation : FAO) รายงานว่า พ.ศ. 2557 ประเทศไทยถูกจัดเป็นหนึ่งในประเทศผู้ผลิตสินค้าประมงที่สำคัญของโลก (FAO, 2016) สินค้าประมงของไทยมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศจำนวนมาก ปัจจุบันสินค้าประมงของไทยมีคุณภาพได้มาตรฐานสากลจนเป็นที่ยอมรับในตลาดโลก ตลาดส่งออกที่สำคัญของไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป และอาเซียน สินค้าส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ กุ้งและผลิตภัณฑ์ ทูน่ากระป๋อง และหมึกสดแช่แข็ง (ชัมยพร ชูงาน, 2561) ปลานับเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยและอีกหลายประเทศทั่วโลก ไม่ว่าจะเป็นปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย และปลาทะเล โดยจากค่าประมาณการผลิตจากการทำการประมงทะเลใน ปี พ.ศ. 2563 มีปริมาณและมูลค่าการจับสัตว์น้ำในแต่ละกลุ่มสัตว์น้ำพบว่า กลุ่มปลาจับได้มากที่สุด 1,211,893 ตัน มูลค่าผลผลิต 34,443 ล้านบาท (ร้อยละ 51.21) การประมาณการผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดใน ปี พ.ศ. 2563 พบว่า ปลานิล มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุด มูลค่าผลผลิต 10,117 ล้านบาท (ร้อยละ 39.65) ปลาดุก มูลค่าผลผลิต 4,452 ล้านบาท (ร้อยละ 17.45) ปลาตะเพียน มูลค่าผลผลิต 992 ล้านบาท (ร้อยละ 3.89) ปลาช่อน มูลค่าผลผลิต 130 ล้านบาท (ร้อยละ 0.51) ปลาแรด มูลค่าการผลิต 73 ล้านบาท (ร้อยละ 0.29) ประมาณการผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งใน ปี พ.ศ. 2563 พบว่าปลากะพงมีการเลี้ยงมากที่สุด มูลค่าผลผลิต 3,904 ล้านบาท (ร้อยละ 93.44) และรองลงมาเป็นการเลี้ยงปลากะรัง มูลค่าผลผลิต 274 ล้านบาท (ร้อยละ 6.56) (กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง, 2563) จากข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในกลุ่มปลา เนื่องจากสามารถสร้างรายได้อย่างมากให้กับเกษตรกรจนกลายเป็นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ ซึ่งส่วนใหญ่มีจุดประสงค์ในการเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด จึงเกิดการเพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่นต่อพื้นที่การเพาะเลี้ยงมากเกินไป (intensive system) ส่งผลทำให้ป่อบและบริเวณที่เพาะเลี้ยงเกิดความเสื่อมโทรม รวมถึงการเกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำ (Bondad-Reantaso et al., 2005) ที่มักมีสาเหตุมาจากการจัดการ

และการควบคุมโรคที่ไม่เหมาะสม โดยโรคระบาดที่เป็นปัญหาในปัจจุบันส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว ปรสิต และไวรัส ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากแก่เกษตรกร เช่น ผู้เพาะพันธุ์ และผู้อนุบาลปลา โดยเฉพาะไวรัสในกลุ่ม nervous necrosis virus (NNV) เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในปลาทั้งปลาทะเล ปลาน้ำจืด และปลาน้ำกร่อย ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมากโรค viral nervous necrosis (VNN) หรือ โรค viral encephalopathy and retinopathy (VER) ซึ่งเป็นโรคที่เคยปรากฏอยู่ในบัญชีรายชื่อของ Office International des Epizooties (OIE) (ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา, 2561) โดยมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม nervous necrosis virus (NNV) จัดอยู่ในวงศ์ Nodaviridae สกุล *Betanodavirus* เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในปลาโดยเชื้อไวรัสจะเข้าทำลายระบบประสาทตาและสมอง (Comps, Pepin, & Bonami, 1994; Mori et al., 1992) ปลาที่ติดเชื้อจะแสดงอาการว่ายน้ำควงสว่าน สีลำตัวคล้ำขึ้น เชื่องซึม ไม่กินอาหาร หงายท้องลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำเป็นครั้งคราว บางส่วนนอนอยู่ที่ก้นบ่อเลี้ยงปลา และเกิดโรคอัมพาตในที่สุด คือ การตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นน้อย (เขาวนิทย์ ดนยดล, สถาพร ดิเรก บุษราคัม และ กิจการ ศุภมาตย์., 2563) ส่วนอวัยวะภายในของปลาที่ติดเชื้อไวรัส คือ ตับซีด ลำไส้ว่างเปล่า และมีของเหลวลักษณะสีเขียวเหลืองในลำไส้ โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในอวัยวะ ได้แก่ ตา สมอง ตับ ไต กระเพาะอาหาร และลำไส้ โดยการเพิ่มจำนวนของเชื้อ Nodavirus มีปัจจัยที่สำคัญ คือ อุณหภูมิ (Chua, Ng, Loo, & Wee, 1995) มีการรายงานการระบาดของโรค VNN ในประเทศไทย เกิดขึ้นทั้งช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาว (Kanchanakhan, Dolnayadol, & Roongkamnertwongsa, 2005) ซึ่งพบเชื้อไวรัส NNV ได้ตลอดทุกช่วงอายุตั้งแต่ในลูกปลาระยะ larva และ juvenile ส่งผลให้มีอัตราการตายสูงถึง 80 - 100% และในปลาขนาดใหญ่จะมีอัตราการตายน้อยกว่า 20% (คะเน สุขเกื้อ และ ธีรวัตร จริตงาม, 2561) การติดต่อของเชื้อไวรัส NNV สามารถติดต่อได้ทั้งในรูปแบบการถ่ายทอดเชื้อในแนวราบ (horizontal transmission) เช่น จากการสัมผัสกับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ และ อาหารมีชีวิตที่ใช้เลี้ยงปลา และรูปแบบการถ่ายทอดเชื้อในแนวตั้ง (vertical transmission) เช่น ติดต่อกันจากพ่อแม่พันธุ์สู่ลูก มีรายงานการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV นี้ในปลากะรังและปลาทะเลอย่างน้อย 30 ชนิดทั่วโลก (OIE, 2019) พบมากในกลุ่มปลากะรัง (grouper) ปลากะพงขาว (sea bass) และปลาอื่น ๆ เช่น parrotfish, striped jack และ halibut เป็นต้น (Breuil, Bonami, Pepin, & Pichot, 1991; Chi et al., 1997; S. Grotmol, Totland, Kvellestad, Fjell, & Olsen, 1995; Mori et al., 1992; Munday, Langdon, Hyatt, & Humphrey, 1992; Yoshikoshi & Inoue, 1990) โรคติดเชื้อ NNV มีการรายงานครั้งแรกในปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus akaara*) วิทย่ออนในประเทศญี่ปุ่น (OIE, 2019; Nakai et al., 1994)

ส่วนในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ NNV ครั้งแรก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526 ในบริเวณพื้นที่การเพาะเลี้ยงภาคใต้ในเขตจังหวัด สงขลา สตูล ตรัง กระบี่ พังงา และภูเก็ต ทำให้เกิดความเสียหายประมาณ 80-90% ของปลาที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด (เขาวนิตย์ ดนยดล และคนอื่น ๆ , 2563) โดยในประเทศไทยสามารถแยกเชื้อได้จากปลากะรัง ปลากะรังจืดน้ำตาล (*E. malabaricus*) ทั้งจากลูกปลา และปลาโตเต็มวัย เชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในจีโนไทป์ red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) (Kanchanakhan et al., 2005) และมีรายงานการติดเชื้อในปลากะรังอีกหลายชนิด ที่เลี้ยงในประเทศไทย สิงคโปร์ ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย บรูไน เกาหลี และ ญี่ปุ่น (Lio-Po & de la Peña, 2004) นอกจากนี้เมื่อปี พ.ศ.2548 พบเชื้อไวรัสจีโนไทป์ RGNNV ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยเป็นปลาที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มบริเวณภาคกลางของประเทศไทย ถือเป็นการรายงานครั้งแรกของการติดเชื้อ *Betanodavirus* ในปลาน้ำจืดของประเทศไทย (Keawcharoen et al., 2015) ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลา

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ NNV จึงมีความสำคัญ ในการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิด (capsid protein) ของเชื้อ RGNNV ในรูปแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่อาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อนี้ได้หลายรูปแบบ เช่น การพัฒนาชุดตรวจแบบแถบสี (strip test) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) โดยการตรวจด้วยชุดตรวจรูปแบบนี้ไม่ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะและไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่มีราคาแพง เกษตรกรสามารถนำไปตรวจเชื้อในฟาร์มได้ ดังนั้นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดของเชื้อไวรัส RGNNV จึงมีประโยชน์ต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในเบื้องต้น และเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์การเกิดโรคจากเชื้อดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV

ขอบเขตการวิจัย

1. กระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV
2. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิด RGNNV ให้บริสุทธิ์
3. การใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RGNNV ร่วมกับโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว
4. การผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV โดยวิธี dot blotting, western blotting และ immunohistochemistry
5. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยการตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี รวมทั้งการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting
6. การทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจวิเคราะห์ปลากระหว่างติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry

สมมติฐานงานวิจัย

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของ RGNNV น่าจะสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ปลาที่ติดเชื้อ RGNNV ในเบื้องต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปลาที่ติดเชื้อ NNV ได้อย่างจำเพาะ แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรค viral nervous necrosis (VNN) หรือ โรค viral encephalopathy and retinopathy (VER)

โรค viral nervous necrosis (VNN) หรือ โรค viral encephalopathy and retinopathy (VER) เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในระบบประสาท เนื่องจากการติดเชื้อไวรัส เริ่มมีการระบาดมาตั้งแต่ปี 1985 ในประเทศออสเตรเลียและแถบแคริบเบียน และถือเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลกมาจนถึงปัจจุบัน (Costa & Thompson, 2016) จากรายงานพบว่าโรค VNN มีอัตราการตายสูงถึง 100% ภายใน 1 อาทิตย์หลังการติดเชื้อ มักส่งผลกระทบต่อปลาในระยะวัยอ่อน (larva) และระยะวัยรุ่นตอนต้น (early juvenile) ทำให้เกิดความสูญเสียในโรงเพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว ในส่วนของปลาโตเต็มวัย สามารถติดเชื้อได้เช่นเดียวกันแต่มีอัตราการตายหลังการติดเชื้อที่ต่ำกว่า (Marsian et al., 2019) โรค VNN เริ่มมีรายงานอย่างเป็นทางการครั้งแรกในปี 1990 ในปลา Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) ที่ประเทศญี่ปุ่น (Yoshikoshi & Inoue, 1990) และยังพบการติดเชื้อในปลาชนิดต่าง ๆ ทั่วโลก ยกตัวอย่างเช่น European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Breuil et al., 1991), Asian sea bass (*Lates calcarifer*) (Glazebrook, Heasman, & De Beer, 1990), red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) และ striped jack (*Pseudocaranx dentex*) (Mori et al., 1992) เป็นต้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้ โรค VNN ถูกระบุว่าสาเหตุมาจากการติดเชื้อ picorna-like virus (Breuil et al., 1991; Glazebrook et al., 1990) หลังจากนั้นในปี 1992 จากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่ถูกแยกออกมาจากปลา striped jack ระยะวัยอ่อน พบว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นไวรัสชนิดใหม่ที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Nodaviridae และตั้งชื่อว่า striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) (Mori et al., 1992) เมื่อทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยอาศัยบริเวณ variable region ของยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนแคปซิด (coat protein) พบว่าสามารถแบ่งเชื้อไวรัสในสกุล *Betanodavirus* ได้เป็น 4 ชนิด คือ striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) และ tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV) (Nishizawa, Furuhashi, Nagai, Nakai, & Muroga, 1997) ต่อมาได้มีการรายงานถึงเชื้อ *Betanodavirus* 2 ชนิด turbot (*Scophthalmus maximus*) (TNV) และเชื้อ Atlantic cod (*Gadus morhua*) (ACNNV) ที่แยกได้จาก Atlantic cod, haddock (*Melanogrammus*

aeglefinus) และ winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) (Gagné, Johnson, Cook-Versloot, MacKinnon, & Olivier, 2004; Johansen et al., 2004) อย่างไรก็ตามมีเพียง TNV ที่ได้รับจัดเป็นชนิดที่ 5 ของเชื้อ *Betanodavirus* ในขณะที่ ACNNV ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ BFNNV (Moody et al., 2009) และในปี 2000 ไวรัสที่อยู่ในวงศ์ Nodaviridae ได้มีการจัดกลุ่มใหม่และมีการแบ่งออกเป็น 2 สกุล คือ *Betanodavirus* และ *Alphanodavirus* โดยเชื้อ *Betanodavirus* เรียกอีกอย่างว่า Nervous necrosis virus (NNV)

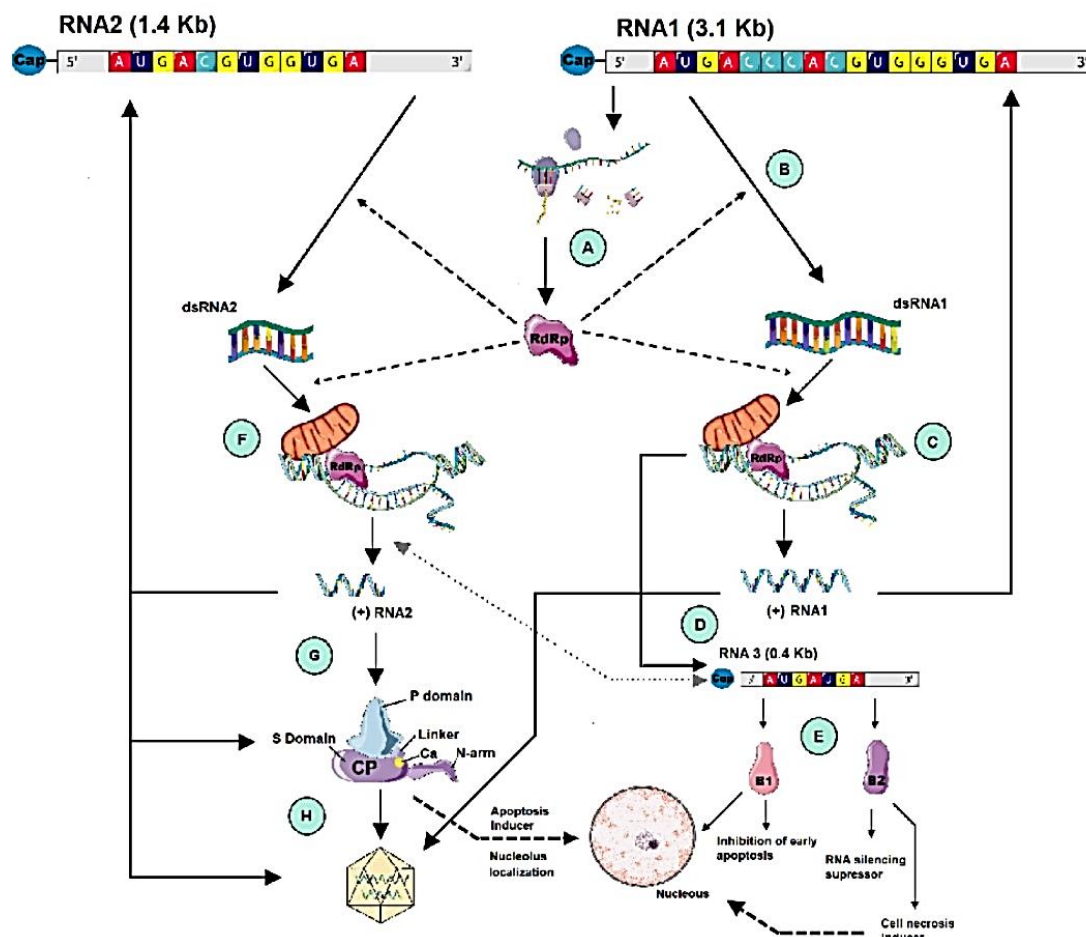
2. Nervous necrosis virus (NNV)

เชื้อ NNV เป็นไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25-30 นาโนเมตร รูปร่างแบบ icosahedral สารพันธุกรรมของไวรัสเป็นแบบ single-stranded positive-sense RNA ประกอบด้วย 2 เส้น คือ RNA1 และ RNA2 บรรจุในอนุภาคของไวรัส โดยปลายทางด้าน 5' มีการเติม cap แต่ปลายทางด้าน 3' ไม่มีการเติม poly A tail (Delsert, Morin, & Comps, 1997)

RNA1 มีขนาดประมาณ 3100 นิวคลีโอไทด์ มี open reading frame (ORF) สำหรับ RNA-dependent RNA-polymerase (*RdRp*) หรือที่เรียกว่า protein A ขนาด 110 kDa และ RNA2 มีขนาดประมาณ 1410–1433 นิวคลีโอไทด์ ถอดรหัสให้โปรตีนแคปซิด (capsid protein; CP) ขนาด 37 kDa และยังมีส่วน subgenomic RNA ที่เรียกว่า RNA3 มีขนาดประมาณ 371–378 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่ถูกบรรจุเข้าอนุภาคของไวรัส โดยชิ้นส่วนนี้ถูกสังเคราะห์มาจากปลายทางด้าน 3' ของ RNA1 ที่ถอดรหัสให้ non-structural viral proteins 2 ชนิด ที่เรียกว่า B1 (111 กรดอะมิโน) และ B2 (75 กรดอะมิโน) (Nagai & Nishizawa, 1999)

การจำลองตัวเองของไวรัสเริ่มจากการที่สาย single-stranded positive-sense RNA ของไวรัสถูกปลดปล่อยเข้าไซโตพลาสซึมของเซลล์ ribosomes ของโฮสต์จะแปลรหัสของ RNA1 เป็น RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) (A) ของไวรัส จากนั้น *RdRp* จะทำการสังเคราะห์ complementary RNA (negative-sense RNA) เป็น dsRNA (B) โครงสร้าง dsRNA ถูกใช้ในกระบวนการ replication/transcription ได้เป็นโมเลกุล RNA1 ใหม่ขึ้นมา (C) โดยกระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นในบริเวณ outer mitochondrial membranes หลังจากนั้นบริเวณ subgenomic RNA ที่เรียกว่า RNA3 ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากปลายทางด้าน 3' ของ RNA1 (D) RNA3 แปลรหัสเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่เรียกว่า B1 และ B2 (E) ซึ่งเกิดในบริเวณ nucleus นอกจากนี้ RNA3 น่าจะมีหน้าที่คล้ายกับใน *Alphanodavirus* ที่ควบคุมการสังเคราะห์ RNA2 (F) และจะถูกลดระดับการแสดงออกลงเมื่อมีการ replication/transcription ของ RNA2 (เส้นประ) โดย RNA2

จะแปลรหัสเป็น capsid protein (G) สุดท้ายแล้ว สาย positive-sense ของ RNA1 และ RNA2 จะถูกบรรจุเข้าสู่อนุภาคไวรัส (H) (Iwamoto et al., 2005) (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 แผนผังภาพรวมวงจรการจำลองตัวเองของไวรัสในสกุล *Betanodavirus*

ที่มา; Bandín, I., & Souto, S. (2020). *Betanodavirus* and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*. p. 2.

3. การแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (viral transmission)

Betanodavirus เป็นเชื้อไวรัสที่ส่งผลกระทบต่อปลาวัยอ่อน (fish larvae) และปลาระยะวัยรุ่น (juvenile) เป็นอย่างมาก ดังนั้น การทำความเข้าใจเกี่ยวกับรูปแบบการแพร่เชื้อของไวรัสจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันและลดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส โดยพบว่าเชื้อไวรัสข้างต้นมีความสามารถในการแพร่เชื้อทั้งในการแพร่ระบาดในแนวราบ (horizontal transmission) คือ การติดต่อผ่านการสัมผัสสารคัดหลั่งโดยตรง เช่น เมือก เลือด หรือผ่านตัวกลางที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิตก็ได้ เช่น แมลง อาหาร เป็นต้น โดยในปี 1997 Breton และคณะได้มีการรายงานถึงการแพร่ระบาดในแนวราบของเชื้อ nodavirus ในกระชังเพาะเลี้ยง European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Le Breton, Grisez, Sweetman, & Ollevier, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในปี 1999 ของ Peducasse และคณะ ที่ทำการตรวจสอบรูปแบบการติดโรค VER ของปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ระยะวัยรุ่น พบว่า VER มีความสามารถในการแพร่ระบาดในแนวราบ และเป็นรายงานแรก que แสดงให้เห็นถึงการแพร่ระบาดรูปแบบนี้ในปลากะพง เป็นต้น (Peducasse et al., 1999) นอกจากนี้ยังสามารถแพร่ระบาดในแนวตั้ง (vertical transmission) คือ การส่งผ่านจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง เช่น จากแม่สู่ลูก โดยในปี 1992 Arimoto และคณะได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อ SJNNV ใน *Pseudocaranx dentex* ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบแอนติเจนของไวรัสในบางตัวอย่างของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว (fertilized egg) และรังไข่แต่ไม่พบในอัณฑะ (testis) หรือสมอง ดังนั้นจึงสามารถบ่งบอกได้ว่าปลาเพศเมียอาจเป็นแหล่งส่งต่อของเชื้อไวรัสนี้ (Arimoto et al., 1992) และสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Breuil และคณะ ในปี 1991 ที่รายงานถึงความเป็นไปได้ในการแพร่ระบาดในแนวตั้งในปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) และในปี 2002 Breuil และคณะ ได้ตีพิมพ์รายงานเกี่ยวกับการทดลองการติดเชื้อ nodavirus ในไข่และปลาระยะวัยรุ่นของ *Dicentrarchus labrax* ที่ยืนยันถึงความเป็นไปได้ข้างต้น (Breuil et al., 1991; Breuil, Pepin, Boscher, & Thiery, 2002) จากข้อมูลดังกล่าว การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์สภาพแวดล้อม อาหาร อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงที่ปราศจากเชื้อตั้งแต่ต้น จึงมีความสำคัญในการป้องกันและลดการแพร่ระบาดของเชื้อเป็นอย่างมาก

4. การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และโฮสต์ (geographical distribution and hosts)

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Betanodavirus* มีการกระจายตัวในหลายที่ทั่วโลก แต่ลักษณะการกระจายตัวของเชื้อขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ (thermotolerance) ของเชื้อไวรัสแต่ละจีโนไทป์

เชื้อจีโนไทป์ BFNNV มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในหลอดทดลอง (*in vitro*) อยู่ที่ 15-20 องศาเซลเซียส มักพบการติดเชื้อในปลาทะเลเขตหนาว (cold-water fish) บริเวณประเทศญี่ปุ่น ตอนเหนือของทวีปยุโรปและอเมริกา โดยส่วนใหญ่เชื้อจีโนไทป์ BFNNV ถูกแยกได้จากฟาร์มปลา เช่น ปลา Atlantic และ Pacific cod (*G. macrocephalus*) ปลา haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) ปลา Atlantic halibut และปลา barfin flounder แต่สามารถพบการติดเชื้อในปลารวมชาติ (wild fish) บางชนิด เช่น ปลา Atlantic cod ปลา wrasse สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น ballan wrasse (*Labrus bergylta*) corking wrasse (*Symphodus melops*) และ goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) ในน่านน้ำชายฝั่งสแกนดิเนเวียและปลา winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ในแคนาดา (Bandín & Souto, 2020)

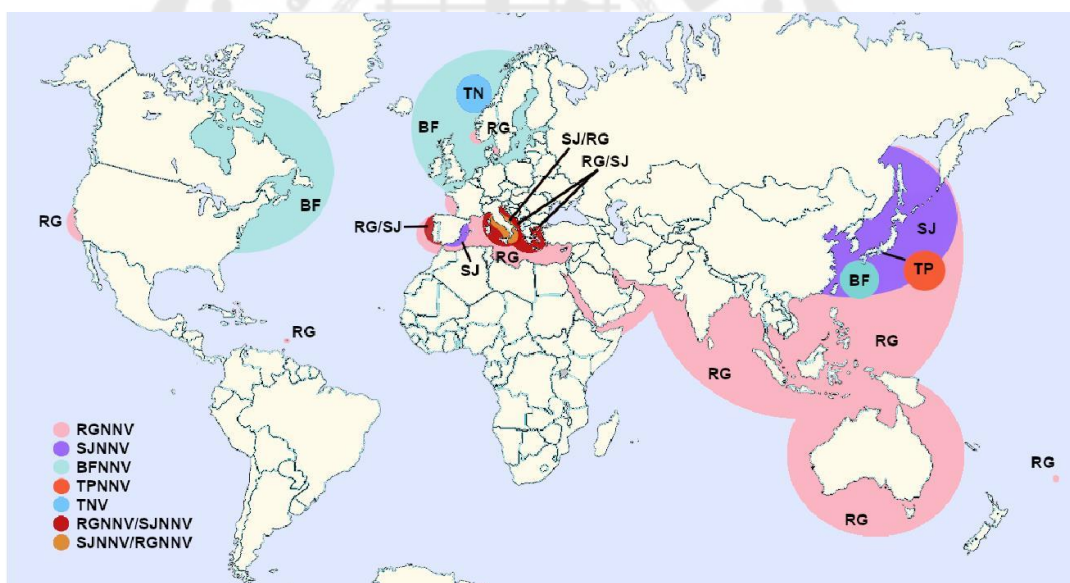
เชื้อจีโนไทป์ RGNNV มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในหลอดทดลอง (*in vitro*) อยู่ที่ 25-30 องศาเซลเซียส มักพบการติดเชื้อในปลาเขตร้อน (tropical fish) และเขตอบอุ่น (temperate fish) รวมทั้งมีความสามารถในการติดเชื้อในโฮสต์ที่หลากหลายด้วย จากรายงานสามารถพบเชื้อนี้ได้ทั้งในฟาร์มปลาและปลารวมชาติ เชื้อจีโนไทป์ RGNNV ถูกแยกได้จากฟาร์มปลา white sea bass (*Atractoscion nobilis*) ในแคลิฟอร์เนีย นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อตามธรรมชาติในปลา ballan wrasse และ corkwing wrasse ที่อาศัยในเขตเมดิเตอร์เรเนียนด้วย และยังพบว่าเป็นเชื้อจีโนไทป์เดียวที่มีการระบาดในปลาน้ำจืดในยุโรป เอเชียและออสเตรเลีย (Doan, Vandeputte, Chatain, Morin, & Allal, 2017)

เชื้อจีโนไทป์ SJNNV มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในหลอดทดลอง (*in vitro*) อยู่ที่ 20-25 องศาเซลเซียส เคยถูกระบุว่ามีการติดเชื้อจำกัดอยู่ในเขตน่านน้ำของประเทศญี่ปุ่นเท่านั้น ต่อมาภายหลังพบการติดเชื้อในฟาร์มปลา senegalese sole และปลา gilthead sea bream farmed ในคาบสมุทรไอบีเรีย ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ที่พบภายหลังมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในประเทศญี่ปุ่น (Bandín & Souto, 2020)

เชื้อจีโนไทป์ TPNNV มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในหลอดทดลอง (*in vitro*) อยู่ที่ 20 องศาเซลเซียสและพบรายงานการติดเชื้อเฉพาะในปลา tiger puffer (*Takifugu rubripes*) ในประเทศญี่ปุ่น (Doan et al., 2017)

เชื้อจีโนไทป์ TNV เป็นเชื้อที่สามารถแยกได้จากปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) ในนอร์เวย์จากการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง SSN-1 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิด cytopathic effects (CPE) ภายหลังจากการเพาะเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน และพบว่าเชื้อ TNV อาจเป็นสมาชิกโบราณของเชื้อ *Betanodavirus* ของสายพันธุ์ยุโรป (Johansen et al., 2004)

นอกจากนี้ยังพบการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสด้วยกัน ทำให้ได้ไวรัสสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้น (reassortant virus) เช่น SJNNV/RGNNV ที่แยกได้จากปลา sea bass ในชายฝั่งของอิตาลี และ RGNNV/SJNNV ที่มีการระบาดในยุโรปตอนใต้และในแถบเมดิเตอร์เรเนียนที่แยกได้จากฟาร์มปลา European sea bass และปลา sole (*Solea senegalensis* และ *S. solea*) ปลา gilthead sea bream และ Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) (Bandín & Souto, 2020) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 การกระจายตัวของเชื้อ nervous necrosis virus (NNV) จีโนไทป์ต่าง ๆ

ที่มา; Bandín, I., & Souto, S. (2020). *Betanodavirus* and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*. p. 5

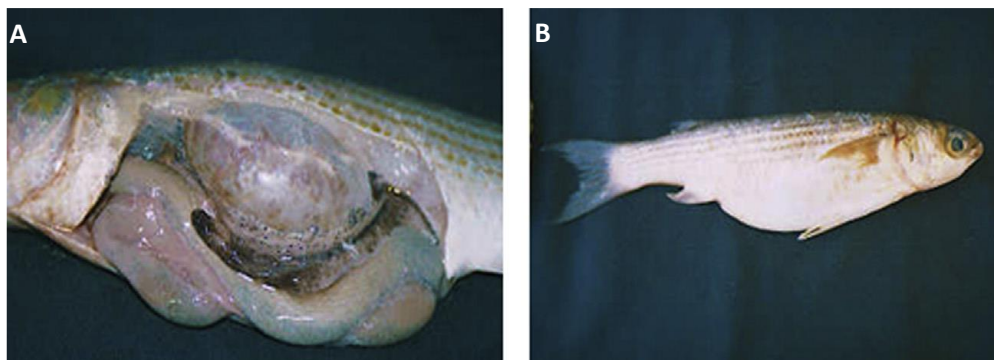
5. อาการแสดงออกของโรค (clinical signs)

การแสดงออกของโรคในปลาติดเชื้อที่สังเกตได้แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ปลา ระยะการพัฒนาของปลา ระยะการพัฒนาของโรคและอุณหภูมิ แต่โดยทั่วไปแล้ว ปลาที่ติดเชื้อมักเกิดการเปลี่ยนสีที่ผิดปกติ (สีจางลงหรือเข้มขึ้น) ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทที่ปรากฏ รอยโรคในสมองและเรตินาของปลา เช่น อาการเบื่ออาหาร อาการเฉื่อยชา และพฤติกรรมก้าวร้าว น้ำที่ผิดปกติ เช่น การว่ายน้ำแบบควงส่ว่าน การว่ายน้ำหงายท้องที่ผิวน้ำ (inverted swimming) เนื่องจากความผิดปกติของระบบประสาท (ภาพประกอบ 3) (Doan et al., 2017) และช่องท้องของปลาที่ติดเชื้อมีการขยายตัวและมีการอักเสบของถุงลม (swim bladder) (ภาพประกอบ 4) โดยมักพบโรคดังกล่าวในลูกปลานขนาดเล็ก แต่ในปลากะพงขาวและปลากะรังหลายชนิดพบเชื้อไวรัสได้ตลอดทุกช่วงอายุสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาเป็นจำนวนมาก (Zorriehzahra et al., 2014)



ภาพประกอบ 3 ลักษณะอาการว่ายน้ำหงายท้องที่ผิวน้ำ (inverted swimming) ของปลา European sea bass ที่ติดเชื้อ nervous necrosis virus (NNV) (ลูกศร = ปลาที่ติดเชื้อ)

ที่มา; Doan, Q., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., & Allal, F. (2017). Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*. p. 10.



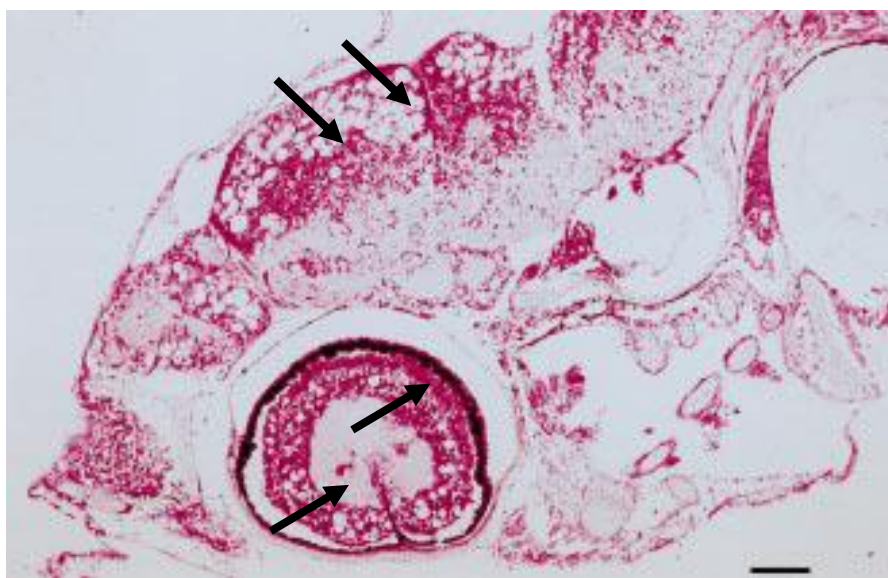
ภาพประกอบ 4 อาการแสดงออกของโรค VNN ในปลา *Liza aurata* ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในทะเลแคสเปียน (A) ช่องท้องมีการขยายขนาด (B) ในปลา *Liza aurata* ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในทะเลแคสเปียน

ที่มา; Zorriehzakra, M. J., Nazari, A., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Karsidani, S. H., Bovo, G., & Daud, H. H. M. (2014). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Virus Disease*. p. 432.

6. ลักษณะทางจุลพยาธิ (histopathology)

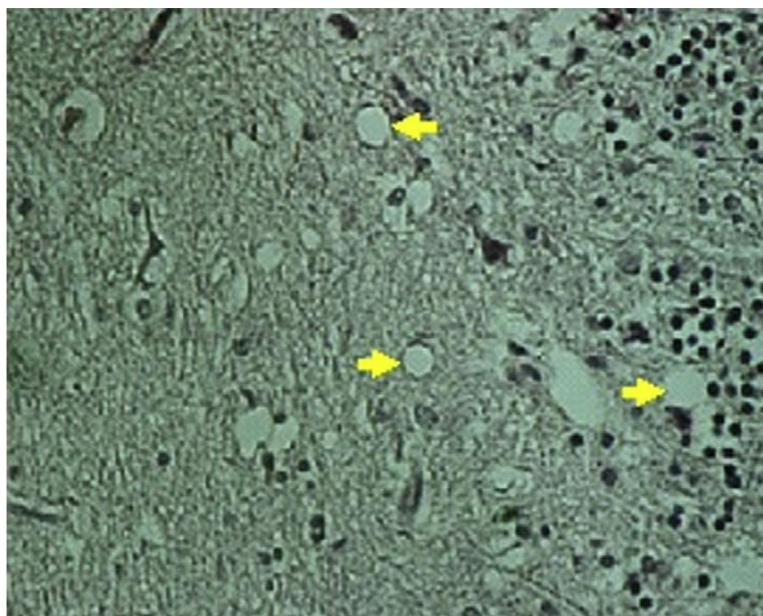
โรค VNN เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสียหายของระบบประสาทส่วนกลางของปลาที่ติดเชื้อเนื่องจากอวัยวะเป้าหมายของเชื้อคือ ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system, CNS) เช่น สมองในส่วน medulla oblongata, telencephalon, metencephalon, mesencephalon, spinal cord และ germinal epithelium และชั้นจอประสาทตา อาการของโรคที่พบในเนื้อเยื่อของปลาดูดเชื้อโดยทั่วไปคือ พบการตายของเซลล์แบบ necrosis ใน central nervous system พบอนุภาคของไวรัสในไซโตพลาซึมของเซลล์ประสาทที่ติดเชื้อ และยังพบการเกิดช่องว่าง (vacuolation) ความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neuronal degeneration) ของสมองส่วนกลาง สมองส่วนหลังและบริเวณเรตินา (Munday, Kwang, & Moody, 2002) (ภาพประกอบ 5) จากการศึกษาโดยใช้ inverted microscopy ส่องดูเนื้อเยื่อของปลา *Cromileptes altivelis* ที่ติดเชื้อ พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในบริเวณลำไส้ ไต ตับ เหงือก สมอง และตา โดยพบว่าเกิด vacuolation การเกิดพังผืด (fibrosis) พบความเสียหายในเนื้อเยื่อบุผิว (epithelial tissue)

ภาวะเลือดคั่ง การบวมของเซลล์ การรวมตัวของ goblet cell และ inclusion bodies เป็นต้น (Zorriehzahra et al., 2014) (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 5 การเกิดช่องว่าง (vacuolation) ที่เกิดจากการตายของเซลล์ในส่วนของสมอง และเรตินาของลูกปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ Betanodavirus (ลูกศร) โดยการย้อมด้วยสี H&E, Scale bar = 100 μ m

ที่มา; Munday, B., Kwang, J., & Moody, N. (2002). *Betanodavirus* infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*. p. 131.



ภาพประกอบ 6 การเกิดช่องว่าง (vacuolation) (ลูกศร) ในสมองของปลา golden grey mullet (*Liza aurata*) ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในแถบทะเลแคสเปียน

ที่มา; Zorriehzahra, M. J., Nazari, A., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Karsidani, S. H., Bovo, G., & Daud, H. H. M. (2014). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Virus Disease*. p. 432.

7. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ NNV

7.1. การเพาะแยกเชื้อไวรัส (virus isolation)

การเพาะแยกเชื้อไวรัสเป็นวิธีการที่มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสอบสูง โดยตัวอย่างที่นำมาใช้สำหรับการเพาะแยกเชื้อไวรัสสามารถใช้ตัวอย่างได้จากทั้งปลาที่มีชีวิตหรือเนื้อเยื่อแช่แข็ง โดยในระยะแรกการเพาะแยกเชื้อไวรัสในสกุล *Betanodavirus* ต้องประสบกับปัญหาของการไม่มี cell line ที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส หลังจากนั้นในปี 1996 ได้มีการพัฒนา cell line ที่ชื่อว่า striped snakehead cell line (SSN-1) (Frerichs, Rodger, & Peric,

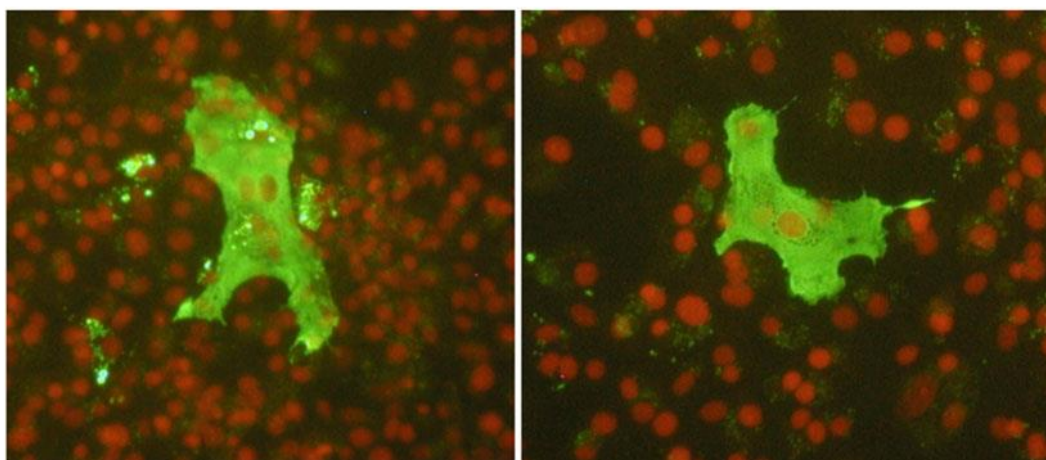
1996) ซึ่งมีความสามารถในการเข้ากันได้กับ 17 isolates ของ nodavirus ซึ่งรวมถึง RGNNV, SJNNV, TPNNV และ BFNNV ต่อมาในปี 1999 มีการพัฒนา cell line จากปลา grouper หรือ ปลาเก๋า (*Epinephelus coioides*) ตั้งชื่อว่า GF-1 (Chi, Hu, & Lo, 1999) cell line ที่พัฒนามา จาก *E. awoara* (Lai et al., 2001) หรือ cell line ที่พัฒนาจากปลา groupers (*E. coioides*) (Q. Qin, Wu, Jia, Hegde, & Zhang, 2006) แต่ SSN-1 ยังคงได้รับความนิยมในการใช้ตรวจสอบเชื้อ มากกว่า โดยไวรัสจะเหนี่ยวนำให้ cell line เกิด cytopathic effects (CPEs) ในไซโตพลาซึมของ เซลล์ ในระยะเวลาประมาณ 3-5 วันหลังการเพาะเชื้อ สำหรับ SSN-1 cells CPE จะเกิดในช่วง ระยะเวลาประมาณ 72 ชั่วโมงหลังการเพาะเชื้อ จะพบเซลล์มีการขยายขนาดขึ้น และเซลล์ที่มี ลักษณะเป็น monolayer จะเกิดช่องว่างจากเซลล์ที่ตายในที่สุด (Maltese & Bovo, 2007) อย่างไรก็ตาม พบว่า อย่างไรก็ตาม cell line SSN-1 ประกอบด้วยเซลล์ที่หลากหลายทำให้เกิดความไม่ สอดคล้องกันของ cytopathic effects (CPE) ที่สังเกตได้ระหว่างติดเชื้อไวรัส ต่อมาในปี 2000 Iwamoto และคณะ ได้ทำการพัฒนา cell line SSN-1 โดยทำให้เกิดการติดเชื้อ C-type retrovirus snakehead fish retrovirus (SnRV) พบว่า cell line ที่ถูกพัฒนาขึ้นมีความเสถียร เจริญเติบโต อย่างรวดเร็วและสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพยาวนานขึ้นเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส และ 4 สัปดาห์ ที่ 20 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถสังเกต CPE คือ การ เกิด vacuole ภายในเซลล์ได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ SSN-1 (Iwamoto, Nakai, Mori, Arimoto, & Furusawa, 2000) สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับความไวในการติดเชื้อ (susceptibility) และการยอมรับเชื้อของ cell line (permissiveness) ใน cell line ที่ถูกพัฒนาขึ้นทั้ง 5 ชนิด คือ E-11, GF-1, SAF-1, DLB-1, และ SaB-1 กับไวรัสในสกุล NNV 3 ชนิด คือ RGNNV, SJNNV และ RGNNV/SJNNV จากผลการศึกษาพบว่า E-11 เป็นเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยง เชื้อไวรัส RGNNV, SJNNV และ RGNNV/SJNNV (Valero et al., 2021)

7.2. Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA เป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีความไวสำหรับการตรวจสอบแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อเชื้อ nodavirus จากเลือดหรือของเหลวที่ได้จากปลาติดเชื้อ ซึ่งเหมาะสำหรับการ ตรวจสอบเชื้อในโฮสต์ที่แตกต่างกันจากทั้งพาหะและพ่อแม่พันธุ์เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบบ vertical transmission โดยการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค ELISA เริ่มมาตั้งแต่ปี 1992 ใน ปลา striped jack, ปลา barfin flounder และ ปลา กะพงขาว (*L. calcarifer*, Bloch) (Zorriehzahra et al., 2014)

7.3. Immunofluorescence antibody test (IFT)

IFT เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ประหยัด มีศักยภาพและเป็นประโยชน์สำหรับการคัดกรองไวรัสในวงศ์ Nodaviridae โดยใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเพื่อตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะในเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบ ได้แก่ สมอง ไขสันหลังและจอประสาทตา หรือการตรวจสอบการติดเชื้อใน cell line (ภาพประกอบ 7) การตรวจสอบด้วยวิธี IFT จำเป็นที่จะต้องเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อของสมองหรือเนื้อเยื่อเป้าหมายส่วนอื่น เช่น ตา ฤงลม ม้าม ไต และตับ จากนั้นทำการย้อมด้วยเทคนิค immunofluorescence เพื่อทำการศึกษาถึงตำแหน่งของไวรัสในอวัยวะเป้าหมาย เมื่อแอนติบอดีเข้าจับกับแอนติเจนที่อวัยวะเป้าหมาย สามารถมองเห็นได้เมื่อทำการติดฉลากแอนติบอดีด้วย fluorochrome โดยตรงหรือการติดฉลากทางอ้อมโดยอาศัย fluorescent reagent โดยสำหรับวิธี indirect fluorescent antibody test ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Betanodavirus* ในเนื้อเยื่อปลา golden grey mullet (*L. auratus*) พบเชื้อใน optic nerve, outer molecular และในชั้น granular ของสมอง รวมทั้งในชั้น nuclear ของเรตินา (Doan et al., 2017; Zorriehzahra et al., 2014)



ภาพประกอบ 7 การตรวจสอบการติดเชื้อ *Betanodavirus* ใน SSN-1 cell line ด้วยเทคนิค immunofluorescence antibody test (บริเวณที่พบเชื้อ = สีเขียว)

ที่มา; Doan, Q., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., & Allal, F. (2017). Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*. p. 10.

7.4. การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular diagnostic techniques)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจที่หลากหลายมากขึ้น แต่เดิมนั้นอาศัยการตรวจโดยพิจารณาจากอาการที่ปลาแสดงออก เช่น การว่ายน้ำผิดปกติ เป็นต้น หรือ การตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิ เช่น การเกิด vacuolation ในเนื้อเยื่อสมองและเรตินาของปลาที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้สามารถใช้เป็นข้อสนับสนุนการวินิจฉัยเท่านั้น เนื่องจากอาจมีความคลาดเคลื่อนจากการสังเกตอาการ หรือการติดเชื้ออื่นที่ส่งผลให้มีพฤติกรรมหรือลักษณะของโรคที่แสดงออกคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ NNV หรือการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น ELISA หรือ IFT โดยเฉพาะเทคนิค ELISA ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ แต่ปัญหาในเรื่องของการเกิด background ของค่า optical density (OD) จากการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีกับอนุภาคของไวรัส (Jaramillo et al., 2016) ภายหลังจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อวินิจฉัยเชื้อ NNV โดยอ้างอิงตามวิธีการตรวจสอบมาตรฐานที่ถูกระบุใน Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals ของ OIE ในปี 2019 (OIE, 2019) ในปี 1994 Muroga และคณะ ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ SJNNV ในปลา striped jack (*Pseudocaranx dentex*) โดยใช้บริเวณ T4 variable region ของ RNA2 เป็นเป้าหมาย ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่มีขนาด 430 คู่เบส และมีความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 100 fg ของ SJNNV RNA (Muroga, 1994)

ในปี 1999 Thiery และคณะ ได้มีการพัฒนาเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบเชื้อ Betanodavirus ในปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ด้วยวิธี RT-PCR ร่วมกับ nested PCR โดยผู้วิจัยได้มีการใช้ไพรเมอร์ในขั้นแรกของปฏิกิริยาที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ (Nishizawa et al., 1994) และได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนแคปซิดของ nodavirus ที่แยกได้จากปลากะพง ซึ่งได้ผลผลิตที่มีขนาด 294 คู่เบส และมีความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 10^{-1} และ 10^{-2} copies ของ plasmid DNA (Thiery, Raymond, & Castric, 1999)

ในปี 2000 Grotmol และคณะ ได้มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ร่วมกับ nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ nodavirus ในปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) โดยผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ T7 ของ RNA2 ของไวรัส ซึ่งได้ผลผลิตที่มีขนาด 341 คู่เบส และมีความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 10 copies ของพลาสมิดที่มียีน T2 ของไวรัส และ 1000 RNA copies ของไวรัส (Sindre Grotmol, Nerland, Biering, Totland, & Nishizawa, 2000)

ในปี 2000 Dalla และคณะ ได้มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ร่วมกับ nested PCR ในการตรวจสอบเชื้อ NNV ในปลา โดยผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ conserved region ของยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนแคปซิดของไวรัส ซึ่งในขั้นแรกของปฏิกิริยาได้ผลผลิตที่มีขนาด 605 คู่เบส และในขั้นต่อมาได้ผลผลิตที่มีขนาด 255 คู่เบส จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค RT-PCR, nested PCR และ RT-PCR ร่วมกับ nested PCR ในหลอดเดียวกันมีความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 10^{-6} , 10^{-8} และ 10^{-7} ของ RNA dilution ที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ SSN-1 ที่ติดเชื้อ NNV ตามลำดับ ซึ่งการพัฒนาเทคนิคข้างต้น ทำให้มีความไวในการตรวจสอบเพิ่มขึ้น 10-100 เท่า (Dalla Valle et al., 2000) โดยทาง OIE แนะนำให้วิธีการตรวจสอบที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Thiéry และคณะ รวมทั้ง Dalla Valle และคณะ เหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Betanodavirus* ที่มาจากแถบเมดิเตอร์เรเนียน ขณะที่วิธีการของ Grotmol และคณะ เหมาะสำหรับการตรวจสอบเชื้อ cold water strains (OIE, 2000)

หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิค real-time RT-PCR โดยอาศัย RNA1 และ RNA2 สำหรับการตรวจสอบ *Betanodavirus* ซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการตรวจสอบและลดการเกิด cross-contamination ระหว่างกระบวนการ post-amplification

ในปี 2005 Dalla และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค SYBR Green I-based real-time PCR สำหรับการตรวจสอบเชื้อ NNV โดยผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ที่จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน *RdRp* ซึ่งได้ผลผลิตที่มีขนาด 273 คู่เบส และยีน CP ที่ได้ผลผลิตที่มีขนาด 230 คู่เบส และยังได้มีการพัฒนาเทคนิค qPCR ที่จำเพาะต่อ 18S rRNA ของปลากระพงเพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณ RNA ที่ใช้ในการทดลอง โดยพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบความเข้มข้นของยีน *Betanodavirus* จาก 10^{-1} ถึง 10^{-8} copies per reaction เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค one-step RT-PCR และ virus isolation พบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ ความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ *Betanodavirus* (Dalla Valle et al., 2005)

ในปี 2006 Grove และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค competitive real-time RT-PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนแคปซิดของไวรัส และใช้เทคนิค double-dye ในการออกแบบไพรเมอร์ จากการทดลองพบผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 194 คู่เบส และเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดความสามารถในการตรวจสอบอยู่ที่ 980 copies ของ RNA per reaction (Grove, Faller, Soleim, & Dannevig, 2006)

ในปี 2010 Hick และ Whittington ได้พัฒนาเทคนิค TaqMan-based RT-qPCR ในการตรวจสอบเชื้อ RGNNV, SJNNV, BFNNV และ TPNNV โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่

จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของ RNA2 ของไวรัส จากการทดลองพบผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 93 คู่เบส และเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดความสามารถในการตรวจสอบอยู่ที่ 10^2 copies ของ พลาสมิดที่มียื่น RNA2 หรือ viral RNA ในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell culture supernatant) อยู่ที่ระหว่าง 0.04 และ 0.4 TCID₅₀ units per reaction นอกจากนี้ยังพบว่าจากการตรวจสอบ ความไวระหว่างเชื้อทั้ง 4 ชนิด พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจพบเชื้อ RGNNV ได้ดีที่สุด (Hick & Whittington, 2010)

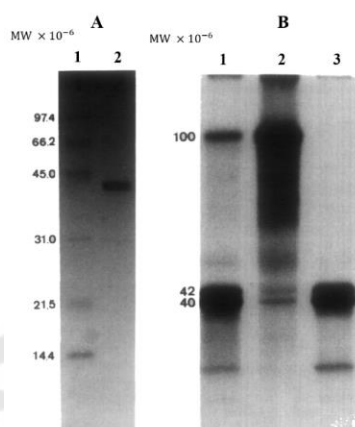
ในปี 2010 Panzarin และคณะได้ทำการพัฒนาเทคนิค real-time TaqMan PCR ที่ใช้เป็นเทคนิคอ้างอิงในการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ อนุรักษ์ของยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนแคปซิดจากการทดลองพบผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 69 คู่เบส และเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดความสามารถในการตรวจสอบอยู่ที่ 10 TCID₅₀/ml ซึ่งมีความไว มากกว่าเทคนิค RT-seminested PCR และเทคนิค virus isolation ในเซลล์เพาะเลี้ยง SSN-1 ประมาณ 100 เท่า (Panzarin et al., 2010)

ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค isothermal amplification สำหรับใช้ตรวจสอบเชื้อ NNV เช่น การใช้เทคนิค nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) ในการ ตรวจสอบเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 1.0 และ 0.1 TCID₅₀ และระหว่าง 10^3 และ 10^2 copies (Starkey et al., 2004) เทคนิค loop-mediated isothermal amplification มีความไวในการตรวจสอบมากกว่า nested PCR 100 เท่า (Mekata et al., 2015; Xu, Feng, Guo, Ou, & Wang, 2010) และ การใช้เทคนิค cross-priming isothermal amplification ร่วมกับ lateral flow dipstick (CPA-LFD) มีความไวในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ 10 copies/ μ L ของ RNA ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับ RT-qPCR (Su et al., 2015)

8. การศึกษาเกี่ยวกับ viral structural protein ของเชื้อ NNV

ตั้งแต่ในปี 1992 ที่ Mori และคณะได้ทำการแยกเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบ ประสาทส่วนกลางและเรตินาของปลา striped jack (*Pseudocaranx dentex*) พบว่าภายหลังการ แยก viral structural protein ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบโปรตีน ขนาดประมาณ 40 และ 42 kDa (ภาพประกอบ 8A) เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคการสร้างโปรตีนใน หลอดทดลอง (*in vitro* translation) พบ polypeptides หลัก 3 สาย โดยสายที่ 1 มีขนาดประมาณ 100 kDa ที่แปลรหัสมาจาก RNA1 และสายที่ 2 และ 3 มีขนาดประมาณ 42 และ 40 kDa ที่แปล รหัสมาจาก RNA2 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 8B) จากการศึกษาคูณสมบัติของไวรัสทางผู้วิจัยจึง ได้จัดให้เป็นสมาชิกใหม่ของวงศ์ Nodaviridae และตั้งชื่อว่า striped jack nervous necrosis

virus (SJNNV) ต่อมาจึงมีการจัดให้เป็นสมาชิกของสกุล *Betanodavirus* ในภายหลัง (Machimbirike et al., 2019; Mori et al., 1992)



ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบ viral structural protein ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ ผลการทดลองของ *in vitro* translation ของ SJNNV

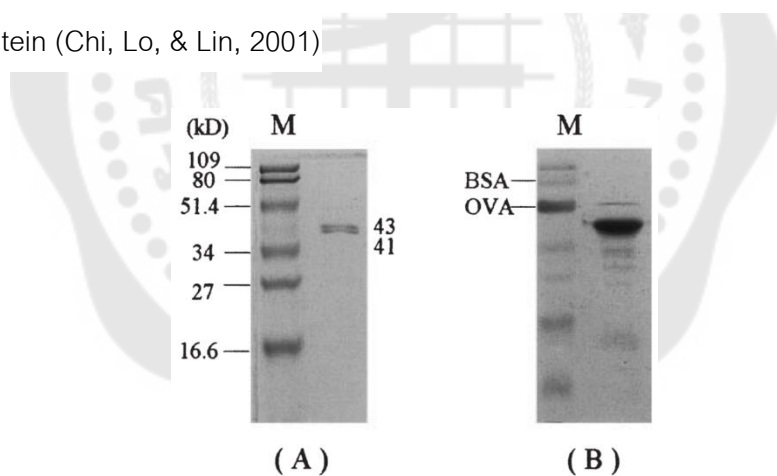
(A) การตรวจสอบ viral structural protein ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel Lane 1: standard marker Lane 2: structural protein (B) ผลการทดลองของ *in vitro* translation Lane1: total viral RNA Lane 2: RNA1 และ Lane 3: RNA2

ที่มา; 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*. p. 370.

ในปี 1995 Nishizawa และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบยีนโปรตีนแคปซิดของ SJNNV กับ TPNNV, BFNNV, RGNNV และ Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV) ที่แยกจาก Japanese flounder โดยไวรัสข้างต้นเป็นสาเหตุในการเกิดโรค viral nervous necrosis ในปลาทะเล พบว่าเมื่อทำการแปลรหัสยีนโปรตีนแคปซิดได้สาย polypeptide ที่มีความยาวประมาณ 340 กรดอะมิโน ซึ่งสามารถคำนวณขนาดโมเลกุลอยู่ที่ 37180 Da ซึ่งน้อยกว่าขนาดโมเลกุลที่ Mori และคณะได้รายงานไว้ในปี 1992 ที่มีขนาด 42 kDa เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสาร

พันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SJNNV ที่มีขนาดประมาณ 870-876 คู่เบส พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SJNNV และ NNV อื่นอีก 4 ชนิด มีความคล้ายคลึงกันอยู่มากกว่า 75.8 % และความคล้ายคลึงกันในระดับกรดอะมิโนอยู่มากกว่า 80.9 % เมื่อพิจารณาเฉพาะ JFNNV และ RGNNV พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ variable region อยู่ที่ 95.1% จากการศึกษาในภายหลังพบว่า JFNNV ถูกจัดเป็นสมาชิกของไวรัสในกลุ่ม RGNNV (Nishizawa, Kise, Nakai, & Muroga, 1995; Thiery, Cozien, de Boisseson, Kerbart-Boscher, & Nevarez, 2004)

ในปี 2001 Chi, Lo, & Lin ได้ทำการศึกษาถึงคุณลักษณะของ grouper nervous necrosis virus (GNNV) ที่แยกจาก *Epinephelus* sp. โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง GF-1 เมื่อทำการตรวจสอบโปรตีนของไวรัสด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นย้อมด้วยสี coomassie blue พบโปรตีนแคปซิดของไวรัส 2 ชนิด คือ 43 และ 41 kDa (ภาพประกอบ 9A) และเมื่อย้อมด้วย periodic acid-silver พบว่า โปรตีนแคปซิดของไวรัสถูกย้อมติดสีน้ำตาลเหมือนกับ glycoprotein และ ovalbumin (ภาพประกอบ 9B) ดังนั้นจึงคาดว่า capsid protein ของ GNNV เป็น glycoprotein (Chi, Lo, & Lin, 2001)



ภาพประกอบ 9 ผลการตรวจสอบโปรตีนของไวรัสด้วยเทคนิค SDS-PAGE(A) การย้อมด้วยสี coomassie blue (B) การย้อมสีด้วย periodic acid-silver M = prestained protein marker (Bio-Rad, Cat. 161±0305), BSA = bovine serum albumin, OVA = ovalbumin.

ที่ ม า ; Chi, S., Lo, B., & Lin, S. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*. p. 6.

9. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: MAb)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือ แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นมาจาก เซลล์พลาสมาที่พัฒนามาจากลิมโฟซัยท์ชนิด B กลุ่มเดียวกัน จึงทำให้แอนติบอดีที่ได้มีคุณสมบัติ เหมือนกันทุกประการ ทั้งด้านองค์ประกอบของแอนติบอดี เช่น สายยาว (heavy chain) และสาย สั้น (light chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) และความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ของแอนติเจน แต่โดยทั่วไปแล้วแอนติเจนแต่ละชนิดจะมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำและ กระตุ้นการตอบสนองของลิมโฟซัยท์ชนิด B กลุ่มต่าง ๆ เป็นจำนวนมากเป็นผลให้มีการสร้าง แอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม เรียกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปที่ปะปนอยู่ในซีรัม เหล่านี้ว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวสิ่งมีชีวิตเอง เพื่อป้องกันอันตรายจากเชื้อโรค แต่อย่างไรก็ตามความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัมอาจ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวินิจฉัยนอกร่างกาย เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีและ แอนติเจนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้นมาเพื่อ แก้ปัญหาเหล่านี้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

9.1. หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

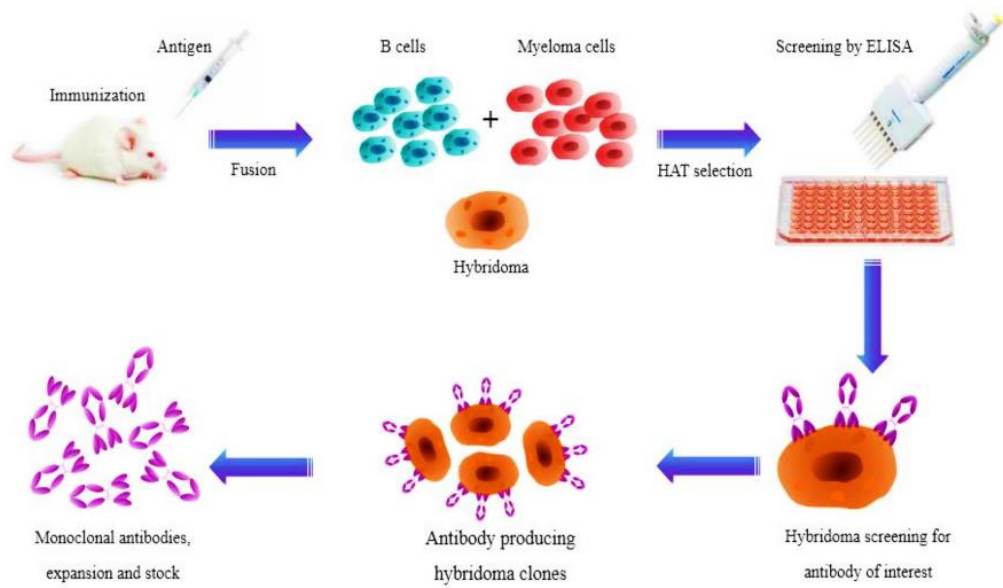
ในปี 1975 Georges Köhler และ César Milstein ได้พัฒนาแนวทางในการผลิตโม โนโคลนอลแอนติบอดีโดยอาศัยการหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) โดยการนำลิมโฟ ซัยท์ชนิด B ที่ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนที่ต้องการมารวมกับเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมา หรือเซลล์ไมอีโลมา (myeloma cell) เพื่อให้กลายเป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติของเซลล์ไมอีโลมา คือสามารถแบ่งตัวและเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีวัน ตาย ขณะเดียวกันคุณสมบัติของลิมโฟซัยท์ชนิด B ทำให้เซลล์ลูกผสมสามารถสร้างและหลั่ง แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนเพียงชนิดเดียวซึ่งเรียกว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี (ภาพประกอบ 10) ต่อมาภายหลัง Köhler และ Milstein ได้รับรางวัลโนเบลสาขา การแพทย์ในปี 1984 (Rajewsky, 2019)

9.2. การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma)

การหลอมรวมเซลล์ไมอีโลมาและลิมโฟซัยท์ชนิด B สามารถทำได้โดยการใช้พอลิเอ ทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ในความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามในความ เป็นจริงไม่สามารถที่จะหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อให้เป็นเซลล์ลูกผสมได้ จะยังคงเหลือเฉพาะเซลล์ ไมอีโลมาและบี-เซลล์ที่ไม่ได้รวมกัน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยง

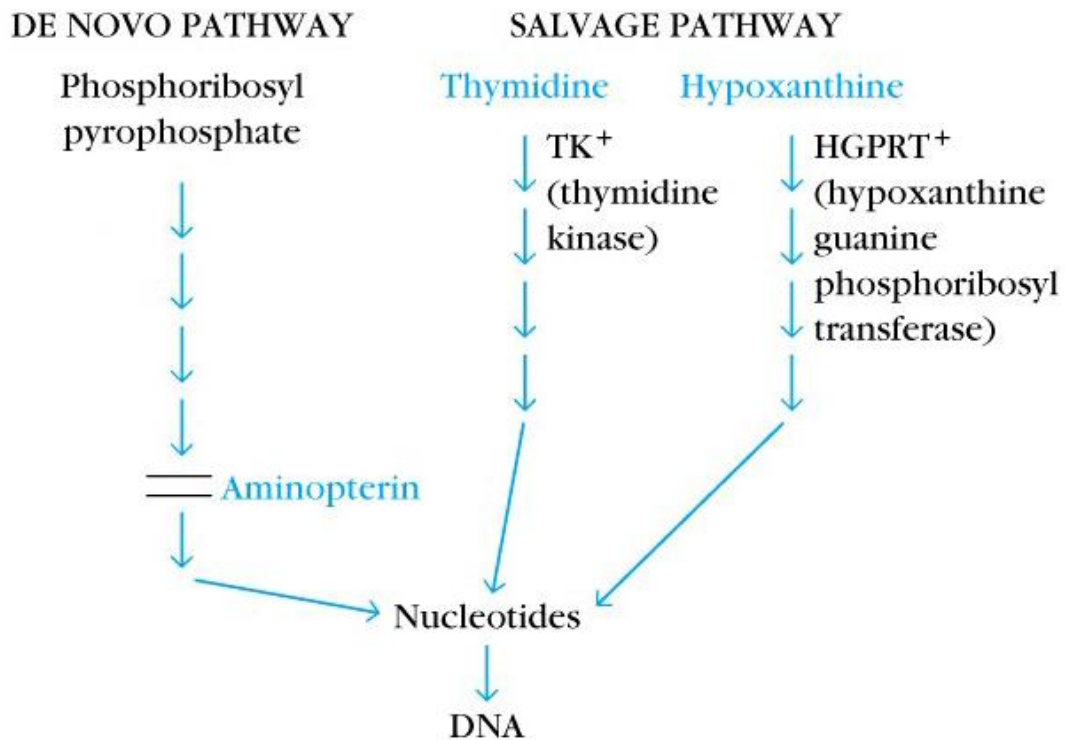
เพื่อให้เหลือเฉพาะเซลล์ลูกผสมเท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ โดยทั่วไปแล้วเซลล์ไมอิโดมาที่ถูกนำมาใช้จะมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ลูกผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ เซลล์ไมอิโดมาที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่เซลล์ลูกผสมที่เกิดจากการหลอมรวมระหว่างเซลล์ไมอิโดมาและลิมโฟไซต์ชนิด B เท่านั้นที่จะสามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากลิมโฟไซต์ชนิด B ส่วนลิมโฟไซต์ชนิด B ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ และตายไปในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 กระบวนการ คือ *de novo* pathway และ salvage pathway ในกรณีของ *de novo* pathway (ภาพประกอบ 11) มีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อ *de novo* pathway ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้ salvage pathway โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA แทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน salvage pathway นั้นได้แก่ เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ เอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ใน salvage pathway ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวาง *de novo* pathway ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์ DNA ได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548; Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014)



ภาพประกอบ 10 หลักการผลิตไมโนโคลนอลแอนติบอดี

ที่มา; Saeed, A., Wang, R., Ling, S., & Wang, S. (2017). Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Frontiers in Microbiology*, 8.



ภาพประกอบ 11 แนวทางการสังเคราะห์ DNA ด้วยวิถี *de novo* และวิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิถี *de novo*

ที่มา; Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*: Elsevier Health Sciences.

การผลิตเซลล์ลูกผสมนั้นมักจะใช้เซลล์ไมอิโดมาที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกัน คือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT (HGPRT⁻) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสมนั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของลิมโฟไซต์ชนิด B และเซลล์ไมอิโดมามีหน้าที่เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ลูกผสมที่สามารถสร้างแอนติบอดีแล้ว จำเป็นที่จะต้องมีการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ เนื่องจากมีเซลล์ลูกผสมบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นแก่สัตว์ทดลองได้ วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไป ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกันรูปแบบต่าง ๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่น ๆ ตามความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่สร้าง

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (re-clone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ลูกผสมนั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ลูกผสมเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ NNV นั้นมีการพัฒนามาตั้งแต่ปี 1995 โดย Nishizawa และคณะ ได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ SJNNV โดยใช้ homogenate ของลูกปลา striped jack ที่ติดเชื้อ เมื่อนำแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบด้วย Western blot พบว่าสามารถจับกับโปรตีนแคปซิดของ SJNNV ที่มีขนาด 42 kDa (Nishizawa et al., 1995) หลังจากนั้นได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เป็น immunoglobulin G (IgG) เมื่อนำมาทดสอบด้วย Western blot พบว่าสามารถจับกับโปรตีนแคปซิดของ YGNNV ที่มีขนาด 42 kDa (Lai et al., 2001) และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ G9508KS ของ grouper nervous necrosis virus (GNNV) ที่สามารถเข้าจับกับโปรตีนแคปซิดที่ถูกทำให้เสียสภาพที่แยกจาก GNNV-infected GF-1 เมื่อนำมาทดสอบด้วย Western blot แต่ไม่เข้าจับกับ GNNV recombinant capsid protein เมื่อทดสอบด้วย indirect immunosorbent enzyme linked assay (ELISA) (Shieh & Chi, 2005) ในปี 2020 Shyam และคณะ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อพัฒนาเป็น lateral flow immunochromatographic assay (LFIA) สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ NNV จีโนไทป์ RGNNV โดยใช้เชื้อ RGNNV isolate (SGYeosu08, GenBank accession No: KM095959.1) ที่แยกได้จากปลา sevenband grouper ที่เพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง SNN-1 พบว่ามีเซลล์ลูกผสม 6 โคลน (2B1, 2B11, 2C12, 13C1-1, 13C1-2 และ 14D11) ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ NNV ที่มีขนาด 41 kDa เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot analysis โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เป็น IgG2a isotype และ kappa light chain ภายหลังผู้วิจัยได้ทำการเลือกโคลนหมายเลข 2B1 ทำการ conjugate กับ colloidal gold nanoparticles และโคลนหมายเลข 2B11 ทำการตรึงที่บริเวณ test line พบว่า ความสามารถในการตรวจสอบต่ำสุดอยู่ที่ $10^{5.05}$ TCID₅₀/100 μ L และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสอื่น ๆ และจากการตรวจสอบโดยใช้เนื้อเยื่อสมองของปลา sevenband grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*) พบว่า LFIA ดังกล่าวมีความจำเพาะ (specificity) ที่ 100% และมีความไว (sensitivity) คิดเป็น 94.92% และมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย (diagnostic effectiveness) อยู่ที่ 96.81% (Shyam, Jeong, Oh, Kim, & Kim, 2020)

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ red-spotted nervous necrosis virus (RGNNV) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในสัตว์น้ำ สำหรับควบคุมและลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการระบาดเป็นวงกว้างภายในฟาร์มเพาะเลี้ยง



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 หนูขาว (Swiss mice) สายพันธุ์ ICR เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม

1.2 ปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ติดเชื้อไวรัส nervous necrosis virus (NNV) จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา จังหวัด เพชรบุรี

2. แบคทีเรียและพลาสมิด

2.1 แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด RGNNV-pGEX ซึ่งมียีนโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม ดังตารางที่ 3

2.3 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV จากความอนุเคราะห์ของ อ. ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 1

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. กล้อง inverted microscope รุ่น IX70	Olympus, U.S.A.
2. กล้อง compound microscope	Olympus, U.S.A.
3. เครื่องชั่งสาร รุ่น A200S	Sartorius, Germany
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge, Korea
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Eppendorf, Germany
6. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G560E	Scientific industries
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Jenway6400	Bausch & Lomb, U.S.A.
8. เครื่อง speed vacuam concentrator รุ่น SC210A	Savant
9. เครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer	Thermo scientific
10. เครื่อง thermal cycler	Eppendorf, Germany
11. เครื่อง sonicator	LABQUIP
12. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์	Bio-Rad, U.S.A.
13. เครื่อง nucleic acid electrophoresis	Bio-Rad, U.S.A.
14. ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad, U.S.A.
15. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad, U.S.A.
16. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ incubator)	NUAIRE, U.S.A.
17. เครื่อง rotary microtome รุ่น RM2135	LEICA

ตาราง 1 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
18. เครื่อง autoclave รุ่น HA-36	Hirayama
20. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinets)	NUAIRE

4 เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ยาปฏิชีวนะ ampicillin, kanamycin	Sigma, U.S.A.
2. ยาปฏิชีวนะ penicillin, streptomycin	M&H
3. ชุด high pure viral nucleic acid	Roche
4. ชุด SuperScript™III One-Step RT-PCR System	Invitrogen
5. Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen
6. Fetal bovine serum	Sigma, U.S.A.
7. Polyethylene glycol (PEG)	Sigma, U.S.A.
8. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma, U.S.A.
9. Hypoxanthine	Gibco, U.S.A.
10. Aminopterin	Sigma, U.S.A.
11. Nitrocellulose membrane	Sigma, U.S.A.

ตาราง 2 (ต่อ)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
12. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed, U.S.A.
13. Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad, U.S.A.
14. D-glucose	Gibco, U.S.A.
15. L-glutamine	Gibco, U.S.A.
16. Sodium pyruvate (C ₃ H ₃ O ₃ Na)	Sigma, U.S.A.
17. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	Amresco, U.S.A..
18. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	Amresco, U.S.A.
19. HT supplement	Gibco, U.S.A.
20. Acrylamide	Bio-Rad, U.S.A.
22. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide)	Bio-Rad, U.S.A.
23. Tris (hydroxyethyl) aminomethane	Bio-Rad, U.S.A.
24. SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Bio-Rad, U.S.A.
25. Mercaptoethanol	Sigma, U.S.A.
26. molecular weight markers	Sigma, U.S.A.
27. Thimerosal	Sigma, U.S.A.
28. Ammonium persulfate	Bio-Rad, U.S.A.
29. Triton X-100	Sigma, U.S.A.
30. TEMED (N', N', N', N', N'-Tetramethylethylenediamine)	Promega

ตาราง 2 (ต่อ)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
31. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma, U.S.A.
32. Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Sigma, U.S.A.
33. Coomassie brilliant blue R-250	Sigma, U.S.A.
34. Eosin Y	Harleco
35. Hematoxylin	Harleco
36. Paraplast	Sherwood
37. O-Phenylenediamine (OPD)	Sigma, U.S.A.
38. Dialysis tubing cellulose membrane	Sigma, U.S.A.
39. Protein standard (Kaleidoscope™)	Bio-Rad, U.S.A.
40. ชุดทดสอบ Hybridoma sub-isotype, mouse	Zymed, U.S.A.
41. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	Gibco, U.S.A.

5 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม ดังตาราง 3

ตาราง 3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม

แบคทีเรีย	รหัส	ที่มา
<i>Aeromonas caviae</i>	22106	DMST
<i>A. hydrophila</i>	22097	DMST

ตาราง 3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	รหัส	ที่มา
<i>A. sobria</i>	22100	DMST
<i>Flavobacterium columnare</i>	1301	CPF
<i>Photobacterium damsela</i>	N/A	DABU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11-12610	DBSWU
<i>Streptococcus iniae</i>	2396	CENTEX
<i>Vibrio alginolyticus</i>	24048	DMST
<i>V. parahaemolyticus</i>	22093	DMST
<i>V. vulnificus</i>	27427	DMST

หมายเหตุ: CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand,

CPF = Charoen Pokphand Food Public Co., Ltd.,

DABU = Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

DBSWU = Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินการสรุปได้ดังนี้

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ RGNNV (GST-RGNNV)



การทำรีคอมบิแนนท์ GST-RGNNV ให้บริสุทธิ์



ปลูกลูกหมึกคัมกันหนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิด GST-RGNNV บริสุทธิ์ ผสมกับตะกอนจาก
น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส



ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาว



ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี



คัดเลือกและทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของ

NNV



ตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการทดสอบหาอีพิโทป class และ subclass และทดสอบความไวของแอนติบอดี

1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV โดยเริ่มจากนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-RGNNV มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ บ่มข้ามคืนใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที จากนั้นนำแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมี ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60-90 นาที แล้วนำไปวัดค่า OD ที่มีความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.5-0.6 แล้วทำการกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วยการเติม isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ซึ่งปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มและเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว $3,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียผสมกับ buffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกันจนตะกอนเซลล์ละลาย และเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปผ่านคลื่นความถี่สูง (sonicate) เพื่อให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตก โดยทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 1 มาผสมกับ 2X SDS-treatment buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำโปรตีนมาแยกตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970) โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะ พลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) มีขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน (kDa) เป็น positive control สำหรับตรวจสอบความสำเร็จจากการกระตุ้นด้วย IPTG ในข้อ 1 และใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ปราศจากพลาสมิดเป็น negative control ทำการแยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV เปรียบเทียบกับโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดที่อยู่ในรูป fusion protein ของ GST-RGNNV ที่มีขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน

3. การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ให้บริสุทธิ์

การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ให้บริสุทธิ์ ทำโดยนำ lysate ของแบคทีเรียที่ได้มาแยกโปรตีนตามขนาดโดยใช้ 15% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 แล้วนำเจลไปแช่ใน KCl ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ที่เย็นเป็นเวลาประมาณ 20 นาที จนโปรตีนภายในเจลตกตะกอนเห็นเป็นแถบสีขาวขุ่น จากนั้นตัดแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดจากเจล แช่ในสารละลาย 0.1% SDS ซ้ำมคืน เก็บสารละลายและเจลที่ตัดใส่ในถุง dialysis แล้วทำการดึงโปรตีนออกจากเจลโดยใช้ชุด transblot apparatus (BioRad) ผ่านกระแสไฟฟ้าใน Towbin buffer 50 โวลต์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ถ้ายาสารละลายที่ได้ใส่ถุง dialysis อันใหม่ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วัน และเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ที่บริสุทธิ์แล้วไปปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และใช้สำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4. การเตรียมเชื้อไวรัส RGNNV จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และการตรวจสอบเชื้อ RGNNV

การเตรียมเชื้อ RGNNV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ ทำโดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 20000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสตกตะกอน (Liu et al., 2009) ดูดเก็บส่วนใสด้านบนแยกใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้ว ละลายตะกอนไวรัสด้วย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนไวรัสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และทำเช่นเดียวกับดังที่กล่าวมา กับน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัส เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดโปรตีน และยืนยันความถูกต้องของขนาดโปรตีนที่ปรากฏหลังนำไปตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบส่วนตะกอนและส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัส โดยการนำมาแยกโปรตีนตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 2 โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัสและไม่ติดเชื้อไวรัสปrior การตกตะกอน เป็นกลุ่มควบคุม โดยทำ

การแยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250

นำตะกอนที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบยืนยันแล้วไปใช้ปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวร่วมกับบริคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในข้อ 3 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และใช้สำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดี

5. การเตรียมตัวอย่างปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ NNV

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างปลากะพงขาวที่มีการติดเชื้อ NNV จากธรรมชาติ ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา จังหวัด เพชรบุรี จากนั้นนำมาตรวจสอบการติดเชื้อ ดังนี้

5.1 การสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลา

กรณีตัวอย่างเป็นลูกปลานขนาดเล็กจะใช้ส่วนหัวทั้งหมดเนื่องจากไม่สามารถแยกอวัยวะได้ แต่ในกรณีตัวอย่างเป็นปลาตัวเต็มวัยจะนำอวัยวะของตัวอย่างปลาบริเวณสมอง ตา และเหงือกของปลากะพงขาว บดใน PBS โดยใช้อัตราส่วน 1:1 (ตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $3,500 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที แบ่งสารสกัดที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ -70°C องศาเซลเซียส สำหรับทดสอบกับแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี dot blotting และ Western blotting และสารสกัดอีกส่วนนำมาผสมกับ lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS, pH 9) เพื่อสกัดกรดนิวคลีอิก โดยใช้ชุด high pure nucleic acid kit (Roche Molecular Biochemical) ทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ เก็บกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ไว้ในอุณหภูมิต่ำ -70°C องศาเซลเซียส

5.2 การตรวจการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV ด้วยวิธี RT-PCR ที่จำเพาะกับยีนโดยนำกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากข้อ 5.1 มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ของยีน RNA2 ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีนแคปซิดของเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ Taq DNA polymerase ตามลำดับ โดยผสมสารเคมีสำหรับ RT-PCR (ตาราง 4) ลงในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นของการเพิ่มจำนวนยีน (ตาราง 5) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ major capsid protein ของ

ไวรัสในกลุ่ม NNV โดยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับวิธี RT-PCR คือ VNNV1 และ VNNV2 (Dalla Valle et al., 2000) โดยให้ผลผลิตที่มีขนาด 605 คู่เบส ลำดับเบสของไพรเมอร์ดังนี้

Forward primer: (VNNV1) 5'- ACACTGGAGTTTCAAATTCA - 3'

Reverse primer: (VNNV2) 5'- GTCTTGTTGAAGTTGTCCCA – 3'

ตาราง 4 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR

ส่วนผสมของการทำ RT-PCR	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
กรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากปลากระพงขาว	5.0
SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq Mix	1.0
2X reaction mix (0.4 mM dNTPs, 2.4 mM MgSO ₄)	12.5
Forward primer : VNNV1 (10 μM)	1.0
Reverse primer : VNNV2 (10 μM)	1.0
Deionized water	4.5
ปริมาตรสุทธิ	25.0

ตาราง 5 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับการตรวจสอบยีนโปรตีนแคปซิดด้วยวิธี RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
1. cDNA synthesis	50	30.00	
2. pre-denaturation	94	2.00	ทำซ้ำขั้นตอนที่
3. denaturation	94	0.15	3 – 5
4. annealing	57	0.30	เป็นจำนวน 40 รอบ
5. extension	68	1.00	
6. final extension	68	5.00	

นำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation ตัดแถบ DNA ที่มีขนาดเท่ากับ 605 คู่เบสซึ่งเป็นผลผลิตของ RT-PCR ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ เก็บผลผลิต DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector และส่งไปตรวจสอบลำดับ DNA ต่อไป

5.3 การตรวจการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV ด้วยวิธี nested RT-PCR

ทำโดยนำผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR ในข้อ 5.2 มาเป็นต้นแบบและทำการเพิ่มจำนวนยีน RNA2 ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีนแคปซิดของเชื้อกลุ่ม NNV โดยใช้ไพรเมอร์ VNNV3 และ VNNV4 ให้ผลผลิตที่มีขนาด 255 คู่เบส โดยผสมสารเคมีสำหรับ nested RT-PCR ดัง ตาราง 6 ลงในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิ และเวลาของแต่ละขั้นของการเพิ่มจำนวนยีน (ตาราง 7) โดยใช้ไพรเมอร์ VNNV3 และ VNNV4 มีลำดับเบสดังนี้ (Dalla Valle et al., 2000)

Forward primer: (VNNV3) 5'- ATTGTGCCCCGCAAACAC - 3'

Reverse primer: (VNNV4) 5'- GACACGTTGACCACATCAGT – 3

ตาราง 6 ส่วนผสมของการทำ nested RT-PCR

ส่วนผสมของการทำ nested RT-PCR	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration)
RT-PCR product	1.00	-
Platinum [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 unit / μ l)	0.25	1X buffer
10X PCR buffer	2.50	200 μ M
10 mM dNTPs	0.50	1.5 mM
50 mM MgCl ₂	0.75	0.4 μ M
Forward primer : VNNV3 (10 μ M)	1.00	0.4 μ M
Reverse primer : VNNV4 (10 μ M)	1.00	0.4 μ M
Deionized water	18.00	-
ปริมาตรสุทธิ	25.0	

ตาราง 7 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนแคปซิด ด้วยวิธี nested RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
1. initial denaturation	94	3.00	
2. denaturation	94	0.30	ทำซ้ำขั้นตอนที่
3. annealing	57	0.30	2 - 4
4. extension	72	0.30	เป็นจำนวน 35 รอบ
5. final extension	72	10.00	

นำผลผลิต nested RT-PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากการทำ RT-PCR ในข้อ 5.2 ไม่พบแถบผลผลิต DNA แต่พบในรอบของการทำ nested RT-PCR จะตัดแถบ DNA ที่มีขนาดเท่ากับ 255 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตของ nested RT-PCR ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ เก็บผลผลิตที่สกัดได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector และส่งไปหาลำดับ DNA ต่อไป

6. การหาลำดับ DNA

6.1 การโคลนผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR เข้าสู่ pCR™ 8/GW/TOPO™ vector และการ transformation เข้าสู่ competent cells

จากการทำ nested RT-PCR มีการใช้ Platinum® *Taq* ทำให้บริเวณปลายของผลผลิต PCR ถูกเติมเบส adenine (A) ส่งผลให้ผลผลิตเป็นปลายเหนียว จึงต้องทำการโคลนผลผลิตเข้าสู่เวกเตอร์ที่มีเบส thymine (T) ยื่นออกมา เพื่อจับกับเบส A บริเวณปลายของผลผลิตได้ จึงทำการโคลนผลผลิตที่ได้จากข้อ 5.3 เข้าสู่ pCR™ 8/GW/TOPO™ vector โดยใช้ชุด pCR™ 8/GW/TOPO™ TA Cloning Kit (Invitrogen) โดยผสมสารต่าง ๆ ดังตาราง 8

ตาราง 8 ส่วนผสมของการเชื่อมกัน (ligation) ระหว่างผลผลิต PCR ที่ได้กับ pCR™8/GW/TOPO™ vector

ส่วนผสมของการทำ ligation	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ผลผลิตจากการทำ nested RT-PCR	4
pCR™8/GW/TOPO™ vector	1
Salt solution	1
ปริมาตรสุทธิ	6

ทำการผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ DNA เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ให้ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากนั้นดูส่วนผสม ligation ทั้งหมดใส่หลอด competent cells สายพันธุ์ *E. coli* TOP10 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรที่ละลายแล้วบนน้ำแข็ง ใช้นิ้วดีดหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน วางไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการ heat-shock โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำกลับไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $4,000 \times g$ เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูสัดส่วนใสด้านบนทิ้งให้ปริมาตรสุทธิที่เหลือในหลอดเป็น 100 ไมโครลิตร ผสม competent cells ที่ตกตะกอนที่ก้นหลอดให้เข้ากัน แล้วดูทั้งหมดไป spread บน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติม isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และ 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-gal) ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

6.2 การคัดเลือกโคลน *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีขึ้น DNA โดยเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวที่เจริญบน LB agar ในข้อ 6.1 มาเลี้ยงต่อใน LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใส่ยา spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด NucleoSpin Plasmid EasyPure (MACHERY-NAGEL) ทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ จะได้พลาสมิดปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แบ่งพลาสมิดปริมาตร 8 ไมโครลิตร ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ตาราง 9) เพื่อตรวจสอบว่า DNA ที่เป็นผลผลิตจากการทำ nested RT-PCR ที่ถูกเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์จริง ก่อนส่งไปหาลำดับ DNA

ตาราง 9 ส่วนผสมของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ส่วนผสม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิด	8
10X CutSmart buffer	1
<i>EcoRI</i> -HF	1
ปริมาตรสุทธิ	10

ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation หาก DNA ที่เป็นผลผลิตจากการทำ nested RT-PCR ถูกเชื่อมต่อเข้ากับ pCRTM8/GW/TOPOTM vector จะปรากฏ 2 แถบ คือ แถบของ pCRTM8/GW/TOPOTM vector ที่มีขนาด 2,817 คู่เบส และแถบของ DNA ที่เป็นผลผลิตจากการทำ nested RT-PCR ที่มีขนาด 225 คู่เบส จากนั้นแบ่งพลาสมิดที่เหลือที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่เพื่อส่งไปหาลำดับ DNA จากผลการหาลำดับ DNA พบว่าเป็นยีนโปรตีนแคปซิด

ของเชื้อกลุ่ม NNV จีนไทป์ RGNNV นำปลากะพงขาวตัวดังกล่าวไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือก และทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

6.3 การเตรียมโปรตีนเสียสภาพของตัวอย่างปลากะพงขาว

นำตัวอย่างปลากะพงขาวปกติและปลากะพงขาวที่ติดเชื้อกลุ่ม NNV ที่ได้รับการตรวจการติดเชื้อจากข้อ 5.2 และผ่านการยืนยันจากการหาลำดับ DNA ในข้อ 6.2 ส่วนหนึ่งมาทำให้เสียสภาพโดย ผสมกับ 2X SDS-treatment buffer ในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ตัดถุง dialysis ให้มีขนาดใหญ่กว่าปากหลอดเล็กน้อย แล้วนำไปครอบปากหลอดในลักษณะที่คว่ำลง จากนั้นนำไปแช่ใน PBS เป็นเวลา 1 คืน เพื่อล้าง SDS ออก และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกและทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

7. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV

7.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 240 ไมโครลิตร และตะกอนของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัสจากข้อ 4 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกัน แล้วนำไปผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV เป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูขาว จำนวน 4 ตัว ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีก 3 ครั้ง โดยผสมโปรตีนที่ความเข้มข้นเดิมกับตะกอน ปริมาตรเท่าเดิม ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant เว้นระยะห่างระหว่างการฉีดแต่ละครั้ง 2 สัปดาห์ หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 ไปแล้ว 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดบริเวณหัวตา (orbital sinus) ของหนูขาวทั้ง 4 ตัว จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกแอนติซีรัม (antiserum) หนูแต่ละตัว แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ด้วยวิธี Western blotting โดยแอนติซีรัมแสดงปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อไวรัสโปรตีนแคปซิดไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และ โปรตีนแคปซิดจากสารสกัดของปลาปกติ น้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อไวรัส โดยไม่แสดงปฏิกิริยาหรือแสดงปฏิกิริยาน้อยที่สุดกับสารสกัดจากปลาปกติ น้ำเลี้ยงเซลล์

E11 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัส เลือกลงตัวที่มีตอบสนองดีที่สุดมาใช้ผลิตเซลล์ไฮบริโดมา โดยฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดผสมกับ incomplete Freund's adjuvant

7.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษาคั้งนี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิมของ (Köhler & Milstein, 1976) ซึ่งดัดแปลงโดย (Mosmann, Bauml, & Williamson, 1979) โดยนำหนูขาวตัวที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติชีรั่มกับแอนติเจนที่ดีที่สุด จากข้อ 7.1 มากระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีกครั้งโดยทำการฉีดซ้ำ 3 วันก่อนดำเนินการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นฆ่าหนูตัวดังกล่าวโดยตั้งข้อต่อบริเวณคอ (cervical dislocation) แล้วทำการผ่าตัดแยกม้ามและกระจายเซลล์ม้ามให้เป็นเซลล์เดี่ยว นำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) เข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 นาที ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสม หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI และบ่มเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วปั่นแยกและกระจายเซลล์ลงใน 96 well microculture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI เสริมด้วย HAT medium (ที่ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) กับ 20% fetal bovine serum (FBS) และ เม็ดเลือดแดง 0.5% เป็นจำนวน 15 เพลต เลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ติดตามการเจริญของเซลล์ภายในเพลต ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting และ western blotting ต่อไป

7.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

จากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 well microculture plate ซึ่งมีจำนวน 15 เพลต ทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องคัดเลือกชั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อน จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของโคลนไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting มาคัดเลือกชั้นที่ 2 ต่อโดยวิธี dot blotting, western blotting และ immunohistochemistry

7.3.1 การคัดเลือกชั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้พลาสมิด pGEX-6P-1 expression vector ในการผลิตโปรตีนลูกผสมของ GST จาก vector กับโปรตีนที่ต้องการดั่งนั้นในการคัดเลือกชั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของ RGNNV เท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหยุด lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ GST-

RGNNV และ lysate ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 (GST) โดยหยดลงบนกระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด รอให้กระดาษ nitrocellulose แห้ง แล้วแช่ใน 5% blotto (นมพว่องมันเนย 5%, 0.1% Triton X-100 ละลายใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง บ่มซ้ำด้วย horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1 : 2500 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย substrate ที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H₂O₂) และ 0.05% cobalt chloride (CoCl₂) ในสารละลาย PBS คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV และโปรตีนแคปซิดไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ โดยดูจากตำแหน่งที่หยดโปรตีน GST-RGNNV ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV ผสมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ปรากฏจุดสีดำขึ้น และไม่ปรากฏจุดสีดำในตำแหน่งที่หยดโปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ผสมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลดังกล่าว ไปคัดเลือกต่อในการคัดเลือกระดับที่ 2 โดยวิธี dot blotting และ Western blotting

7.3.2 การคัดเลือกระดับที่ 2 โดยวิธี dot blotting

การคัดเลือกในขั้นตอนนี้คล้ายกับการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 1 แต่ในขั้นตอนนี้ทำการหยดตัวอย่าง 4 จุดที่ต่างกัน ได้แก่ 1) โปรตีน GST-RGNNV ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV 2) โปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 3) น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV และ 4) น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ RGNNV โดยหยดตัวอย่างสารละลายแต่ละจุดประมาณ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นบ่มกับน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากหลุมเดียวกันกับที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกระดับที่ 1 ในข้อ 7.3.1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง บ่มซ้ำด้วย GAM-HRP จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกันกับข้อ 7.3.1 คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV และจำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อได้

7.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting

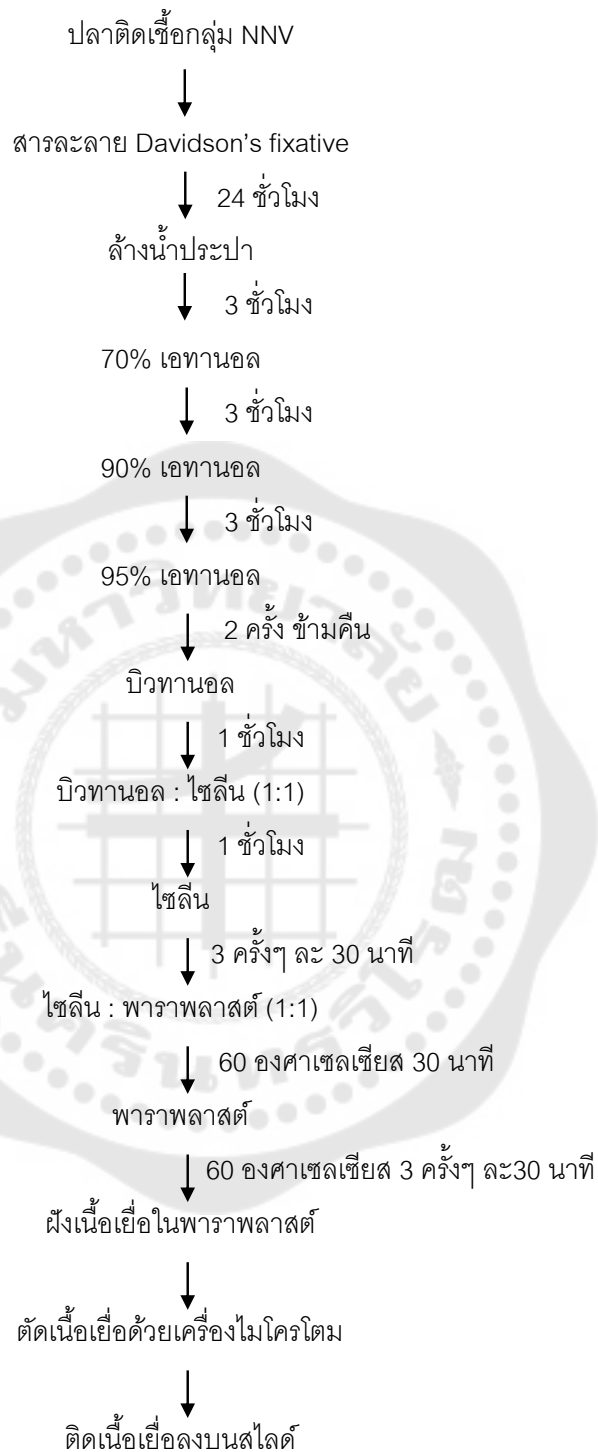
นำ lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV และ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ RGNNV มาแยกโปรตีนใน 15% SDS-PAGE ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่กระดาษ nitrocellulose โดยใช้ชุด transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำกระดาษ nitrocellulose แขนในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที แล้วตัดกระดาษ nitrocellulose เป็นเส้นแยกใส่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:20 ใน 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านกระบวนการ immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 7.3.1 เพื่อยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี และตรวจสอบผลที่ได้โดยเทียบกับแถบโปรตีนที่บ่มด้วยแอนติซีรัม

7.3.4 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี immunohistochemistry

นำตัวอย่างปลากะพงขาวที่ตรวจพบการติดเชื้อกลุ่ม NNV มาทำให้คงสภาพ (fix) ในสารละลาย Davidson's fixative นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยให้น้ำผ่านตลอดเพื่อกำจัด fixative แล้วนำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก ดังนี้ 70, 90, 95 เปอร์เซ็นต์ บิวทานอล บิวทานอลผสมไซลีนในอัตราส่วน 1:1 และ ไซลีน ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltration) ด้วยพาราฟลาสต์และฝังเนื้อเยื่อในพาราฟลาสต์ (embedding) แล้วนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อแบบโรตารี (rotary microtome) ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นที่มีความหนา 8 ไมโครเมตร นำไปติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin solution) อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 12) นำมาผ่านกระบวนการ immune-peroxidase โดยนำสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อมาละลายพาราฟลาสต์ออกด้วยไซลีน (deparaffination) และบิวทานอล จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการเติมน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นมากไปน้อยดังนี้ 95, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอมาลินความเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่น และ PBS 3 ครั้ง หยดคลุมเนื้อเยื่อด้วยสารละลาย P_1^+ (fetal bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในกล่องเก็บความชื้นเป็นเวลา 30 นาที นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกในข้อ 7.3.1 และ 7.3.2 เจือจาง 1:20 ในสารละลาย P_1^+ หยดคลุมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นบ่มซ้ำด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:2500 ในสารละลาย P_1^+ หยดคลุมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

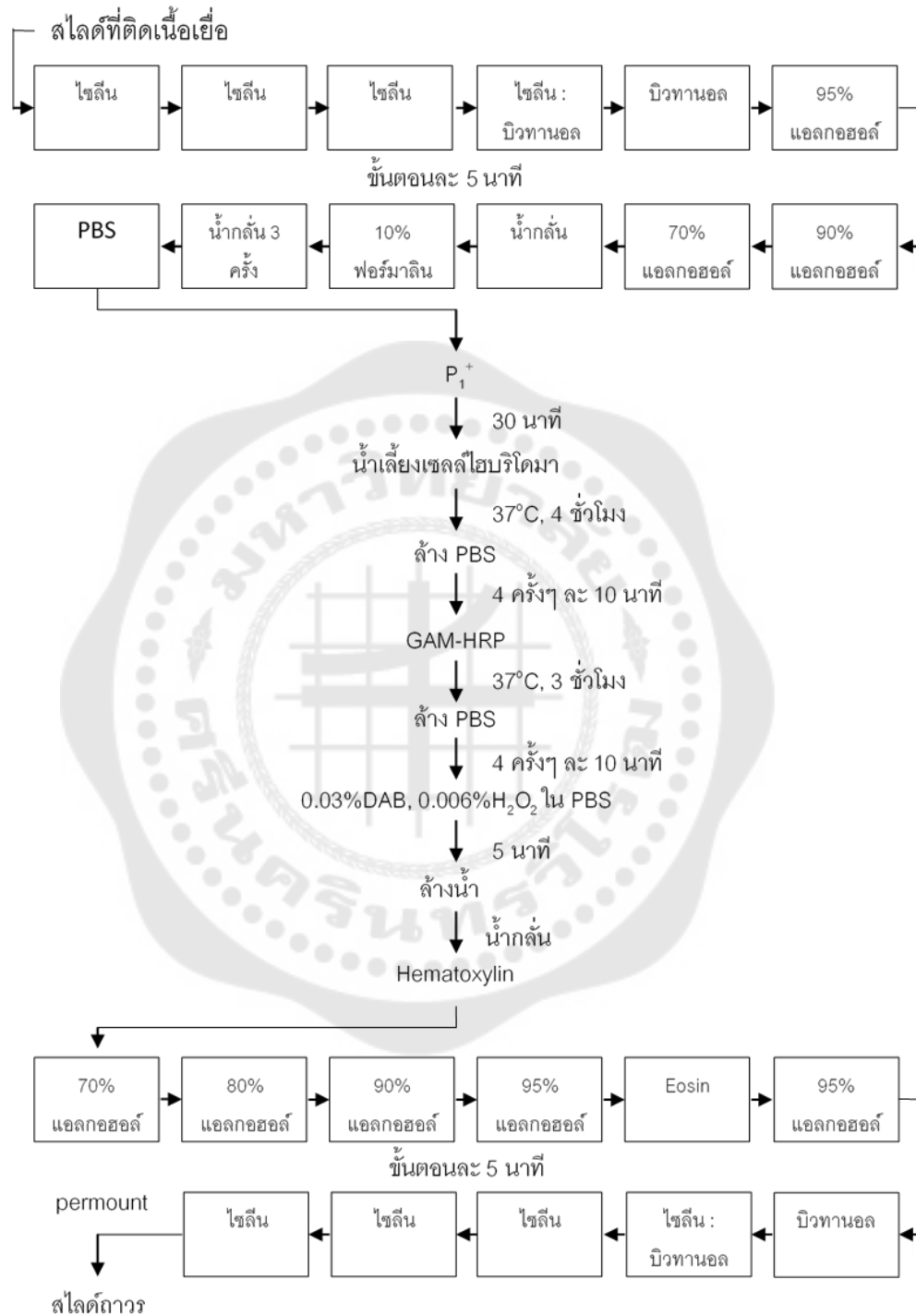
เซลล์เย็บส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และนำไปทำปฏิกิริยากับ สารละลายซัลเฟอร์ทรีไฮไดรด์ ประกอบด้วย 0.03% DAB และ 0.006% H_2O_2 ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปย้อมซ้ำด้วยสี haematoxylin และสี eosin Y (H&E) เพื่อให้เห็นขอบเขตเนื้อเยื่อได้ชัดเจน แล้วผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่ออีกครั้งด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก จากนั้นทำให้เนื้อเยื่อใสด้วยไซลีน ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยหยดทับเนื้อเยื่อด้วย permount และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่มีการติดเชื้อจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายของเนื้อเยื่อของปลา กะพงขาวที่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ 13)





ภาพประกอบ 12 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อปลาสำหรับวิธี immunohistochemistry (IHC)

(ดัดแปลงจาก ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548 : หน้า 27-34)



ภาพประกอบ 13 แผนผังกระบวนการย้อมโดยวิธี immunohistochemistry

(ดัดแปลงจาก ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548 : หน้า 27-34)

8. การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

นำโคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้งขั้นที่ 1 และ 2 มาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar, 1985) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ไฮบริโดมาเพียงเซลล์เดียว โดยนำเซลล์ไฮบริโดมากระจายภายในหลุม 96 well plate โดยใช้ปิเปตดูดสารขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งแน่ใจว่าเซลล์ในหลุมกระจายแล้ว หยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 ไมโครลิตร ทำการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope ปรับให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ จากนั้นเติม RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, 1% mouse red blood cell ปริมาณ 7.5 มิลลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน 48 หลุมแรก (แถว 1-6) ของ 96 wells plate อันใหม่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RPMI medium เพิ่มในจานเลี้ยงเชื้ออันเดิมอีก 2.5 มิลลิตร ดูดลงใน 48 หลุมหลัง (แถว 7-12) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในตู้ CO₂ incubator ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบหลุมที่มีไฮบริโดมาโคลนเดี่ยว (single clone) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมดังกล่าวมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ก่อนการขยายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา

9. การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ในอาหาร RPMI medium ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum กระจายและดูดเซลล์แขวนลอยในหลอดขนาด 50 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 ×g เป็นเวลา 5 นาที ดูดแยกสารละลายแอนติบอดีส่วนใสออกจากเซลล์ไฮบริโดมาใส่ในหลอดใหม่แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบ จากนั้นเติมสารละลาย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12% (dimethyl sulfoxide: DMSO) ปริมาตร 3 มิลลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดสำหรับเก็บเซลล์ (cryopreservation tube) หลอดละ 1 มิลลิตร และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

10. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ภายหลังจากการเลือกเซลล์ไฮบริโดมาและโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution แล้วทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาณมาก นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติ โดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ตรวจสอบชนิดของ class และ

subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA ทดสอบความไวในการตรวจจับเชื้อ RGNNV ด้วยวิธี dot blotting และยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลา ด้วยวิธี immunohistochemistry

10.1 การตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ลงที่ก้นหลุมของ ELISA microtiter plate ความเข้มข้น 5 µg/mL ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สกัดสารละลายทิ้งแล้วล้างทุกหลุมด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วเติม 5% blotto ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิดผสมกัน (เจือจาง 1:20 ใน 5% blotto) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม ELISA microtiter plate (ภาพประกอบ 14) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง สกัดสารละลายทิ้งแล้วล้างทุกหลุมด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 ในสาร 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในครั้งสุดท้าย จากนั้นเติมสารละลายซับสเตรทประกอบด้วย O-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006% H₂O₂ ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1N H₂SO₄ ลงในทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Thermo iEMS microplate reader สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปต่างกัน ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน จะมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีชนิดเดียว (อารีรัตน์ คุณานพรัตน์, 2553)

Mab	A	B	C	D	E
A	A+A	A+B	A+C	A+D	A+E
B		B+B	B+C	B+D	B+E
C			C+C	C+D	C+E
D				D+D	D+E
E					E+E

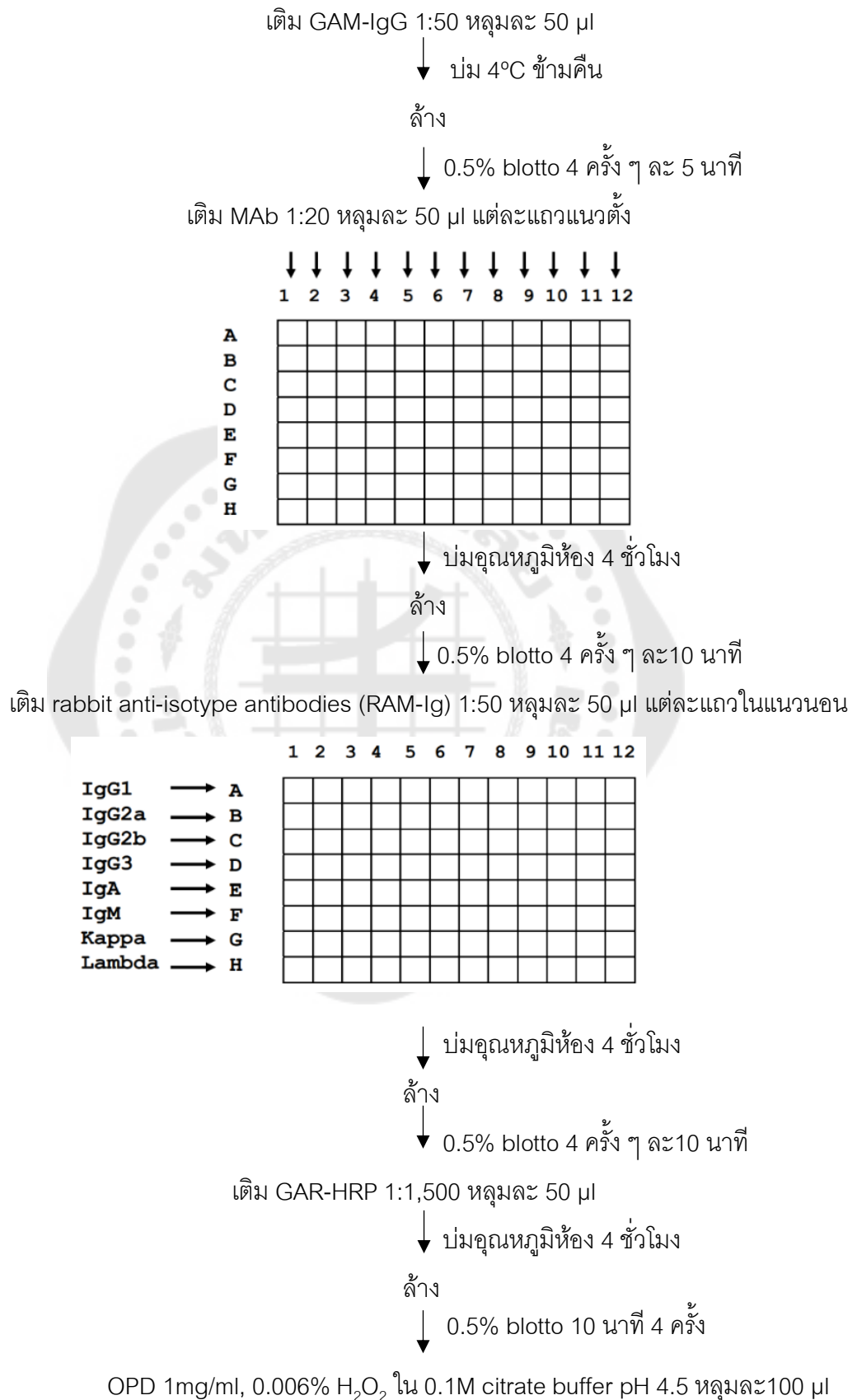
ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน แคปซิดของ RGNNV (ตัวอักษร A-E แสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ)

10.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID kit (HRP) ดังนี้ ทำการตรึง goat anti-mouse Ig heavy and light chain specific antibody (GAM-H+L) ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบเวลาล้างทุกหลุมด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:20 ใน 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างทุกหลุมด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติม rabbit anti-isotype

antibodies แต่ละชนิด (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, Kappa และ Lambda) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H แถวละ 1 ชนิด บ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วเติม goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1:1,500 ใน 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และล้างด้วย PBS ในครั้งสุดท้าย จากนั้นเติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย OPD 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006% H_2O_2 ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และอ่านค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Thermo iEMS microplate reader (ภาพประกอบ 15)





↓ 5 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H₂SO₄ หลุมละ 100 µl และวัด OD 490 nm

ภาพประกอบ 15 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ดัดแปลงจาก กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล, 2551 : หน้า 36)

10.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลาด้วยวิธี immunohistochemistry

ทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยบ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ เป็น positive control คือ 10F3 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (Vaniksampanna et al., 2023), 12B12 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส scale drop disease virus (SDDV) (อรพรรณ มานะจิตต์; ไม่ได้ตีพิมพ์) และ 15A10 ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส tilapia lake virus (TiLV) (นันทธัญฉวี พลภักดี; ไม่ได้ตีพิมพ์) ซึ่งเมื่อผ่านการเตรียมเป็นสไลด์ถาวรแล้ว นำมาส่องดูเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เบี่ยงเทียบบริเวณต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ที่เห็นเป็นสีน้ำตาลซึ่งบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสที่ใช้เป็น positive control กับผลที่ได้จากการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ที่ผลิตได้ในตำแหน่งเดียวกันบนเนื้อเยื่อ

10.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลาด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด คือ GST-ISKNV, GST-SDDV และ His-TiLV โปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E.coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 และ โปรตีน histidine ของ lysate ที่ได้จาก *E.coli* ที่มีพลาสมิด pET15b มาหยดบนกระดาษ nitrocellulose ประมาณ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV

หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสชนิดต่าง ๆ ซึ่งใช้เป็น positive control เช่นเดียวกับข้อ 10.3 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นผ่านกระบวนการ immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา แล้วตรวจสอบผลที่ได้

10.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting

นำแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 ในรูปแบบ heat killed ความเข้มข้น 10^8 CFU/mL หยดลงบนกระดาษ nitrocellulose ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มด้วย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แล้วบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของ RGNNV ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นผ่านกระบวนการ immuno-peroxidase เช่นเดียวกับข้อ 10.4

10.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV และสารสกัดจากปลาที่ติดเชื้อ NNV ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและในรูปเสียสภาพจากข้อ 6.3 มาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดลงบนกระดาษ nitrocellulose โดยใช้สารสกัดจากปลาที่ไม่ติดเชื้อเป็น negative control แล้วนำไปบ่มด้วย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละโคลน หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีอิทธิฤทธิ์ต่างกันรวมกัน โดยเจือจาง 1:10 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นผ่านกระบวนการ immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ตรวจสอบระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของแต่ละตัวอย่างที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

10.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบตัวอย่างปลาติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับ วิธี RT-PCR

นำตัวอย่างปลาติดเชื้อกลุ่ม NNV มาบดใน PBS โดยใช้อัตราส่วน 1 : 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร PBS) แล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วยสารสกัดจากเนื้อเยื่อปลาปกติใน PBS นำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยดบนกระดาษ nitrocellulose ทดสอบด้วยวิธี dot blotting เช่นเดียวกับข้อ 9.6 จากนั้นนำตัวอย่างอีกส่วนมาสกัดกรดนิวคลีอิก โดยใช้ชุด high pure nucleic acid kit (Roche

Molecular Biochemical) ทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ ทำการเจือจางแบบ 10 fold serial dilution ด้วยกรดนิวคลีอิกที่สกัดจากปลาปกติ แล้วนำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นทำสอบด้วยวิธี RT-PCR เช่นเดียวกับข้อ 5.2 เปรียบเทียบระดับความเจือจางสูงสุดที่ทั้ง 2 วิธีสามารถตรวจพบการติดเชื้อได้

10.8 การตรวจการติดเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลาด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR

นำตัวอย่างปลาจำนวน 30 ตัวอย่างจากฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรี โดยแบ่งเป็นปลาติดเชื้อมุม NNV จำนวน 15 ตัว และปลาปกติจำนวน 15 ตัวอย่าง มาแยกอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ตา สมอง และเหงือก บดใน PBS โดยใช้อัตราส่วน 1 : 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งนำไปทดสอบด้วยวิธี dot blotting โดยตีตารางขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร บนกระดาษ nitrocellulose แล้วนำสารสกัดจากปลาแต่ละตัวที่ผ่านการต้มแล้วมาหยดในแต่ละช่อง โดยหยดปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน จากนั้นผ่านกระบวนการ immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา และตัวอย่างอีกส่วนนำมาสกัดกรดนิวคลีอิก แล้วทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR เช่นเดียวกับข้อ 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ และบันทึกผลการตรวจตัวอย่างปลาติดเชื้อแต่ละตัวในแต่ละวิธี

บทที่ 4

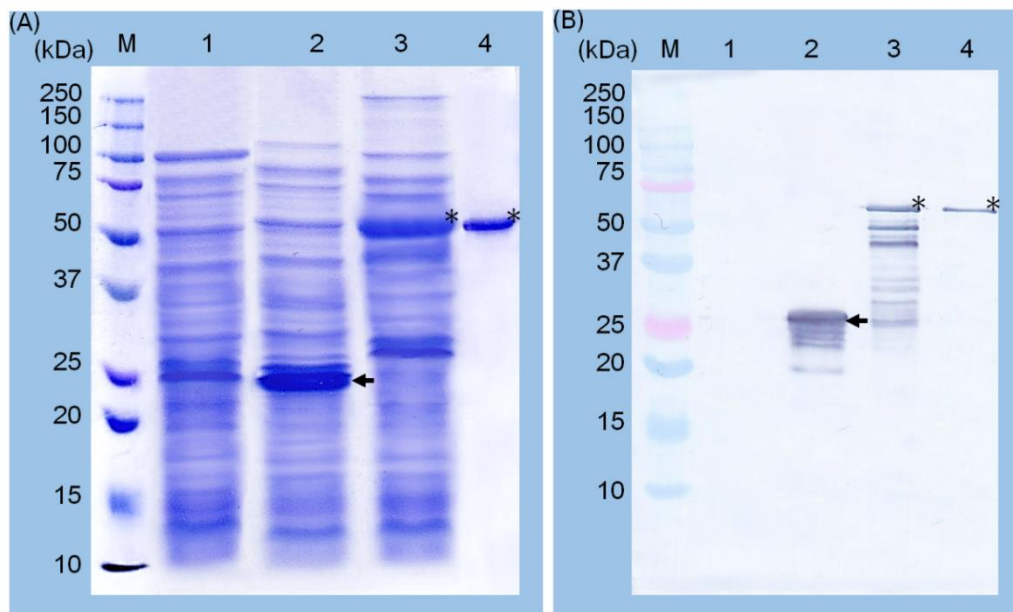
ผลการทดลอง

1. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV

จากการนำแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-RGNNV มากระตุ้นให้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ด้วย IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ *lac* promoter หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์และผ่านคลื่นความถี่สูงเพื่อให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกจากนั้นทำการตรวจสอบการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยนำโปรตีนมาแยกตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 พร้อมกับตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting ที่ป่มกับแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน GST (ภาพประกอบ 16) พบว่า แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ซึ่งอยู่ในรูป fusion protein ของ GST-RGNNV ที่มีขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 16 แถว 3) ส่วนแบคทีเรียที่มีเพียงพลาสมิด pGEX-6P-1 ผลิตเฉพาะโปรตีน GST ที่มีขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 16 แถว 2) และแบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดไม่พบการสร้างโปรตีนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว (ภาพประกอบ 16 แถว 1)

2. การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ให้บริสุทธิ์

จากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV มาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-RGNNV มาแยกโปรตีนตามขนาดโดยใช้ 15% SDS-PAGE แล้วนำแผ่นเจลไปแช่ใน KCl ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เมื่อโปรตีนภายในเจลตกตะกอนจนเห็นเป็นแถบสีขาวขุ่น ตัดแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดจากเจลที่มีขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน แช่ในสารละลาย 0.1% SDS ข้ามคืน เก็บสารละลายและเจลที่ตัดใส่ในถุง dialysis แล้วทำการดึงโปรตีนออกจากเจลโดยใช้ชุด transblot apparatus โดยผ่านกระแสไฟฟ้าใน Towbin buffer และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum concentrator นำไปตรวจสอบโดยแยกโปรตีนตามขนาดโดยใช้ 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 เปรียบเทียบกับวิธี Western blotting ที่ป่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน GST พบว่าโปรตีนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์และไม่พบการเจือปนของแถบโปรตีนอื่น ซึ่งโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 16 แถว 4)



ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV

โดยนำมาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250

(A) และ ตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting (B) ที่บ่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน GST

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ปราศจากพลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX- RGNNV

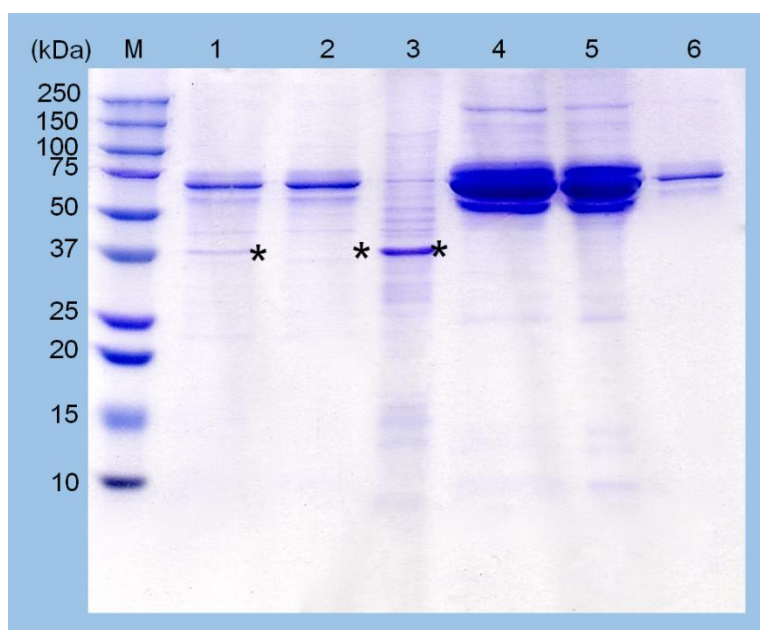
แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RGNNV ที่ทำให้บริสุทธิ์

โดย * คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RGNNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน

← คือ โปรตีน GST ขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน

3. การเตรียมเชื้อไวรัส RGNNV จากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และการตรวจสอบเชื้อ RGNNV

จากการทำบริสุทธิ์บางส่วน of เชื้อ RGNNV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ไปปั่นที่ความเร็ว 20000 รอบต่อนาที เพื่อต้องการให้ไวรัสตกตะกอน แล้วดูดูส่วนใสด้านบนแยกใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และทำเช่นเดียวกันกับน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัส เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดโปรตีน และยืนยันความถูกต้องของขนาดโปรตีน ตรวจสอบโดยนำส่วนตะกอนและส่วนใสที่ได้ไปแยกโปรตีนตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 ใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัสและไม่ติดเชื้อไวรัสก่อนการตกตะกอน เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าทั้งในส่วนตะกอน (ภาพประกอบ 17 แถว 3) ส่วนใส (ภาพประกอบ 17 แถว 2) และน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ ก่อนการตกตะกอน (ภาพประกอบ 17 แถว 1) พบแถบโปรตีน 2 แถบที่มีขนาดต่างกัน คือ แถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดโปรตีนแคปซิดของไวรัสกลุ่ม NNV และ แถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 72 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนของเซลล์ E11 แต่พบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน ที่ปรากฏในส่วนตะกอนในปริมาณมากกว่าที่ปรากฏในส่วนใส และในน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนตกตะกอน ในขณะที่แถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 72 กิโลดาลตัน ที่ปรากฏในส่วนตะกอน มีปริมาณน้อยกว่าที่ปรากฏในส่วนใส และในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และในทางตรงกันข้ามพบว่าทั้งในส่วนตะกอน (ภาพประกอบ 17 แถว 6) ส่วนใส (ภาพประกอบ 17 แถว 5) และน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อก่อนการตกตะกอน (ภาพประกอบ 17 แถว 4) พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 72 กิโลดาลตัน โดยแถบโปรตีนที่ปรากฏในน้ำเลี้ยงก่อนตกตะกอนของเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อหนากว่าที่ปรากฏในส่วนใส และส่วนตะกอน (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบการแยกเชื้อ RGNNV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ให้บริสุทธิ์จากการตกตะกอน

โดยนำมาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ RGNNV ก่อนตกตะกอน

แถวที่ 2 ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ RGNNV หลังตกตะกอน

แถวที่ 3 ส่วนตะกอนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ RGNNV หลังตกตะกอน

แถวที่ 4 น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ RGNNV ก่อนตกตะกอน

แถวที่ 5 ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ RGNNV หลังตกตะกอน

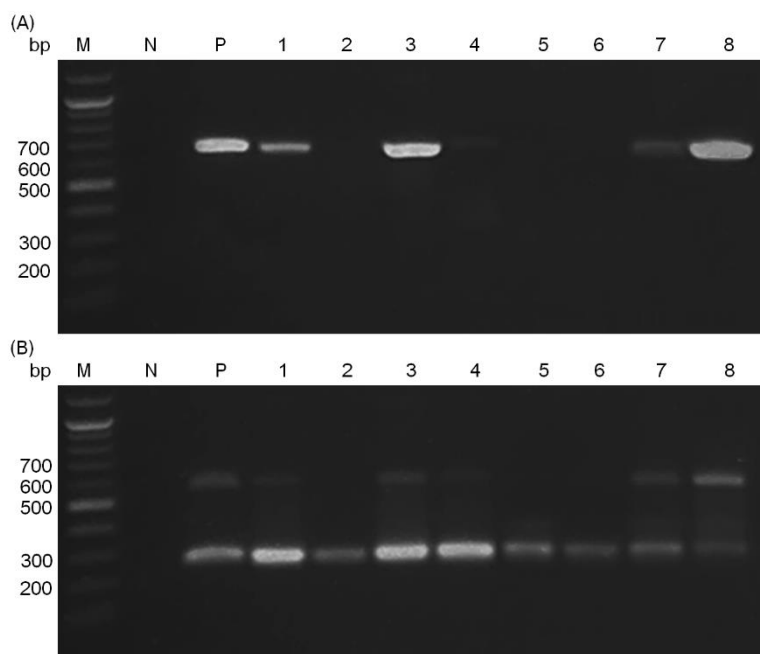
แถวที่ 6 ส่วนตะกอนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ RGNNV หลังตกตะกอน

โดย * เป็นโปรตีนแคปซิดไวรัส RGNNV ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน

4. การตรวจการติดเชื้อกลุ่ม NNV ในปลากะพงขาวด้วยวิธี RT-PCR และวิธี nested RT-PCR

จากการนำกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากตัวอย่างปลากะพงขาวที่มีการติดเชื้อ NNV จากธรรมชาติ ได้รับความอนุเคราะห์จาก จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา จังหวัด เพชรบุรี จำนวน 8 ตัวอย่าง มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ของยีน *RNA2* ซึ่งแปลรหัสเป็น coat protein ของเชื้อไวรัสกลุ่ม NNV โดยใช้ไพรเมอร์ VNNV1 และ VNNV2 ที่จำเพาะต่อ major capsid protein ของไวรัสในกลุ่ม NNV นำผลผลิตที่ได้ส่วนหนึ่งวิเคราะห์ขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV พบผลผลิตมีขนาด 605 คู่เบส ในปลาตัวที่ 1, 3, 7 และ 8 (ภาพประกอบ 18 A)

นำผลผลิตจากการทำ RT-PCR อีกส่วนหนึ่งมาเป็นต้นแบบสำหรับการตรวจด้วยวิธี nested RT-PCR และทำการเพิ่มจำนวนยีน *RNA2* ซึ่งแปลรหัสเป็น coat protein ของเชื้อกลุ่ม NNV โดยใช้ไพรเมอร์ VNNV3 และ VNNV4 วิเคราะห์ขนาดผลผลิตด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis ส่องดูผลภายใต้แสง UV พบผลผลิตมีขนาด 255 คู่เบส ในปลาตัวที่ 1 - 8 (ภาพประกอบ 18 B)



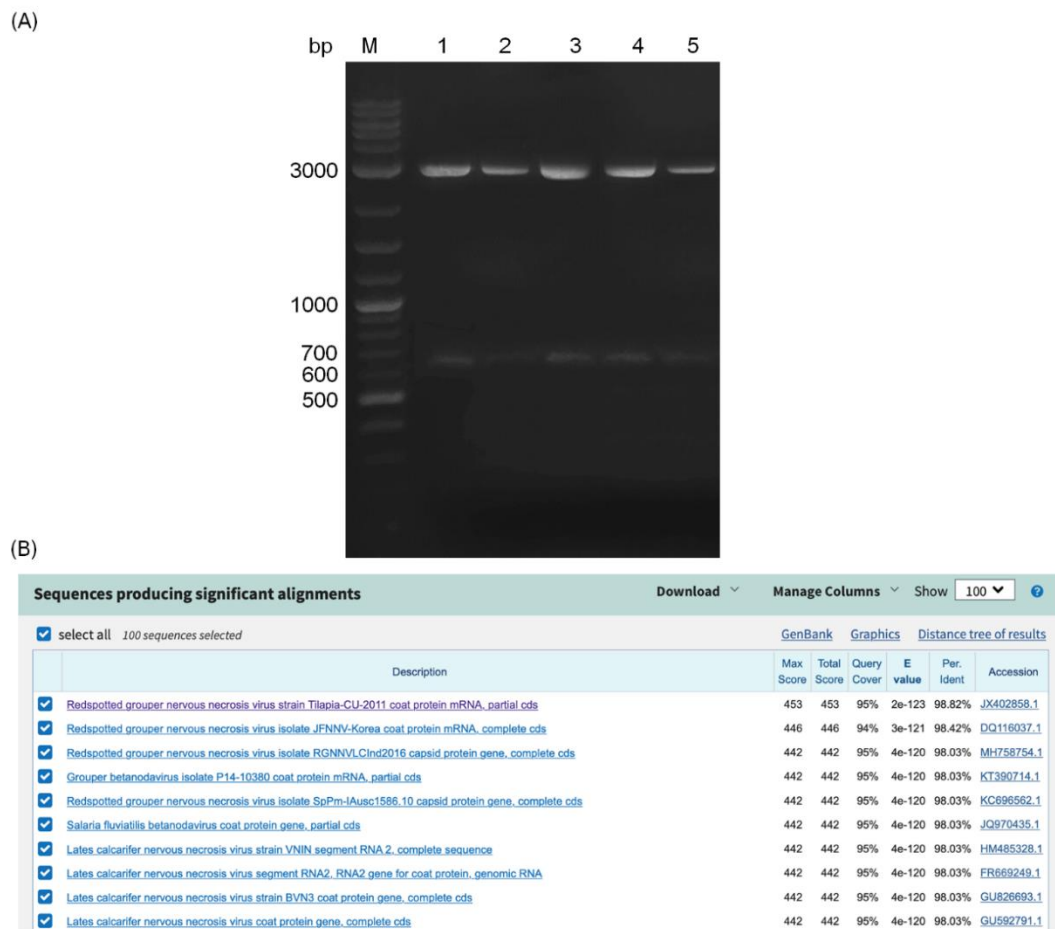
ภาพประกอบ 18 การตรวจการติดเชื้อกลุ่ม NNV ในปลากะพงขาวด้วยวิธี (A) RT-PCR และวิธี

(B) nested RT-PCR

โดยวิเคราะห์ขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลผลิตมีขนาด 605 bp และ 255 bp ตามลำดับ M คือ DNA มาตรฐาน (1 kb plus DNA ladder) N คือ negative control (น้ำปราศจาก DNase และ RNase สำหรับทำ PCR) P คือ positive control (พลาสมิด pGEX-RGNNV) และ ตัวเลข 1 - 8 คือ ตัวอย่างปลาที่นำมาตรวจ

5. การหาลำดับ DNA

จากการตัดแถบ DNA ของปลาตัวที่ 3 และ 8 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของปลาตัวอื่น ๆ ที่ให้ผลผลิตที่มีขนาดเท่ากับ 605 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตของ RT-PCR ไปทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปโคลนเข้าสู่ pCR™ 8/GW/TOPO™ vector ซึ่งเป็น cloning vector และทำการ transformation เข้าสู่ competent cells สายพันธุ์ *E. coli* TOP10 ด้วยวิธี heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับ vector ด้วยวิธี blue white screening โดยนำเชื้อไป spread บน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ spectinomycin, IPTG, X-gal และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวที่เจริญบน LB agar มาเลี้ยงต่อใน LB broth ที่มียา spectinomycin จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิด แล้วแบ่งพลาสมิดส่วนหนึ่งไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบว่า DNA ที่เป็นผลผลิตจากการทำ RT-PCR ถูกเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์จริง นำไปวิเคราะห์ขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis ส่งดูผลภายใต้แสง UV พบว่าปรากฏแถบ 2 แถบ ที่มีขนาดต่างกัน คือ แถบขนาดประมาณ 2,800 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาด pCR™ 8/GW/TOPO™ vector ที่มีขนาด 2,817 คู่เบส และแถบขนาด 605 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดผลผลิตจากการทำ RT-PCR (ภาพประกอบ 19A) จากนั้นนำพลาสมิดส่วนที่เหลือจากการตรวจสอบส่งไปหาลำดับ DNA และเมื่อนำลำดับ DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Blastn ผลการวิเคราะห์พบว่า DNA ที่ได้จากปลาติดเชื้อทั้ง 2 ตัวมีความคล้ายกับยีนที่แปลรหัสให้ coat protein ของเชื้อกลุ่ม NNV จีโนไทป์ RGNNV (ภาพประกอบ 19B) และคาดว่าปลาติดเชื้อตัวอื่น ๆ ที่พบแถบ DNA ขนาดเดียวกันให้ผลเช่นเดียวกัน



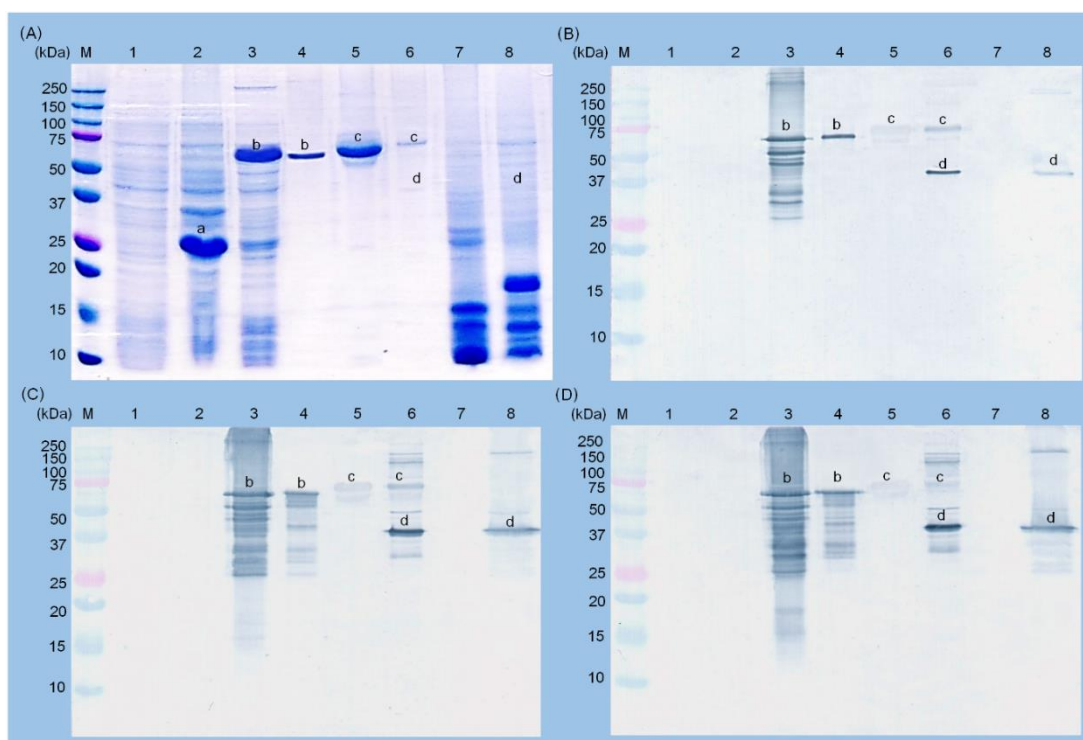
ภาพประกอบ 19 การตรวจสอบ recombinant DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (A) และ ภาพแสดงผลพีพจากฐานข้อมูล NCBI (B)

(A) การตรวจสอบ DNA ที่เป็นผลผลิตจากการทำ RT-PCR ซึ่งมีขนาด 605 pb ถูกเชื่อมต่อนำเข้ากับ pCR™ 8/GW/TOPO™ vector ที่มีขนาด 2,817 bp โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนส่งไปหาลำดับ DNA M คือ DNA มาตรฐาน (1 kb plus DNA ladder) ตัวเลข 1 - 5 คือ พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีสีขาวที่ถูกคัดเลือกจำนวน 5 โคโลนี (B) แสดงผลลัพธ์ของลำดับ DNA จากฐานข้อมูล NCBI ที่ตรงกับลำดับ DNA ของปลาติดเชื้อที่นำมาตรวจ พบว่าลำดับ DNA ตรงกับ NNV จีนไทป์ RGNNV

6. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV

จากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV บริสุทธิ์ ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ผสมกับส่วนตะกอนของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส มาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อปลูก ภูมิคุ้มกันในหนูขาว เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blotting พบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน และโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส ขนาด ประมาณ 37 กิโลดาลตัน ได้ในระดับที่ใกล้เคียง และมีหนูขาวเพียง 3 ตัวที่สามารถตอบสนองต่อ โปรตีนในสารสกัดจากปลาติดเชื้อ ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน ในระดับที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติซีรั่มของหนูทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่ารีคอมบิแนนท์ โปรตีนแคปซิด คาดว่าอาจเป็นแถบโปรตีนที่เกิดจากการเสียดสภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน ระหว่างการเตรียม (ภาพประกอบ 20) เพื่อเป็นการเน้นให้เกิดการตอบสนองต่อส่วนโปรตีนแคปซิด ให้ได้มากที่สุด จึงฉีดกระตุ้นหนูทุกตัวซ้ำอีก 2 เข็มด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดผสมกับ incomplete Freund's adjuvant โดยได้เลือกหนูขาวตัวจำนวน 2 ตัว ที่สามารถตอบสนองดีที่สุด ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิด โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส และโปรตีนในสาร สกัดจากปลาติดเชื้อ มาฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาเป็นเวลา 3 วัน ด้วยรี คอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของ RGNNV กับส่วนตะกอนของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant จากการผลิตและทำการคัดเลือกโมโนโคลนอล แอนติบอดีขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting พบว่ามีน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาใน 96 well plate จำนวนหลายหลุม ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ได้ (ไม่ได้แสดง ภาพประกอบ) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาหลุมที่ให้ผลดังกล่าว มาคัดเลือกต่อในการคัดเลือกขั้นที่ 2 ในวิธี dot blotting พบว่ามีน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพียงไม่กี่หลุมที่สามารถทำปฏิกิริยากับ โปรตีน GST-RGNNV ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV และ โปรตีนใน น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 (ภาพประกอบ 21A) ส่วนในวิธี Western blotting พบว่ามีน้ำ เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพียงไม่กี่หลุมเช่นเดียวกันที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน GST-RGNNV ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน และ โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 21B) จากนั้นทำการแยกโคลนไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับทั้ง 2 วิธีและโคลนซ้ำ แล้วตรวจสอบ

ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting พบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 5 โคลน ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิด ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน โปรตีนของไวรัสขนาด 37 กิโลดาลตัน ในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และในสารสกัดจากปลาติดเชื้อ ส่วนแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าในแถวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดอาจเกิดจากการเสียดสภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

(A) การตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE แยกโปรตีนตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250(B-D) การตรวจสอบความจำเพาะแอนติซีรัมของหนูตัวที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ด้วยวิธี Western blotting โดยทำการดูดซับแอนติเจนที่เจือปน (preabsorption) ด้วย lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GST น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่มีการติดเชื้อ และสารสกัดจากปลาปกติ

พบว่าหนูขาว 3 ตัว มีการตอบสนองต่อทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีน RGNNV ขนาด 63 กิโลดาลตัน โปรตีนขนาด 37 กิโลดาลตันของไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ และ ไวรัสในสารสกัดจากปลาติดเชื้อ NNV

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ปราศจากพลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RGNNV ที่ทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 5 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ

แถวที่ 6 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV

แถวที่ 7 สารสกัดจากปลาปกติ

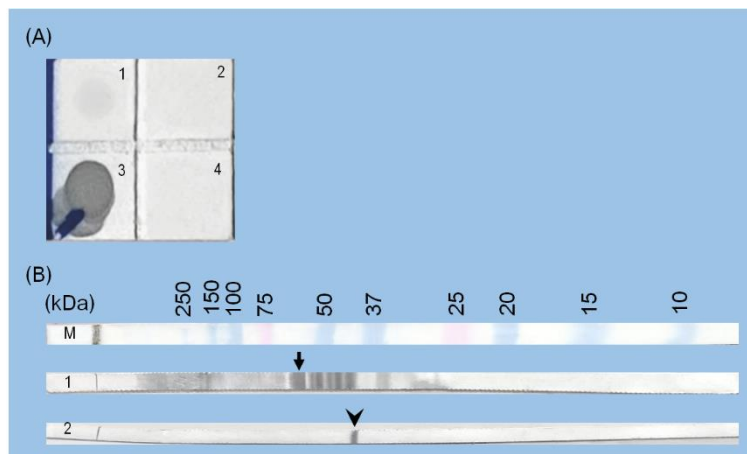
แถวที่ 8 สารสกัดจากปลาติดเชื้อ

a คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

b คือ โปรตีน GST-RGNNV ขนาด 63 กิโลดาลตัน

c คือ โปรตีนของเซลล์ E11 ขนาด 72 กิโลดาลตัน

d คือ โปรตีนแคปซิด NNV ขนาด 37 กิโลดาลตัน



ภาพประกอบ 21 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่สองด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting

Dot blotting (A)

ช่องที่ 1 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ

ช่องที่ 2 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ

ช่องที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV

ช่องที่ 4 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

Western blotting (B)

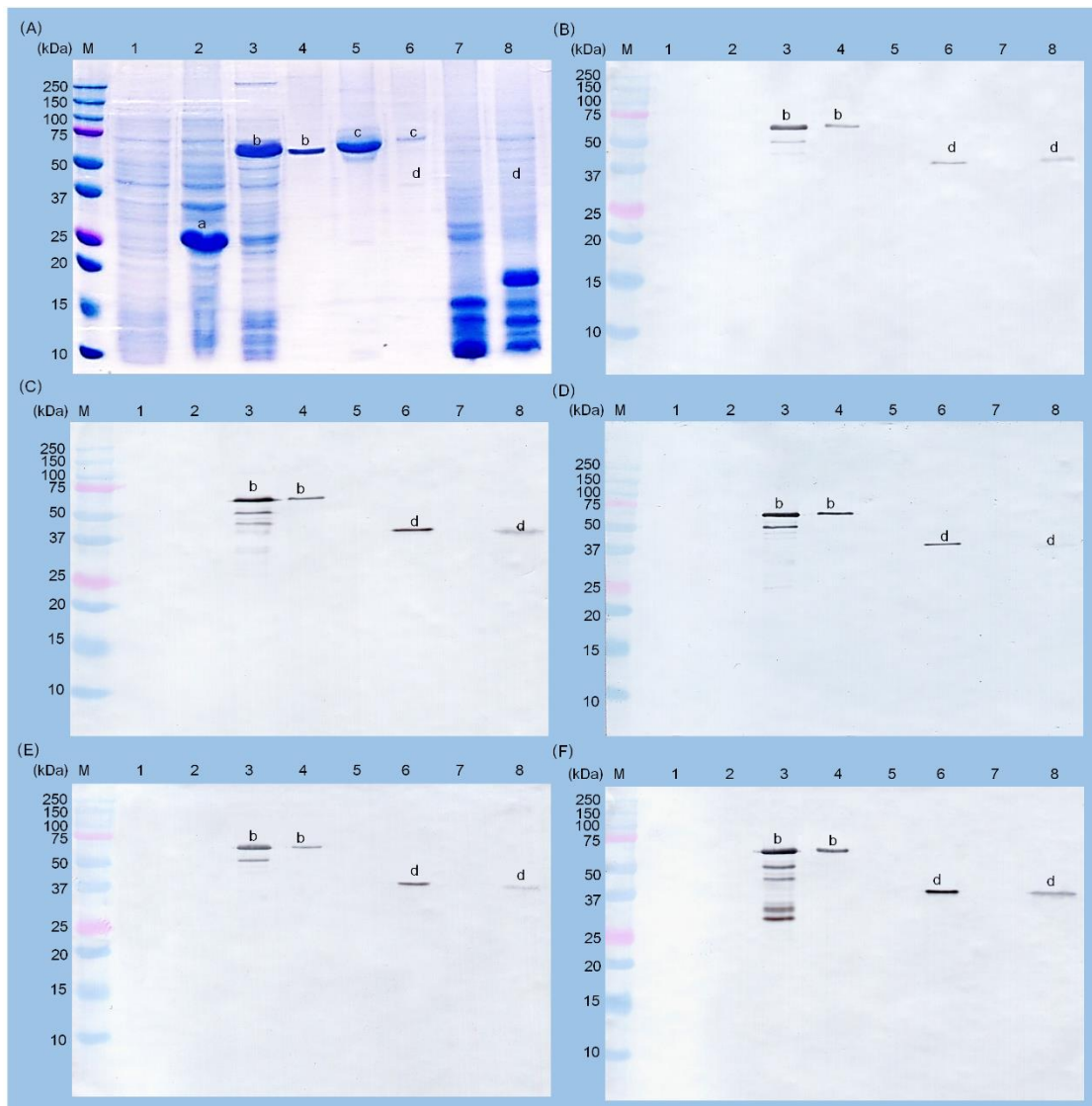
แถบ M โปรตีนมาตรฐาน

แถบที่ 1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ไฮบริโดมากับ lysate ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ขนาดประมาณ 63 กิโลดาลตัน

แถบที่ 2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมากับโปรตีนแคปซิดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อไวรัส ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน

โดย ↓ คือ แถบโปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV

▼ คือ แถบโปรตีนขนาด 37 กิโลดาลตัน ของแคปซิดไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ



ภาพประกอบ 22 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

(A) ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยแยกโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE ย้อมเจลดด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 เจลอีกส่วนนำมาทำ Western blotting ทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C1(B), 5C4(C), 14E6(D) 15E10(E) และ 9D1(F)

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ปราศจากพลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNNV

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RGNNV ที่ทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 5 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ

แถวที่ 6 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV

แถวที่ 7 สารสกัดจากปลาปกติ

แถวที่ 8 สารสกัดจากปลาติดเชื้อ

a คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

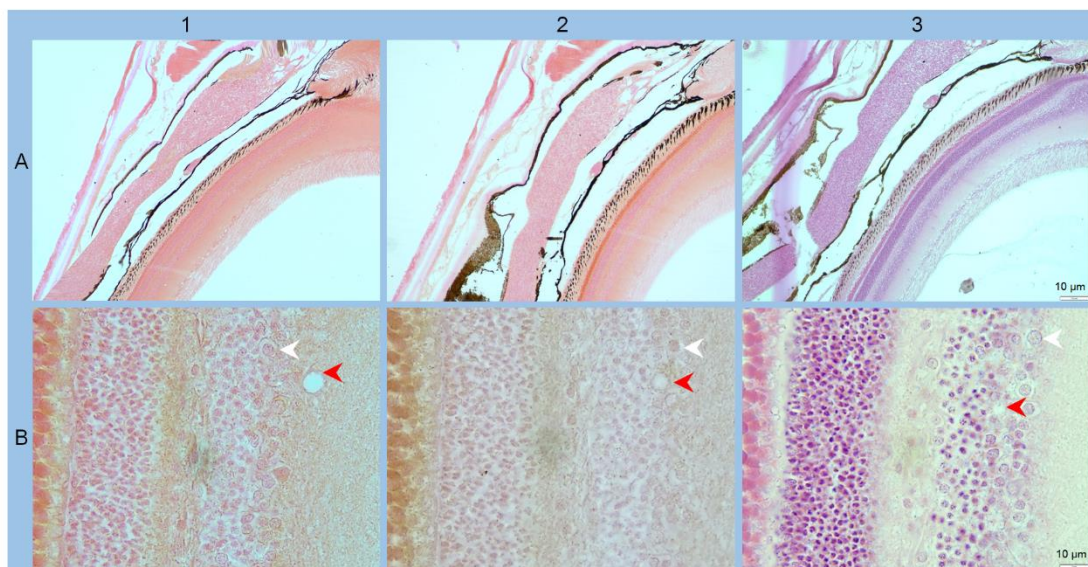
b คือ โปรตีน GST-RGNNV ขนาด 63 กิโลดาลตัน

c คือ โปรตีนของเซลล์ E11 ขนาด 72 กิโลดาลตัน

d คือ โปรตีนแคปซิด NNV ขนาด 37 กิโลดาลตัน

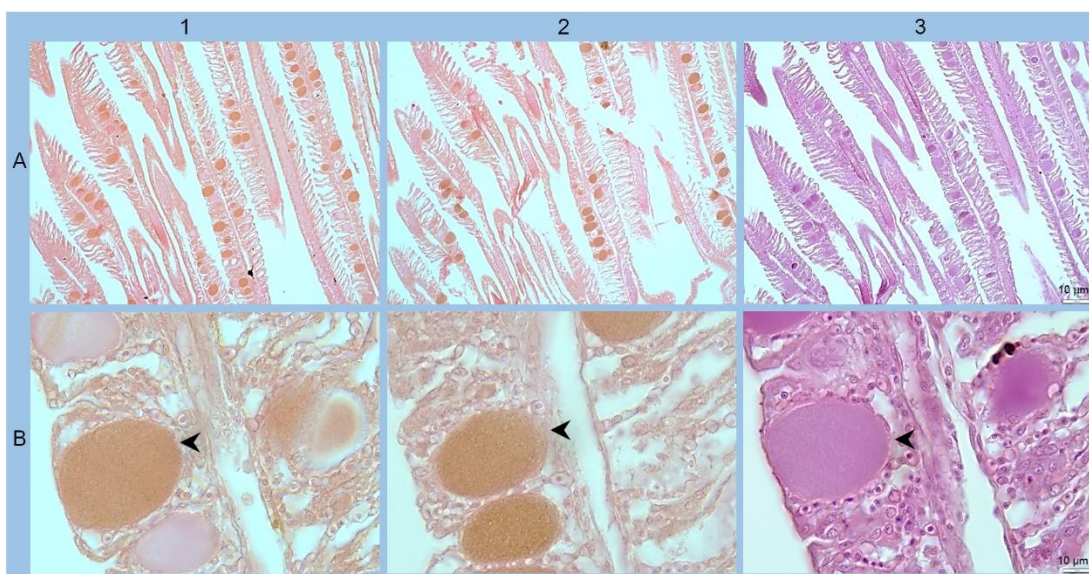
7. การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry

สำหรับการตรวจสอบเชื้อ NNV ในเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน ที่ผลิตได้สามารถตรวจจับเชื้อไวรัส NNV บริเวณไซโตพลาซึมของเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสในกลุ่ม NNV คือ ในเนื้อเยื่อตาพบ immunoreactivity ในไซโตพลาซึมของเซลล์ทุกชั้น พบความผิดปกติของเซลล์ ได้แก่ การเกิด vacuolation ในเซลล์ชั้น inner plexiform และการเกิด hypertrophy ในชั้น ganglion cell และ ชั้น inner nuclear (ภาพประกอบ 23) เนื้อเยื่อเหงือก พบการรวมของเซลล์จากการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 24) และเนื้อเยื่อปมประสาทพบการเกิด inclusion body และ vacuolation (ภาพประกอบ 25) โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเซลล์ในอวัยวะเหล่านี้ในเนื้อเยื่อปลาปกติ (ภาพประกอบ 26) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 และ 9D1 สามารถตรวจจับเชื้อ NNV ในเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อได้ชัดเจนที่สุด ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนอื่น ๆ คือ 5C1 สามารถจับกับเชื้อ NNV ได้ต่ำกว่าเล็กน้อย ส่วน 14E6 และ 15E10 สามารถจับเชื้อ NNV ได้เล็กน้อย (ตาราง 10)



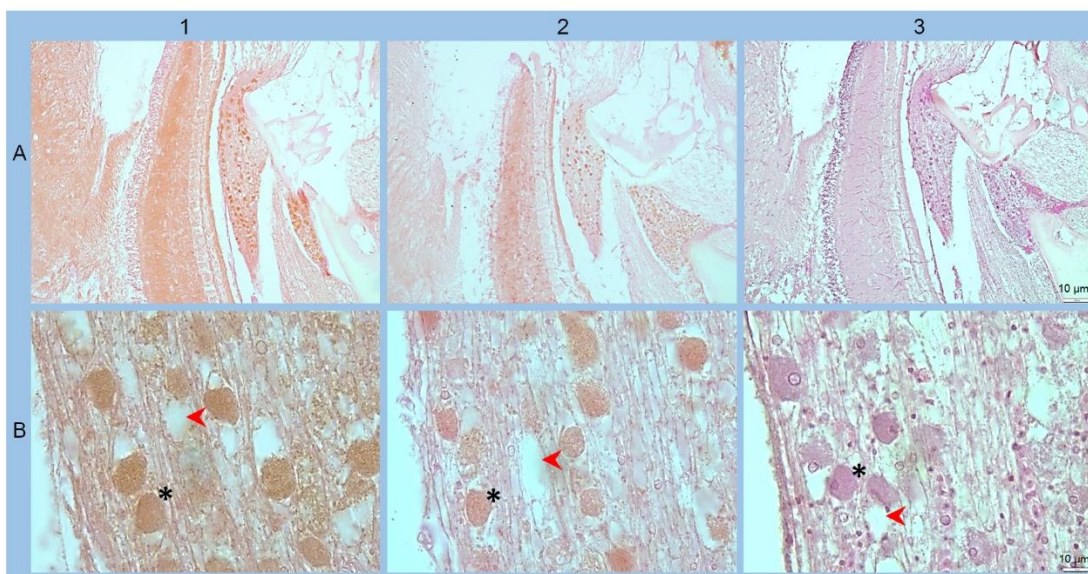
ภาพประกอบ 23 การตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อตาของปลาติดเชื้อ

(A) ภาพที่กำลังขยาย 10X แสดงภาพรวมเนื้อเยื่อตาของปลาติดเชื้อ (B) ภาพกำลังขยาย 100X แสดงลักษณะความผิดปกติของเซลล์ในเนื้อเยื่อตาปลาติดเชื้อ ได้แก่ การเกิด vacuolation (ลูกศรสีแดง) และ การเกิด hypertrophy (ลูกศรสีขาว) ในเซลล์ชั้น inner nuclear และ พบ immunoreactivity ในไซโตพลาซึมของเซลล์ทุกชั้น โดยในคอลัมน์ (1) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 (2) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 และ (3) ย้อมสี H&E



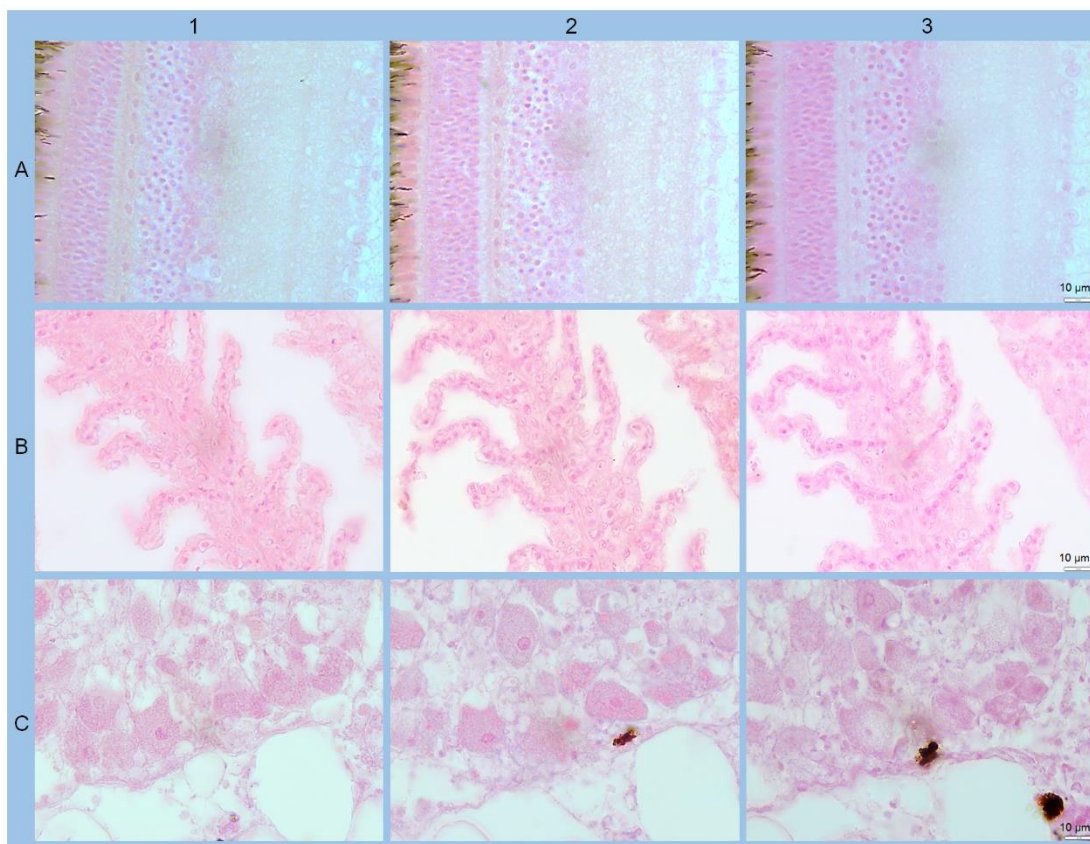
ภาพประกอบ 24 การตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อ

(A) ภาพที่กำลังขยาย 10X แสดงภาพรวมเนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อ (B) ภาพกำลังขยาย 100X แสดงลักษณะความผิดปกติของเซลล์ในเนื้อเยื่อเหงือกปลาติดเชื้อ ได้แก่ การบวมของเซลล์จากการติดเชื้อ (ลูกศรสีดำ) และ พบ immunoreactivity ในไซโตพลาซึมของเซลล์ โดยในคอลัมน์ (1) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 (2) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 และ (3) ย้อมสี H&E



ภาพประกอบ 25 การตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อประสาทของปลาทืดเชื้อ

(A) ภาพที่กำลังขยาย 10X แสดงภาพรวมเนื้อเยื่อประสาทของปลาทืดเชื้อ (B) ภาพกำลังขยาย 100X แสดงลักษณะความผิดปกติของเซลล์ในเนื้อเยื่อประสาทปลาทืดเชื้อ ได้แก่ การเกิด inclusion body (ดอกจันสีดำ) และ vacuolation (ลูกศรสีแดง) และ พบ immunoreactivity ในไซโตพลาซึมของเซลล์ โดยในคอลัมน์ (1) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 (2) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 และ (3) ย้อมสี H&E



ภาพประกอบ 26 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามในเนื้อเยื่อปลาปกติ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส NNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry

โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณเดียวกันกับที่ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปลาติดเชื้อ ได้แก่ ตา (A), เหงือก (B) และปมประสาท (C) ซึ่งเป็นภาพที่กำลังขยาย 100X โดยในคอลัมน์ (1) ปุ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 (2) ปุ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 และ (3) ไม่ได้ปุ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้เทียบเป็น negative control

8. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

8.1 การตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปทับซ้อนของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมรวมกันทีละคู่ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดไวรัส RGNNV จำนวน 5 โคลน มีอิพิโทปที่ต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอิพิโทปที่ 1 คือ 5C1 และ 5C4 กลุ่มอิพิโทปที่ 2 คือ 14E6 15E10 และ 9D1 เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ในกลุ่มอิพิโทปต่างกันมาผสมกัน ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเพียงชนิดเดียว ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีอิพิโทปคาบเกี่ยวกัน ค่าดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อย (ภาพประกอบ 27)

แอนติบอดี	5C1	5C4	14E6	15E10	9D1
5C1	1.175 ¹	1.084	1.319	1.336	1.379
5C4		1.186 ¹	1.291	1.321	1.440
14E6			0.724 ²	0.797	1.368
15E10				0.809 ²	1.079
9D1					1.290 ²

ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบอิพิโทปทับซ้อนของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ด้วยวิธี indirect ELISA

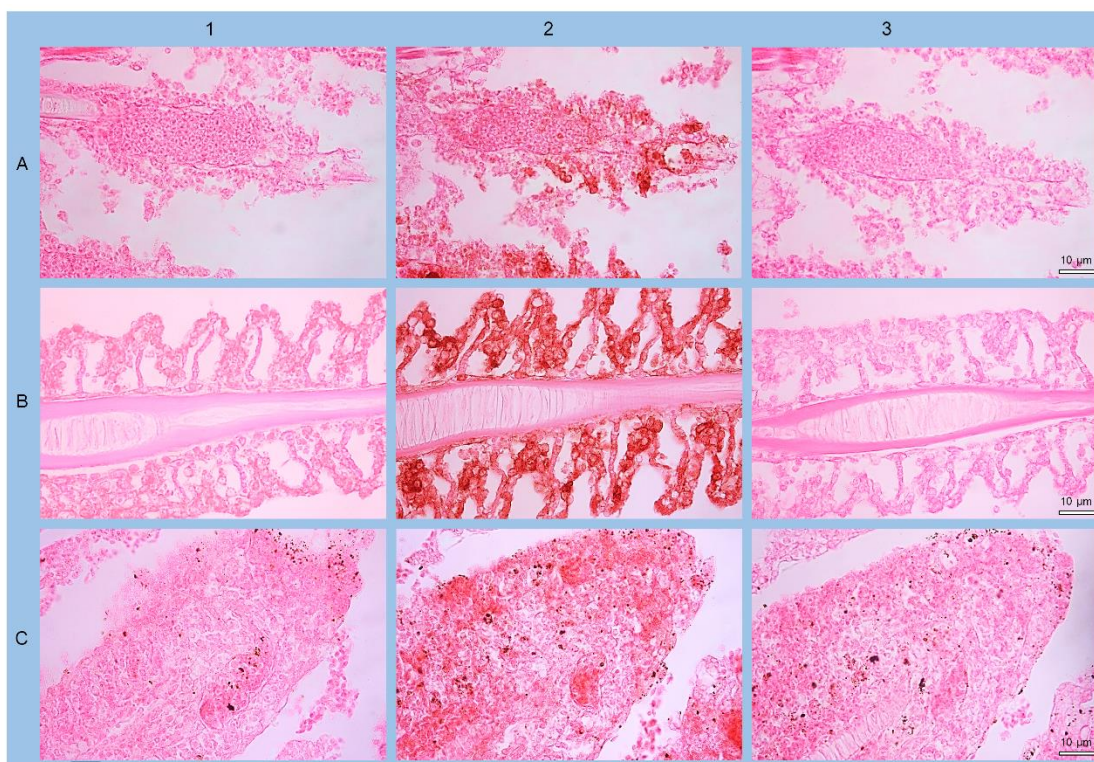
สามารถจำแนกแอนติบอดีได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ 5C1 และ 5C4 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ 14E6 15E10 และ 9D1 จากค่าดูดกลืนแสงในตาราง จึงใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 และ 9D1 เป็นตัวแทนกลุ่มอพิโทปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เนื่องจากมีผลรวมของค่าดูดกลืนแสงสูงสุด

8.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาทำด้วย sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จำนวน 3 โคลน มี class เป็น IgG โดยมี subclass เป็น IgG2a และ IgG2b ส่วนอีก 2 โคลน มี class เป็น IgA และ light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน เป็น kappa (K) (ตาราง 10)

8.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลาด้วยวิธี immunohistochemistry

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ NNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้เนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อไวรัสอื่น ๆ ได้แก่ ISKNV SDDV และ TiLV และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ เป็น positive control คือ 10F3 15A10 และ 12B12 ตามลำดับ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 5 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อไวรัสเหล่านั้น (ภาพประกอบ 28)

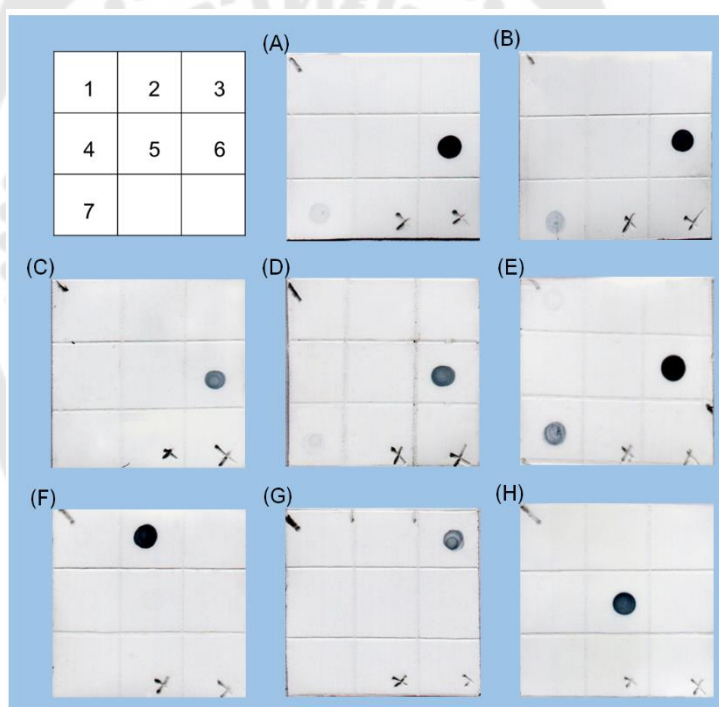


ภาพประกอบ 28 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส RGNNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry กับเนื้อเยื่อของปลาติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ

ได้แก่ เหยื่อที่ติดเชื้อ ISKNV (A), เหยื่อที่ติดเชื้อ TiLV (B), และเหยื่อที่ติดเชื้อ SDDV (C) โดยในคอลัมน์ (1) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 (2) บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อที่ติดในเนื้อเยื่อนั้น ๆ ได้แก่ 10F3 จำเพาะต่อเชื้อ ISKNV (A2), 15A10 จำเพาะต่อเชื้อ TiLV (B2) และ 12B12 จำเพาะต่อเชื้อ SDDV (C2) คอลัมน์ (3) เนื้อเยื่อของปลาติดเชื้อที่ไม่ได้บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้เทียบเป็น negative control

8.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลาด้วยวิธี dot blotting

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้ออื่น ๆ มาทดสอบ ได้แก่ GST-ISKNV, GST-SDDV และ His-TiLV และมีการหยุดโปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 และ โปรตีน Histidine ของ lysate ที่ได้จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pET15b เพื่อใช้เป็น negative control และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ เป็น positive control คือ 10F3 15A10 และ 12B12 ตามลำดับ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อเหล่านั้น (ภาพประกอบ 29)



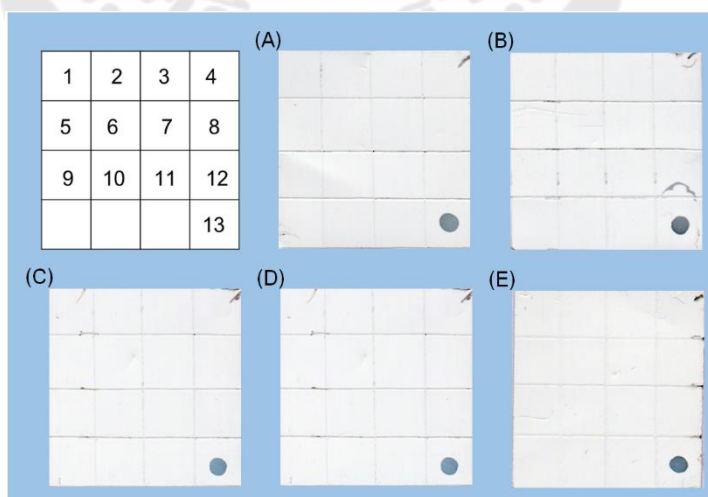
ภาพประกอบ 29 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส RGNNV ที่ผลิตได้ด้วยวิธี dot blotting

โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ก่อโรคในปลา ได้แก่ lysate GST-ISKNV, lysate GST-SDDV, และ lysate His-TiLV โดยบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C1(A), 5C4(B), 14E6(C), 15E10(D) และ 9D1(E) และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ ISKNV 10F3 (F), จำเพาะต่อเชื้อ SDDV 12B12, (G) และ จำเพาะต่อเชื้อ TiLV 15A10 (H)

- ช่องที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX
- ช่องที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-ISKNV
- ช่องที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-SDDV
- ช่องที่ 4 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET15b
- ช่องที่ 5 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET15b-TiLV
- ช่องที่ 6 lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-RGNV
- ช่องที่ 7 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNV

8.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ด้วยวิธี dot blotting พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (ภาพประกอบ 30)



ภาพประกอบ 30 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ด้วยวิธี dot blotting โดยใช้แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในรูปแบบ heat killed

ป่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C1 (A), 5C4 (B), 14E6 (C), 15E10 (D), และ 9D1 (E) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

- ช่องที่ 1 *Aeromonas veronii*
- ช่องที่ 2 *Aeromonas sobria*
- ช่องที่ 3 *Aeromonas hydrophila*
- ช่องที่ 4 *Aeromonas caviae*
- ช่องที่ 5 *Streptococcus agalactiae*
- ช่องที่ 6 *Photobacterium damsela*
- ช่องที่ 7 *Pseudomonas aeruginosa*
- ช่องที่ 8 *Flavobacterium columnare*
- ช่องที่ 9 *Vibrio vulnificus*
- ช่องที่ 10 *Vibrio parahaemolyticus*
- ช่องที่ 11 *Vibrio cholerae*
- ช่องที่ 12 *Streptococcus iniae*
- ช่องที่ 13 positive control (lysate GST-RGNNV)

8.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

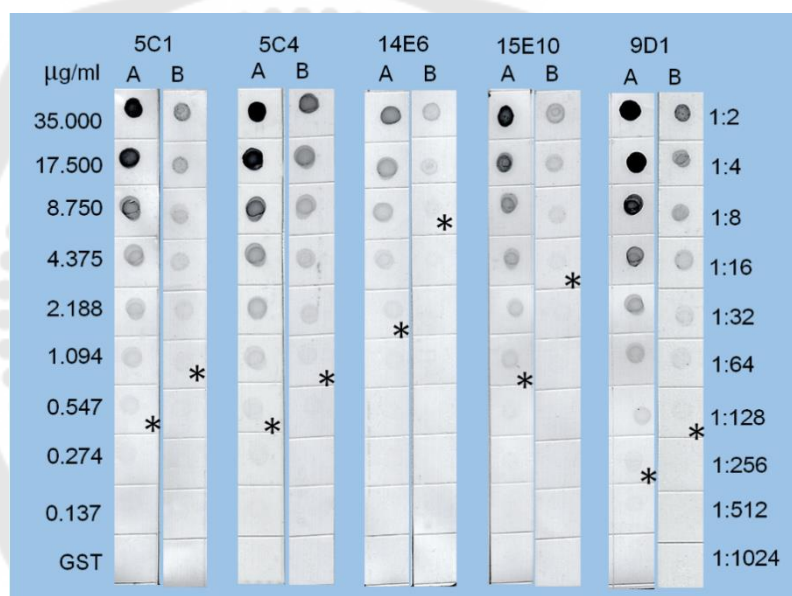
จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน ด้วยวิธี dot blotting ในการตรวจหาโรคอหิวาต์ที่โปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV และสารสกัดจากปลาที่ติดเชื้อกลุ่ม NNV โดยใช้ปลาปกติเป็น negative control พบว่าการทดสอบความไวโดยใช้แอนติเจนทั้ง 3 ชนิดให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนมีความไวที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถตรวจหาโรคอหิวาต์ที่โปรตีนที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดอยู่ในช่วง 0.274 - 2.188 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และตรวจน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุด 8 - 128 เท่า โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 มีความไวมากที่สุด คือสามารถตรวจหาโรคอหิวาต์ที่โปรตีนที่มีความเข้มข้นเพียง 0.274 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (4.3 เฟมโตโมล/จุด) ตรวจน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ ได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุด 128 เท่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวรองลงมาคือ 5C1 และ 5C4 สามารถตรวจหาโรคอหิวาต์ที่โปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.547 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (8.6 เฟมโตโมล/จุด) ตรวจน้ำเลี้ยง

เซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ ได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุด 64 เท่า ถึงแม้ 5C1 และ 5C4 สามารถตรวจเชื้อได้ที่ค่าความเจือจางเดียวกันแต่จุดดำที่ปรากฏของ 5C4 เข้มกว่า 5C1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนอื่น ๆ (14E6 และ 15E10) สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ความเข้มข้น 2.188 และ 1.094 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และตรวจการติดเชื้อในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ อยู่ในช่วง 8 ถึง 32 เท่า (ภาพประกอบ 31)

สำหรับความไวในการตรวจพบเชื้อในสารสกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อในรูปแบบเสียสภาพธรรมชาติ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุด 512 เท่า 5C1 และ 5C4 ตรวจพบได้ที่ 128 เท่า ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนอื่น ๆ สามารถตรวจพบเชื้อได้ในช่วง 64 ถึง 128 เท่า (ภาพประกอบ 32 แถว A) และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนแสดงปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดจากปลาปกติในรูปแบบสภาพธรรมชาติที่ใช้เป็น negative control ได้ที่ค่าความเจือจางต่างกัน (ภาพประกอบ 32 แถว C) ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากการจับของแอนติบอดีตัวที่ 2 (GAM-HRP) ที่ใช้ในการทดสอบ (ไม่ได้แสดงผล)

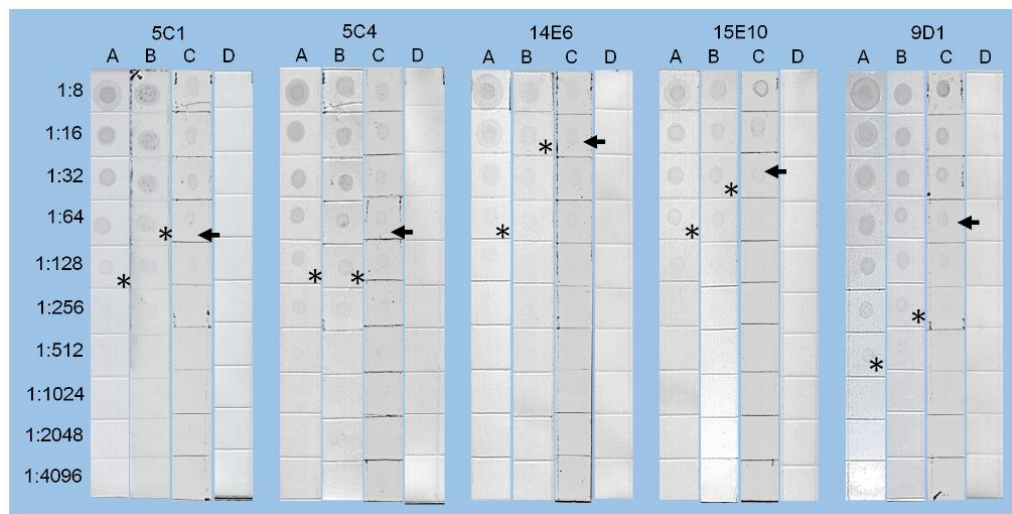
เมื่อเปรียบเทียบผลจากการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting จากภาพประกอบ 20 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างปลาปกติที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นปลาตัวเดียวกันกับที่นำมาใช้เป็น negative control ในการตรวจสอบความไวด้วยวิธี dot blotting ดังนั้นก่อนนำตัวอย่างปลา มาทดสอบ จึงมีการเตรียมตัวอย่างโดยการนำสารสกัดจากตัวอย่างปลาไปต้มเพื่อให้โปรตีนอยู่ในรูปเสียสภาพ เช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบด้วยวิธี Western blotting จากนั้นเจือจางตัวอย่างปลาในรูปแบบเสียสภาพแบบ 2 fold serial dilution แล้วทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนอีกครั้ง พบว่า 9D1 สามารถตรวจตัวอย่างปลาติดเชื้อในรูปแบบเสียสภาพได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุด 256 เท่า ส่วน 5C4 5C1 15E10 และ 14E10 สามารถตรวจได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุดที่ 128, 64, 32 และ 16 เท่า ตามลำดับ (ภาพประกอบ 32 แถว B) และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกตัวไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างปลาปกติที่อยู่ในรูปเสียสภาพ (ภาพประกอบ 32 แถว D) ดังนั้น เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีตัวที่ 2 กับเนื้อเยื่อของปลาที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งอาจทำให้เกิดการแปลผลผิดจากการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot blotting จึงนำสารสกัดจากตัวอย่างปลาไปต้มเพื่อทำให้โปรตีนต่าง ๆ อยู่ในรูปเสียสภาพก่อนการนำไปทดสอบ

จากการยืนยันโมโนโคลนอลแอนติบอดีว่าไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ต่อ และที่ปะปนอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู โดยนำตัวอย่างที่เป็นองค์ประกอบเหล่านั้น มาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน lysate *E.coli* ที่ปราศจากพลาสมิด และ โปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E.coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ได้ที่ค่าความเจือจางสูงสุด 16 เท่า (ภาพประกอบ 33 แถว A และ B ตามลำดับ) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ 33 แถว C) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวอื่น ๆ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 33)



ภาพประกอบ 31 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแคปซิดของไวรัส RGNNV ด้วยวิธี dot blotting

โดยทดสอบกับ (A) รีคอมบิแนนท์โปรตีน RGNNV ที่มีความเข้มข้น 0.137-35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ (B) น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ที่เจือจาง 2-1,024 เท่า * แสดงความเข้มข้นและความเจือจางที่สูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้



ภาพประกอบ 32 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting ในการตรวจไวรัสในสารสกัดจากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ โดยทำการเจือจางตัวอย่างแบบ 2 fold serial dilution เริ่มต้น 1: 8 -1:4,096

แถว A สารสกัดจากปลาติดเชื้อกลุ่ม NNV ในรูปสภาพธรรมชาติ

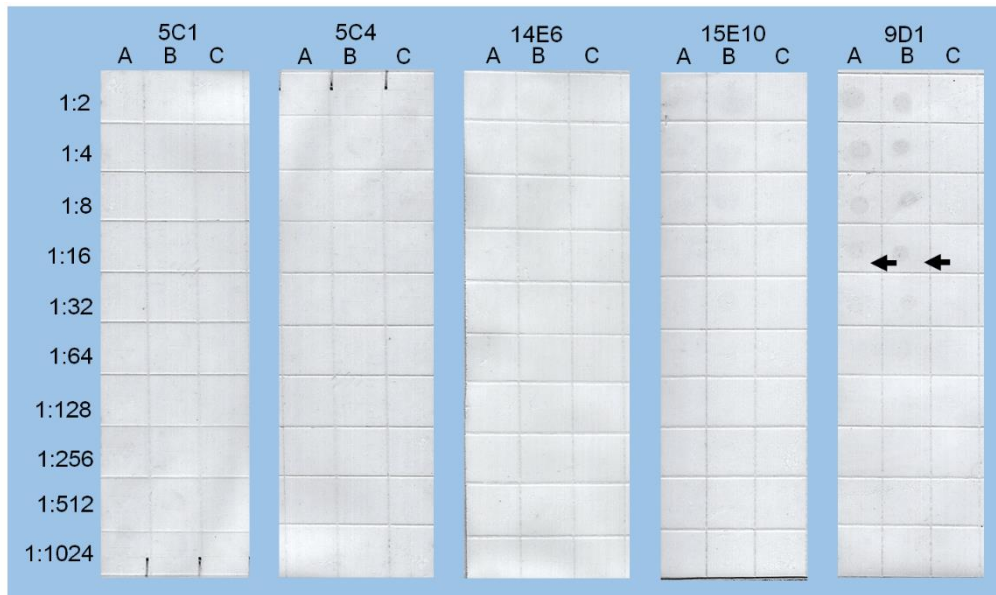
แถว B สารสกัดจากปลาติดเชื้อกลุ่ม NNV ในรูปเสียสภาพธรรมชาติ

แถว C สารสกัดจากปลาปกติ ในรูปสภาพธรรมชาติ

แถว D สารสกัดจากปลาปกติ ในรูปเสียสภาพธรรมชาติ

* แสดงค่าความเจือจางที่สูงสุด ที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้

← แสดงค่าความเจือจางที่สูงสุด ที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาข้ามได้



ภาพประกอบ 33 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ต่อและที่ปะปนอยู่กับแอนติเจนที่ใช้ปลูกภูมิคุ้มกันหนู ด้วยวิธี dot blotting

โดยทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution เริ่มต้น 1:2 -1:1,024 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ปราศจากแอนติบอดีและมีพลาสมิด pGEX-6P-1

แถว A lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ปราศจากพลาสมิด

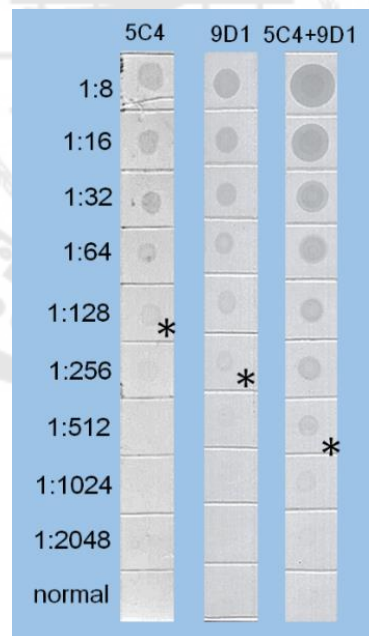
แถว B lysate ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX

แถว C น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ

← แสดงค่าความเจือจางที่สูงสุด ที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาข้ามได้

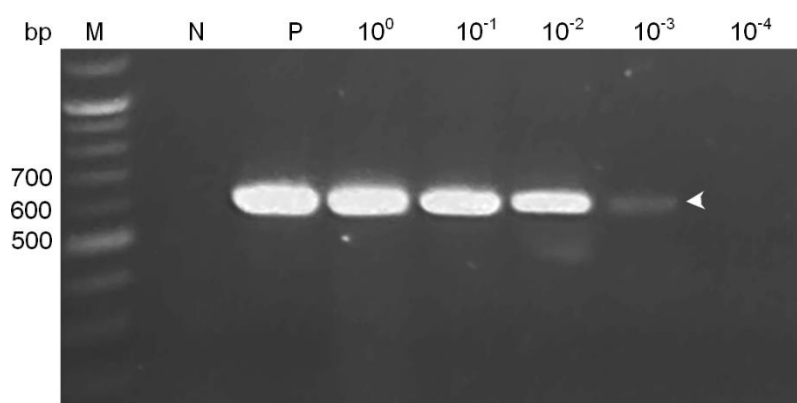
8.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ ด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับ วิธี RT-PCR

จากการทดสอบความไวในการตรวจปลาที่ติดเชื้อ NNV โดยนำสารสกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ติดเชือกลุ่ม NNV ในรูปแบบที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ มาเจือจางที่ระดับต่าง ๆ โดยนำมาทดสอบกับตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีของอิพิโทปแต่ละกลุ่ม (5C4 และ 9D1) หรือนำมาผสมรวมกัน พบว่าเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีผสมกันสามารถเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อในตัวอย่างจากสารสกัดปลาติดเชื้อในรูปเสียสภาพ ขึ้นอีก 2 - 4 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านั้นเพียงชนิดเดียว (ภาพประกอบ 34) และเมื่อนำสารสกัดจากตัวอย่างปลาติดเชือกลุ่ม NNV ที่ใช้ทดสอบเดียวกันนี้ ไปสกัดกรดนิวคลีอิก แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อ NNV จากกรดนิวคลีอิกที่ค่าความเจือจาง 1:1,000 (ภาพประกอบ 35) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวต่ำกว่าการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ประมาณ 2 เท่า



ภาพประกอบ 34 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ NNV ด้วยวิธี dot blotting

โดยเจือจางสารสกัดจากปลาติดเชื้อ NNV ในรูปแบบเสียสภาพ ด้วยสารสกัดจากปลาปกติในรูปแบบเสียสภาพ ใน PBS ตั้งแต่ 1:8 ถึง 1:2,048 โดยบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4, 9D1 และ 5C4 ผสมกับ 9D1 (*) คือระดับความเจือจางสูงสุดที่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยา normal คือ สารสกัดจากปลาปกติในรูปแบบเสียสภาพเจือจาง 1 : 10

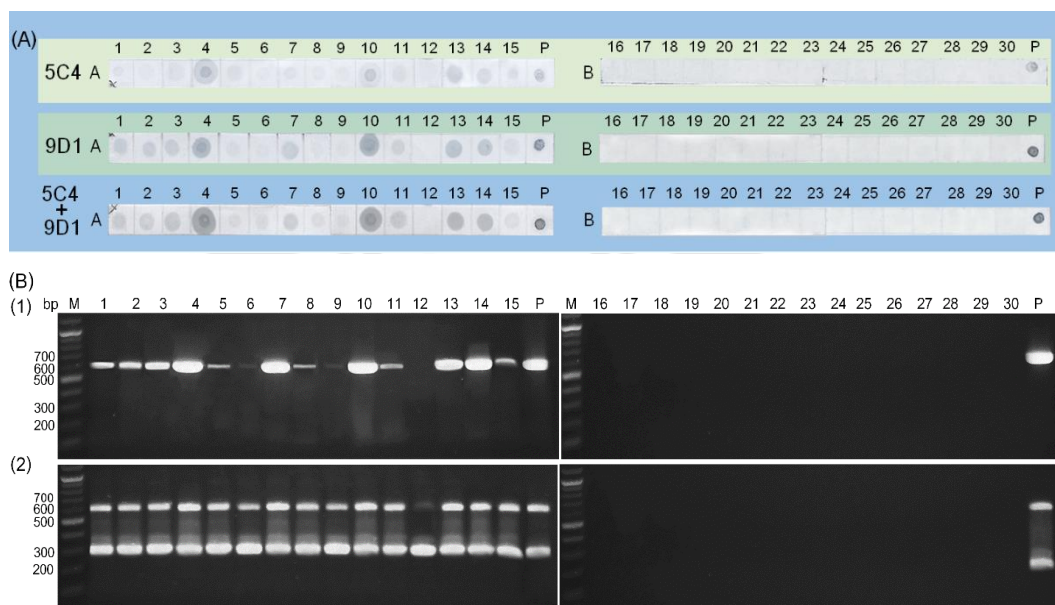


ภาพประกอบ 35 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ NNV ด้วยวิธี RT-PCR โดยเจือจางกรดนิวคลีอิกของปลาติดเชื้อ NNV ด้วยกรดนิวคลีอิกของปลาปกติตั้งแต่ 10^0 ถึง 10^{-4} แล้วนำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยผลผลิตมีขนาด 605 คู่เบส หัวลูกศร คือ ระดับการเจือจางสูงสุดที่สามารถตรวจพบได้ M คือ DNA มาตรฐาน (1 kb plus DNA ladder) N คือ กรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างปลาปกติ และ P คือ positive control โดยใช้พลาสมิด pGEX-RGNV เป็น DNA ต้นแบบ

8.8 การตรวจหาเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลาด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR

จากการนำตัวอย่างปลาจากฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นติดเชื้อกลุ่ม NNV 15 ตัวอย่าง และปลาปกติจำนวน 15 ตัวอย่าง มาแยกอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ตา สมอง และเหงือก บดใน PBS โดยใช้อัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งนำไปต้มเพื่อให้เสียสภาพก่อนทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting และอีกส่วนนำมาสกัดกรดนิวคลีอิก แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR ตามลำดับ จากการตรวจสอบพบว่า ตัวอย่างปลาติดเชื้อทุกตัวจำนวน

15 ตัวอย่าง (15/15) มีการติดเชื้อ NNV เมื่อตรวจด้วยวิธี nested RT-PCR ในขณะที่พบตัวอย่างปลา จำนวน 14 ตัวอย่าง (14/15) มีการติดเชื้อ NNV เมื่อตรวจด้วยวิธี RT-PCR และพบตัวอย่างปลาจำนวน 14 ตัวอย่าง (14/15) มีการติดเชื้อ NNV เมื่อตรวจด้วยไมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 36)



ภาพประกอบ 36 การตรวจการติดเชื้อ NNV จากตัวอย่างปลาติด โดยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR

โดยนำสารสกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อ จำนวน 15 ตัว (1-15) และสารสกัดจากปลาปกติจำนวน 15 ตัว (16-30) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำสารสกัดจากตัวอย่างปลามาทำให้อยู่ในรูปเสียสภาพ (ผ่านการต้ม) แล้วนำมาทดสอบกับไมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 หรือ 9D1 ซึ่งเป็นตัวแทนของอีพิโทปแต่ละกลุ่ม หรือ 5C4 ผสมกับ 9D1 สารสกัดตัวอย่างปลาส่วนที่ 2 นำมาสกัดกรดนิวคลีอิกและทดสอบด้วยวิธี RT-PCR (B-1) และ nested RT-PCR (B-2) โดยผลผลิตมีขนาด 605 คู่เบส และ 255 คู่เบส ตามลำดับ M คือ DNA มาตรฐาน (1 kb plus DNA ladder) และ P คือ positive control โดยใช้กรดนิวคลีอิกที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ

ตาราง 10 สรุปสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ NNV ที่ผลิตได้

MAbs (class /subclass)	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจน โดยวิธี dot blotting		การตรวจหาแอนติเจน โดยวิธี Western blotting (สารสกัดจาก เนื้อเยื่อของปลาติดเชื้อ)	IHC	การทดสอบ ปฏิกิริยาข้ามกับ ISKNV, SDDV และ TiLV	การทดสอบ ปฏิกิริยาข้าม กับแบคทีเรีย ทั้ง 12 ชนิด
	$\mu\text{g/mL}$	fmole /spot				
5C1 (IgG2a)	0.547	8.6	++	++	-	-
5C4 (IgG2a)	0.547	8.6	+++	++ +	-	-
14E6 (IgA)	2.188	34.7	+	+	-	-
15E10 (IgA)	1.094	17.3	+	+	-	-
9D1 (IgG2b)	0.274	4.3	+++	++ +	-	-

หมายเหตุ - โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่แสดงปฏิกิริยา
 ++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจน
 +++ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจนมาก

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ major capsid protein (MCP) ของเชื้อ RGNNV โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-RGNNV ภายหลังทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาด 63 กิโลดาลตัน (kDa) ขณะที่การเตรียมสารละลายไวรัส RGNNV กึ่งบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเซลล์ พบกลุ่มของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 37 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นอนุภาคของไวรัสจากน้ำเลี้ยงเซลล์ รวมถึงโปรตีนอื่นขนาดประมาณ 72 kDa ซึ่งมาจากเซลล์ E11 เมื่อนำไปแยกโปรตีนตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ RGNNV โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* และ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ตามทดลองก่อนหน้านี้ (Choi, Kim, Lee, Kang, & Kim, 2013; Y. Qin, Liu, Lu, & Liu, 2022) ตามลำดับ ภายหลังการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ผสมกับสารละลายไวรัสกึ่งบริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวและทดสอบแอนติซีรั่มด้วยวิธี Western blot พบว่าหนูทุกตัวมีการตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนและโปรตีนแคปซิดของไวรัส RGNNV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ จึงเลือกหนูที่ตอบสนองดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 5 โคลน ได้แก่ 5C1 5C4 14E6 15E10 และ 9D1 จากการตรวจสอบ class และ subclass พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C1 5C4 และ 9D1 เป็น immunoglobulin G (IgG) โดยพบว่า 5C1 5C4 มี subclass เป็น IgG2a และ 9D1 มี subclass IgG2b ในขณะที่ 14E6 และ 15E10 มี class เป็น immunoglobulin A (IgA) โดยทุกตัวมี light chain เป็น Kappa (K) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ สามารถเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิด ขนาด 63 กิโลดาลตัน และโปรตีนแคปซิดของไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์และในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อ RGNNV ขนาด 37 กิโลดาลตัน เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting

จากการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกัน กลุ่มอีพิโทปที่ 1 ได้แก่ 5C1 และ 5C4 กลุ่มอีพิโทปที่ 2 คือ 14E6 15E10 และ 9D1 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 และ 9D1 เป็นแอนติบอดีที่มีความไวสูงที่สุดภายในแต่ละกลุ่ม เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด สอดคล้องกับผลการทดสอบความไวด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.547 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (8.6 เฟมโตโมล/จุด) ตรวจน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ที่เจือจาง 64

เท่า และตรวจสอบสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อ RGNNV ที่เจือจาง 128 เท่า ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 มีความไวสูงกว่า 5C4 ประมาณ 2 เท่า โดยสามารถตรวจหาโรคคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.274 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (4.3 เฟมโตโมล/จุด) ตรวจน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ RGNNV ที่เจือจาง 128 เท่า และตรวจสอบสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างปลาติดเชื้อ RGNNV ได้ที่ความเจือจาง 256 เท่า

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความสามารถในการตรวจสอบเชื้อ RGNNV ได้แตกต่างกันในแต่ละวิธีการ โดยโคลน 5C1 5C4 และ 9D1 สามารถจับกับอวัยวะที่ติดเชื้อในปลาได้ เมื่อตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยพบว่าแอนติบอดีข้างต้นสามารถเข้าจับกับเชื้อไวรัส NNV ในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ตา เหงือก ปมประสาท และสมอง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปลาปกติ ในขณะที่ 14E6 และ 15E10 ไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจการติดเชื้อด้วยวิธีนี้ เนื่องจากแสดงผลการติดเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อปลาได้ไม่ชัดเจน เมื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียและเชื้อไวรัสอื่นที่มีรายงานการติดเชื้อในสัตว์น้ำ ด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ เป็น positive control ได้แก่ 10F3 จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ISKNV, 12B12 จำเพาะต่อเชื้อ SDDV และ 15A10 จำเพาะต่อเชื้อ TiLV พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ ISKNV, SDDV, TiLV และโรคคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัสข้างต้น และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในรูปแบบ heat killed ทั้ง 12 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting

อย่างไรก็ตามพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน เกิดปฏิกิริยาข้ามเมื่อนำมาทดสอบกับสารละลายที่สกัดจากปลาที่ไม่ติดเชื้อที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามเมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting แสดงให้เห็นว่าอาจมีองค์ประกอบของโปรตีนอื่นในสารละลายที่สกัดจากปลาทำให้เห็นเป็นพื้นหลัง (background) ซึ่งส่งผลต่อการอ่านและแปลผลการตรวจสอบการติดเชื้อ เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้สารละลายที่สกัดจากปลาที่ไม่ติดเชื้อที่อยู่ในสภาพธรรมชาติบ่มกับ goat anti-mouse antibody (GAM) เพียงอย่างเดียว พบว่า สามารถเห็นจุดดำซึ่งเป็นผลของปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกัน ภายหลังเมื่อนำสารสกัดจากปลาที่ไม่ติดเชื้อผสมกับ treatment buffer (10 % SDS, β -mercaptoethanol) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยวิธี dot blotting และบ่มด้วย GAM เพียงอย่างเดียว พบว่า ไม่เห็นจุดดำบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส จึงสรุปได้ว่า GAM สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบของโปรตีนอื่นในสารละลายปลาที่ไม่ติดเชื้อที่อยู่

ในสภาพธรรมชาติได้ ดังนั้นในการเตรียมตัวอย่างสารละลายที่สกัดจากปลา เพื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค dot blotting จำเป็นต้องนำไปทำให้เสียสภาพด้วยการผสมกับ treatment buffer และต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ก่อนเพื่อลดการเกิดฟุ้งหลังทำให้สามารถอ่านและแปลผลการตรวจสอบด้วยตาเปล่าได้ง่ายและแม่นยำขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจเชื้อ RGNNV ในสารสกัดจากปลาติดเชื้อก่อนและหลังต้ม ด้วยวิธี dot blotting พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 สามารถตรวจเชื้อ RGNNV ในสารสกัดจากปลาติดเชื้อก่อนและหลังต้มได้ที่ค่าความเจือจางเดียวกัน แต่จุดดำที่ปรากฏในตัวอย่างหลังต้มจางกว่าตัวอย่างก่อนต้ม ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C1 14E6 15E10 และ 9D1 สามารถตรวจเชื้อ RGNNV ในสารสกัดจากปลาติดเชื้อหลังต้มได้ที่ค่าความเจือจางน้อยกว่าก่อนต้ม 2 เท่า และจากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบอื่นที่ปะปนอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และ โปรตีน GST ของ lysate ที่ได้จาก *E.coli* ได้ที่ค่าความเจือจางเดียวกัน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำเลี้ยงเซลล์ไลน์ E11 ที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งอาจเกิดจากรูปแบบของแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนลูกผสมระหว่างโปรตีนแคปซิดของไวรัส ที่มีขนาด 37 กิโลดาลตัน กับโปรตีน GST ซึ่งมีขนาด 26 กิโลดาลตัน ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลูกผสมและส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน แต่ในขณะเดียวกันโปรตีน GST มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะขนาดของโปรตีนที่ 26 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับโปรตีนของเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) (Vaniksampanna, Longyant, Wangman, Sithigorngul, & Chaivisuthangkura, 2017) เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนปลุกภูมิคุ้มกันในหนูขาวจึงทำให้มีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีทั้งต่อส่วนโปรตีนแคปซิดและส่วนโปรตีน GST ในขณะที่จากการทดสอบด้วยวิธี Western blotting โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม เช่นเดียวกันกับในกรณีตรวจตัวอย่างปลา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 9D1 ที่ผลิตได้ เหมาะสำหรับการตรวจการติดเชื้อในตัวอย่างที่ผ่านการทำให้โปรตีนเสียสภาพหรือประยุกต์ใช้ในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และ โปรตีน GST ตัวอย่างเช่น วิธี immunohistochemistry เพื่อให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ RGNNV ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำกว่า

จากการทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ NNV จากสารสกัดปลาติดเชื้อ ที่ผ่านการทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวสูงสุดและมีตำแหน่งการจับอิพิโทปที่ต่างกัน จำนวน 2 ชนิด ร่วมกันคือ 5C4 และ 9D1 พบว่าความไวในการ

ตรวจเชื้อ NNV เพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่พบว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่า 1 ชนิด โดยแต่ละชนิดจับอีพิโทปตำแหน่งต่างก็นำมารวมกัน สามารถเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อได้ เช่น การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ ISKNV (14H7 ร่วมกับ 1G11 และ 14H7 ร่วมกับ 10F3) สำหรับตรวจเชื้อไวรัส ISKNV (Vaniksampanna et al., 2023) หรือการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ IMNV (IMN3 IMN92 และ IMC19 ร่วมกัน) สำหรับการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัส IMNV (ประดิษฐ์ หวังมาน, 2559) จากการทดสอบการตรวจการติดเชื้อในแต่ละวิธีพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 ซึ่งเป็นตัวแทนอีพิโทปกลุ่มที่ 1 และ 9D1 ซึ่งเป็นตัวแทนอีพิโทปกลุ่มที่ 2 มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อต่างกันในแต่ละวิธี จากการศึกษาพบว่า 9D1 มีความไวในการตรวจเชื้อในวิธี dot blotting สูงกว่า 5C4 แต่ประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry ไม่ชัดเจนเท่า 5C4 จึงสามารถสรุปความสามารถของแอนติบอดีที่ผลิตได้ ดังนี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 เหมาะสำหรับการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry ส่วน 9D1 เหมาะสำหรับการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี Western blotting และ dot blotting ซึ่งจากผลการทดสอบด้วยวิธี dot blotting ที่ให้ผลที่แม่นยำและชัดเจนขึ้นเมื่อใช้ 5C4 ร่วมกันกับ 9D1

การตรวจสอบความสามารถในการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจตัวอย่างปลาจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นปลาติดเชื้อจำนวน 15 ตัวอย่าง และปลาปกติจำนวน 15 ตัว พบว่าการตรวจด้วยวิธี RT-PCR พบการติดเชื้อจำนวน 14 จาก 15 ตัวอย่าง และเมื่อตรวจด้วยวิธี dot blotting โดยบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 ร่วมกับ 9D1 พบการติดเชื้อจำนวน 14 จาก 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 93% ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี nested RT-PCR สามารถตรวจพบการติดเชื้อทั้ง 15 ตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อของทั้ง 2 วิธี แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดของเชื้อ NNV ที่ผลิตได้ สามารถตรวจยืนยันการติดเชื้อ RGNNV ในตัวอย่างปลาติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้จะมีความไวในการตรวจต่ำกว่าวิธี nested RT-PCR แต่มีความถูกต้องแม่นยำเหมือนกับการตรวจด้วยวิธี RT-PCR

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกัน สามารถกระตุ้นให้หนูตอบสนองและสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ อย่างไรก็ตามพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นไม่สามารถเข้าจับกับโปรตีนแคปซิดของไวรัส RGNNV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ได้ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting และสามารถจับได้เล็กน้อยเมื่อนำมา

ทดสอบด้วยวิธี Western blotting ซึ่งอาจเกิดจากรูปแบบของแอนติเจนที่นำมาใช้ในการปลูก ภูมิคุ้มกันที่เป็นโปรตีนในรูปเสียสภาพจากการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค electroelution อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (neutralizing antibody) พบว่าอนุภาคไวรัส RGNNV ที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนสามารถกระตุ้นให้เกิด การสร้างแอนติบอดีที่เข้าจับกับอนุภาคไวรัสในรูปแบบธรรมชาติและเสียสภาพได้ (Gye, Park, Kim, Oh, & Nishizawa, 2018) ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากความเป็น antigenicity ที่ลดลงใน ขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนด้วย dialysis buffer (Gye & Nishizawa, 2016) ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ แอนติเจนรูปแบบผสมระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคปซิดและสารละลายไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นไวรัสทั้งอนุภาค ซึ่งทำให้ได้แอนติเจนที่มีส่วนของ epitope ที่หลากหลาย ส่งผลให้สามารถ ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถเข้าจับกับโปรตีนแคปซิดของเชื้อ RGNNV ในสภาพ ธรรมชาติและเสียสภาพได้

ดังนั้นคาดว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแคปซิดไวรัสของเชื้อ RGNNV ที่ผลิตได้ในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสแบบง่ายในรูปแบบ immunochromatographic strip test เช่นเดียวกับ ชุดตรวจเชื้อ WSSV (Sithigorngul et al., 2006) ชุดตรวจเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (Wangman et al., 2020) เพื่อใช้ในการตรวจการ ติดเชื้อเบื้องต้นได้ในระดับห้องปฏิบัติการ และเป็นแนวทางในการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพ ของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ RGNNV ได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

- กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. (2551). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*. (ปริญญาณิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ). สืบค้นจาก http://ils.swu.ac.th:8991/exlibris/aleph/a22_1/apache_media/SQSBAR21RB4TQGM33G936L49IMYBHY.pdf
- กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง. (2563). ผลผลิตของการประมงไทย ปี 2563. สืบค้นจาก https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200922100212_1_file.pdf
- คะเนน สุขเกื้อ และ ธีรวัตร จริตงาม. (2561). การนำเข้าส่งออกปลากระรังมีชีวิตผ่านด่านตรวจสัตว์น้ำของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2557-2559 (เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2561).
- ชัมัยพร ชูงาน. (2561). สถานการณ์การประมงไทย Thailand's Fisheries Situation. . (เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2561).
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์ : สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. หน้า 90-91
- เยาวนิตย์ ดนยดล สถาพร ดิเรกนุชราคม และ กิจการ ศุภมาตย์. (2563). โรคอัมพาตในปลากระรังจุดน้ำตาล (*Epinephelus malabaricus*). (เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 6/2536)
- ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา. (2561). คู่มือการตรวจโรคสัตว์น้ำด้วยเทคนิค PCR Manual for Aquatic Animal's Disease Diagnosis Using PCR Techniques. สืบค้นจาก https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200128151951_1_file.pdf
- ประดิษฐ์ หวังมาน. (2559). การพัฒนาชุดตรวจแถบสีความไวสูงสำหรับไวรัสก่อโรครุนแรงในกุ้ง : ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวและไวรัสกล้ามเนื้อตาย. (ปริญญาณิพนธ์ปริญญาดุขฎิบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ). สืบค้นจากวิทยานิพนธ์ปริญญาเอก
- อารีรัตน์ คุณานพรัตน์. (2553). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบีแนนท์แคปซิดโปรตีนของ *infectious myonecrosis virus (IMNV)*. (ปริญญาณิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ). สืบค้นจาก http://ils.swu.ac.th:8991/exlibris/aleph/a22_1/apache_media/GP3LYMMXG9ENJLC5MCUC2XRQ9BVIT6.pdf
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*: Elsevier Health Sciences

- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroge, K., & Furusawa, I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathology*, 27(4), 191-195.
- Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*, 9(2), 106.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., . . . Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary parasitology*, 132(3-4), 249-272.
- Breuil, G., Bonami, J., Pepin, J., & Pichot, Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97(2-3), 109-116.
- Breuil, G., Pepin, J., Boscher, S., & Thiery, R. (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 25(12), 697-702.
- Chi, S., Hu, W., & Lo, B. (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 22(3), 173-182.
- Chi, S., Lo, B., & Lin, S. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 24(1), 3-13.
- Chi, S., Lo, C., Kou, G., Chang, P., Peng, S., & Chen, S. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 20(3), 185-193.
- Choi, Y. R., Kim, H. J., Lee, J. Y., Kang, H. A., & Kim, H.-J. (2013). Chromatographically-purified capsid proteins of red-spotted grouper nervous necrosis virus expressed in *Saccharomyces cerevisiae* form virus-like particles. *Protein Expression and Purification*, 89(2), 162-168.
- Chua, F. H. C., Ng, M. K., Loo, I. J., & Wee, J. Y. (1995). Mass mortality in juvenile greasy

- grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. *Dis Asian Aquacult*, 11, 235-241.
- Comps, M., Pepin, J., & Bonami, J. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123(1-2), 1-10.
- Costa, J. Z., & Thompson, K. D. (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & shellfish immunology*, 53, 35-49.
- Dalla Valle, Zanella, L., Patarnello, P., Paolucci, L., Belvedere, P., & Colombo, L. (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of Fish Diseases*, 23(5), 321-327.
- Dalla Valle, L., Toffolo, V., Lamprecht, M., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., & Colombo, L. (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Veterinary microbiology*, 110(3-4), 167-179.
- Dalla Valle, L., Zanella, L., Patarnello, P., Paolucci, L., Belvedere, P., & Colombo, L. (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of Fish Diseases*, 23(5), 321-327.
- Delsert, C., Morin, N., & Comps, M. (1997). A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Archives of virology*, 142(12), 2359-2371.
- Doan, Q., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., & Allal, F. (2017). Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*, 40(5), 717-742.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and techniques *Hybridoma technology in the Biosciences and Medicine* (pp. 3-41): Springer.
- FAO. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations for a world without hunger. Retrieved from http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_thailand/en#tcN700C5
- Frerichs, G., Rodger, H., & Peric, Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy

- nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*, 77(9), 2067-2071.
- Gagné, N., Johnson, S., Cook-Versloot, M., MacKinnon, A., & Olivier, G. (2004). Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Diseases of aquatic organisms*, 62(3), 181-189.
- Glazebrook, J., Heasman, M., & De Beer, S. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 13(3), 245-249.
- Grotmol, S., Nerland, A. H., Biering, E., Totland, G. K., & Nishizawa, T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases of aquatic organisms*, 39(2), 79-88.
- Grotmol, S., Totland, G., Kvellestad, A., Fjell, K., & Olsen, A. (1995). Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, 15, 176-180.
- Grove, S., Faller, R., Soleim, K. B., & Dannevig, B. H. (2006). Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *Journal of virological methods*, 132(1-2), 104-112.
- Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2016). Dialysis buffer with different ionic strength affects the antigenicity of cultured nervous necrosis virus (NNV) suspensions. *Virus Research*, 223, 108-114.
- Gye, H. J., Park, M.-J., Kim, W.-S., Oh, M.-J., & Nishizawa, T. (2018). Heat-denaturation of conformational structures on nervous necrosis virus for generating neutralization antibodies. *Aquaculture*, 484, 65-70.
- Hick, P., & Whittington, R. J. (2010). Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus.

Journal of virological methods, 163(2), 368-377.

- Iwamoto, T., Mise, K., Takeda, A., Okinaka, Y., Mori, K.-I., Arimoto, M., . . . Nakai, T. (2005). Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of General Virology*, 86(10), 2807-2816.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K.-i., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of aquatic organisms*, 43(2), 81-89.
- Jaramillo, D., Hick, P., Deece, K., Tweedie, A., Kirkland, P., Arzey, E., & Whittington, R. J. (2016). Comparison of ELISA formats for detection of antibodies specific for nervous necrosis virus (Betanodavirus) in the serum of immunized barramundi *Lates calcarifer* and Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *Aquaculture*, 451, 33-38.
- Johansen, R., Sommerset, I., Tørud, B., Korsnes, K., Hjortaa, M., Nilsen, F., . . . Dannevig, B. (2004). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27(10), 591-601.
- Kanchanakhan, S., Dolnayadol, Y., & Roongkamnertwongsa, S. (2005). Detection and identification of viral pathogens of grouper (*Epinephelus malabaricus*) cultured in Thailand *Recent Advances in Diagnosis and Prevention of Fish and Shrimp Diseases in Southeast Asia* (pp. 85-94): Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Keawcharoen, J., Techangamsuwan, S., Ponpornpisit, A., Lombardini, E., Patchimasiri, T., & Pirarat, N. (2015). Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 38(1), 49-54.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology*, 6(7), 511-519.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, Y. S., Murali, S., Chiu, H. C., Ju, H. Y., Lin, Y. S., Chen, S. C., . . . Chang, C. Y. (2001). Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *Journal of Fish Diseases*, 24(5), 299-309.
- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, 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(2), 145-151.
- Lio-Po, G. D., & de la Peña, L. D. (2004). Viral disease. In K. Nagasawa, E. R. Cruz-Lacierda, & (Eds.), *Disease of Culture Groupers*. Tigbauan, Iloilo, Philippines,: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Liu, Q.-H., Ma, C.-Y., Chen, W.-B., Zhang, X.-L., Liang, Y., Dong, S.-L., & Huang, J. (2009). White spot syndrome virus VP37 interacts with VP28 and VP26. *Diseases of aquatic organisms*, 85(1), 23-30.
- Machimbirike, V. I., Jansen, M. D., Senapin, S., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., & Dong, H. T. (2019). Viral infections in tilapines: More than just tilapia lake virus. *Aquaculture*, 503, 508-518.
- Maltese, C., & Bovo, G. (2007). Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia*, 9, 93-146.
- Marsian, J., Hurdiss, D. L., Ranson, N. A., Ritala, A., Paley, R., Cano, I., & Lomonossoff, G. P. (2019). Plant-Made Nervous Necrosis Virus-Like Particles Protect Fish Against Disease. *Frontiers in Plant Science*, 10(880).
- Mekata, T., Satoh, J., Inada, M., Dinesh, S., Harsha, P., Itami, T., & Sudhakaran, R. (2015). Development of simple, rapid and sensitive detection assay for grouper nervous necrosis virus using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases*, 38(10), 873-879.
- Moody, N., Horwood, P., Reynolds, A., Mahony, T., Anderson, I., & Oakey, H. (2009). Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. *Diseases of aquatic organisms*, 87(3), 151-160.

- 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(1), 368-371.
- Mosmann, T. R., Baumal, R., & Williamson, A. R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. *European journal of immunology*, 9(7), 511-516.
- Munday, B., Kwang, J., & Moody, N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25(3), 127-142.
- Munday, B., Langdon, J., Hyatt, A., & Humphrey, J. (1992). Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, 103(3-4), 197-211.
- Muroga, K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of aquatic organisms*, 18, 103-107.
- Nagai, T., & Nishizawa, T. (1999). Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. The DDBJ accession number of the sequence reported in this paper is AB025018. *Journal of General Virology*, 80(11), 3019-3022.
- Nakai, T., Dung, N. H., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M., & Ootsuki, K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathology*, 29(3), 211-212.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., 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*, 63(4), 1633-1636.
- Nishizawa, T., Kise, M., Nakai, T., & Muroga, K. (1995). Neutralizing monoclonal antibodies to striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Fish Pathology*, 30(2), 111-114.
- Office International des Epizootics (OIE). (2019). Chapter 2.3.12. Viral encephalopathy and retinopathy. In *Manual of diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Paris: Aquatic Animal Health Standards Commission, Office International des Epizooties. FAO.
- Office International des Epizootics (OIE). (2000). Viral encephalopathy and retinopathy

Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases (pp. 69-73).

Office International des Epizootics (OIE). (2017). Chapter 2.3. 12. Viral encephalopathy and retinopathy. In: *World Organisation for Animal Health* Paris, France.

Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappelozza, E., Bovo, G., & Cattoli, G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Archives of virology*, 155(8), 1193-1203.

Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Le Ven, A., & Laurencin, F. B. (1999). Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Diseases of aquatic organisms*, 36(1), 11-20.

Qin, Q., Wu, T., Jia, T., Hegde, A., & Zhang, R. (2006). Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *Journal of virological methods*, 131(1), 58-64.

Qin, Y., Liu, J., Lu, Y., & Liu, X. (2022). Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV). *Journal of Ocean University of China*, 21(4), 1061-1067.

Rajewsky, K. (2019a). The advent and rise of monoclonal antibodies. In: Nature Publishing Group.

Rajewsky, K. (2019). The advent and rise of monoclonal antibodies. In: Nature Publishing Group.

Saeed, A., Wang, R., Ling, S., & Wang, S. (2017). Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Shieh, J., & Chi, S. (2005). Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA. *Diseases of aquatic organisms*, 63(1), 53-60.

Shyam, K., Jeong, H.-N., Oh, M.-J., Kim, C.-S., & Kim, W.-S. (2020). Development of a lateral flow immuno-chromatic strip assay for the detection of nervous necrosis

- virus (NNV, RGNNV genotype). *Aquaculture*, 520, 734944.
- Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Pecharaburanin, N., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., & Sithigorngul, P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 72(2), 101-106.
- Starkey, W. G., Millar, R. M., Jenkins, M. E., Ireland, J. H., Muir, K. F., & Richards, R. H. (2004). Detection of piscine nodaviruses by real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Diseases of aquatic organisms*, 59(2), 93-100.
- Su, Z. D., Shi, C. Y., Huang, J., Shen, G. M., Li, J., Wang, S. Q., & Fan, C. (2015). Establishment and application of cross-priming isothermal amplification coupled with lateral flow dipstick (CPA-LFD) for rapid and specific detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Virology journal*, 12(1), 1-8.
- Thiery, R., Cozien, J., de Boisseson, C., Kerbart-Boscher, S., & Nevarez, L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology*, 85(10), 3079-3087.
- Thiery, R., Raymond, J.-C., & Castric, J. (1999). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *Virus Research*, 63(1-2), 11-17.
- Valero, Y., López-Vázquez, C., Souto, S., Oliveira, J., Cuesta, A., & Bandín, I. (2021). Differential Nervous Necrosis Virus (NNV) Replication in Five Putative Susceptible Cell Lines. *Pathogens* 2021, 10, 1565. In: s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published
- Vaniksampanna, A., Longyant, S., Wangman, P., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2017). Enhancement and confirmation of white spot syndrome virus detection using monoclonal antibody specific to VP 26. *Aquaculture Research*, 48(4), 1699-1710.
- Vaniksampanna, A., Manajit, O., Senapin, S., Kamsamarn, S., Wangman, P., Longyant, S., & Chaivisuthangkura, P. (2023). Generation of monoclonal antibodies against

heterologously expressed major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 563, 738895.

Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Taengchaiyaphum, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2020). Development of a rapid immunochromatographic strip test for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* toxin B that cause acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of Fish Diseases*, 43(2), 207-214.

Xu, H.-D., Feng, J., Guo, Z.-X., Ou, Y.-J., & Wang, J.-Y. (2010). Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods*, 163(1), 123-128.

Yoshikoshi, K., & Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13(1), 69-77.

Zorriehzahra, M. J., Nazari, A., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Karsidani, S. H., Bovo, G., & Daud, H. H. M. (2014). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *VirusDisease*, 25(4), 430-436.





ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

2. LB agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	7.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

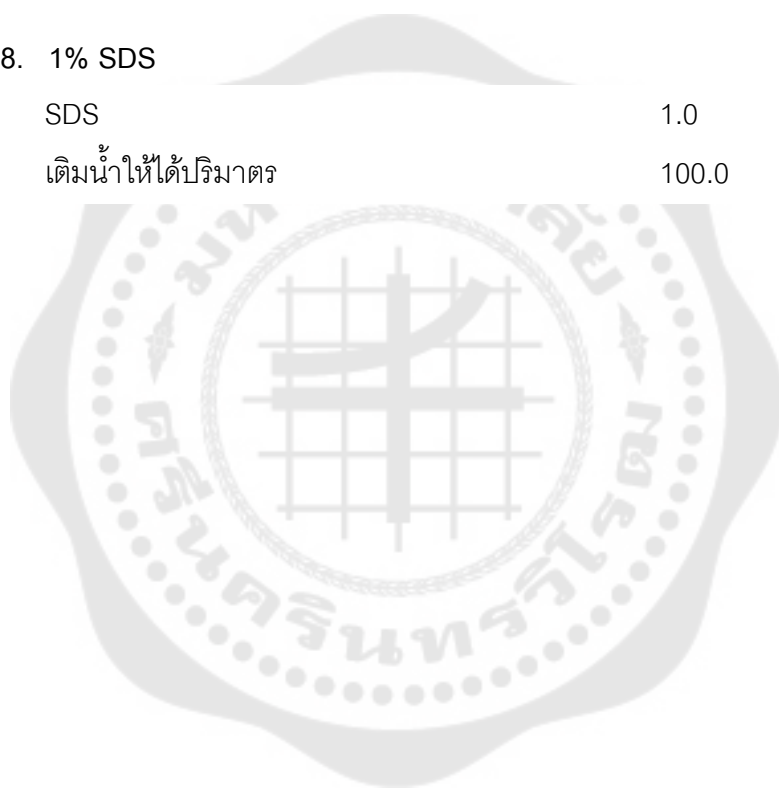




บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 100 mM IPTG		
IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
2. Buffer B (100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea pH 8)		
NaH ₂ PO ₄	1.38	กรัม
Tris-HCl (ปรับ pH 8)	0.12	กรัม
Urea	48.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร
3. 100 mM PMSF		
PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol	1.0	มิลลิลิตร
4. 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2		
NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
NaH ₂ PO ₄	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร
5. 5% blotto		
นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร
1% Merthiolate (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (sigma)	0.1	มิลลิลิตร

6. 1% Merthiolate		
Thimerosal (sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร
7. 1M KCl		
KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร
8. 1% SDS		
SDS	1.0	กรัม
เติมน้ำให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค



สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.60	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
Sodium pyruvate (C ₃ H ₃ O ₃ Na) (Sigma)	1.1005	กรัม
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	2.0160	กรัม
HEPES (Sigma)	5.5925	กรัม
Penicillin G	20,000	units
Streptomycin G	200.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรให้ได้	1,000	มิลลิลิตร

จากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันดีทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่าน sterilized Millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์ 1% ใน RPMI (1)	80.0	มิลลิลิตร
FBS RPMI medium (1)	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement RPMI medium (1)	1.0	มิลลิลิตร
50X Aminopterin (Sigma) RPMI medium (1)	2.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายเพื่อใช้ในการหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol ความเข้มข้น 40%)

Polyethylene glycol	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มิลลิลิตร

เติม RPMI medium (1) ลงใน Polyethylene glycol ที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนนำมาใช้งาน

5. สารละลายเพื่อใช้ในการแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethyl sulfoxide ความเข้มข้น 12%)

Dimethyl sulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium (1)	88.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำมาใช้งาน



ภาคผนวก ง



บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
(SDS-PAGE) และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 Monomer solution (30% T, 2.7% C_{Bis})

Acrylamide	58.4	กรัม
N, N'-methylene-bis-acrylamide	1.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C		

1.2 4X Running gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร

1.3 4X Stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		

1.4 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate	50.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

1.5 Ammonium persulfate ความเข้มข้น 10%

Ammonium persulfate	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

0.15 M Tris-HCl (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

1.7 2X treatment buffer

0.5 M Tris-HCl (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 15% separating gel

Monomer solution (1.1)	15.0	มิลลิลิตร
0.15 M Tris-HCl (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.75	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	20.0	ไมโครลิตร

2.2 4% stacking gel

Monomer solution (1.1)	2.7	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

3. Running buffer

4X Tank buffer

Tris	2.0	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
10% SDS (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4,000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมโปรตีน และล้างสีส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Stain stock (1% Coomassie blue R-250)

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain (0.01% Coomassie blue R-250)

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
Methanol	250.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain)

4.2.1 Destain 1

Methanol	500.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร

4.2.2 Destain 2

Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	880.0	มิลลิลิตร

ทำการย้อมเจลโดยถอดเจลออกจากกระจก แชนลงในสีย้อม Coomassie blue R- 250 ความเข้มข้น 0.01% (4.1.2) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีส่วนเกิน โดยนำเจลลงแช่ใน Destain 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ย้ายเจลลงแช่ใน Destain 2 (4.2.2) จนสีพื้นของเจลใส

5. Towbin transfer buffer pH 8.8

Tris	3.0	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร



บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
Merthiolate 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

2. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 0.5%

สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5% (1)	50.0	มิลลิลิตร
PBS เข้มข้น 0.15 M pH 7.2	950.0	มิลลิลิตร

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 M pH 4.5

Sodium citrate	29.41	กรัม
Merthiolate 1% (Sigma)	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

4. 1 N H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)



สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISATYPE ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ 3 chain specific)
- 5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
- 6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
- 7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
- 8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
- 9) Normal Rabbit Serum (negative control)
- 10) Positive control, Monoclonal Mouse IgG1
(Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
- 11) Substrate buffer, concentration (10X)
(1M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H₂O₂)
- 12) ABTS substrate, concentration (50X)
(2,2-azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
- 13) Blocking solution, concentration (50X)
(25% BSA in PBS and 0.05% NaN₃)
- 14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), concentrated (50X)
- 15) Goat anti- Mouse IgGAM, concentrated (50X)
(0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN₃)
- 16) 50% Tween 20



ภาคผนวก ช

สารเคมีสำหรับ IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. coated slide solution		
Gelatin	1.0	กรัม
CrK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
2. Davidson's fixative		
95% ethanol	30.0	มิลลิลิตร
100% formalin	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร
3. Fetal bovine serum 10% (P ₁ ⁺)		
Fetal bovine serum	10.0	มิลลิลิตร
0.15 M PBS pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
4. สี Enrilich's acid hematoxylin		
Hematoxylin	8.0	กรัม
95% ethanol	400.0	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.0	กรัม
Glycerine	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร
5. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol		
Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร

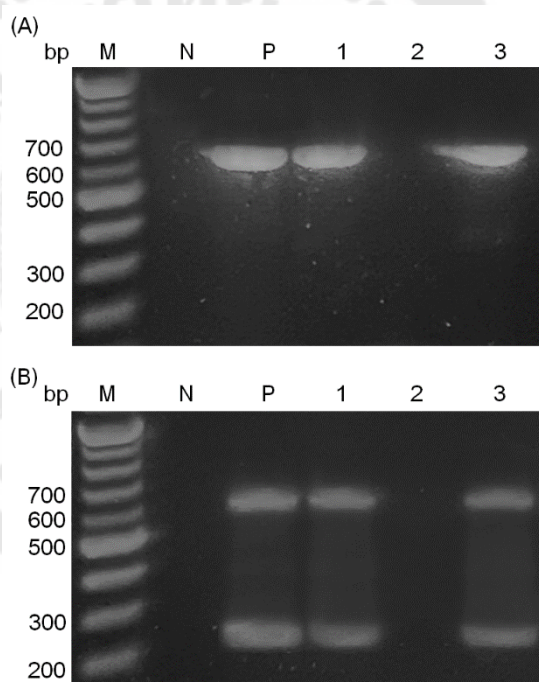


ภาคผนวก ซ

ผลการทดลองเพิ่มเติม

การตรวจสอบส่วนไอและส่วนตะกอนของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ หลังตกตะกอนด้วยวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR

นำส่วนไอ และส่วนตะกอน ของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 หลังตกตะกอน ไปสกัดกรดนิวคลีอิก โดยใช้ชุด high pure nucleic acid kit (Roche Molecular Biochemical) ทำการเจือจางกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้แบบ 10 fold serial dilution ด้วยกรดนิวคลีอิกที่สกัดจากปลาปกติ ตั้งแต่ 10^0 ถึง 10^{-10} จากนั้นนำความเข้มข้นที่ 10^{-5} ของทุก ๆ ตัวอย่างมาทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และ nested RT-PCR โดยวิเคราะห์ขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลผลิตมีขนาด 605 bp และ 255 bp (ภาพประกอบ 37) ตามลำดับ



ภาพประกอบ 37 การตรวจสอบส่วนไอและส่วนตะกอนของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ที่ติดเชื้อ หลังตกตะกอนด้วยวิธี RT-PCR (A) และ nested RT-PCR (B)

M คือ DNA มาตรฐาน (1 kb plus DNA ladder)

N คือ negative control (น้ำปราศจาก DNase และ RNase สำหรับทำ PCR)

P คือ positive control (พลาสมิด pGEX-RGNNV)

แถวที่ 1 ส่วนตะกอน ของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อหลังตกตะกอน ความเข้มข้น 10^{-5}

แถวที่ 2 ส่วนใส ของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อหลังตกตะกอน ความเข้มข้น 10^{-5}

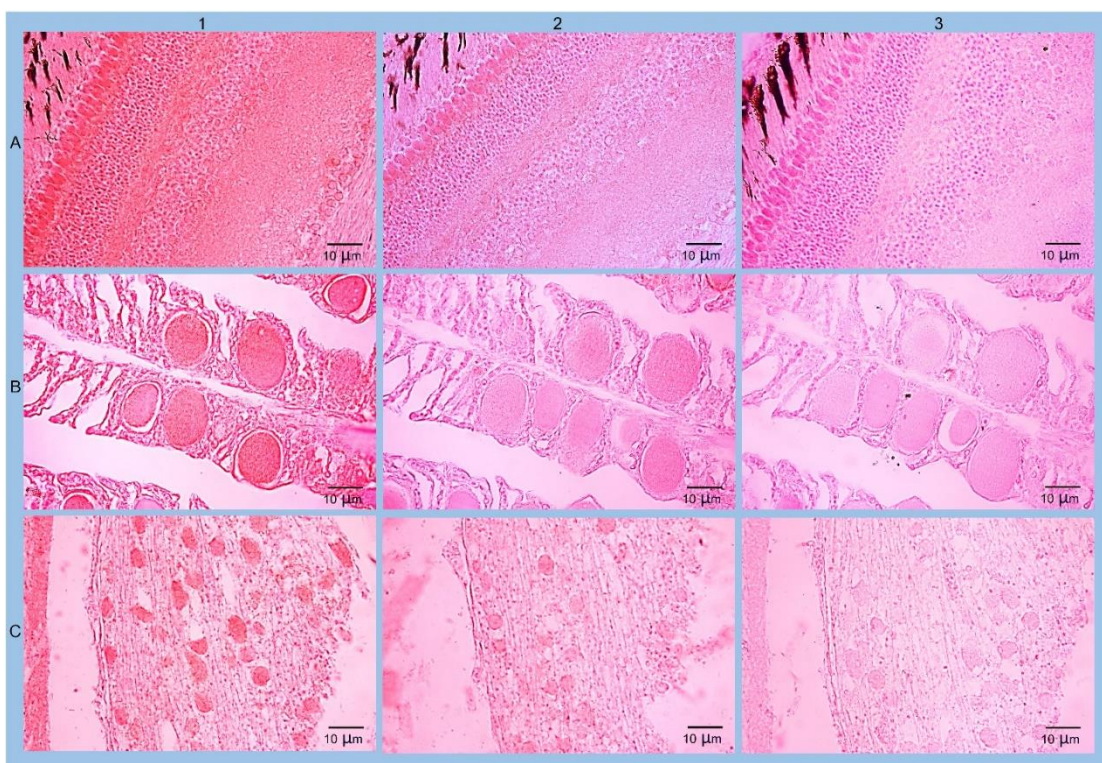
แถวที่ 3 น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อ ก่อนตกตะกอน ความเข้มข้น 10^{-5}

จากผลการทำสอบเมื่อเปรียบเทียบความหนาของแถบ DNA ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า ส่วนตะกอนของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อ หนาที่สุด รองลงมาคือ น้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อ ก่อนตกตะกอน และไม่พบแถบ DNA ในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อหลังตกตะกอนทั้งใน วิธี RT-PCR และ nested RT-PCR ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การนำน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ติดเชื้อไปปั่นที่ ความเร็วรอบ 20000 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้ไวรัสตะกอนลงมา ในส่วนตะกอนจึงมีปริมาณ ไวรัสมากที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนใส และในน้ำเลี้ยงเซลล์ E11 ก่อนตกตะกอน



ยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry

ทำโดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทำการดูดซับด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส NNV (preabsorption) ก่อนนำไปป่มกับเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ NNV



ภาพประกอบ 38 ยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีการตรวจการติดเชื้อ NNV ด้วยวิธี immunohistochemistry

โดยใช้เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของปลาติดเชื้อ ได้แก่ ตา (A), เหงือก (B) และปมประสาทใต้สมองส่วน mesencephalon (C) ป่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4

คอลัมน์ที่ 1 ป่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ผ่านการดูดซับ (preabsorption)

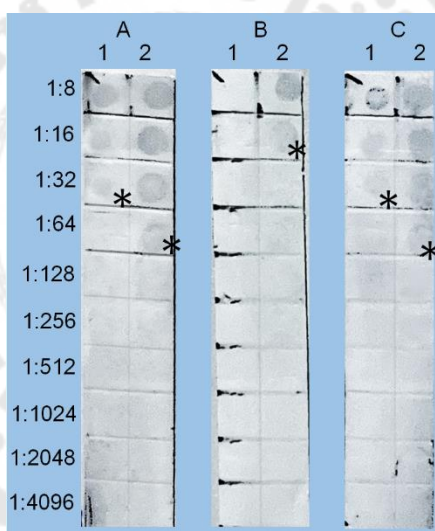
คอลัมน์ที่ 2 ป่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ติดเชื้อ

คอลัมน์ที่ 3 ไม่ได้ป่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้เทียบเป็น negative

control

ตรวจสอบตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้ม และยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

จากผลการทดสอบความไวในภาพประกอบ 32 เมื่อนำตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ไม่ผ่านการต้มและผ่านการต้มทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution แล้วบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าค่าความเจือจางของทั้ง 2 ตัวอย่างที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจสอบได้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นเพื่อตรวจสอบและยืนยันว่าผลที่ปรากฏเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับไวรัสในตัวอย่าง จึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ และตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้มมาเจือจางแบบ 2 fold serial dilution แล้วบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ดูดซับ 2 แบบเปรียบเทียบกัน คือ 1) ดูดซับด้วยตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้มซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่นำไปเจือจาง และ 2) ดูดซับกับตัวอย่างปลาปกติที่ผ่านต้ม



ภาพประกอบ 39 ตรวจสอบตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้ม และยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

โดยเจือจางตัวอย่างแบบ 2 fold serial dilution บ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5C4 ที่ดูดซับด้วยตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้ม หรือดูดซับกับตัวอย่างปลาปกติที่ผ่านต้ม แล้วบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:20 ซึ่งใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าการทดสอบความไวในภาพประกอบ 32

A บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ผ่านการดูดซับ

B บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับด้วยตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้ม

C บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับด้วยตัวอย่างปลาปกติที่ผ่านการต้ม
แถวที่ 1 น้ำเลี้ยงเซลล์ติดเชื้อ NNV

แถวที่ 2 ตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้ม

* คือ ค่าความเจือจางที่น้อยที่สุดที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาได้
จากการพิสูจน์เพื่อยืนยันความจำเพาะจากทั้งวิธี immunohistochemistry และวิธี
dot blotting สามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจับจำเพาะกับเชื้อไวรัส NNV และ สิ่งที่ทำ
ปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในตัวอย่างปลาติดเชื้อที่ผ่านการต้ม คือ โปรตีนแคปซิดของ
ไวรัส





ภาคผนวก ฅ

วิธีคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนเป็นหน่วย fmole

แปลงหน่วยความเข้มข้นจาก $\mu\text{g/mL}$ เป็น $\text{fg}/\mu\text{g}$

ตัวอย่าง โปรตีนเข้มข้น $0.274 \mu\text{g/mL}$

$$\begin{aligned}
 0.274 \mu\text{g/mL} &= 274 \text{ ng/mL} \\
 &= 274000 \text{ pg/mL} \\
 &= 274000000 \text{ fg/mL} \\
 \text{ดังนั้น โปรตีนปริมาตร } 1 \mu\text{L} \text{ มีความเข้มข้น} &= 274000000/1000 \\
 &= 274000 \text{ fg}/\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

คำนวณ mol

mol = น้ำหนักที่วัดได้/มวลโมเลกุล (dalton)

รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-RGNNV ขนาด 63 กิโลดาลตัน

$$\begin{aligned}
 \text{ดังนั้น mol} &= 274000/63 \times 1000 \\
 &= 4.3 \text{ fmol}/\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุพัตรา คำสมาน
วัน เดือน ปี เกิด	18 เมษายน 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2561 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

