



การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ tilapia lake virus (TiLV)
PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST TILAPIA LAKE VIRUS (TiLV)



รัชพงศ์ ไสภา

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ tilapia lake virus (TiLV)



ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST TILAPIA LAKE VIRUS (TiLV)



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

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ tilapia lake virus (TiLV)
ของ
ชัชพงศ์ โสภา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....
คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)
..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ)

ชื่อเรื่อง	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ tilapia lake virus (TiLV)
ผู้วิจัย	รัชพงศ์ โสภา
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลในทวีปเอเชียเป็นที่นิยมมากขึ้นรวมถึงในประเทศไทย เนื่องจากปลานิลนี้เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ราคาไม่แพงและมีความอดทนต่อโรค โดยสามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรได้มาก แต่เนื่องจากการระบาดของเชื้อ Tilapia lake virus (TiLV) ซึ่งเป็นไวรัสที่จัดอยู่ในอยู่กลุ่มของไวรัส Orthomyxovirus มีรูปร่างกลมและมีเปลือกหุ้ม เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 60 - 80 nm จัดเป็น Single-stranded RNA virus ประกอบไปด้วย 10 จีโนมเซกเมนต์ โดยก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกร ส่งผลให้ปลานิลที่ติดเชื้อตายจำนวนมาก สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ TiLV segment 8 (TiLV-S8) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในปลานิล โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่ได้จากการนำยีนของโปรตีน S8 โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET15-b แล้วทำการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ และคัดเลือกหนูตัวที่ให้ผลดีที่สุด มาทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ผลจากการวิจัยพบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV-S8 ได้โดยสามารถแบ่งตามความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันได้จำนวน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ 8H-3, 3H-12 และ 14F-4 และกลุ่มที่ 2 คือ 14D-9 จากการตรวจสอบด้วยวิธี western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความสามารถในการจับกับโปรตีนของ TiLV-S8 และโปรตีนของเชื้อไวรัส TiLV ที่ติดในปลา ที่มีขนาด 20 และ 18 kDa ตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อไวรัส TiLV ที่ติดเชื้อในปลาได้และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อชนิดอื่น และแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการจับสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ TiLV ที่เจือจางประมาณ 1:16 ซึ่งมีความไวต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR ประมาณ 6.25 เท่า เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 และ 8H-3 ผสมกันสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ตามธรรมชาติได้ด้วยวิธี dot blotting ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลาที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อตามธรรมชาติได้

คำสำคัญ : ปลานิล, Tilapia lake virus, TiLV, โมโนโคลนอลแอนติบอดี, Immunohistochemistry

Title	PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST TILAPIA LAKE VIRUS (TiLV)
Author	CHATCHAPONG SOPA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Siwaporn Longyant
Co Advisor	Professor Dr. Parin Chaivisuthangkura

The culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an important industry in many countries around the world, including Thailand. This is because this fish is an important source of protein, which can greatly increase the income of farmers. There was an outbreak of Tilapia Lake Virus (TiLV), which is classified as a Orthomyxovirus. The virus has been described as an enveloped, negative-sense, single-stranded RNA virus with 10 segments. This may also cause economic losses for farmers. As a result, the infected tilapia dies. The objective of this study was to produce a monoclonal antibody specific to TiLV segment 8 to detect TiLV infection in tilapia by using recombinant TiLV-S8 protein obtained from the gene. The S8 protein was cloned into plasmid pET15-b, then protein expression was increased and purified. Then the immunization in mice and select the mice that give the best results to produce monoclonal antibodies. The results show that monoclonal antibodies specific to TiLV-S8 that can be divided into two groups, according to their specificity towards different epitopes: Group 1 consists of 8H-3, 3H-12 and 14F-4 and group 2 consists of 14D-9. Western blotting examination found that the monoclonal antibodies were able to bind to TiLV-S8 proteins and TiLV-infected fish proteins of 20 and 18 kDa, respectively, when tested by dot blotting and immunohistochemistry methods, monoclonal antibodies could bind with proteins of TiLV-infected fish and did not cross-reactivity with tissue extracts of other infected fish and bacteria that cause diseases in aquatic animals. The produced monoclonal antibody was sensitive to detecting tissue extracts of TiLV-infected fish at a dilution of approximately 1:16, which was approximately 6.25 times lower than the RT-PCR method. The combination of monoclonal antibodies 14D-9 and 8H-3 can be used to detect naturally TiLV-infected tilapia by dot blotting, with results consistent with RT-PCR. The monoclonal antibodies produced in this study can therefore be used to detect TiLV infection in fish samples.

Keyword : Nile tilapia, Tilapia lake virus, TiLV, Monoclonal antibody, Immunohistochemistry

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือรวมถึงคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล และ ศาสตราจารย์ ดร. ปริพันธ์ ชัยวิสุทธางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอบรมให้ความรู้ในการศึกษาและการทำวิจัย อีกทั้งคอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านจริยธรรมประกอบการทำปริญญาานิพนธ์ ทำให้การทำปริญญาานิพนธ์นี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานในการสอบปริญญาานิพนธ์และให้คำแนะนำสำหรับการแก้ไขปริญญาานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนา ชลธนานารถ ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.ประดิษฐ์ หวังมาน ผู้ซึ่งคอยให้คำแนะนำช่วยเหลือแก้ปัญหา และถ่ายทอดเทคนิคต่าง ๆ ทั้งในห้องปฏิบัติการและงานเอกสาร อีกทั้งยังได้แบ่งปันความรู้และประสบการณ์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ทุกคน ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ผู้วิจัยได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา ครอบครัวอันเป็นที่รัก และบรรดาผู้มีพระคุณ ที่เป็นกำลังใจ สนับสนุน และเป็นแรงผลักดันให้ก้าวข้ามผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และขอบคุณมิตรภาพของเพื่อน ๆ ที่ช่วยสนับสนุน ให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้เสมอมา สุดท้ายนี้ขอให้กุศลประโยชน์อันเกิดจากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ อุทิศเป็นกุศลแก่ หนูทวดลอง และปลานิลทุกตัว ที่ได้สละชีวิตในการทำปริญญาานิพนธ์ของผู้วิจัยในครั้งนี้

ชัชพงศ์ ไสเภา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลัง และความสำคัญของการวิจัย.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2.....	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. ปลานิล.....	6
1.1 อนุกรมวิธานของปลานิล.....	6
1.2 ลักษณะโดยทั่วไปของปลานิล.....	6
1.3 คุณสมบัติและนิสัย.....	7
1.4 การสืบพันธุ์.....	7
1.5 โรคที่เกิดในปลานิล.....	9

2. Tilapia Lake virus (TiLV)	11
2.1 การระบาดของ TiLV	12
2.2 ลักษณะอาการของปลาที่ติดโรค	14
2.3 พยาธิสภาพของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV	14
3. การศึกษาและการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV	17
3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส TiLV	17
3.2 การตรวจการติดเชื้อ TiLV โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	18
3.3 การตรวจการติดเชื้อ TiLV โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน	19
4. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: MAbs)	22
4.1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	23
4.2 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	24
บทที่ 3	27
วิธีการดำเนินการวิจัย	27
อุปกรณ์และสารเคมี	27
สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง	27
แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ	27
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	28
เคมีภัณฑ์	29
วิธีการดำเนินการทดลอง	33
1. การนำ recombinant plasmid เข้าสู่แบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21	34
2. การคัดเลือกโคลนและการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 (TiLV segment-8 recombinant protein)	34
3. การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	35

4. การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV-S8 ให้บริสุทธิ์	35
5. การเตรียมตัวอย่างปลานิลติดเชื้อ TiLV	36
5.1 การเตรียม RNA ของ TiLV.....	36
5.2 การตรวจการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR	36
6. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์.....	38
7. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV-S8	38
8. การคัดเลือกไฮบริโดมา.....	39
8.1 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting.....	39
8.2 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2 โดยวิธี western blot.....	40
8.3 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2 โดยวิธี dot blotting	40
8.4 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2 โดยวิธี immunohistochemistry	40
9. การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution.....	41
10. การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา.....	42
11. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	42
11.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	42
11.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	43
11.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ TiLV	45
11.4 ทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting.....	46
12. การทดสอบการติดเชื้อไวรัส TiLV ตามธรรมชาติในปลานิลด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธี RT-PCR และยืนยันการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry	46
บทที่ 4.....	47
ผลการทดลอง	47

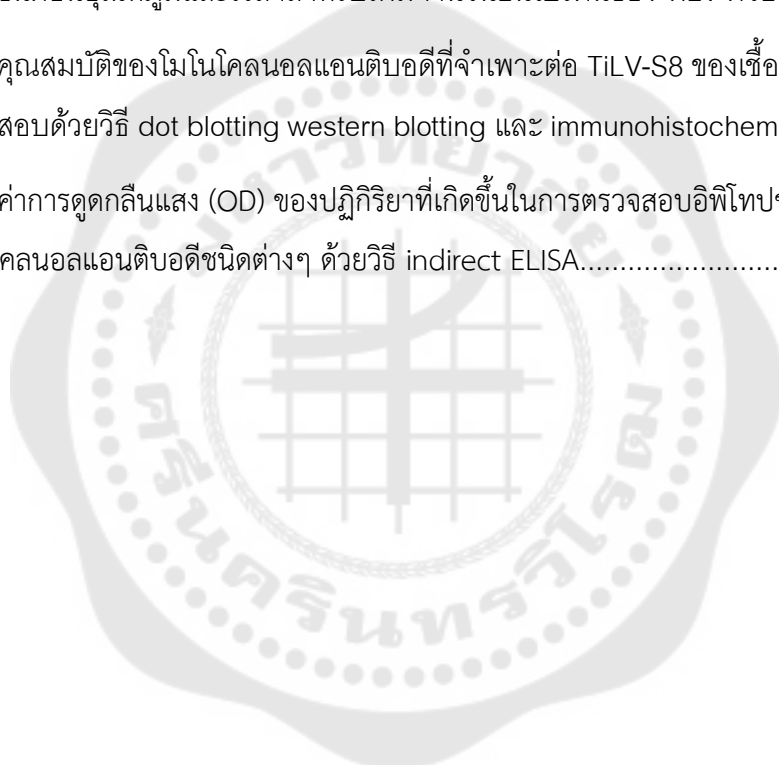
1. การเตรียมและการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 บริสุทธิ์	47
2. การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลาในธรรมชาติ.....	49
3. การปลูกภูมิคุ้มกันและการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูเมาส์	49
4. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ TiLV	50
5. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	52
5.1 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting.....	52
5.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry	54
5.3 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA	56
5.4 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	57
5.5 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ TiLV ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR	58
5.6 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลาตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธี RT-PCR	60
บทที่ 5.....	64
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	64
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	76
ภาคผนวก ค	78
ภาคผนวก ง.....	81

ภาคผนวก จ.....	86
ภาคผนวก ฉ.....	88
ภาคผนวก ช.....	90
ภาคผนวก ซ.....	92
ภาคผนวก ฌ.....	95
ประวัติผู้เขียน.....	97



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	28
ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	29
ตาราง 3 ส่วนผสมของสารต่างๆที่ใช้ในการทำ RT-PCR.....	37
ตาราง 4 ขั้นตอนอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนของ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR.....	37
ตาราง 5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV-S8 ของเชื้อ TiLV ที่ผลิตได้ในครั้งนี้ ทดสอบด้วยวิธี dot blotting western blotting และ immunohistochemistry (IHC).....	56
ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA.....	57



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ปลานิล <i>Oreochromis niloticus</i>	7
ภาพประกอบ 2 ภาพอนุภาคของ TiLV จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM)	11
ภาพประกอบ 3 Phylogenetic ของ TiLV ที่คัดแยกเชื้อไวรัสจากปลาที่ติดเชื้อในประเทศไทย	13
ภาพประกอบ 4 ปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV มีลักษณะอาการผิวหนังมีแผลจุดเลือดออก ตาบวมโปน 14	
ภาพประกอบ 5 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณสมอง ภาพ A เนื้อเยื่อบริเวณสมองของปลาที่ไม่ติดเชื้อ และ ภาพ B เนื้อเยื่อบริเวณสมองส่วน optic tectum :OT และบริเวณ stratum periventriculare :StP ของปลาที่ติดเชื้อ ในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงอาการคั่งของเลือดรวมตัวกันเป็นจุด (multifocal hemorrhages)	15
ภาพประกอบ 6 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณตับ ภาพ C เนื้อเยื่อบริเวณตับของปลาที่ไม่ติดเชื้อ และ ภาพ D เนื้อเยื่อบริเวณตับของปลาที่ติดเชื้อในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์ตับ การเกิดการอักเสบและการเกิด hepatocellular necrosis	15
ภาพประกอบ 7 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณ้ามและไต ภาพ E เนื้อเยื่อบริเวณ้ามของปลาที่ไม่ติดเชื้อ ,ภาพ F เนื้อเยื่อบริเวณ้ามของปลาที่ติดเชื้อในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงการเพิ่มจำนวนของ melanomacrophage ภาพ G เนื้อเยื่อบริเวณไตของปลาที่ไม่ติดเชื้อ และ ภาพ H เนื้อเยื่อบริเวณไตของปลาที่ติดเชื้อมีลักษณะของเซลล์ที่มีอาการอักเสบ (inflammatory cells) และการเพิ่มจำนวนของ melanomacrophage	16
ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบลักษณะไวรัสที่ทำให้การเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภาพ A เซลล์เพาะเลี้ยง E-11 หลังจากทำให้ติดเชื้อ 5 วัน เซลล์มีลักษณะของ CPE และพบบริเวณที่เซลล์ก่อตัวกันเป็น plaque formation(*), ภาพ B เซลล์เพาะเลี้ยง primary tilapia brain cells หลังจากติดเชื้อ 10 วัน พบลักษณะการของ CPE ลูกศรแสดงถึงการยึดยาวของเซลล์มีลักษณะบวมรวมกันเป็นก้อน, ภาพ C เซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ปกติ, ภาพ D เซลล์เพาะเลี้ยง primary tilapia brain cells ปกติ, ภาพ E และ F ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	

พบอนุภาคของไวรัส มีขนาดอยู่ที่ 55-60 นาโนเมตร และ ภาพ G การย้อมสีแบบเนกาทีฟ (negative staining) เพื่อดูโครงสร้างของไวรัส.....	17
ภาพประกอบ 9 การตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัส TiLV ในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 โดยดูจาก ลักษณะของเซลล์ cytopathic effect (CPE) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภาพ C เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ปกติ และภาพ D เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ที่ติดไวรัส TiLV.....	18
ภาพประกอบ 10 การตรวจด้วยวิธี Western blotting (1) เซลล์เพาะที่ติดเชื้อ TiLV, (2) เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ และ (3) รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV S8 โดยลูกศร แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาของ แอนติบอดีและแอนติเจนที่จับกันด้วยวิธี Western blotting.....	19
ภาพประกอบ 11 immunofluorescence assay (IFA) จากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อ S8 protein กับ เชื้อไวรัส TiLV ในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ภาพ 1 เซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ TiLV และ ภาพ 2 เซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ติดเชื้อ TiLV.....	20
ภาพประกอบ 12 การตรวจการติดเชื้อ TiLV ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry	21
ภาพประกอบ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ TiLV segment 8	22
ภาพประกอบ 14 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	23
ภาพประกอบ 15 แนวทางการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo pathway และ salvage pathway และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo pathway	25
ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบอพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV-S8 หรือผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด (ตัวอักษร A-D แสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)	43
ภาพประกอบ 17 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA ลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบลงในแต่ละคอลัมน์ (1 คอลัมน์ต่อ 1 โคลนที่ต้องการทดสอบ)	44
ภาพประกอบ 18 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA ลูกศรแสดงการเติม rabbit anti-isotype antibody แต่ละชนิดในแต่ละแถว ตั้งแต่แถว A-H.....	45

ภาพประกอบ 19 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 โดยนำโปรตีนชนิดต่าง ๆ มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วทำการย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250..... 48

ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลตามธรรมชาติด้วยวิธี RT-PCR พบผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 491 bp 49

ภาพประกอบ 21 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้จากหนูเม้าส์ทั้ง 4 ตัว โดยวิธี Western blotting 50

ภาพประกอบ 22 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (B) TiLV8H-3, (C) 14D-9, (D) 14F-4 และ (E) 3H-12 โดยเปรียบเทียบกับ (A) โพลีโคลนอลแอนติซีรั่มจากหนู ด้วยวิธี Western blotting..... 51

ภาพประกอบ 23 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่าง ๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (B) TiLV8H-3, (C) 14D-9, (D) 14F-4 และ (E) 3H-12 โดยเปรียบเทียบกับ (A) โพลีโคลนอลแอนติซีรั่มจากหนู..... 52

ภาพประกอบ 24 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่าง ๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้คือ TiLV14D-9, 8H-3, 14F-4 และ 3H-12 ตามลำดับโดยทำการหยดโปรตีนชนิดต่าง ๆ ตามตารางดังนี้..... 53

ภาพประกอบ 25 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อสมองของปลาที่ติดเชื้อ TiLV ทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) TiLV8H-3, (B) TiLV14D-9, (C) TiLV14F-4 และ (D) TiLV3H-12 พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณสมองของตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ TiLV โดยบริเวณที่ติดเชื้อจะแสดงออกเป็นสีน้ำตาล 55

ภาพประกอบ 26 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ด้วยวิธี dot blotting 58

ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบความไวในการจับโปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเจือจางตั้งแต่ 600

จนถึง 4.6 µg/ml และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้คือ TiLV8H-3, 14D-9, 3H-12, 14F-4 และ 14D-9 ผสมกับ 8H-3 ตามลำดับ 59

ภาพประกอบ 28 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR โดยทำการเจือจาง RNA จากสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-7} เท่า 60

ภาพประกอบ 29 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ร่วมกับ 8H-3 (A) เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR (B) 61

ภาพประกอบ 30 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก (A) และสมอง (B) ของปลาที่ติดเชื้อ TiLV ตามธรรมชาติและปลาปกติด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9..... 63

ภาพประกอบ 31 การคำนวณหาจำนวนโมเลกุลของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ. 93

ภาพประกอบ 32 ภาพตัวอย่างปลานิลและปลาที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ 96

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง และความสำคัญของการวิจัย

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง ในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Nile tilapia ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus* (ชื่อเดิมคือ *Tilapia niloticas*) เป็นปลาเศรษฐกิจที่นิยมเพาะเลี้ยงกันมากกว่า 135 ประเทศทั่วโลก ซึ่งในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ในทวีปเอเชียได้เป็นที่นิยมมากขึ้น เนื่องจากปลาชนิดนี้เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ราคาไม่แพงและเป็นปลาที่มีความอดทนต่อโรค โดยสามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลเติบโตอย่างรวดเร็ว เพื่อตอบสนองต่อความต้องการหาแหล่งโปรตีนที่มีคุณค่าเพียงพอต่อการบริโภคที่เพิ่มขึ้น (FAO, 2014, 2020) แต่เนื่องจากเกิดการระบาดของไวรัส Tilapia lake virus (TiLV) ส่งผลให้ปลานิลที่ติดเชื้อตาย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการสูญเสียทางรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาชนิดนี้ ไวรัสชนิดนี้มีการระบาดในฟาร์มเลี้ยงปลาในประเทศต่าง ๆ เช่น อีสราเอล เอกวาดอร์ โคลัมเบีย อียิปต์ ไทย จีน อินเดีย และมาเลเซีย (Senapin, Shyam, Meemetta, Rattanarojpong, & Dong, 2018)

การระบาดของ TiLV มีรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล ของประเทศอิสราเอลในปี 2009 (Eyngor et al., 2014) ซึ่งส่งผลเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมาก TiLV เป็นไวรัสที่ค้นพบใหม่ จัดอยู่ในกลุ่มของไวรัส Orthomyxovirus มีรูปร่างกลม และมีเปลือกหุ้ม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 60-80 nm จัดเป็น Single-stranded RNA virus ประกอบไปด้วย 10 จีโนมเซ็กเมนต์ (Bacharach et al., 2016; Surachetpong et al., 2017; Tattiyapong, Dachavichitlead, & Surachetpong, 2017) ปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV จะมีอาการเฉื่อยชา และสภาพร่างกายผอมลง พฤติกรรมการว่ายน้ำผิดปกติ มีภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง บริเวณตาของปลามีลักษณะบวมโป่งทั้งสองด้าน ส่วนของเลนส์กระจกตามีลักษณะขุ่น ในปลาที่ติดเชื้อรุนแรงพบการหลุดของเลนส์ตา บริเวณที่ผิวหนังเกิดรอยโรคแผลแบบลอกหลุด พบจุดเลือดออกตามลำตัว เกิดขี้ตั้ง ช่องท้องขยายใหญ่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณ เยื่อหุ้มสมองส่วน leptomeninges และน้ำมพบจุดเลือดออก (Eyngor et al., 2014; Surachetpong et al., 2017)

ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของเชื้อ TiLV ในปลานิลในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2558-2560 พบอัตราการตายสะสมอยู่ในช่วง 20-90 % ซึ่งช่วงอายุของปลาที่ตายเกิดในช่วงลูกปลาเล็กที่มีการเคลื่อนย้ายจากโรงเพาะฟักมาทำการเลี้ยงในบ่อดินหรือกระชัง นอกจากนี้ยังมีการรายงานการพบเชื้อ TiLV ในปลาที่ป่วยหนัก (moribund fish) จึงทำให้มีการรายงานความสูญเสียในเชื้อโรคปลานิลตายเดือน (tilapia one month mortality syndrome) (Surachetpong et al., 2017)

สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ TiLV นั้นมีการพัฒนาขึ้นมาหลายวิธี เช่น การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) (Tattiyapong et al., 2017) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และบุคลากรที่มีประสบการณ์สูง

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น (presumptive test methods) สามารถทำได้โดยการแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) และการเพาะเลี้ยงไวรัส (virus culture) ในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาทางไวรัสวิทยา (จารุภา เถาว์ลย์, 2558) เนื่องจากเชื้อที่แยกได้สามารถนำไปศึกษาแอนติเจนและคุณสมบัติทางพันธุกรรม เชื้อไวรัส TiLV สามารถเจริญใน primary tilapia brain cells หรือ E-11 cell line และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสได้จากการดูลักษณะของเซลล์ หากเซลล์มีการติดเชื้อ เซลล์จะมีลักษณะกลมเกาะเป็นกลุ่มเล็กๆ และค่อยๆ ขยายเป็นกลุ่มก้อนซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการติดเชื้อไวรัส เรียกว่าเกิด cytopathic effect (CPE) ที่เวลา 5-10 วัน (Eyngor et al., 2014)

สำหรับการตรวจยืนยัน (confirmatory test methods) ได้มีการออกแบบและพัฒนา PCR primer set ที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี reverse transcriptase (RT) PCR (Eyngor et al., 2014) ซึ่งผลการตรวจยังมีความแม่นยำน้อย จึงมีการพัฒนาวิธี nested RT-PCR ให้มีความแม่นยำและความไวต่อเชื้อมากขึ้น (Kembou Tsofack et al., 2017) และในปัจจุบันได้มีกระบวนการตรวจวินิจฉัยด้วย semi-nested RT-PCR ที่ได้รับการพัฒนาให้มีความไวในการตรวจมากกว่าวิธี nested RT-PCR โดยสามารถตรวจที่ 7.5 viral copies per reaction ได้ (Dong et al., 2017) ซึ่งวิธีที่กล่าวมาเป็นวิธีที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัสให้มีปริมาณที่มากขึ้น ทำให้สามารถตรวจเชื้อไวรัสได้แม้ในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย ซึ่งวิธีข้างต้นสามารถช่วยลดระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยได้ และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจเชื้อไวรัส แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถ และมีความชำนาญในการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ทำให้เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อในพื้นที่ฟาร์มจริง อีกทั้งมีราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูง

เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) เป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงคล้ายกับการทำงานของลูกกุญแจและแม่กุญแจ ดังนั้นจึงได้มีการนำมาใช้ในการตรวจสอบโดยการผลิตแอนติบอดีในรูปโพลีโคลนอล แอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) และมีการนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพัฒนาเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) โดยได้มีนักวิชาการหลายกลุ่มพัฒนาวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันมาใช้สำหรับการตรวจสอบเชื้อ TiLV โดยมีรายงานการผลิตแอนติบอดีในการตรวจสอบเชื้อ TiLV ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ในการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA (iELISA) (Hu et al., 2020)

สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัส TiLV เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในปลานิล ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาแบบต่าง ๆ ได้แก่ วิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry ซึ่งเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน สามารถให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว นอกจากนี้ บางวิธีการทดสอบ เช่น วิธีการตรวจด้วย strip test ที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ เกษตรกรยังสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมาก ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลา เป็นการลดความเสียหายของปลานิลจากการติดเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์ ดังนี้

1. เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV segment 8 ของเชื้อ TiLV
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ TiLV เพื่อตรวจสอบปลาที่ติดเชื้อ
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจการติดเชื้อ TiLV ในปลานิลด้วยวิธี

dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

ขอบเขตการวิจัย

1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli*
2. การคัดเลือกโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV segment 8
3. การทำให้บริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV segment 8 ที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21
4. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์ โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน
5. การผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV segment 8 โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry
6. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยการตรวจสอบความทับซ้อนอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี รวมทั้ง การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting
7. การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ TiLV จากปลาติดเชื้อตามธรรมชาติ

สมมติฐานในการวิจัย

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV อาจทำได้โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV segment 8 เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ TiLV ได้
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี

dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งในวงศ์ของปลาหมอสีอยู่ใน Family Cichlidae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* มีชื่อสามัญคือ Nile Tilapia ซึ่งปลานิลเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารทางโปรตีนที่สูง ผู้คนนิยมรับประทาน และปลาชนิดนี้สามารถเพาะพันธุ์ได้ง่ายเลี้ยงได้ในทุกสภาพ เต็มโตได้รวดเร็วและเพาะเลี้ยงจนเกิดเป็นปลาเศรษฐกิจที่นิยมเพาะเลี้ยงกันมากกว่า 135 ประเทศทั่วโลก โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลนั้นมีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในไทยตั้งแต่ปี 2508 และในภูมิภาคเอเชีย (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, 2553)

1.1 อนุกรมวิธานของปลานิล

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Cichliformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*

1.2 ลักษณะโดยทั่วไปของปลานิล

ลักษณะพิเศษของปลานิล จะมีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว มีลายขวางพาดตามลำตัวจำนวน 9-10 แถบ และมีลักษณะทั่วไป ดังนี้ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบอ่อนและก้านครีบแข็งเป็นจำนวนมาก ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้มที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกันและครีบหาง มีจุดสีขาว

และสีดำตัดขวางดูคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป (ภาพประกอบ 1) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กรมประมง, 2562)



ภาพประกอบ 1 ปลานิล *Oreochromis niloticus*

ที่มา: (Zeitoun, EL-Azrak, Zaki, Nemat-Allah, & Mehana, 2016)

1.3 คุณสมบัติและนิสัย

ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นช่วงเวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนต่อโรค และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดี โดยมีการศึกษาความสามารถในการทนต่อความเค็ม ปลานิลมีความสามารถทนความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพัน มีความสามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ในช่วง 6.5-8.3 และสามารถทนต่อสภาวะอุณหภูมิที่สูงได้ถึง 40 องศาเซลเซียส ในส่วนของอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส พบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดี เนื่องจากถิ่นกำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้ อยู่ในเขตร้อน (นวลมณี พงศ์ธนา, 2553)

1.4 การสืบพันธุ์

1.4.1 ลักษณะของปลานิล

ตามปกติแล้วรูปร่างภายนอกของปลานิล เพศผู้และเพศเมีย จะมีลักษณะที่เหมือนกัน แต่จะสังเกตลักษณะเพศได้ก็โดยการดู อวัยวะเพศที่บริเวณใกล้กับช่องทวาร โดยเพศผู้จะมีอวัยวะเพศในลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา แต่สำหรับตัวเมียมีลักษณะเป็นรูค่อนข้างใหญ่และกลม ขนาดปลาที่จะดูเพศได้ชัดเจนนั้นต้องเป็นปลาที่มีขนาดยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป สำหรับปลาที่มีขนาดโตเต็มที่แล้ว สามารถสังเกตเพศได้อีกวิธีหนึ่งด้วย การดูสีที่ลำตัว ซึ่งปลาเพศผู้

ที่ได้คางและลำตัวจะมีสีเข้มต่างกับเพศเมีย โดยสีของปลานิลจะยิ่งเข้มขึ้นเมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กรมประมง, 2562)

1.4.2 การผสมพันธุ์และการวางไข่

ปลานิลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี โดยใช้เวลา 2-3 เดือน/ครั้ง ถ้าสภาวะแวดล้อมเหมาะสมในช่วงเวลา 1 ปี จะสามารถผสมพันธุ์ได้มากถึง 5-6 ครั้ง โดยระยะเวลาการสืบพันธุ์ของปลาแต่ละตัวจะแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อม โดยปลานิลที่ยังโตไม่เต็มวัยยังไม่ได้ขนาดผสมพันธุ์ หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการวางไข่ โดยปกติปลาจะรวมกันอยู่เป็นฝูง เมื่อปลามีขนาดโตพอที่จะสามารถสืบพันธุ์ได้ ปลาเพศผู้จะแยกออกจากฝูงแล้วเริ่มสร้างรังโดยเลือกเอาบริเวณแนวลาดหรือก้นบ่อที่มีระดับน้ำลึกระหว่าง 0.5-1 เมตร โดยวิธีการสร้างรังนั้นปลานิลจะทำการปักหัวลงในแนวตั้งฉากกับพื้นดินแล้วใช้ปากและการเคลื่อนไหวของลำตัวเพื่อที่จะเขี่ยดินตะกอนออก จากนั้นจะอมดินตะกอน เศษสิ่งของต่าง ๆ ออกไปทิ้งจนกระทั่งจนกว่าจะได้รังที่มีลักษณะค่อนข้างกลม ความกว้างและลึกของรังขึ้นอยู่กับขนาดลำตัวของพ่อปลา หลังจากสร้างรังเสร็จเรียบร้อยแล้ว พ่อปลาจะพยายามไล่ปลาตัวอื่น ๆ ให้ออกไปนอกรัศมีของรังประมาณ 2-3 เมตร ขณะเดียวกันพ่อปลาที่สร้างรังจะแผ่ครีบท้องและอ้าปากกว้างในขณะที่มีปลาตัวเมียว่ายน้ำเข้ามาใกล้ ๆ รัง และเมื่อเลือกตัวเมียได้ถูกใจแล้วก็จะแสดงอาการจับคู่โดยว่ายน้ำเข้าคู่กันไป โดยใช้หางดีดและกัดกันเบา ๆ การเข้าคู่ใช้เวลาไม่นานนัก ปลานิลเพศผู้จะใช้บริเวณหน้าผกคุดนที่บริเวณใต้ท้องของปลานิลเพศเมียเพื่อเป็นการกระตุ้นให้เกิดวางไข่ โดยจะวางไข่ครั้งละ 10-15 ฟอง โดยปริมาณไข่ที่ปลานิลเพศเมียวางรวมกันแต่ละครั้งจะมีประมาณ 50-600 ฟอง โดยขึ้นอยู่กับขนาดตัวของแม่ปลานิล

เมื่อปลานิลเพศเมียทำการวางไข่แต่ละครั้งปลานิลเพศผู้จะว่ายน้ำไปเหนือไข่แล้วทำการปล่อยน้ำเชื้อลงไปจนกว่าการผสมพันธุ์แล้วเสร็จ โดยใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง ปลานิลเพศเมียจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วไว้ในปากและว่ายน้ำออกจากรัง ส่วนปลานิลเพศผู้จะคอยหาโอกาส เคล้าเคลียกับปลาตัวเมียอื่นต่อไป (นวลมณี พงศ์ธนา, 2553)

1.4.3 การฟักไข่

ไข่ปลาที่ได้รับการผสมแล้วจะถูกอมไว้โดยปลานิลเพศเมียจะมีการพัฒนาขึ้นตามลำดับ โดยแม่ปลาจะขยับปากให้น้ำไหลเข้าออกในช่องปากอยู่เสมอ เพื่อให้ได้รับน้ำที่สะอาด และยังเป็น การป้องกันศัตรูที่จะมากินไข่ ระยะเวลาที่ปลานิลเพศเมียใช้ฟักไข่แตกต่างกันตามอุณหภูมิของน้ำ โดยในน้ำที่มีอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ไข่จะมีการพัฒนาเป็นลูกปลาวัยอ่อนภายใน 8 วัน ซึ่งใน ระยะเวลาดังกล่าวนี้ถุงอาหารยังไม่ยุบ และจะยุบเมื่อลูกปลานิลมีอายุครบ 2 สัปดาห์ หลังจาก วันที่แม่ปลาวางไข่ ในช่วงระยะเวลาที่ลูกปลาถูกฟักตัวออกเป็นลูกปลา ลูกปลานิลวัยอ่อนจะอยู่ รวมตัวกันเป็นกลุ่ม โดยว่ายวนเวียนอยู่บริเวณหัวของแม่ปลา และจะเข้าไปหลบซ่อนอยู่ในช่อง ปากของแม่ปลาเมื่อมีภัยหรือถูกรบกวนโดยปลานิลด้วยกันเอง เมื่อถุงอาหารยุบลง ลูกปลานิลจะ เริ่มกินอาหารจำพวกฟิซและไรน้ำขนาดเล็กได้ และหลังจาก 3 สัปดาห์ไปแล้ว ลูกปลาก็จะกระจาย แดกฝูงไปหากินเลี้ยงตัวเองได้โดยลำพัง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กรมประมง, 2562; นวลมณี พงศ์ธนา, 2553)

1.5 โรคที่เกิดในปลานิล

แม้ว่าปลานิลจะมีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดีสามารถ เลี้ยงได้ในทุกสภาพทั้งในบ่อดิน และในกระชัง อุปสรรคที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงปลานิล คือ การ เกิดโรคในปลานิล เนื่องจากการเลี้ยงที่หนาแน่นมากและขาดการจัดการที่ดี รวมทั้งอาหารที่ใช้ เลี้ยงไม่มีคุณภาพ สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และคุณภาพน้ำไม่ดี ทำให้ปลาอ่อนแอ ง่ายต่อ การติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส

1.5.1 โรคที่เกิดในปลานิลจากเชื้อแบคทีเรีย

ลักษณะอาการจากการติดเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะคล้าย ๆ กัน ได้แก่ มีการตก เลือด ตามลำตัวมีแผลถลอก ครีบกร่อนหรือมีแผลบริเวณครีบ เบื่ออาหาร และมีน้ำในช่องท้อง แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลที่พบบ่อยมี 2 ชนิด คือ

- โรคที่เกิดจากเชื้อแอโรโมแนส (*Aeromonas hydrophila*)

เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและมักพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยงโดย การให้อาหารสดหรือการเลี้ยงแบบผสมผสาน สามารถพบเชื้อแบคทีเรียนี้ในแหล่งน้ำที่มี สารอินทรีย์ปริมาณสูง และสาเหตุที่ทำให้ปลานิลติดเชื้อ ได้แก่ ความเครียดหรือการบาดเจ็บจาก

การขนส่งการเคลื่อนย้าย ปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารคุณภาพไม่เหมาะสมรวมทั้ง
 บาดแผลที่เกิดจากปรสิต ปลาติดเชื้อจะว่ายน้ำเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน มีการตกเลือด
 เกิดบาดแผล ท้องบวม ตับเหลืองมีการตกเลือดบริเวณลำไส้ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

- โรคคอคัลมนาริส

เกิดจากเชื้อฟลาโวแบคทีเรีย (*Flavobacterium columnarae*) ชื่อเดิมคือ แฟลค
 ซิแบคเตอร์ (*Flexibacter columnaris*) โรคนี้มักเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปลา ได้แก่
 ความเครียดจากการขนส่ง โดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อน และการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศกะทันหัน
 อาการทางคลินิกที่พบ เช่น มีการหลั่งเมือกมาก ลำตัวปลามีสีด่างซีดเป็นแถบ ๆ ครีบและเหงือก
 กร่อน อาจมีสีเหลืองเกิดขึ้นบริเวณบาดแผล การป้องกันการระบาดของโรคทำได้โดยการลดความ
 บอบช้ำจากการจับและคัดขนาดปลา ไม่เลี้ยงปลาหนาแน่นและควบคุมคุณภาพน้ำโดยเฝ้าระวัง
 อย่าวาให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2557)

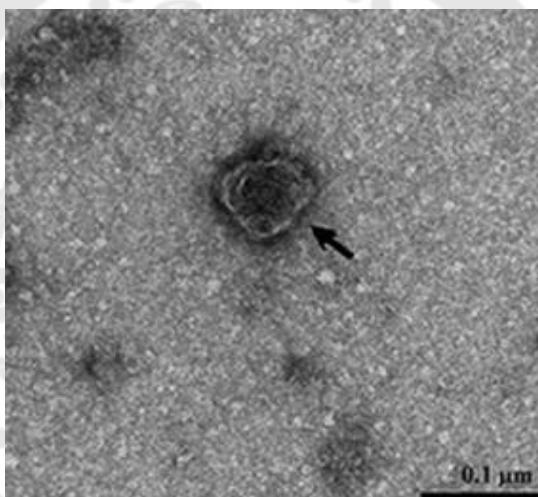
1.5.2 โรคที่เกิดในปลานิลจากเชื้อไวรัส

การที่ปลาดูดเชื้อไวรัสนั้นยากต่อการตรวจวินิจฉัยจำเป็นต้องนำตัวอย่างปลาที่ติด
 เชื้อไปตรวจวินิจฉัยตามห้องปฏิบัติการและไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา โดยมีรายงานว่า
 เชื้อไวรัส Bohle iridovirus (BIV) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคควงสว่าง (spinning tilapia
 syndrome) ในปลา *O. mossambicus* (Ariel & Owens, 1997), โรคที่เกิดจาก Infectious
 pancreatic necrosis virus (IPNV) โดยไวรัสสามารถเพิ่มจำนวน และก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในตับ
 มีอาการอักเสบบริเวณตับและอวัยวะภายในของลูกปลานิลที่เลี้ยงหนาแน่นสูง (Kim, Oseko,
 Nishizawa, & Yoshimizu, 2009)

ในปัจจุบันมีรายงานการระบาดของไวรัสชนิดใหม่ที่ก่อโรคในปลานิล โดยไวรัสชนิด
 นี้มีชื่อว่า Tilapia lake virus หรือเรียกว่า TiLV การระบาดของไวรัสชนิดนี้ส่งผลต่อระบบ
 อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลานิลเนื่องจากไวรัสชนิดนี้ส่งผลให้ปลาที่ติดเชื้อมีอัตราการตาย
 สะสมที่สูง (Eyngor et al., 2014)

2. Tilapia Lake virus (TiLV)

Tilapia lake virus (TiLV) จัดอยู่ในกลุ่ม Orthomyxo-like virus เมื่อศึกษาโครงสร้างของ TiLV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) พบว่าอนุภาคของไวรัสมีลักษณะรูปร่างกลมและมีเปลือกหุ้ม (envelop) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 60-80 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 2) (Tattiyapong et al., 2017) จัดเป็น novel segmented single-stranded RNA virus ที่ประกอบด้วย 10 genome segments แต่ละ segments มีความยาว ระหว่าง 456 ถึง 1,641 nucleotides และ genome total size มีความยาว 10,323 kb (Bacharach et al., 2016; Kembou Tsofack et al., 2017)



ภาพประกอบ 2 ภาพอนุภาคของ TiLV จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM)

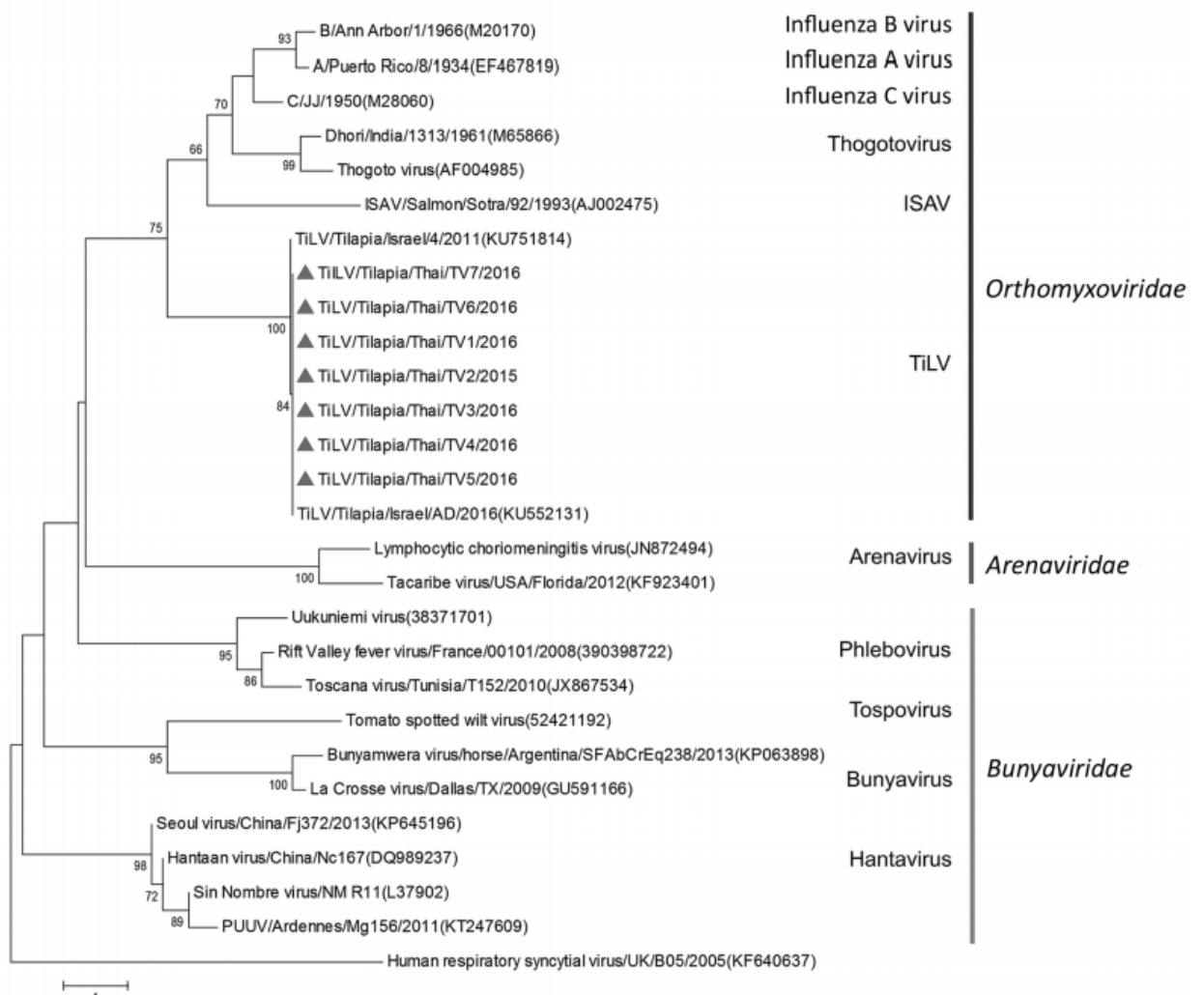
ที่มา (Tattiyapong et al., 2017)

2.1 การระบาดของ TiLV

Tilapia lake virus disease (TiLVD) จัดเป็นโรคอุบัติใหม่ในปลานิล (*Oreochromis* spp.) มีการรายงานในหลากหลายภูมิภาคของโลก โดยมีสาเหตุมาจาก Tilapia Lake virus (TiLV) การระบาดของ TiLV มีรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลของประเทศอิสราเอลในปี 2009 (Eyngor et al., 2014) ต่อมาไวรัสชนิดนี้มีการพบในประเทศอื่นๆ เช่น เอกวาดอร์ (Bacharach et al., 2016) โคลอมเบีย (Tsofack et al., 2017) อียิปต์ (Fathi et al., 2017; Nicholson et al., 2017) อินเดีย (Behera et al., 2018) อินโดนีเซีย (Koesharyani, Gardenia, Widowati, Khumaira, & Rustianti, 2018) มาเลเซีย (Amal et al., 2018) และประเทศไทย (Dong et al., 2017; Surachetpong et al., 2017)

สำหรับในประเทศไทยพบการรายงานการติดเชื้อ TiLV ในปี 2015-2016 ซึ่งในขณะนั้นยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้ แต่ด้วยผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสทำให้เกิดการสูญเสียในฟาร์มเลี้ยงปลานิลและปลานิลแดงในประเทศไทยหลายแห่ง โดยพบอัตราการตายสะสมอยู่ในช่วง 20-90% ซึ่งช่วงอายุของปลาที่ตายเกิดในช่วงลูกปลาเล็กที่มีการเคลื่อนย้ายจากโรงเพาะฟักมาทำการเลี้ยงในบ่อดินหรือในกระชัง ประกอบกับการรายงานการพบเชื้อ TiLV ในปลาที่ป่วยหนัก (moribund fish) จึงทำให้มีการรายงานความสูญเสียนี้ในชื่อ โรคปลานิลตายเดือน (tilapia one month mortality syndrome) (Surachetpong et al., 2017)

ต่อมาในปี 2017 ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้ โดยได้ทำการแยกเชื้อไวรัสจากปลานิลที่ติดเชื้อในประเทศไทย ซึ่งขณะนั้นยังไม่ทราบสาเหตุว่าการติดเชื้อนั้นเกิดจากไวรัสชนิดใด จากนั้นนำไวรัสจากตัวอย่างปลาที่มีอาการป่วยมาตรวจสอบลำดับ sequence ซึ่งลำดับของ sequence ของไวรัสที่ได้จากการตรวจสอบปลาติดเชื้อในประเทศไทยนั้นมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ตรงกันกับเชื้อไวรัส TiLV ที่มีการรายงานการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในประเทศอิสราเอลในปี 2009 จึงสรุปได้ว่าสาเหตุของการติดเชื้อในปลานิลในประเทศไทยนั้นมาจากเชื้อไวรัส TiLV (ภาพประกอบ 3) (Eyngor et al., 2014; Surachetpong et al., 2017)



ภาพประกอบ 3 Phylogenetic ของ TiLV ที่คัดแยกเชื้อไวรัสจากปลาที่ติดเชื้อในประเทศไทย

พินิจ (Surachetpong et al., 2017)

2.2 ลักษณะอาการของปลาที่ติดโรค

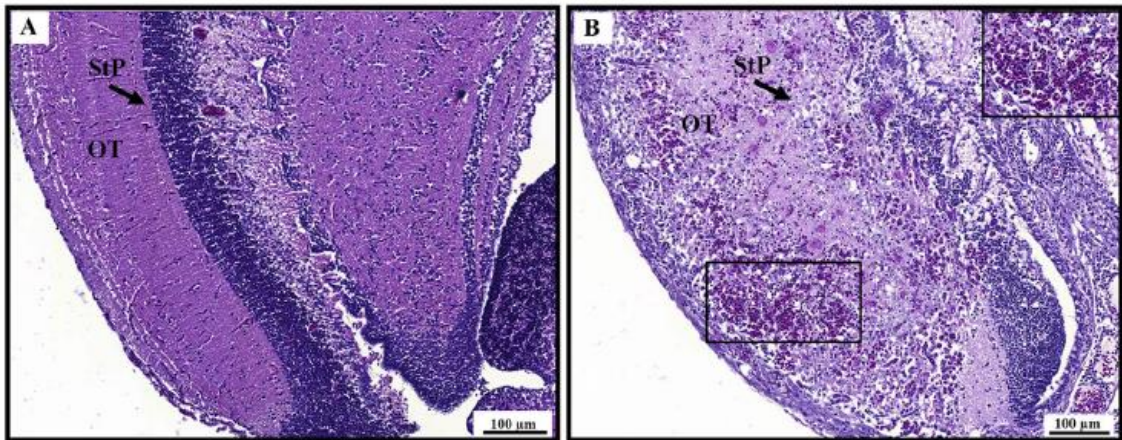
ปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV แสดงอาการเฉื่อยชา และสภาพร่างกายผอมลง พฤติกรรมการว่ายน้ำผิดปกติ มีภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง บริเวณตาของปลา มีลักษณะบวมโป่งทั้งสองด้าน ส่วนของเลนส์กระจกตามีลักษณะขุ่น ในปลาที่ติดเชื้อรุนแรงพบการลอกหลุดของเลนส์ตา บริเวณที่ผิวหนังเกิดรอยโรคแผลแบบลอกหลุด พบจุดเลือดออกตามลำตัว เกิดขี้ตั้ง ช่องท้องขยายใหญ่ นอกจากนี้บริเวณเยื่อหุ้มสมองส่วน leptomeninges และ ม้ามพบจุดเลือดออก (ภาพประกอบ 4) (Eyngor et al., 2014; Surachetpong et al., 2017; Tattiyapong et al., 2017)



ภาพประกอบ 4 ปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV มีลักษณะอาการผิวหนังมีแผลจุดเลือดออก ตาบวมโป่ง
ที่มา: (Tattiyapong et al., 2017)

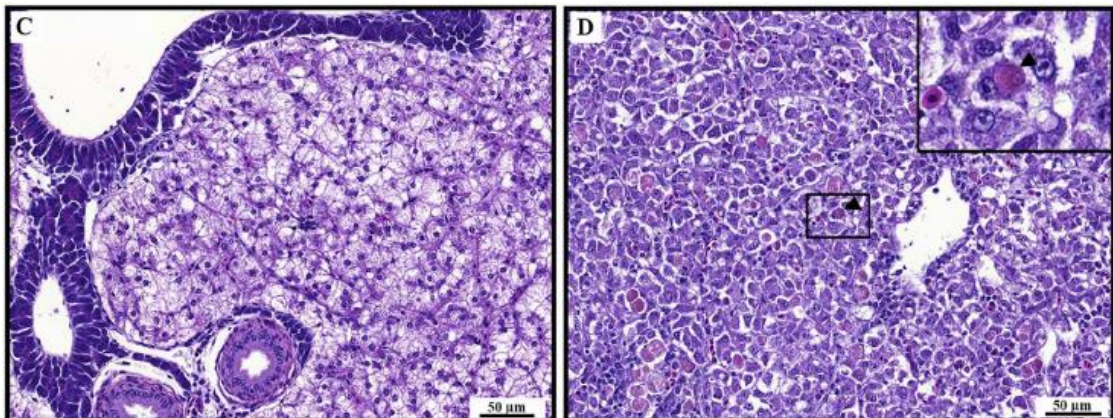
2.3 พยาธิสภาพของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV

การตรวจพยาธิสภาพของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV สามารถตรวจสอบอวัยวะเป้าหมายของการติดเชื้อ ได้แก่ บริเวณสมอง ตับ ไต ม้าม หัวใจ ของปลานิล ลักษณะของเนื้อเยื่อของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV บริเวณของสมองจะมีอาการคั่งของเลือดรวมตัวกันเป็นจุด (multifocal hemorrhages) และมีการแพร่กระจายของ glial cells (ภาพประกอบ 5) ในส่วนของบริเวณตับ ลักษณะของเนื้อเยื่อของปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV นั้นเซลล์จะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม (syncytial cell formation) และเกิดการอักเสบที่บริเวณของเซลล์ตับ (hepatocellular necrosis) (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 5 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณสมอง ภาพ A เนื้อเยื่อบริเวณสมองของปลาที่ไม่ติดเชื้อ และ ภาพ B เนื้อเยื่อบริเวณสมองส่วน optic tectum :OT และบริเวณ stratum periventriculare :StP ของปลาที่ติดเชื้อ ในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงอาการคั่งของเลือดรวมตัวกันเป็นจุด (multifocal hemorrhages)

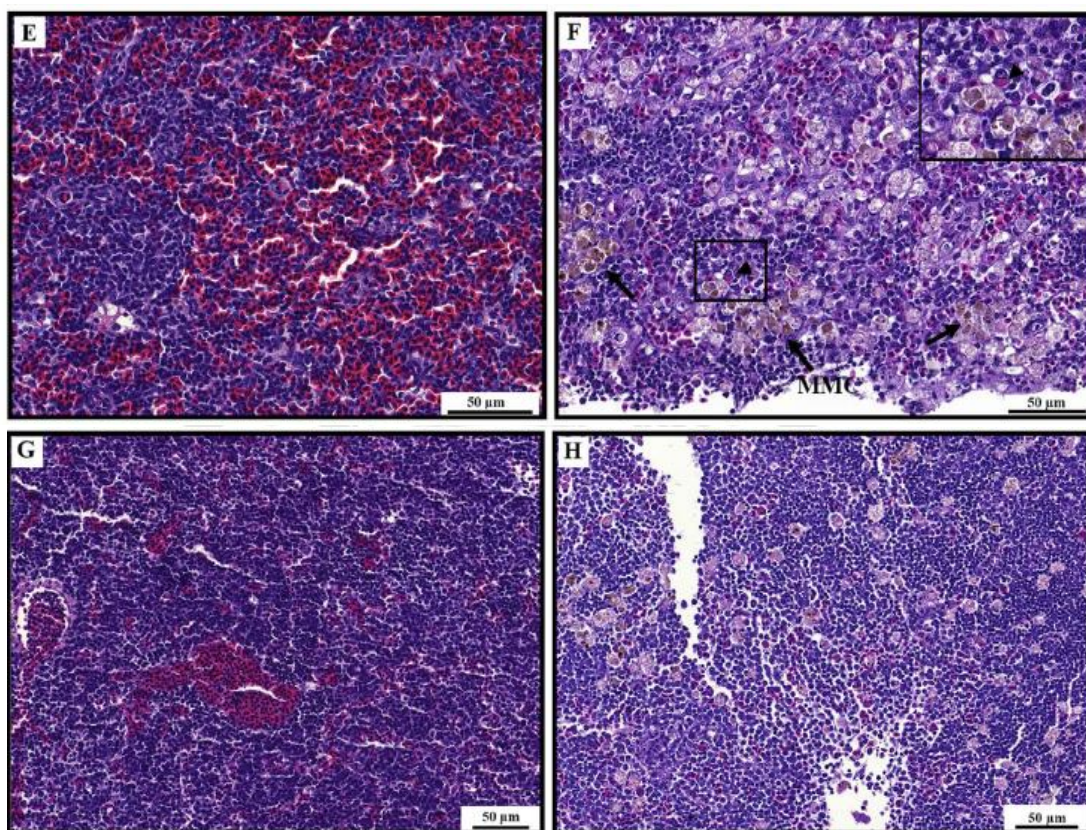
ที่มา: (Tattiyapong et al., 2017)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณตับ ภาพ C เนื้อเยื่อบริเวณตับของปลาที่ไม่ติดเชื้อ และ ภาพ D เนื้อเยื่อบริเวณตับของปลาที่ติดเชื้อในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์ตับ การเกิดการอักเสบและการเกิด hepatocellular necrosis

ที่มา: (Tattiyapong et al., 2017)

บริเวณม้ามและไตของปลาชนิดที่ติดเชื้อไวรัส TiLV เนื้อเยื่อบริเวณม้ามมีอาการอักเสบ (inflammatory cells) มีการเพิ่มจำนวนของ melanomacrophage เป็นจำนวนมาก (melanomacrophage center : MMC) และพบการรวมกลุ่มของ inclusion bodies (ภาพประกอบ 7)



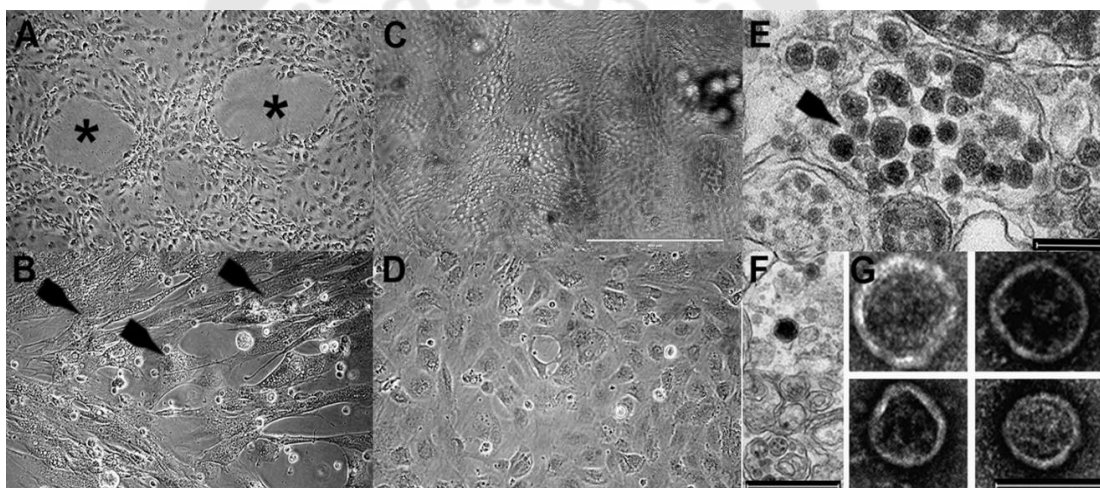
ภาพประกอบ 7 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณม้ามและไต ภาพ E เนื้อเยื่อบริเวณม้ามของปลาที่ไม่ติดเชื้อ ,ภาพ F เนื้อเยื่อบริเวณม้ามของปลาที่ติดเชื้อในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงการเพิ่มจำนวนของ melanomacrophage ภาพ G เนื้อเยื่อบริเวณไตของปลาที่ไม่ติดเชื้อ และ ภาพ H เนื้อเยื่อบริเวณไตของปลาที่ติดเชื้อมีลักษณะของเซลล์ที่มีอาการอักเสบ (inflammatory cells) และการเพิ่มจำนวนของ melanomacrophage

ที่มา: (Tattiyapong et al., 2017)

3. การศึกษาและการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV

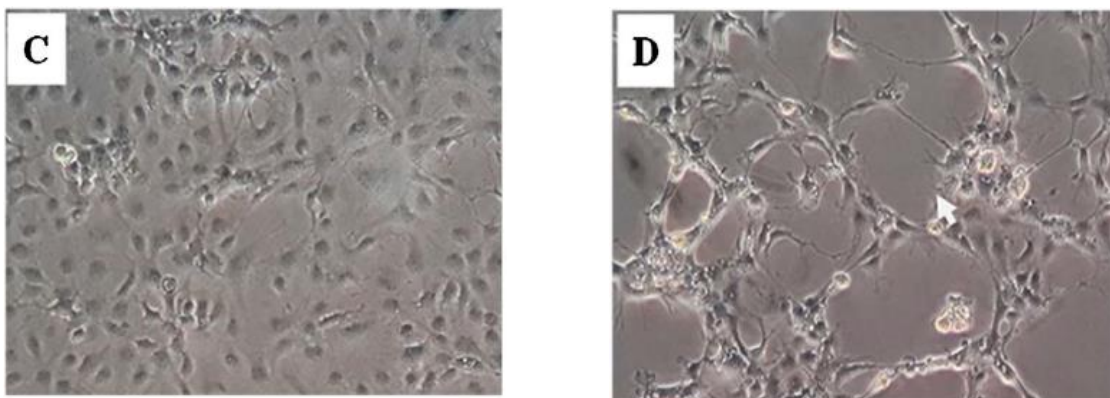
3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส TiLV

มีการศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงไวรัส TiLV ในเซลล์เพาะเลี้ยง primary tilapia brain cells หรือ E-11 cell line จากการศึกษพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนไวรัส TiLV ได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสได้จากการดูลักษณะของเซลล์ พบเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีลักษณะกลมเกาะกลุ่มเล็กๆ และค่อยๆ ขยายเป็นกลุ่มก้อนซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเชื้อไวรัส เรียกว่าเกิด cytopathic effect (CPE) (ภาพประกอบ 8 และ 9) ในระยะเวลา 5-10 วัน โดยทำการยืนยันผลการศึกษาโดยวิธี RT-PCR การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Eyngor et al., 2014) จากนั้น Tsofack และคณะ ได้มีการศึกษาในการหาอนุหภูมิ และปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์ให้ดีขึ้น (Tsofack et al., 2017)



ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบลักษณะไวรัสที่ทำการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภาพ A เซลล์เพาะเลี้ยง E-11 หลังจากทำให้ติดเชื้อ 5 วัน เซลล์มีลักษณะของ CPE และพบบริเวณที่เซลล์ก่อกันเป็น plaque formation(*), ภาพ B เซลล์เพาะเลี้ยง primary tilapia brain cells หลังจากติดเชื้อ 10 วัน พบลักษณะการของ CPE ถูกตรึงแสดงถึงการยึดยวของเซลล์มีลักษณะบวมรวมกันเป็นก้อน, ภาพ C เซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ปกติ, ภาพ D เซลล์เพาะเลี้ยง primary tilapia brain cells ปกติ, ภาพ E และ F ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของไวรัส มีขนาดอยู่ที่ 55-60 นาโนเมตร และ ภาพ G การย้อมสีแบบเนกาทีฟ (negative staining) เพื่อดูโครงสร้างของไวรัส

ที่มา: (Eyngor et al., 2014)



ภาพประกอบ 9 การตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัส TiLV ในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 โดยดูจากลักษณะของเซลล์ cytopathic effect (CPE) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภาพ C เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ปกติ และภาพ D เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ที่ติดไวรัส TiLV

ที่มา: (Tattiyapong et al., 2017)

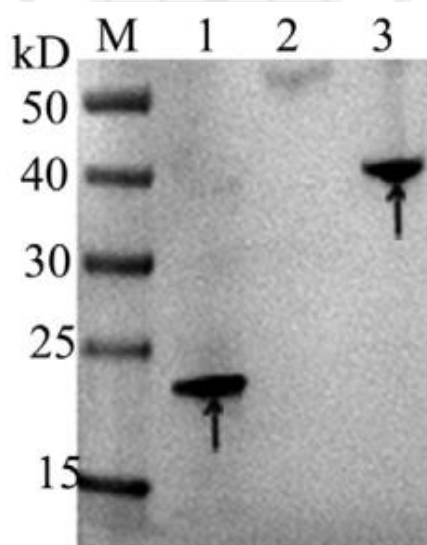
3.2 การตรวจการติดเชื้อ TiLV โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

มีการรายงานการตรวจการติดเชื้อ TiLV ครั้งแรกในปี 2014 โดยมีการออกแบบและพัฒนา PCR primer set ได้แก่ Nested ext-1, Nested ext-2 และ ME1, 7450/150R/ME2 ที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธีการ reverse transcriptase RT-PCR ซึ่งผลผลิตของ RT-PCR ที่ได้มีขนาด 491 และ 250 คู่เบส ตามลำดับ (Eyngor et al., 2014) ซึ่งผลการตรวจยังมีความแม่นยำน้อย จึงมีการพัฒนาวิธี nested RT-PCR ให้มีความแม่นยำและความไวต่อการตรวจสอบเชื้อ TiLV มากขึ้นเพื่อตรวจตัวอย่างปลาติดเชื้อจากประเทศ อิสราเอล, เอกวาดอร์ และโคลอมเบีย จากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วย real-time PCR ขึ้นเพื่อความสะดวกในการตรวจสอบ (Kembou Tsoufak et al., 2017)

ในปัจจุบันวิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ TiLV คือวิธี semi-nested RT-PCR ซึ่งถูกปรับปรุงให้มีความสามารถในการตรวจที่ไวกว่าวิธี nested RT-PCR โดยสามารถตรวจได้ที่ 7.5 viral copies per reaction (Dong et al., 2017) ต่อมาจากรายงานจากประเทศไทยได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจ โดยใช้ TaqMan probe RT-qPCR โดยมีเป้าหมายเป็น genome segments ที่ 3 ของ TiLV โดยทำการตรวจสอบปลาติดเชื้อในประเทศไทย พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะและความไวในการตรวจสอบที่สูง (Waiymitra et al., 2018)

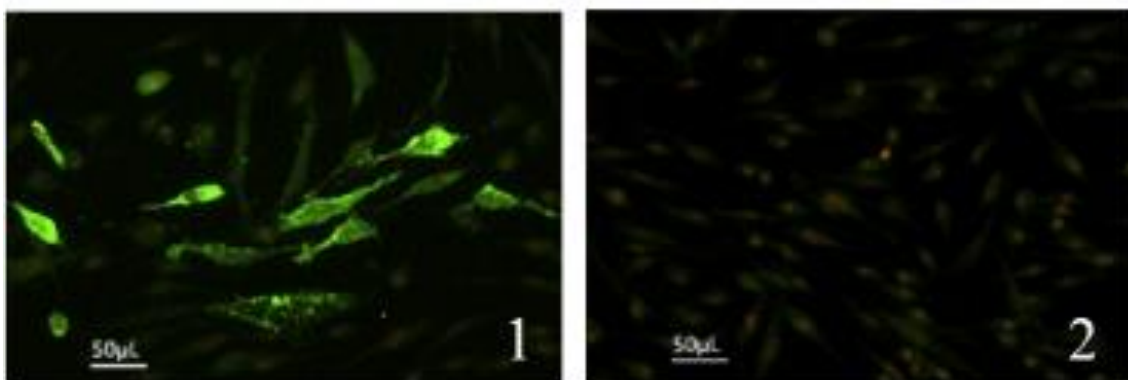
3.3 การตรวจการติดเชื้อ TiLV โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

นอกจากการตรวจการติดเชื้อ TiLV ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลแล้ว ได้มีการพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยงานวิจัยของ Hu และคนอื่นๆ ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) จากการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์มาใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนู เมื่อตรวจด้วยวิธี Western blotting พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจเชื้อ TiLV มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 19 กิโลดาลตัน และรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตันได้ (ภาพประกอบ 10) และได้มีการพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันในการตรวจเชื้อ TiLV ด้วยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV segment 8 พบว่าสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลได้ นอกจากนี้ยังได้ใช้วิธี immunofluorescence assay (IFA) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV โดยทำการตรวจเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสพบว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อ TiLV segment 8 protein กับ เชื้อไวรัส TiLV ในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 สืบเนื่องจากการเรืองแสงของสี fluorescence (ภาพประกอบ 11) (Hu et al., 2020)



ภาพประกอบ 10 การตรวจด้วยวิธี Western blotting (1) เซลล์เพาะที่ติดเชื้อ TiLV, (2) เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ และ (3) รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV S8 โดยลูกศร แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีและแอนติเจนที่จับกันด้วยวิธี Western blotting

ที่มา: (Hu et al., 2020)



ภาพประกอบ 11 immunofluorescence assay (IFA) จากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อ S8 protein กับ เชื้อไวรัส TiLV ในเซลล์เพาะเลี้ยง E-11 ภาพ 1 เซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ TiLV และ ภาพ 2 เซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ติดเชื้อ TiLV

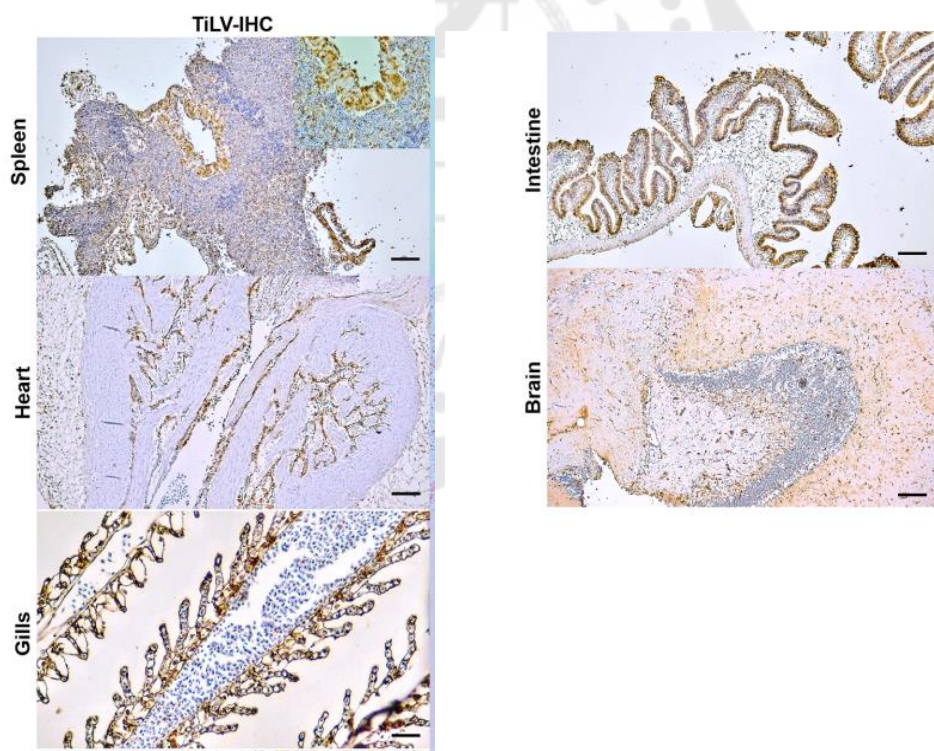
ที่มา: (Hu et al., 2020)

จากการประยุกต์ใช้วิธี indirect ELISA ในการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV พบว่าสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลได้และเมื่อเทียบกับวิธี semi-nested PCR มีความไว (sensitivity) อยู่ที่ 80.8% ค่าความจำเพาะ (specificity) อยู่ที่ 95.6% และในส่วนของวิธี indirect ELISA เทียบกับวิธี immunofluorescence assay (IFA) พบมีความไวอยู่ที่ 100% ค่าความจำเพาะอยู่ที่ 92.6% (Hu et al., 2020)

จากการศึกษาจีโนมของ TiLV มีรายงานว่า TiLV เป็น negative-sense single-stranded RNA (-ssRNA) virus ที่ประกอบด้วย 10 genome segments โดยทุก segment ถอดรหัสได้โปรตีน 1 ตัว มีบริเวณปลาย 5' และ 3' เป็น non-coding regions ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Orthomyxo-like virus มีส่วนของ segment 1 ที่มีลักษณะคล้ายกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ influenza C virus polymerase basic 1 (PB1) segment และ TiLV มี genome total size มีความยาว 10,323 kb (Bacharach et al., 2016; Eyngor et al., 2014) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาฟังก์ชันการทำงานของทั้ง 10 segment (Bacharach et al., 2016; Surachetpong et al., 2017)

จากการศึกษาเกี่ยวกับ segment ต่าง ๆ ของ TiLV เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของ TiLV พบรายงานในปี 2020 ได้ทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (antigenicity) ที่เกิดขึ้นของ segment ต่าง ๆ ซึ่งผลสรุปที่ได้คือ TiLV segment 8 มีความสามารถในการเป็น antigenicity หรือ immunogen ที่ให้ผลดีที่สุดจากผลทดสอบด้วยแอนติบอดีต่อ TiLV segment 8 protein กับ เชื้อไวรัส TiLV ด้วยวิธี western blotting และ immunofluorescence assay (Hu et al., 2020)

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ anti-TiLV IgG antibody จากการทดสอบปฏิกิริยา ด้วยวิธี immunohistochemistry ภายในเนื้อเยื่อของปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV สามารถตรวจสอบการติดเชื้อของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 12) (Piewbang, Tattiyapong, Techangamsuwan, & Surachetpong, 2021)



ภาพประกอบ 12 การตรวจการติดเชื้อ TiLV ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry

ที่มา: (Piewbang et al., 2021)

ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงเลือกใช้ TiLV segment 8 (TiLV-S8) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ TiLV segment 8 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน จำนวน 178 ตัว (GenBank accession no. MN687722.1) (ภาพประกอบ 13) โดยการนำพลาสมิด pET15-b ที่มียีนของโปรตีน TiLV-S8 ที่ผลิตโดยบริษัท Genscript (New Jersey, USA) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 แล้วกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ และคัดเลือกหนูตัวที่ให้ผลดีที่สุด มาทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

```

                                atg gct caa att cca aca cta aga gag ggc caa ggg aag ctc tac gat ttc acg ctc aac
M   A   Q   I   P   T   L   R   E   G   Q   G   K   L   Y   D   F   T   L   N
ggc atg aca gtc act aga gac aca gtc aac act gta gtt gct ctg gag ttt ctt gtc aat
G   M   T   V   T   R   D   T   V   N   T   V   V   A   L   E   F   L   V   N
gca agc tcg gat ttg ctt tcc cta aca att ggc gaa ggc ctc tca gaa gaa aca aag ttt
A   S   S   D   L   L   S   L   T   I   G   E   G   L   S   E   E   T   K   F
aaa cac ctg ctt gtt aag cac gcc ggt atg acc cga aag cgg ata gag gaa agg ctg gga
K   H   L   L   V   K   H   A   G   M   T   R   K   R   I   E   E   R   L   G
cga atc tcg agg cga gtc agt gtc aca gtc gac gca att ata ata aca aac cgc aag ggt
R   I   S   R   R   V   S   V   T   V   D   A   I   I   I   I   T   N   R   K   G
caa aga ttt gaa ttc aat cgg aaa cag tac ctg gat att gcc aaa caa gct atg aag ctt
Q   R   F   E   F   N   R   K   Q   Y   L   D   I   A   K   Q   A   M   K   L
aag ctc cct ggg att aac tgc gtc gac ata ccc act gcg ctc gct ttt ctc gag gaa gtc
K   L   P   G   I   N   C   V   D   I   P   T   A   L   A   F   L   E   E   V
ctg gca act gct ttg aag gac act gaa ggt tca caa gat gac aga atg gcc ctt aag gca
L   A   T   A   L   K   D   T   E   G   S   Q   D   D   R   M   A   L   K   A
gac act tct gct gct atc aat cat ttc cgt gaa atg ctt aaa taa
D   T   S   A   A   I   N   H   F   R   E   M   L   K   -

```

ภาพประกอบ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ TiLV segment 8

ที่มา: (GenBank accession no. MN687722.1)

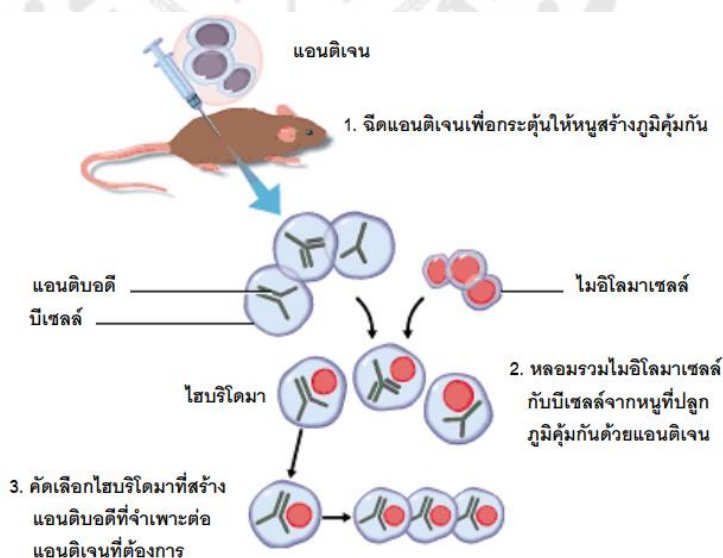
4. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: MAbs)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์ (B-cell หรือ B-lymphocytes) เซลล์เดียวทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีนั้นมีคุณสมบัติที่เหมือนกัน ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของโปรตีนสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่าง ๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปโดยรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลี

โคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่าง ๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

4.1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยหลักการหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้ถูกคิดค้นเป็นผลสำเร็จโดย Köhler และ Milstein ในปี ค.ศ.1975 โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมารวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) โดยคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่มีอายุจำกัดไม่สามารถมีชีวิตยาวนาน ส่วนไมอีโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่มีความสามารถในการแบ่งตัวเติบโตได้ตลอดและเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีวันตาย จากการหลอมรวมกันทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวไม่มีที่สิ้นสุดจากคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 14) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพประกอบ 14 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

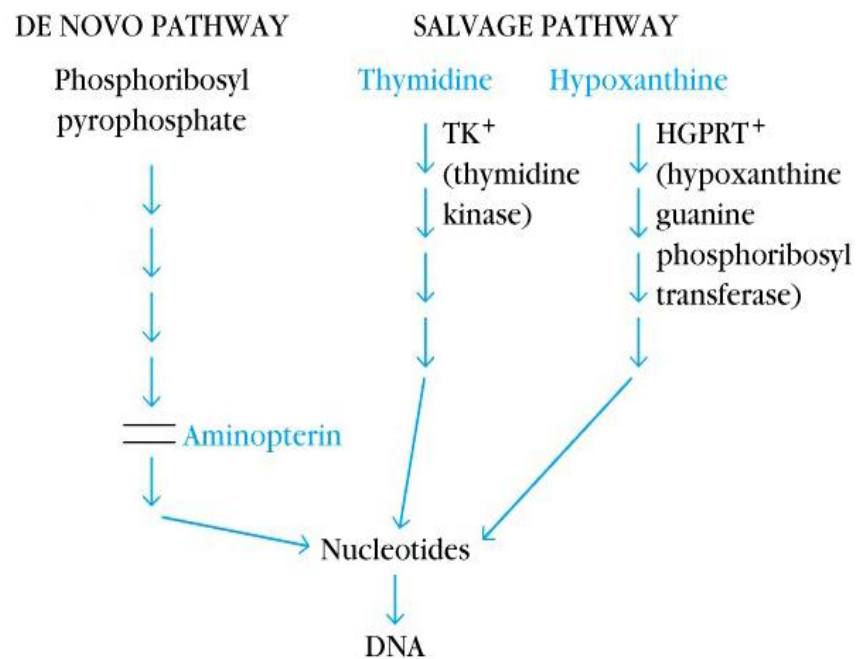
ที่มา: (หทัยทิพย์ สุขสดใส, 2551)

4.2 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากที่มีการหลอมรวมไมอิโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีโดยการใช้อนุพันธ์โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ซึ่งในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด โดยจะมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่เกิดการหลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสภาพที่เหมาะสมที่ในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้มีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ โดยทั่วไปเซลล์ไมอิโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในขบวนการ salvage pathway คือมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT-) ให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium ไมอิโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอิโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 ขบวนการ คือ de novo pathway และ salvage pathway ในกรณีของ de novo pathway จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ 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) และเอนไซม์ 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 (ภาพประกอบ 15) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

สำหรับการผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมอิลوماเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกัน คือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT⁻ และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻ mutant) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์มะเร็ง ส่วนไมอิลوماเซลล์เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ การทดสอบทางวิทยภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆ เช่นวิธี dot-blotting, western blotting และ immunohistochemistry เมื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำเพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สติทธิกรกุล, 2548)



ภาพประกอบ 15 แนวทางการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo pathway และ salvage pathway และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo pathway

ที่มา: (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาประยุกต์ใช้ในหลาย ๆ ด้าน ได้แก่ ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการใช้รักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ การตรวจโรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ การวัดปริมาณยาในเลือด การตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส TiLV นั้นยังไม่พบว่ามีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส TiLV ได้ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการวิจัยแรกเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส TiLV สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในปลานิล เพื่อที่จะสามารถแยกปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ออกและกำจัด สำหรับเป็นการป้องกันการสูญเสียของเกษตรกรที่ทำฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

- หนูเมาส์ (Swiss mouse) อายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขต ศาลายา จังหวัดนครปฐม
- พลาสมิด pET15-b ที่มีเอ็นโปรตีนของ TiLV segment-8
- ปลานิลและปลาทับทิมจากฟาร์มเลี้ยงปลาในบริเวณภาคกลางของประเทศไทย สำหรับการดำเนินการเกี่ยวกับสัตว์ทดลองได้รับอนุญาตภายใต้การควบคุมของ คณะกรรมการควบคุมการใช้สัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ตามเอกสารการอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองเพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ CO/AE-002-2566

แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (LB broth)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 1

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์	Bio-Rad
2. ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
3. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
4. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
5. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	Scientific industries
6. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ cell culture (horizontal laminar flow cabinets)	NUAIRE
7. ตู้ biosafety cabinet	NUAIRE
8. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ incubator)	NUAIRE
9. เครื่อง spectrophotometer	JANWAY
10. เครื่อง Thermo iEMS Microplate Reader	Thermo scientific
11. เครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer	Thermo scientific
12. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135	LEICA
13. แท่งอุ่นสไลด์ (Slide warmer)	Medax

14. เครื่อง Autoclave รุ่น HA-36	Hirayama Manufacturing
15. Memmert Water Bath	Memmert
17. กล้อง compound microscope	Olympus
18. เครื่องชั่ง รุ่น A200S	Sartorius
19. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo
20. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	Sanyo
21. เครื่อง spectrophotometer รุ่น 6400	JENWAY

เคมีภัณฑ์

สารเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

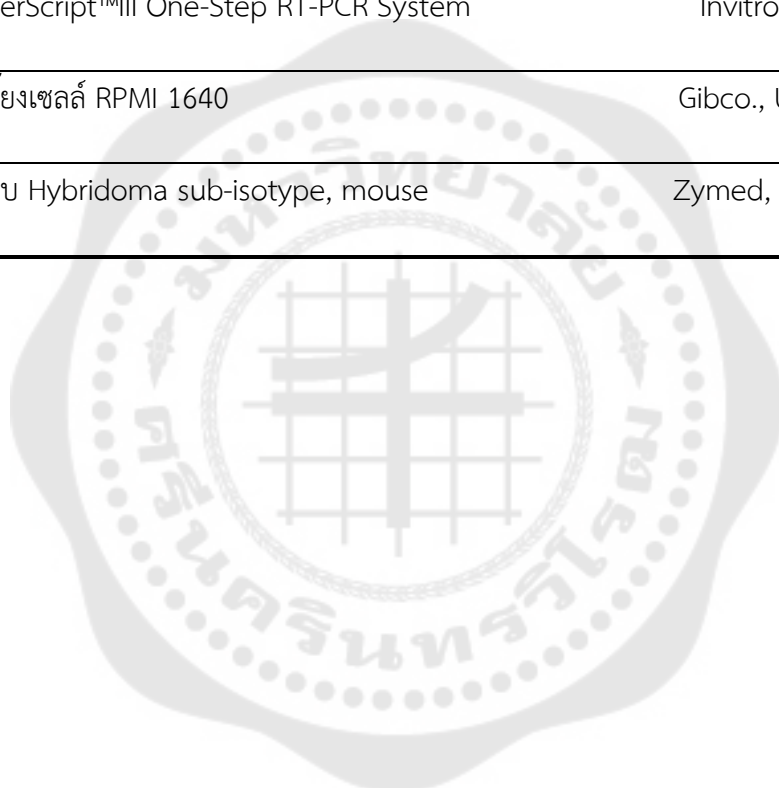
ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. Ampicillin	Sigma
2. pET15-b expression vector	New England Biolab
3. Glycine	Research Organics
4. Fetal bovine serum	Gibco., U.S.A.
5. Polyethylene glycol (PEG)	Sigma., U.S.A.
6. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma., U.S.A.

7. Hypoxanthine	Gibco., U.S.A.
8. Nitrocellulose membrane	Sigma., U.S.A.
9. D-glucose	Gibco., U.S.A.
10. L-glutamine	Gibco., U.S.A.
11. Sodium pyruvate (C ₃ H ₃ O ₃ Na)	Sigma., U.S.A.
12. NaHCO ₃	Amresco
13. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	Amresco
HT supplement	Gibco, U.S.A.
14. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed, U.S.A
14. Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad
15. Tris aminomethane	Promega
16. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma., U.S.A.
17. Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Sigma., U.S.A.
18. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad, U.S.A.
19. SDS molecular weight markers	Sigma, U.S.A.
20. Acrylamide	GE healthcare
21. Mercaptoethanol	Sigma., U.S.A.
22. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide)	Bio-Rad, U.S.A.

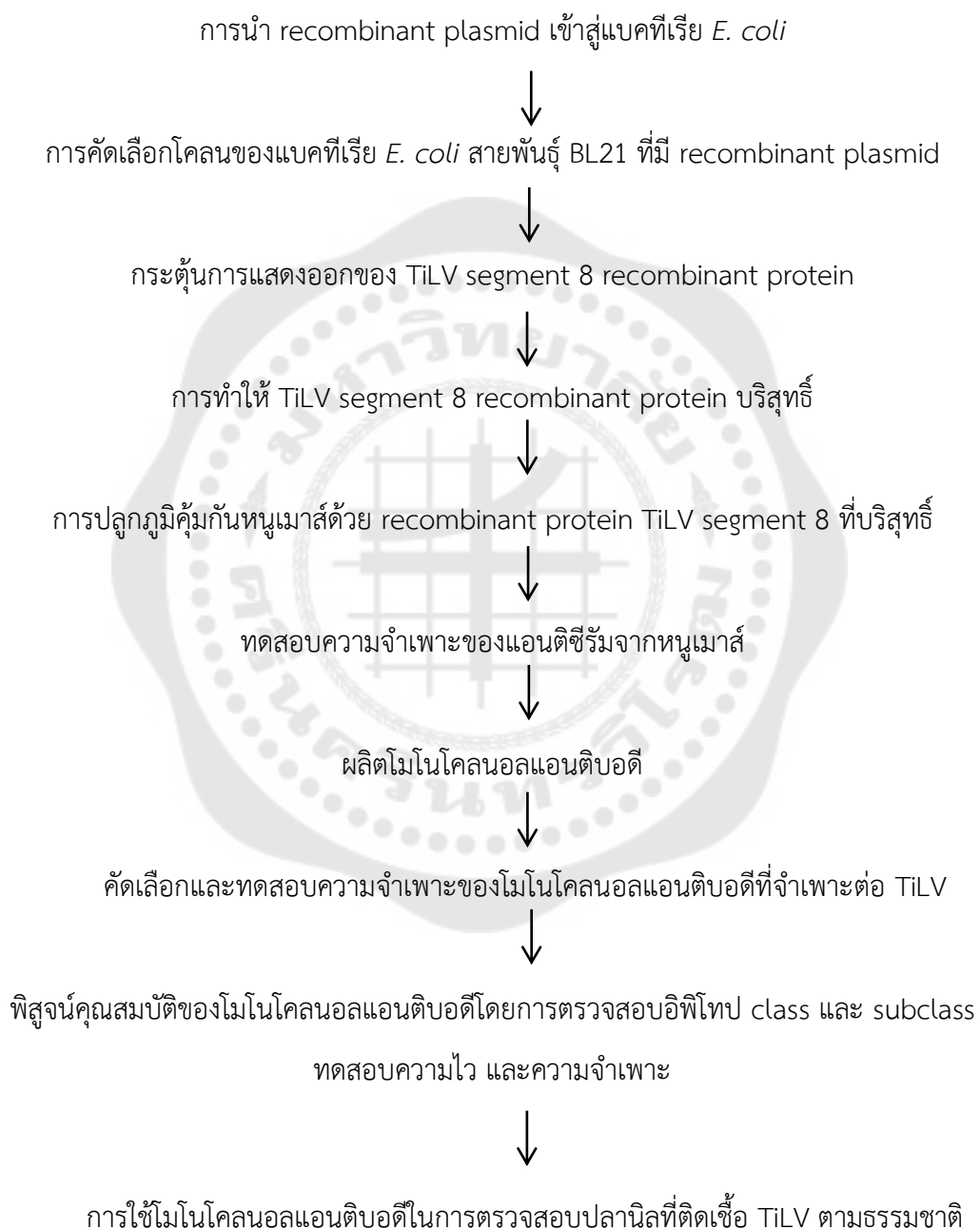
23. Tris (hydroxyethyl) aminomethane	Bio-Rad, U.S.A.
24. Triton X-100	Sigma., U.S.A.
25. Ammonium sulfate	Promega
26. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)	BDH
27. N-butyl alcohol	Univar
28. Xylene	Carlo Erba
29. Formaldehyde	Carlo Erba
30. Paraplast plus paraffin	LEICA
31. TEMED	Sigma., U.S.A.
32. Cobalt Chloride (CoCl ₂)	Sigma., U.S.A.
33. Hydrogen peroxide	Sigma., U.S.A.
34. O-Phenylenediamine (OPD)	Sigma., U.S.A.
35. Coomassie brilliant blue R-250	Sigma., U.S.A.
36. Protein standard (Kaleidoscope™)	Bio-Rad
37. Davidson's fixative	ดูภาคผนวก
38. สารละลาย P1+ (calf bovine serum: PBS dilution 1:10)	ดูภาคผนวก
39. สีสียโอซิน (Eosin Y)	Harleco (ภาคผนวก)
40. สีสีมาทอกไซลีน (Haematoxylin)	Harleco (ภาคผนวก)

41. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution)	DIFCO (ภาคผนวก)
42. Permount	Fischer Scientific
43. Paraplast	Sherwood
44. ชุดสกัด Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extration Kit	iNtRON Biotechnology
45. ชุด SuperScript™III One-Step RT-PCR System	Invitrogen
46. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	Gibco., U.S.A.
47. ชุดทดสอบ Hybridoma sub-isotype, mouse	Zymed, U.S.A.



วิธีการดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนต่างๆ สามารถสรุปได้ดังนี้



1. การนำ recombinant plasmid เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

การนำพลาสมิด pET15-b ที่มียีนของโปรตีน TiLV-S8 (GenBank accession no. MN687722.1) ที่ผลิตโดยบริษัท Genscript (New Jersey, USA) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด TiLV-S8 pET-15b ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้น วางลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำลงอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (heat-shock) แล้วนำลงวางในน้ำแข็งอีกครั้ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม LB broth ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสออก และเติม Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อ resuspend ตะกอน ก่อนนำไป spread บน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร LB broth และกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การคัดเลือกโคลนและการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 (TiLV segment-8 recombinant protein)

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด TiLV-S8 มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มีกาโรสยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำ starter โดยเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีกาโรสยาปฏิชีวนะและอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาขยายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 ให้มีค่าดูดกลืนแสง (O.D) อยู่ในช่วง 0.5-0.7 จากนั้นใส่ Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) เพื่อเป็นตัว inducer แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างของตะกอนมาผสมกับ Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง (Sonicate) จากนั้นนำมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 6,000 xg ทำการแยก

ตะกอนและสารละลายออกมาแล้ว นำส่วนสารละลายแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตะกอนและส่วนของสารละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 จากข้อ 2 มาผสมกับ 2X SDS-treatment buffer อัตราส่วน 1:1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที ผ่าน 15% SDS-PAGE จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาทำการย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วล้างด้วย Destain I (45% Methanol, 9% Glacial acetic acid) และ Destain II (5% Methanol, 7% Acetic acid) ตามลำดับจนกว่าสีส่วนเกินจะหลุดออกจนหมด แล้วตรวจสอบผลของแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน

4. การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV-S8 ให้บริสุทธิ์

เนื่องจากพลาสมิด pET15-b ที่ทำการโคลนยีน TiLV-S8 มีการติดฉลาก Histidine tag ดังนั้นในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ จึงนำไปแยกผ่าน metal ion affinity column HisTrap FF (GE Healthcare, USA) แล้วทำการล้างโปรตีนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย binding buffer (20 mM Na_3PO_4 , 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) ก่อนชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (20 mM Na_3PO_4 , 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) เก็บสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร ไปตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากนั้นรวบรวม fraction ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำโปรตีนที่ได้มาใส่ถุง dialysis เพื่อกำจัดสาร imidazole โดยแช่ใน PBS และทำการเปลี่ยน PBS ออกทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยใช้ชุด Vivaspin 6 (GE Healthcare) ที่มี molecular weight cut off 10 kDa นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 15-30 นาที ทำการวัดความเข้มข้นของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford protein assay โดยเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) แล้วทำการเก็บโปรตีน TiLV-S8 แบ่งใส่หลอดเก็บรักษา

ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูเมาส์เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี

5. การเตรียมตัวอย่างปลานิลติดเชื้อ TiLV

ทำการรวบรวมตัวอย่างปลานิลที่มีการติดเชื้อ TiLV จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลในจังหวัดต่างๆ ของประเทศ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก CPF ฟาร์มหาดเจ้าวิจัยและพัฒนาปลา) นำมาทำการตรวจยืนยันการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR โดยมีวิธีการและขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

5.1 การเตรียม RNA ของ TiLV

นำตัวอย่างอวัยวะต่างๆ ของปลานิล ได้แก่บริเวณสมอง เหงือก มาบดใน lysis buffer นำสารละลายที่บดได้ปริมาณ 200 ไมโครลิตรมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extration Kit (iNtRON Biotechnology) ตามขั้นตอนต่างๆ ในคู่มือการใช้งาน RNA ที่ได้จะละลายใน elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

5.2 การตรวจการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจการติดเชื้อ TiLV ในปลานิลด้วยวิธี RT-PCR ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีน ของ TiLV โดยนำ RNA ที่สกัดได้ (จากข้อ 5.1) มาเป็น template ใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ Taq DNA polymerase ซึ่งผสมสารต่างๆ ดังตาราง 3 จากนั้นนำหลอดที่ผสมสารต่างๆ ใส่ในเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิและเวลาตามตาราง 4 สำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีน โดย primer Nested ext-1 และ Nested ext-2 (Eyngor et al., 2014) สำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีน ของ TiLV มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer: (Nested ext-1) 5'-TATGCAGTACTTTCCCTGCC-3'

Reverse primer: (Nested ext-2) 5'-TTGCTCTGAGCAAGAGTACC-3'

ตาราง 3 ส่วนผสมของสารต่างๆที่ใช้ในการทำ RT-PCR

ส่วนผสมของการทำ RT-PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA ที่สกัดจากปลานิล	2
SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	0.5
2X Reaction Mix (0.4 mM dNTP, 2.4 mM MgSO ₄)	12.5
Forward primer (Nested ext-1)	0.5
Reverse primer (Nested ext-2)	0.5
Deionized Water	9
ปริมาตรสุทธิ	25.0

ตาราง 4 ขั้นตอนอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีนโปรตีนของ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
1. cDNA synthesis	50	30	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3-5 เป็น จำนวน 40 รอบ
2. pre-denaturation	95	2	
3. denaturation	95	0.30	
4. annealing	58	0.30	
5. extension	68	0.30	
6. final extension	68	5	

ผลผลิต RT-PCR ที่ได้นำมาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 90 โวลต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผล RT-PCR ของ TiLV มีขนาดอยู่ที่ 491 คู่เบส โดยปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV จะนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ TiLV ต่อไป

6. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์

นำหนูเมาส์จำนวน 4 ตัวมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 4 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการฉีดเป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยเว้นห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ โดยครั้งแรกทำการฉีดสารผสมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 กับ complete Freund's adjuvant ส่วนในครั้งต่อ ๆ มาทำการฉีดรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหนู 1 ตัว เช่นเดียวกันในทุก ๆ ครั้งหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการเก็บซีรัมของหนูเมาส์แต่ละตัวมาตรวจสอบการตอบสนอง โดยใช้วิธี western blot แล้วทำการคัดเลือกหนูที่มีการตอบสนองที่ดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

7. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV-S8

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษานี้ ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิมของ Köhler และ Milstein ซึ่งได้รับการดัดแปลงโดย Mosmann, Bauman และ Williamson ในปี 1979 โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่มีการตอบสนองของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยผ่าตัดม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นนำมาหลอมรวมกับ P3X โดยใช้ 40% polyethylene glycol (PEG) จากนั้นนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน selective medium-HAT medium ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal bovine serum ใน RPMI medium และ 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน 96 wells microculture plate และบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการเติบโตของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่าง ๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมาไป

คัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และเชื้อ TiLV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ วิธี immunohistochemistry

8. การคัดเลือกไฮบริโดมา

จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน 96 well plate จำนวน 15 เพลต ทำให้ได้ไฮบริโดมาจำนวนมากจึงจำเป็นต้องทำการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อนจากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากโคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting มาคัดเลือกต่อในขั้นตอนที่ 2 โดยวิธี Western blotting และ วิธี immunohistochemistry

8.1 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting

สำหรับการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV ด้วยวิธี dot blotting ทำโดยแยกการหยดแอนติเจนบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด แบ่งออกเป็นสองส่วนคือ 1) lysate ที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* นำมาเจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1:50 เพื่อเป็น Negative control และ 2) รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่เจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นที่ 1:100 เป็น Positive control จากนั้นทิ้งให้แห้งแล้วนำไปบ่มในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาแต่ละหลุม (น้ำเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 1:10 ใน 1% blotto) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการล้างด้วย PBS แล้วทำการบ่มซ้ำด้วย goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1:3000 เท่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS จากนั้นแช่ด้วยสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) โดยละลายใน PBS จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาเพื่อหยุดปฏิกิริยา เลือกลโคลนไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8

8.2 การคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี western blot

นำสารสกัดจากเนื้อเยื่ออวัยวะของตัวอย่างปลาติดเชื้อ TiLV ที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี RT-PCR มาแยกบน 15% SDS-PAGE ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแถบโปรตีนจากแผ่นเจลสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยวิธี western blot นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาบ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาบ่มกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบโดยทำการใส่ด้วยแอนติบอดีจากโคลนไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกจากวิธี dot blotting ในข้อที่ 8.1 ที่เจือจาง 1:50 ใน 1% blotto บ่มใน 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย PBS ทำการบ่มซ้ำด้วย GAM-HRP เจือจาง 1: 3000 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วทำการเติมด้วยสารละลาย substrate เช่นเดียวกับขั้นตอน dot blot ในข้อ 8.1 ตรวจสอบ ปฏิบัติการที่เกิดขึ้นเพื่อยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดี

8.3 การคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี dot blotting

ทำโดยแยกการหัดแอนติเจนบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/หัด แบ่งออกเป็น 4 ส่วนคือ 1) lysate ที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* นำมาเจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1:50 2) รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่เจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นที่ 1:100 3) สารสกัดจากเนื้อเยื่ออวัยวะของตัวอย่างปลานิลปกติ 4) สารสกัดจากเนื้อเยื่ออวัยวะของตัวอย่างปลาติดเชื้อ TiLV จากนั้นทิ้งให้แห้งแล้วนำไปบ่มในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาบ่มกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบโดยทำการใส่ด้วยแอนติบอดีจากโคลนไฮบริโดมา ที่ผ่านการคัดเลือกจากวิธี dot blotting ในข้อที่ 8.1 ที่เจือจาง 1:50 ใน 1% blotto บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย PBS แล้วบ่มซ้ำด้วย GAM-HRP เจือจาง 1: 3000 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วทำการบ่มด้วยสารละลาย substrate เช่นเดียวกับขั้นตอน dot blot ในข้อ 8.1 ตรวจสอบ ปฏิบัติการที่เกิดขึ้นเพื่อยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดี

8.4 การคัดเลือกชั้นที่ 2 โดยวิธี immunohistochemistry

นำตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV มาตัดส่วนเหงือก สมองและอวัยวะภายในของปลา นำมาแช่ใน Bouin solution เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการตรึงโครงสร้างของชิ้นเนื้อ และนำมาแช่ใน Davidson's fixative ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วล้างด้วยน้ำประปาทุกๆ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด fixative ออก ต่อมานำมาผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 70%, 90% และ 95% เอทานอล จากความเข้มข้นน้อยไปมาก ต่อมาใส่ใน บิวทานอล ตามด้วย บิวทานอล : ไชลีน และตามด้วยไชลีน จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltration) ด้วยพาราพลาสต์และฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสต์ (embedding)

นำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ด้วยเครื่องตัดตัวอย่าง (microtome) โดยทำการตัดเนื้อเยื่อหนา 10 ไมโครเมตร ทำการติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ที่ทำการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin solution) แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase โดยนำสไลด์มาล้างด้วยไซลีน และผ่านกระบวนการเติมน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วย ไซลีน บิวทานอล และ แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ จากมากไปน้อย ล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นแช่ใน PBS แล้วบล็อกด้วย P_1^+ (fetal bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS แล้วทำการบ่มด้วย GAM-HRP 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS แล้วทำการบ่มในสารละลายซึบสเตรท ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 โดยละลายใน PBS แล้วล้างด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง นำมาย้อมสีด้วย haematoxylin ทำการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากความเข้มข้นน้อยไปมาก แล้วย้อมด้วยสี eosin Y ตามด้วย บิวทานอล ไซลีน ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ permount ปิดทับด้วย cover glass แล้วนำไปส่งใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยบริเวณที่ติดเชื้อ TiLV จะติดสีน้ำตาลในเซลล์เป้าหมายของเนื้อเยื่อปลานิลที่ติดเชื้อ

9. การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

นำโคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนของ TiLV-S8 ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ขั้นตอน มาโคลนซ้ำ (reclone) ด้วยวิธี limited dilution เพื่อให้แน่ใจว่าโคลนไฮบริโดมาที่ได้มานั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยนำเซลล์ไฮบริโดมากระจายในหลุมโดยการใส่ปิเปตดูดสาร แล้วนำไปหยดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ จากนั้นเติม RPMI medium ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum และ 1% mouse red blood cell ดูดเซลล์ลงใน 96 well plate หลุมละ 110 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาตรวจสอบโคลนเดี่ยว แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี dot botting ต่อไป

10. การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากทดสอบด้วยวิธี dot botting เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นเป็นไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนของ TiLV จากนั้นเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญเติบโต ทำการขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามต้องการ และเก็บเซลล์ทำโดยการดูดเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วทำการปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 1,500 xg เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกจากเซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12% (DMSO) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับเซลล์ แล้วดูดเก็บใส่หลอดสำหรับเก็บเซลล์ (cryopreservation tube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้นำมาทำการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

11. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากการโคลนซ้ำและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากโคลนต่างๆ มาศึกษาคุณสมบัติ โดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ทำการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ TiLV และยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting ดังต่อไปนี้

11.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate 96 well ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมสารละลายในหลุมทิ้งและล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ 1 หรือ 2 ชนิด เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุมต่างๆ (ภาพประกอบ 16) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนเทออกแล้วล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1: 1,500 ในสารละลาย 1% blotto

ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายซับสเตรตประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006% H₂O₂ ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N H₂SO₄ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

MAbs	A	B	C	D
A	A+A	A+B	A+C	A+D
B		B+B	B+C	B+D
C			C+C	C+D
D				D+D

ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบอิมูโนโพรตีนของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV-S8 หรือผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด (ตัวอักษร A-D แสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

11.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's mouse MonoAb (HRP) ดังนี้ ทำการตรึง goat anti-mouse Ig heavy chain and light chain specific antibody (GAM H+L) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงที่พื้นผิวของเพลท ELISA บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเททิ้งจากนั้นล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที เทออกก่อนเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1: 20 ในสารละลาย 1% blotto ปริมาตร

50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ (1-12) (ภาพประกอบ 17) ปุ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเทออกและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนเติม rabbit anti-isotype antibody แต่ละชนิดเจือจาง 1:50 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแถวแต่ละแถว (A-H) (ภาพประกอบ 18) ปุ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนเทออกและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม Goat Anti-Rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1: 1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปุ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทออกและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายซับสเตรทและหยุดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการตรวจสอบอิมูโนโอบีโอทีปในข้อ 11.1 สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจะให้สีเหลืองส้ม 1 หลุมตาม isotype และอีก 1 หลุมตามชนิดของโปรตีนสายสั้น (light chain)

	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ภาพประกอบ 17 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA ลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบลงในแต่ละคอลัมน์ (1 คอลัมน์ต่อ 1 โคลนที่ต้องการทดสอบ)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IgG ₁	→	A											
IgG _{2a}	→	B											
IgG _{2b}	→	C											
IgG ₃	→	D											
IgA	→	E											
IgM	→	F											
Kappa	→	G											
Lambda	→	H											

ภาพประกอบ 18 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA ลูกศรแสดงการเติม rabbit anti-isotype antibody แต่ละชนิดในแต่ละแถว ตั้งแต่แถว A-H

11.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ TiLV

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และสารสกัดจากเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ TiLV มาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนเจือจาง 1:100 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มกับ GAM-HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายซับสเตรท ตรวจดูระดับความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แสดงปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และสารสกัดจากเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ TiLV โดยสังเกตความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยาและเกิดตะกอนสีดำบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และนำตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ TiLV ไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยทำการเจือจางแบบ 10 fold serial dilution แล้วนำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบด้วยวิธี RT-PCR เช่นเดียวกับในข้อ 5.2 เปรียบเทียบระดับความเจือจางสูงสุดที่สามารถเห็นผลผลิตจากการทำ RT-PCR กับการทดสอบโดยการใช้นิโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting และ RT-PCR ที่สังเกตเห็นได้

11.4 ทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting

ทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อไวรัส และแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ เชื้อไวรัส Red grouper nervous necrosis virus (RGNNV), Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), Scale Drop Disease Virus (SDDV) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในปลากะพงขาว หรือแบคทีเรีย ได้แก่, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Flectobacillus roseus*, *Chryseobacterium massiliae*, *C. taichungense*, *Vibrio vulnificus*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อไวรัส RGNNV, ISKNV, SDDV และแบคทีเรียต่างๆ ที่ก่อโรคในปลาและสัตว์น้ำ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละโคลน เจือจาง 1:100 ใน 1% blotto เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับสารสกัดเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อของ RGNNV, ISKNV, SDDV และแบคทีเรียต่าง ๆ

12. การทดสอบการติดเชื้อไวรัส TiLV ตามธรรมชาติในปลานิลด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธี RT-PCR และยืนยันการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry

นำตัวอย่างปลาที่ไม่ติดเชื้อและมีการติดเชื้อ TiLV ตามธรรมชาติ จากนั้นทำการตัดเหงือกของปลาทั้ง 2 กลุ่ม โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน โคนส่วนแรกนำมาทดสอบด้วย วิธี dot blotting โดยทำการบดเหงือกให้ละเอียดด้วยสารละลาย PBS (Phosphate Buffered Saline) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ผสมกับ 8H-3 ที่เจือจาง 1:100 ใน 1% blotto อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มกับ GAM-HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายซัลเฟตเตรท เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 11.3 สำหรับเหงือกปลาอีกส่วนที่ 2 นำไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยทำการสกัด RNA โดยชุดสกัด Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extration Kit (iNtRON Biotechnology) ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 5.1 จากนั้นทำการทดสอบด้วยโดยใช้ชุด Platinum™ Taq DNA Polymerase ในการทดสอบและใช้คูไพรเมอร์ และวิธีการเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 5.2 จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้ สำหรับเนื้อเยื่อเหงือกส่วนที่ 3 นำไปทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยทำตามขั้นตอนเดียวกับในข้อ 8.4

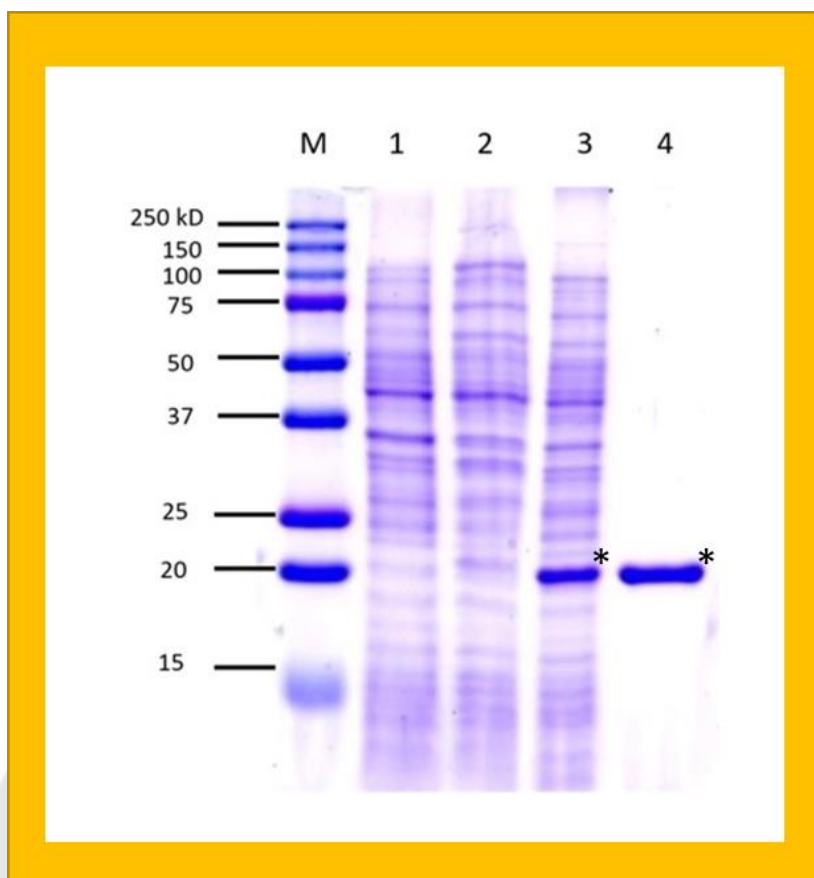
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเตรียมและการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 บริสุทธิ์

จากการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 โดยใช้ 1 mM IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัว inducer ของ T7 promotor ทำการเก็บเซลล์ของแบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 โดย 15% SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 20 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 19 แถว 3) ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากกรดอะมิโนทั้งหมด 174 ตัว มีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 19.5 กิโลดาลตัน รวมกับ 6x-His tag ที่มีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 0.8 กิโลดาลตันโดยรวมแล้วขนาดโปรตีนของ TiLV-S8 จะมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 20 กิโลดาลตัน ทั้งนี้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่พบแถบของโปรตีน TiLV-S8 (ภาพประกอบ 19 แถว 1) และ แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET15b-TiLV-S8 แต่ยังไม่ผ่านการกระตุ้นการแสดงออก จะไม่พบแถบของโปรตีน TiLV-S8 เช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 19 แถว 2)

จากนั้นนำ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 มาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน His-Tag protein purification column และทำการล้างโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ได้ติดฉลาก histidine tag ออกจากคอลัมน์ด้วย binding buffer แล้วทำการชะล้างโปรตีนที่ต้องการด้วย elution buffer จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบด้วย 15% SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 19 แถว 4)



ภาพประกอบ 19 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 โดยนำโปรตีนชนิดต่าง ๆ มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วทำการย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 M คือ โปรตีนมาตรฐาน

แถว 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

แถว 2 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET15b-TiLVS8 (non-induced)

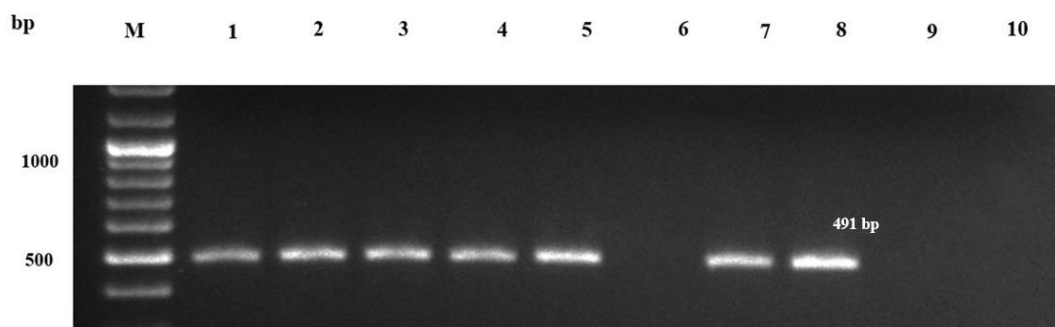
แถว 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET15b-TiLVS8 (induced)

แถว 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์

* แสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ 20 กิโลดาลตัน

2. การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลในธรรมชาติ

นำตัวอย่างปลานิลจากธรรมชาติ มาทำการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV จำนวน 10 ตัว ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการใช้ไพรเมอร์ Forward primer: (Nested ext-1) 5'-TATGCAGTACTTCCCTGCC-3' และ Reverse primer: (Nested ext-2) 5'-TTGCTCTGAGCAAGAGTACC-3' ที่จำเพาะต่อยีนของ TiLV พบว่าผลผลิตของปฏิกิริยามีขนาด 491 bp จากตัวอย่างปลานิลจากธรรมชาติ หมายเลข 1,2,3,4,5,7 และ 8 ซึ่งแสดงผลเป็นบวก และ ตัวอย่างปลานิลจากธรรมชาติ หมายเลข 6,9 และ 10 แสดงผลเป็นลบ (ภาพประกอบ 20) จากนั้นจึงนำตัวอย่างของปลานิลที่ตรวจพบและไม่พบการติดเชื้อ TiLV มาใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อไป

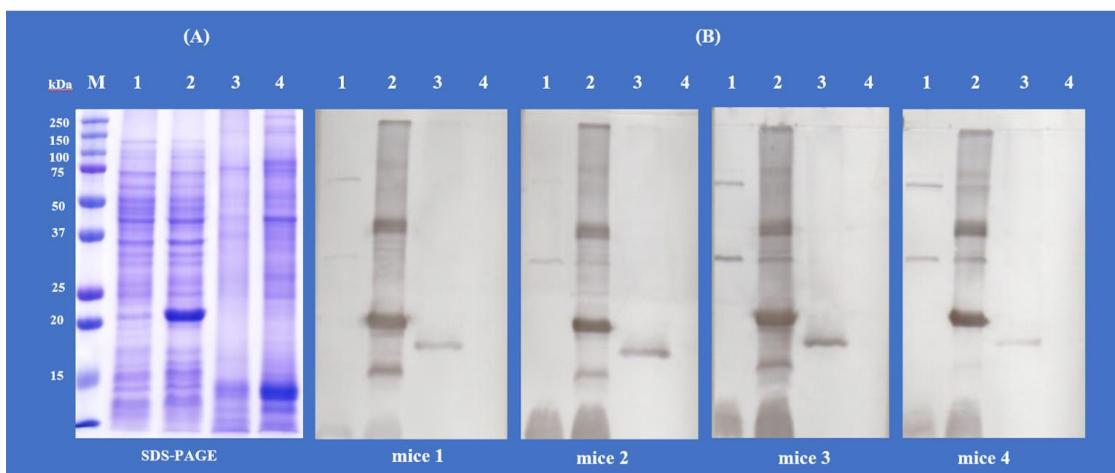


ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลตามธรรมชาติด้วยวิธี RT-PCR พบผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 491 bp

3. การปลูกภูมิคุ้มกันและการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูเมาส์

จากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV ที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาฉีดให้หนูเมาส์จำนวน 4 ตัว โดยฉีดรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV ที่ทำให้บริสุทธิ์ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อตัว หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ครั้งที่ 4 แล้วทำการเก็บแอนติซีรัมจากหนูเมาส์ นำมาทดสอบความจำเพาะกับ lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 สารสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อจากปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV และ สารสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลานิลปกติ วิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัว สามารถจับกับแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และ ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ได้ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 20 และ ประมาณ 18 กิโลดาลตัน โดยหนูตัวที่ 3

ให้ผลการตอบสนองที่ดีที่สุด สังเกตจากแถบโปรตีนของปลาติดเชื้อที่เข้มที่สุด (ภาพประกอบ 21) ดังนั้นจึงใช้หนูตัวที่ 3 สำหรับขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา



ภาพประกอบ 21 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้จากหนูเมาส์ทั้ง 4 ตัว โดยวิธี Western blotting

โดยนำโปรตีนชนิดต่าง ๆ มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE ทำการตัดเจลส่วนหนึ่งแล้วทำการย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 (A) จากนั้นเจลกอีกส่วนทำการย้ายโปรตีนสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสและทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่รับจากหนูเมาส์ด้วยวิธี Western blotting (B)

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

แถว 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

แถว 2 lysate ของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8

แถว 3 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV

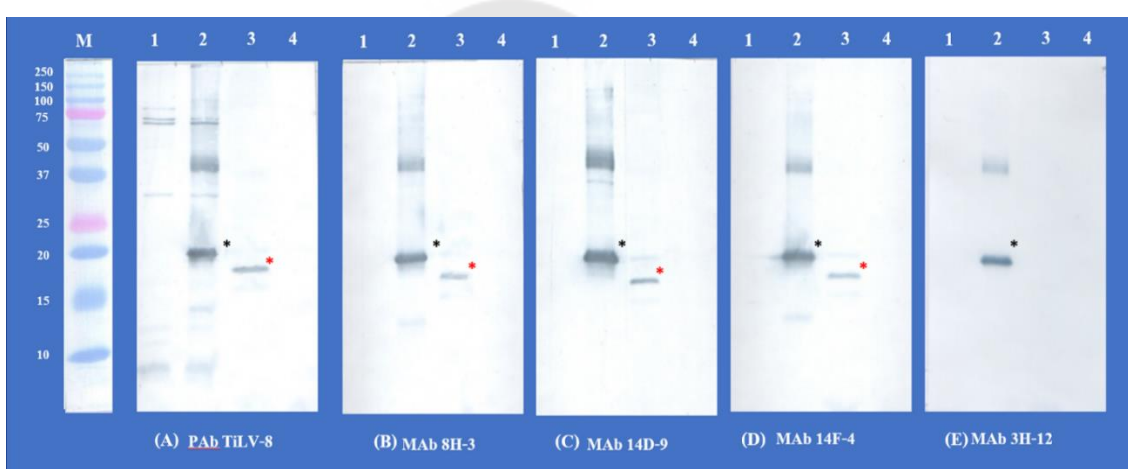
แถว 4 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลปกติ

4. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ TiLV

จากการนำหนูเมาส์ตัวที่มีการตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV และ สารสกัดเนื้อเยื่อของปลานิลที่ติดเชื้อที่ดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV ที่ทำให้บริสุทธิ์ ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน แล้วนำมาผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ TiLV โดยวิธี western blotting และวิธี dot blotting พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ TiLV ได้จำนวน 4 โคลน ดังนี้ TiLV8H-3, 14D-9, 3H-12 และ 14F-4 (ตาราง 5) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV8H-3, 14D-9, 3H-12 และ 14F-4 สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ 20 กิโล

คาลตัน และ โปรตีนของไวรัส TiLV จากการสกัดเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อซึ่งมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 18 กิโลดาลตัน ยกเว้น TiLV 3H-12 ที่ไม่สามารถจับกับโปรตีนของไวรัส TiLV ได้ ด้วยวิธี western blotting (ภาพประกอบ 22)

สำหรับการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV8H-3, 14D-9, 3H-12 และ 14F-4 สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และสารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ไม่ติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 22 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (B) TiLV8H-3, (C) 14D-9, (D) 14F-4 และ (E) 3H-12 โดยเปรียบเทียบกับ (A) โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่รับจากหนู ด้วยวิธี Western blotting

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

แถว 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

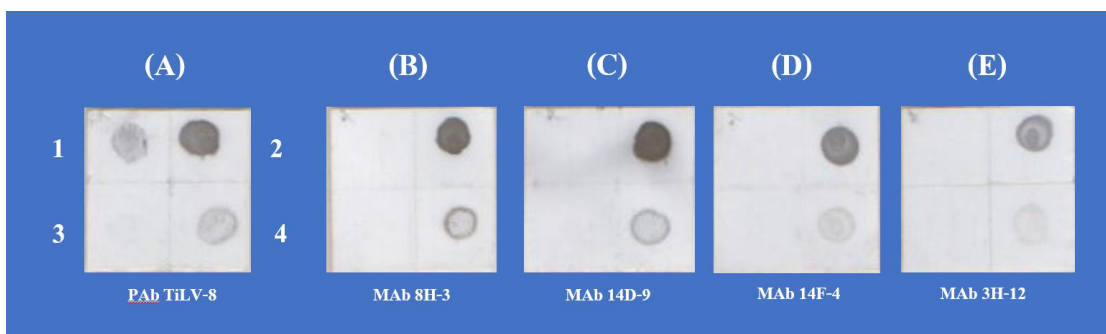
แถว 2 lysate ของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8

แถว 3 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV

แถว 4 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลปกติ

* แสดงคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ 20 กิโลดาลตัน

* แสดงโปรตีนของไวรัส TiLV ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 18 กิโลดาลตัน



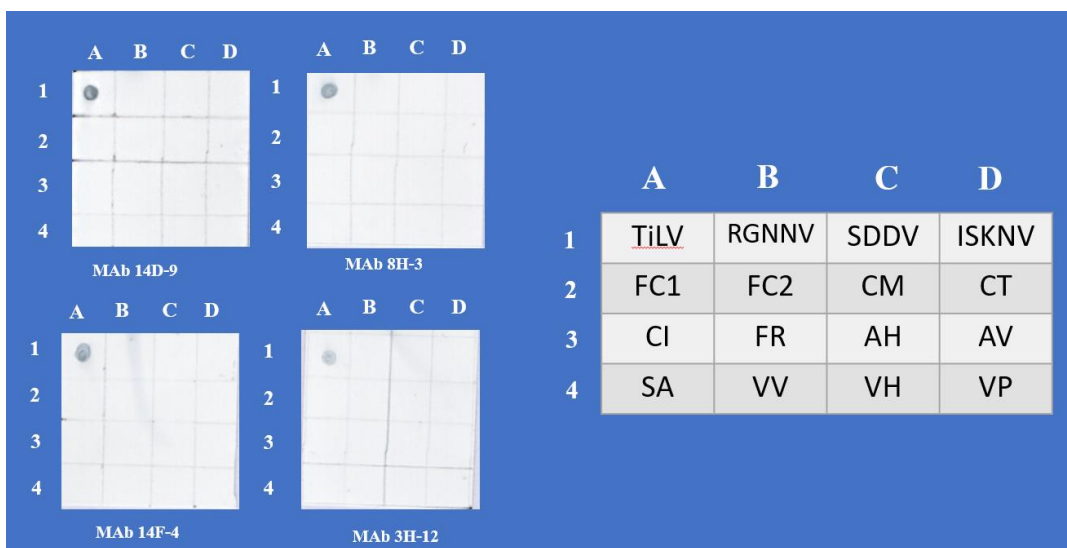
ภาพประกอบ 23 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (B) TiLV8H-3, (C) 14D-9, (D) 14F-4 และ (E) 3H-12 โดยเปรียบเทียบกับ (A) โพลีโคลนอลแอนติซีรัมจากหนู

- 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด
- 2 lysate ของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8
- 3 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลปกติ
- 4 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV

5. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

5.1 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting

จากการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ RGNNV, ISKNV, SDDV และ แบคทีเรียต่างๆที่ก่อโรคในปลาและสัตว์น้ำ (ภาพประกอบ 24)



ภาพประกอบ 24 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมครอลิตรต่อหยด และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้คือ TiLV14D-9, 8H-3, 14F-4 และ 3H-12 ตามลำดับโดยทำการหยดโปรตีนชนิดต่างๆ ตามตารางดังนี้

แถวที่ 1 รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ (TiLV) (A), สารสกัดเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ RGNNV (RGNNV) (B), สารสกัดเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ SDDV (SDDV) (C), สารสกัดเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ ISKNV (ISKNV) (D)

แถวที่ 2 *Flavobacterium columnare* isolate 1301 (FC1) (A), *F. columnare* isolate AT (FC2) (B), *Chryseobacterium massiliae* (CM) (C) และ *C. taichungense* (CT) (D)

แถวที่ 3 *C. indologenes* (CI) (A), *Flectobacillus roseus* (FR) (B), *Aeromonas hydrophila* (AH) (C), และ *A. veronii* (AV) (D)

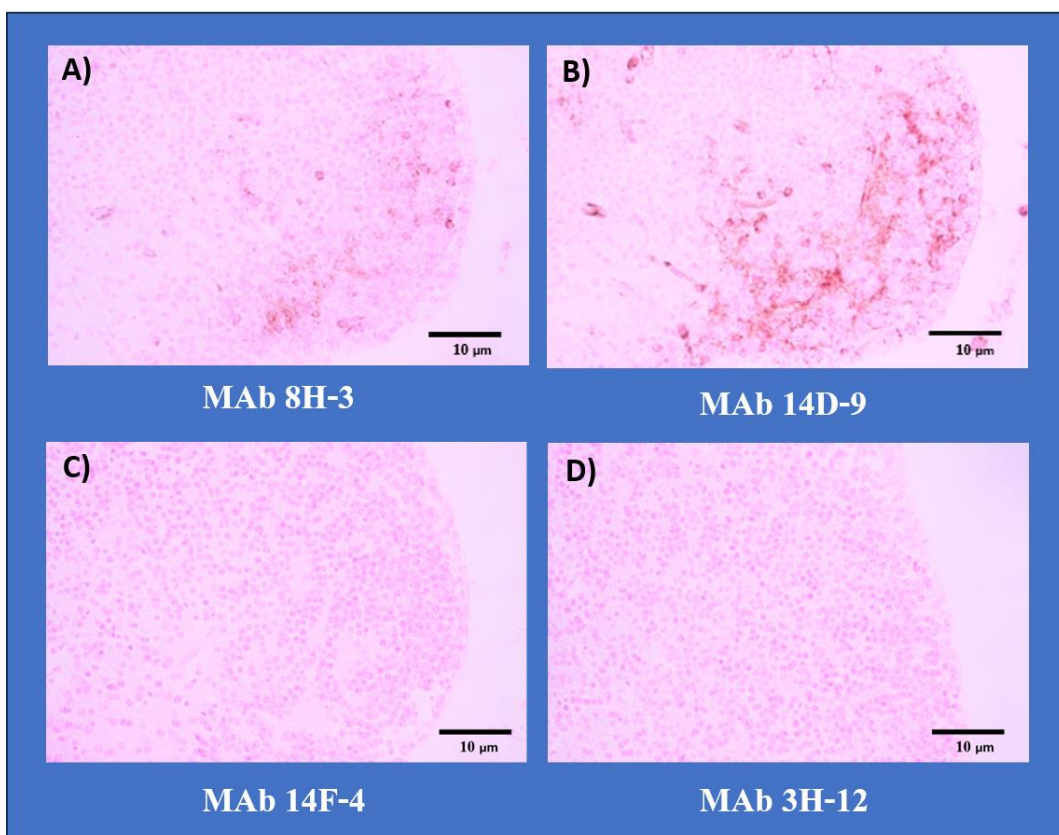
แถวที่ 4 *Streptococcus agalactiae* (SA) (A), *Vibrio vulnificus* (VV) (B), *V. harveyi* (VH) (C) และ *V. parahaemolyticus* (VP) (D)

5.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี

immunohistochemistry

จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 4 โคลน ได้แก่ TiLV8H-3, TiLV14D-9, TiLV14F-4 และ TiLV3H-12 ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยทดสอบในเนื้อเยื่อสมองของปลาที่ติดเชื้อ TiLV พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV8H-3 และ TiLV14D-9 สามารถตรวจจับเชื้อไวรัส TiLV โดยพบการเกิดปฏิกิริยา immunoreactivity ในบริเวณเนื้อเยื่อสมอง หรือเซลล์ประสาทของปลานิลที่ติดเชื้อ ในส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14F-4 และ TiLV3H-12 ไม่พบการเกิดปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อปลานิลที่ติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ทั้งนี้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9 สามารถจับกับเชื้อ TiLV ได้ชัดเจนที่สุด ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV8H-3 จับได้ต่ำกว่า (ภาพประกอบ 25)





ภาพประกอบ 25 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อสมองของปลาที่ติดเชื้อ TiLV ทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) TiLV8H-3, (B) TiLV14D-9, (C) TiLV14F-4 และ (D) TiLV3H-12 พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณสมองของตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ TiLV โดยบริเวณที่ติดเชื้อจะแสดงออกเป็นสีน้ำตาล

5.3 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี

sandwich ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่ผลิตได้ มี class และ subclass เป็น IgG1 และ IgG2a โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV 8H-3 และ 14F-4 จัดอยู่ class IgG และ subclass เป็น IgG1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV 14D-9 และ 3H-12 จัดอยู่ class IgG และ subclass เป็น IgG2a (ตาราง 5)

ตาราง 5 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TiLV-S8 ของเชื้อ TiLV ที่ผลิตได้ในครั้งนี้ ทดสอบด้วยวิธี dot blotting western blotting และ immunohistochemistry (IHC)

ชนิด	Mab (isotype)	ความไวของการตรวจหา แอนติเจน โดยวิธี dot blotting (µg/ml)	การตรวจหา แอนติเจนด้วยวิธี western blotting	IHC	การทดสอบ ปฏิกิริยาข้าม
1	8H-3 (IgG1)	37.5	++	+	-
2	14D-9 (IgG2a)	37.5	+++	+++	-
3	3H-12 (IgG2a)	300	-	-	-
4	14F-4 (IgG1)	75	++	-	-

หมายเหตุ	-	โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่แสดงปฏิกิริยา
	+	โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาชัดเจนน้อย
	++	โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาชัดเจนปานกลาง
	+++	โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงปฏิกิริยาชัดเจนมาก

5.4 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้ พบว่าสามารถแยกความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิพิโทปของแอนติเจนได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 (8H-3, 3H-12 และ 14F-4) และกลุ่มที่ 2 (14D-9) ซึ่งเมื่อนำแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงเมื่อเทียบกับนำแอนติบอดีที่อยู่ต่างกลุ่มกันมาผสมกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันจับกับอิพิโทปของแอนติเจนตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน (ตาราง 6)

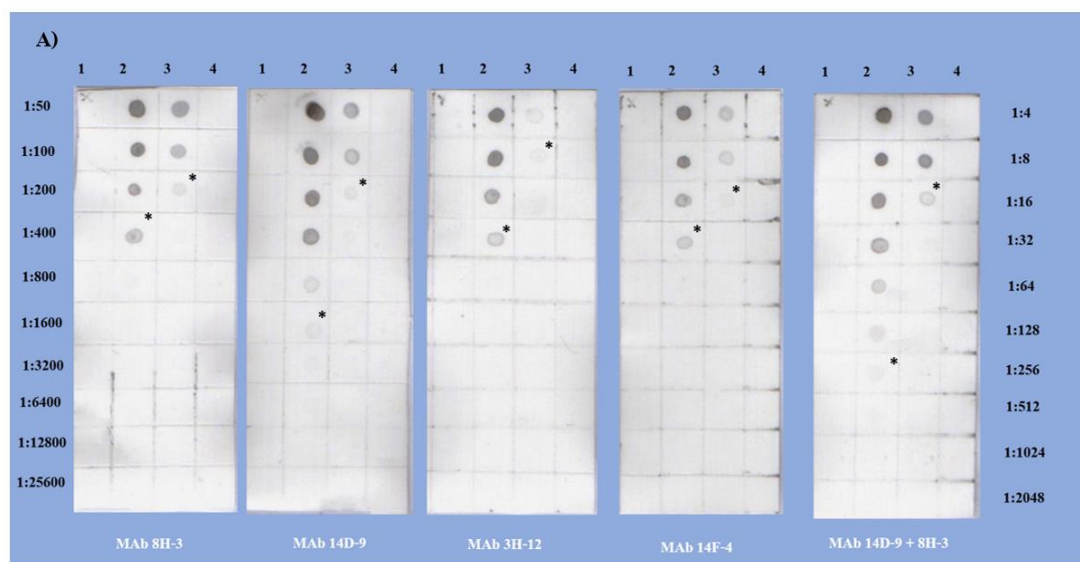
ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA

MAbs	8H-3	14D-9	3H-12	14F-4
8H-3	0.2440 ¹	0.5597	0.3029	0.2582
14D-9		0.4769 ²	0.5359	0.5566
3H-12			0.2203 ¹	0.2979
14F-4				0.2698 ¹

ตัวเลขที่เหนือค่า OD คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ที่จับกับอิพิโทปเดียวกัน(คาบเกี่ยวกันหรือที่ต่างกัน) โดยกำหนดค่า Cut off อยู่ที่ OD ที่แตกต่างกันเกิน 0.1 จัดเป็นคนละกลุ่ม

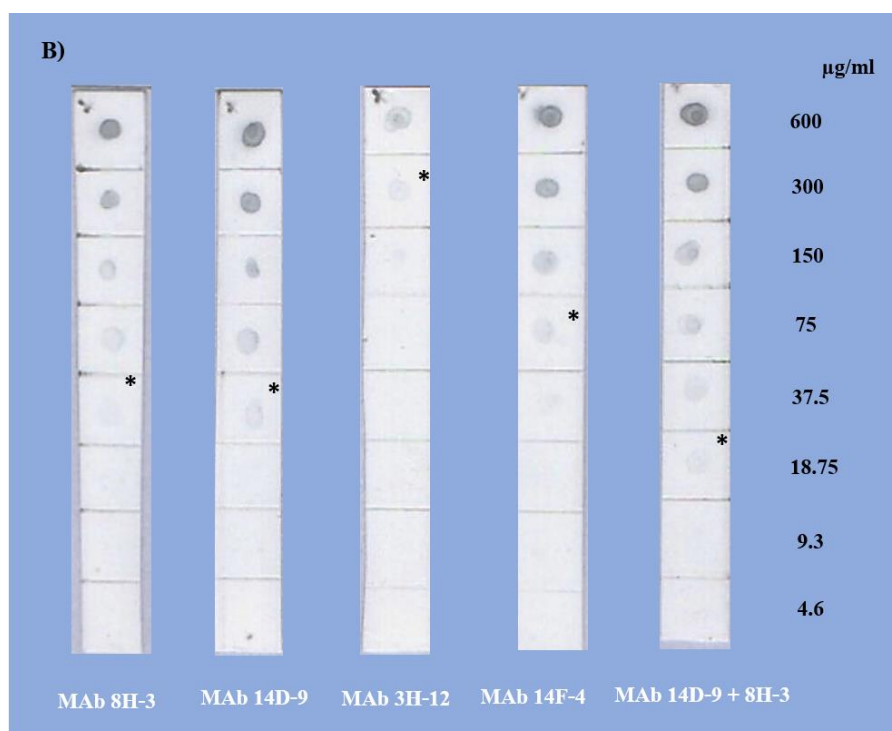
5.5 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ TiLV ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับ lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ และ สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาที่ไม่ติดเชื้อ โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกชนิดสามารถในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และ สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ TiLV ได้แตกต่างกัน โดยไม่พบปฏิกิริยากับ lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และ สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาปกติ ทั้งนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยความไวสูงสุดประมาณ 1:1600 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดอื่นๆ สามารถตรวจรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ 1:400 สำหรับการตรวจความไวในการตรวจเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาติดเชื้อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 8H-3, 14D-9 และ 14F-4 สามารถตรวจพบด้วยความไวสูงสุดประมาณ 1:16 ส่วน MAb 3H-12 จับได้ที่ 1:8 เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 รวมกับ 8H-3 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยความไวสูงสุดประมาณ 1:3200 และ ในส่วนของสารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาติดเชื้อมีความไวสูงสุดประมาณ 1:16 (ภาพประกอบ 26)



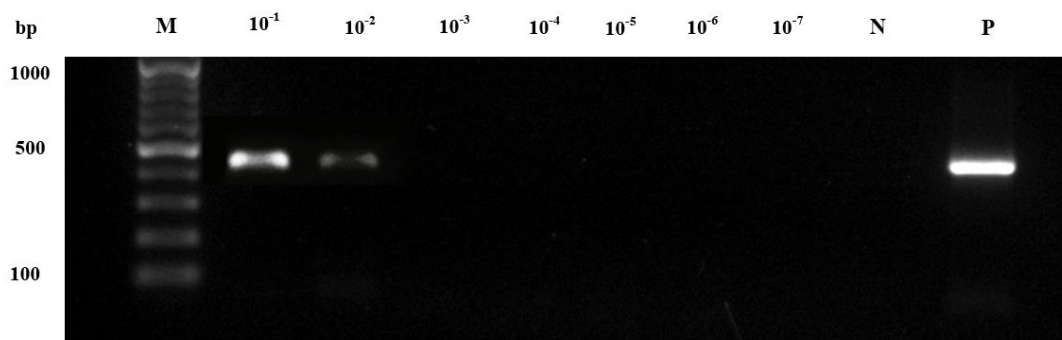
ภาพประกอบ 26 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ด้วยวิธี dot blotting
 แถว 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด ความเข้มข้น 1:50 ถึง 25600
 แถว 2 lysate ของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ความเข้มข้น 1:50 ถึง 25600
 แถว 3 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ TiLV ที่เจือจาง 1:4 ถึง 1:2048
 แถว 4 สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาปกติ ที่เจือจาง 1:4 ถึง 1:2048

สำหรับการตรวจความไวในการจับโปรตีนของ TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ ถึง 4.6 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 8H-3 และ 14D-9 สามารถจับกับโปรตีน TiLV ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นอยู่ที่ 37.5 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3H-12 และ 14F-4 จับได้ที่ความเข้มข้น 300 และ 75 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ร่วมกับ 8H-3 สามารถตรวจความไวได้อยู่ที่ 18.75 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพประกอบ 27)



ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบความไวในการจับโปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเจือจางตั้งแต่ 600 จนถึง 4.6 $\mu\text{g/ml}$ และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้คือ TiLV8H-3, 14D-9, 3H-12, 14F-4 และ 14D-9 ผสมกับ 8H-3 ตามลำดับ

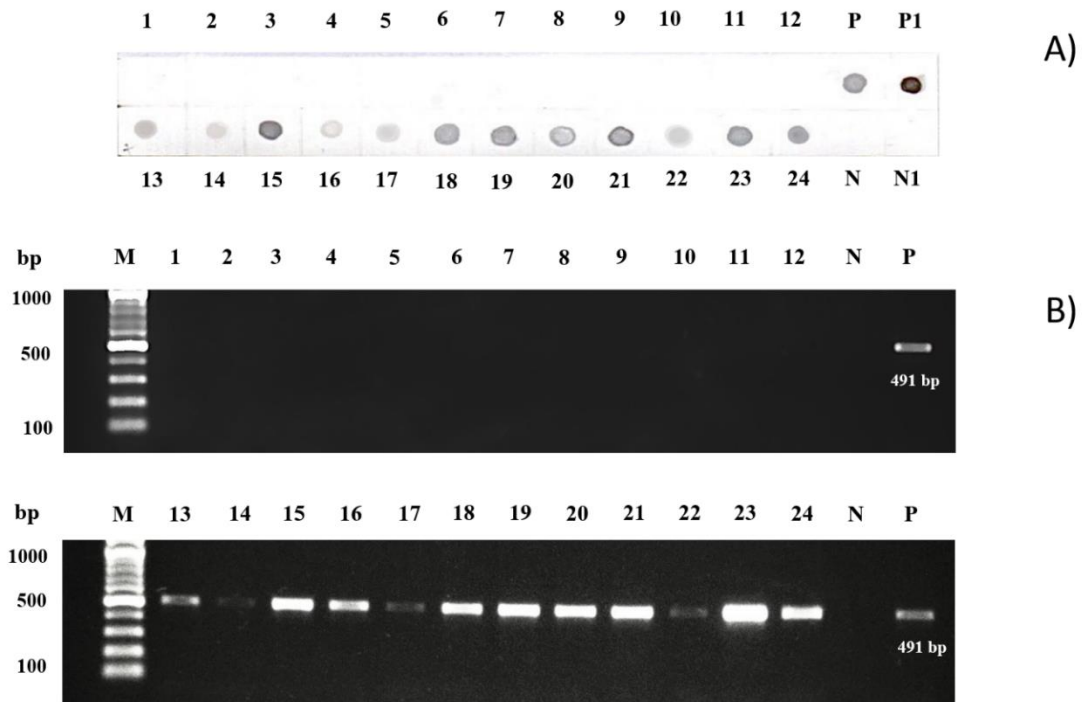
เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดเนื้อเยื่อจากปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ที่ใช้ในการทดสอบความไวของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting มาทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถ ตรวจพบเชื้อ TiLV จากสารสกัด RNA ที่ทำการเจือจาง 100 เท่า (ภาพประกอบ 28) ดังนั้นการใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิด คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 และ 8H-3 ผสมกันในการ ตรวจเชื้อ TiLV ด้วยวิธี dot blotting มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 6.25 เท่า



ภาพประกอบ 28 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ TiLV ด้วยวิธี RT-PCR โดยทำการเจือจาง RNA จากสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-7} เท่า
 M = น้ำหนักโมเลกุลของ DNA มาตรฐาน (bp)
 P = Positive control ใช้สารสกัดเนื้อเยื่อบริเวณจากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV
 N = Negative control ใช้สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ไม่ติดเชื้อ

5.6 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลาตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธี RT-PCR

จากการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV จากตัวอย่างปลานิลจำนวน 24 ตัวอย่าง โดยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ผสมกับ 8H-3 เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR พบว่า ตัวอย่างปลาที่ไม่ติดเชื้อ หมายเลข 1-12 ให้ผลเป็นลบทั้งหมด จากการทดสอบทั้ง 2 วิธี และ ตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ หมายเลข 13-24 ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด จากการทดสอบทั้ง 2 วิธี เช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 29)



ภาพประกอบ 29 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ร่วมกับ 8H-3 (A) เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR (B)

โดยทำการหยดสารสกัดจากเหงือกของปลานิลที่ไม่มีการติดเชื้อหมายเลข 1-12 และตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อหมายเลข 13-24 บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และผ่านกระบวนการ dot blotting (A) และตรวจสอบการติดเชื้อของปลานิลวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Nested ext-1 และ Nested ext-2 ที่จำเพาะต่อเชื้อ TiLV ทดสอบกับตัวอย่างปลาเดียวกัน (B)

P = Positive control โดยใช้สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV

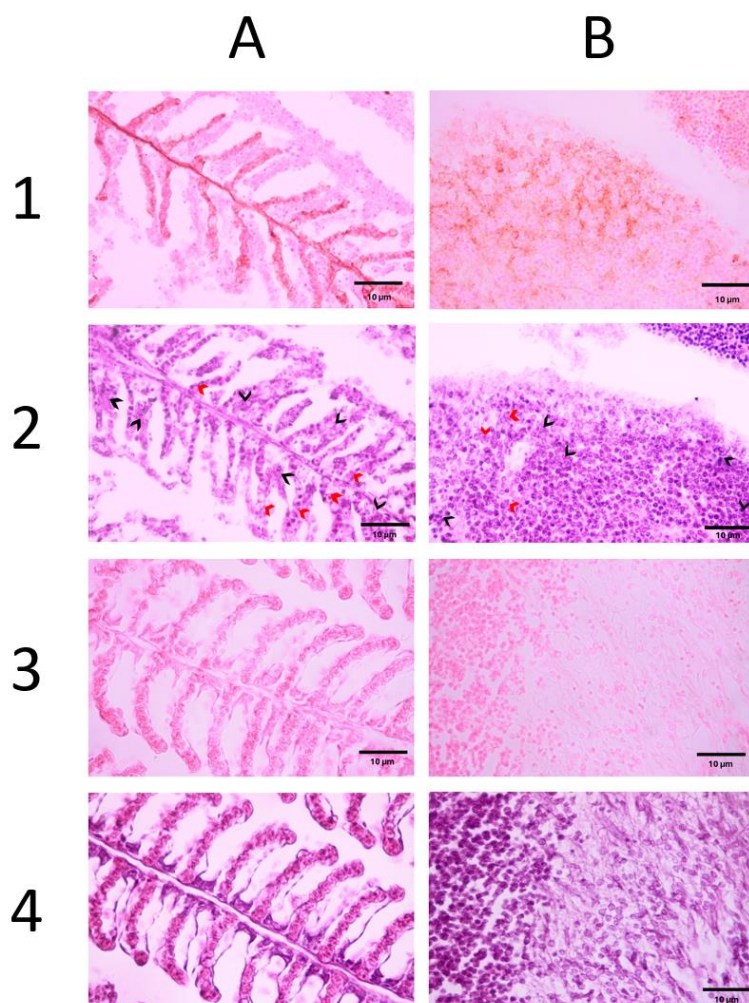
P1 = Positive control โดยใช้ lysate ของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8

N = Negative control โดยใช้สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลที่ไม่ติดเชื้อ

N1 = Negative control โดยใช้ lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

M = น้ำหนักโมเลกุลของ DNA มาตรฐาน (bp)

นอกจากนี้ได้ทำการตรวจเชื้อ TiLV ในปลาที่ติดเชื้อ TiLV ตามธรรมชาติและปลาปกติด้วยการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry เพื่อยืนยันการติดเชื้อ TiLV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9 ที่สามารถจับกับเชื้อ TiLV ได้ชัดเจนที่สุดมาทดสอบ พบว่าสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในปลาที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ผลเช่นเดียวกับวิธี dot blotting และวิธี RT-PCR โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับเชื้อ TiLV ได้บริเวณ gill filaments ของเซลล์เหงือก และบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณสมองของปลาที่ติดเชื้อพบปฏิกิริยา immunoreactivity (ภาพประกอบ 30-1A และ 1B) และจากการตรวจสอบทางพยาธิวิทยาพบบริเวณเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกเกิดการอักเสบของเซลล์ (inflammatory cells) และการรวมกลุ่มกันของเซลล์ที่ติดเชื้อ (syncytial cell formation) (ภาพประกอบ 30-2A) ในส่วนของเนื้อเยื่อสมองพบเซลล์ที่มีอาการอักเสบ (inflammatory cells) (ภาพประกอบ 30-2B) โดยไม่พบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับองค์ประกอบต่างๆในเนื้อเยื่อของปลานิลปกติ (ภาพประกอบ 30-3A และ 3B) และความผิดปกติทั้งในเนื้อเยื่อเหงือกและสมองของปลาปกติ (ภาพประกอบ 30-4A และ 4B)



ภาพประกอบ 30 การตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก (A) และสมอง (B) ของปลาที่ติดเชื้อ TiLV ตามธรรมชาติและปลาปกติด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9

1) เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกและสมองของปลาที่ติดเชื้อ ตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry และย้อมสีด้วยอีโอซิน

2) เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกและสมองของปลาที่ติดเชื้อ ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและย้อมทับด้วยอีโอซิน

3) เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกและสมองของปลานิลที่ไม่ติดเชื้อ ตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry และย้อมสีด้วยอีโอซิน

4) เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกและสมองของปลานิลที่ไม่ติดเชื้อ ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและย้อมทับด้วยอีโอซิน

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบปลานิลในธรรมชาติที่ติดเชื้อ TiLV ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึทให้ผลเป็นบวกจากการใช้ไพรเมอร์ Forward primer: (Nested ext-1) 5'-TATGCAGTACTTCCCTGCC-3' และ Reverse primer: (Nested ext-2) 5'-TTGCTCTGAGCAAGAGTACC-3' ที่จำเพาะต่อยีนของ TiLV โดยพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาขนาด 491 bp ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Eyngor และคณะในปี ค.ศ. 2014 และของ Surachetpong และคณะในปี ค.ศ. 2017 ที่มีการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของ TiLV ในการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อ (Eyngor et al., 2014; Surachetpong et al., 2017)

จากการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน TiLV-S8 สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 พบโปรตีนขนาด 20 กิโลดาลตันซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีรายงานเกี่ยวกับการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ที่มีขนาดอยู่ที่ 20 กิโลดาลตัน (Hu et al., 2020) และจากรายงานก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่า TiLV-S8 นั้นมีความสามารถในการเป็น immunogen ที่ดีสามารถใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยมีการตอบสนองที่สูง และสามารถนำโปรตีน TiLV-S8 นี้ไปทดสอบด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันแบบอื่นได้แก่ วิธี western blotting, ELISA และ immunofluorescence assay (IFA) (Hu et al., 2020) งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและสามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์จากการนำไปแยกผ่าน metal ion affinity column HisTrap FF (GE Healthcare, USA) โดยพบแถบของโปรตีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 เมื่อทดสอบด้วยจากวิธี SDS-PAGE มีขนาดโปรตีนที่ 20 กิโลดาลตันเช่นเดียวกัน เมื่อนำโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์ พบว่าหนูเม้าส์สามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 ได้ทุกตัว จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูแต่ละตัวต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และต่อเชื้อ TiLV ในปลานิลที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยวิธี Western blotting พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 20 และ 18 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งในกรณีของเชื้อ TiLV จากปลาที่ติดเชื้อพบว่าขนาดของโปรตีนใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ทำการทดสอบในน้ำเลี้ยงเซลล์ E-11 ที่ติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี Western blotting พบโปรตีนของไวรัสมี

ขนาดอยู่ที่ประมาณ 19 กิโลดาลตัน (Hu et al., 2020) ทั้งนี้ขนาดของโปรตีนของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อในการทดลองนี้ มีขนาดแถบโปรตีนอยู่ต่ำกว่าแถบโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E-11 เล็กน้อยอาจมีสาเหตุเนื่องจากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อประกอบไปด้วย โปรตีนอื่นๆ ของเนื้อเยื่อปลาที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่อาจมีการเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลที่ช้ากว่าทำให้โมเลกุลของไวรัสที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นทำให้เมื่อทำการแยกโปรตีนผ่านกระแสไฟฟ้าจึงพบแถบโปรตีนของเชื้อ TiLV ที่ได้ต่ำกว่าแถบโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ E-11 ซึ่งประกอบไปด้วยไวรัสเพียงอย่างเดียว จากนั้นเลือกหนวดตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 4 โคลน ดังนี้ TiLV8H-3, 14D-9, 3H-12 และ 14F-4 โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 ตัวที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้ มี class และ subclass เป็น IgG1 และ IgG2a โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV 8H-3 และ 14F-4 มี class และ subclass เป็น IgG1 และโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV 14D-9 และ 3H-12 มี class และ subclass เป็น IgG2a

จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 และเชื้อ TiLV จากปลานิลที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และเมื่อทดสอบด้วยวิธี western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกชนิด สามารถจับคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 กับโปรตีนของเชื้อ TiLV ที่มีขนาดประมาณ 20 และ 18 กิโลดาลตันตามลำดับ ยกเว้น TiLV3H-12 ที่ไม่สามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ RGNNV, ISKNV, SDDV และ แบคทีเรียต่าง ๆ ที่ก่อโรคในปลานิลและสัตว์น้ำเมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส RGNNV (Kamsamarn et al., 2023) และ ISKNV (Vaniksampanna et al., 2023) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TiLV และ แบคทีเรียต่าง ๆ ที่ก่อโรคในปลานิลและสัตว์น้ำเช่นเดียวกัน

สำหรับการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ TiLV ในเนื้อเยื่อเหงือกและสมองของปลานิลที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับเชื้อ TiLV ที่ติดทั้งในเนื้อเยื่อเหงือกบริเวณ gill filaments และเนื้อเยื่อสมองบริเวณ cortex ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (Dong et al., 2017; Eyngor et al., 2014) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9 นั้นสามารถแสดงการ

เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในการตรวจสอบการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อ RGNNV, ISKNV, SDDV และเนื้อเยื่อปลาที่ไม่ติดเชื้อ เช่นเดียวกับในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Kamsamarn et al., 2023; Vaniksampanna et al., 2023) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ดี โดยให้ผลในการตรวจสอบเช่นเดียวกับวิธี in situ hybridization ซึ่งใช้ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ TiLV (Piewbang et al., 2021)

จากการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน ที่ผลิตได้เมื่อทดสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนพบว่าสามารถแยกความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิพิโทปของแอนติเจนได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 (8H-3, 3H-12 และ 14F-4) และกลุ่มที่ 2 (14D-9) ซึ่งเมื่อนำแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงเมื่อเทียบกับการนำแอนติบอดีที่อยู่ต่างกลุ่มกันมาผสมกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันจับกับอิพิโทปของแอนติเจนตำแหน่งเดียวกัน นอกจากนี้จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-8 โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9 ตัวแทนจากกลุ่มที่ 2 สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เจือจางสูงสุด 1:1600 และเมื่อนำมาผสมรวมกับ TiLV 8H-3 ตัวแทนจากกลุ่มที่ 1 สามารถตรวจความไวเพิ่มขึ้นที่ 1:3200 และเมื่อทดสอบกับสารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลาติดเชื้อพบว่าจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 8H-3 ผสมกับ 14D-9 สามารถตรวจพบได้ที่ความไวสูงสุดประมาณ 1:16 ซึ่งเท่ากับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวแต่พบว่าจุดมีสีเข้มขึ้นกว่าและไม่พบปฏิกิริยาใน lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และ สารสกัดเนื้อเยื่อจากตัวอย่างปลานิลปกติเช่นเดียวกัน ส่วนการตรวจความไวในการจับโปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 8H-3 และ 14D-9 สามารถตรวจพบที่ 37.5 µg/ml และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดผสมรวมกันพบว่า สามารถตรวจความไวในการจับโปรตีน TiLV-S8 ที่ทำให้บริสุทธิ์ ได้อยู่ที่ 18.75 µg/ml

สำหรับการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ TiLV จากปลานิลที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9, 8H-3, 14F-4 และ 8H3 ผสมกับ 14D-9 สามารถตรวจพบเชื้อ TiLV จากตัวอย่างปลานิลที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เจือจางสูงสุด 1:16 และเมื่อนำตัวอย่างปลาติดเชื้อไปทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ TiLV จากการสกัด RNA ที่เจือจาง 1:100 ดังนั้น

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ TiLV ด้วยวิธี dot blotting มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 6.25 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส ISKNV โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นเมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี dot blotting กับวิธี RT-PCR พบว่าวิธี dot blotting มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 7.8 เท่า (Vaniksampanna et al., 2023)

จากงานวิจัยนี้ถึงแม้ว่าวิธี dot blotting จะมีความไวน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR แต่วิธีการ dot blotting นี้มีข้อดีก็คือไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อและไม่ต้องใช้สารละลายต่าง ๆ สำหรับสกัดกรดนิวคลีอิก โดยวิธี dot blotting สามารถนำเอาเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบมา homogenate แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ได้โดยตรง และใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 6 ชั่วโมง (Ponpukdee et al., 2021; Vaniksampanna et al., 2023)

สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในตัวอย่างปลานิลตามธรรมชาติจำนวน 24 ตัวอย่าง โดยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ผสมกับ 8H-3 พบว่าผลการทดสอบด้วยวิธี dot blotting ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามปริมาณที่ต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัส TiLV จากปลานิลที่ติดเชื้อ และช่วยลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่างๆ ในเนื้อเยื่อของปลานิล โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ TiLV เท่านั้นดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อ TiLV ในปลานิลที่ติดเชื้อ ด้วยวิธี dot blotting, western blotting และ immunohistochemistry ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจการติดเชื้อ TiLV ในปลานิลที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ ด้วยวิธี dot blotting ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบในเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของปลาที่ติดเชื้อเพื่อื่อยืนยันผลของการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ ดังนั้นการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจการติดเชื้อ TiLV นั้นจึงเป็นอีกวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ และราคาถูก โดยไม่ต้องอาศัยการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังคงมีความไวต่ำดังนั้นจึง

ยังมีความจำเป็นต้องผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ TiLV เพิ่มเติมให้มีความไวและประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยการเพิ่มความหลากหลายของแอนติเจนสำหรับการปลูกภูมิคุ้มกัน โดยอาจใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อ TiLV หรือเปลี่ยน His-tag เป็น GST-tag ของ vector ในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน TiLV-S8 หรืออาจทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ TiLV ในเช็กเมนต์อื่นๆ เพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนตัวใหม่สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันซึ่งคาดว่าอาจทำให้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ TiLV ที่มีความไวและมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อ TiLV ได้ดีขึ้น

ทั้งนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV14D-9 ที่ผลิตได้มีความไวสูงสุดในการตรวจการติดเชื้อ TiLV จากตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อตามธรรมชาติด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry และเมื่อนำมาใช้ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี TiLV8H-3 ซึ่งอาจสามารถนำไปพัฒนาชุดตรวจไวรัสอย่างง่าย เช่น strip test เช่นเดียวกับชุดตรวจเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) (Sithigorngul et al., 2007) โดยชุดตรวจดังกล่าวอาจสามารถใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสในปลาที่เลี้ยงในบ่อที่มีการระบาดได้ โดยอาจนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจการติดเชื้อไวรัสได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับการใช้วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น dot blotting หรือ western blotting เนื่องจากชุดตรวจสามารถใช้งานโดยเกษตรกรได้ด้วยตนเอง และผู้ใช้สามารถทราบผลการตรวจสอบได้สะดวกรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 15 นาที (Sithigorngul et al., 2007) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสที่ระบาดในฟาร์มของเกษตรกรได้

บรรณานุกรม

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*: Elsevier Health Sciences.
- Amal, M., Koh, C., Nurliyana, M., Suhaiba, M., Nor-Amalina, Z., Santha, S., . . . Zamri-Saad, M. (2018). A case of natural co-infection of Tilapia Lake Virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. *Aquaculture*, 485, 12-16.
- Ariel, E., & Owens, L. (1997). Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(1), 1-6.
- Bacharach, E., Mishra, N., Briese, T., Zody, M. C., Kembou Tsofack, J. E., Zamostiano, R., . . . Corvelo, A. (2016). Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia. *MBio*, 7(2), e00431-00416.
- Behera, B., Pradhan, P., Swaminathan, T., Sood, N., Paria, P., Das, A., . . . Dev, A. (2018). Emergence of tilapia lake virus associated with mortalities of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture*, 484, 168-174.
- Dong, H., Siriroob, S., Meemetta, W., Santimanawong, W., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., . . . Senapin, S. (2017). Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, 476, 111-118.
- Eyngor, M., Zamostiano, R., Kembou Tsofack, J. E., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., . . . Bacharach, E. (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of clinical microbiology*, 52(12), 4137-4146.
- FAO. (2014). Cultured aquatic species information programme, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Rome, Italy: In on Food and Agriculture Organization of the United Nation.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Rome, Italy: In on Food and Agriculture Organization of the United Nation.
- Fathi, M., Dickson, C., Dickson, M., Leschen, W., Baily, J., Muir, F., . . . Weidmann, M. (2017). Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by

- 'summer mortality'syndrome. *Aquaculture*, 473, 430-432.
- Hu, H., Zeng, W., Wang, Y., Wang, Q., Bergmann, S. M., Yin, J., . . . Zhang, D. (2020). Development and application of a recombinant protein-based indirect ELISA for detection of anti-tilapia lake virus IgM in sera from tilapia. *Aquaculture*, 520, 734756.
- Kamsamarn, S., Longyant, S., Senapin, S., Vaniksampanna, A., Manajit, O., & Chaivisuthangkura, P. (2023). Generation of Monoclonal Antibodies against Major Capsid Protein (MCP) of Nervous Necrosis Virus (NNV).
- Kembou Tsofack, J. E., Zamostiano, R., Watted, S., Berkowitz, A., Rosenbluth, E., Mishra, N., . . . Ferguson, H. (2017). Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology*, 55(3), 759-767.
- Kim, H. J., Oseko, N., Nishizawa, T., & Yoshimizu, M. (2009). Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly (I: C). *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(2), 105-113.
- Koesharyani, I., Gardenia, L., Widowati, Z., Khumaira, K., & Rustianti, D. (2018). Studi kasus infeksi tilapia lake virus (TiLV) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(1), 85-92.
- Nicholson, P., Fathi, M., Fischer, A., Mohan, C., Schieck, E., Mishra, N., . . . Jores, J. (2017). Detection of Tilapia Lake Virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015.
- Piewbang, C., Tattiyapong, P., Techangamsuwan, S., & Surachetpong, W. (2021). Tilapia lake virus immunoglobulin G (TiLV IgG) antibody: Immunohistochemistry application reveals cellular tropism of TiLV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 115-123.
- Ponpukdee, N., Wangman, P., Rodkhum, C., Pengsuk, C., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2021). Detection and identification of a fish pathogen *Flavobacterium columnare* using specific monoclonal antibodies.

Aquaculture, 545, 737231.

- Senapin, S., Shyam, K., Meemetta, W., Rattanarojpong, T., & Dong, H. T. (2018). Inapparent infection cases of tilapia lake virus (TiLV) in farmed tilapia. *Aquaculture*, 487, 51-55.
- Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Sittidilokratna, N., Pecharaburanin, N., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., & Sithigorngul, P. (2007). A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. *Journal of Virological Methods*, 140(1-2), 193-199.
- Surachetpong, W., Janetanakit, T., Nonthabenjawan, N., Tattiyapong, P., Sirikanchana, K., & Amonsin, A. (2017). Outbreaks of tilapia lake virus infection, Thailand, 2015–2016. *Emerging infectious diseases*, 23(6), 1031.
- Tattiyapong, P., Dachavichitlead, W., & Surachetpong, W. (2017). Experimental infection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Veterinary microbiology*, 207, 170-177.
- Tsofack, J. E. K., Zamostiano, R., Watted, S., Berkowitz, A., Rosenbluth, E., Mishra, N., . . . Ferguson, H. (2017). Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology*, 55(3), 759-767.
- 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.
- Waiyamitra, P., Tattiyapong, P., Sirikanchana, K., Mongkolsuk, S., Nicholson, P., & Surachetpong, W. (2018). A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) detection in tilapia. *Aquaculture*, 497, 184-188.
- Zeitoun, M. M., EL-Azrak, K. E.-D. M., Zaki, M. A., Nemat-Allah, B. R., & Mehana, E.-S. E. (2016). Effects of ammonia toxicity on growth performance, cortisol, glucose and hematological response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aceh Journal of Animal Science*, 1(1), 21-28.

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กรมประมง. (2562). การเลี้ยงปลานิล. <https://www.fisheries.go.th/if-suratthani/1planile.htm>
- จารุภา เถาว์วัลย์. (2558). การแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (*ISOLATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES*) คู่มือการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ชนกันต์ จิตมนัส. (2556). โรคปลานิล. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร, 11(1), 75-86.
- ชนกันต์ จิตมนัส. (2557). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหงือกในปลานิล (*Flavobacterium columnare*) เพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรค (รหัสโครงการวิจัย มจ.1-56-057.8). เชียงใหม่:
- นวลมณี พงศ์ธนา. (2553). ปัจจัยการเพาะเลี้ยงปลานิลและปลานิลแดงให้ประสบผลสำเร็จ. <http://www.fisheries.go.th/rgm-pathumtani>
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์ศึกษาระดับปริญญาโทสำหรับการเรียนการสอนและวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, ส. (2553). การเพาะเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- หทัยทิพย์ สุขสวัสดิ์. (2551). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas caviae*. (ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

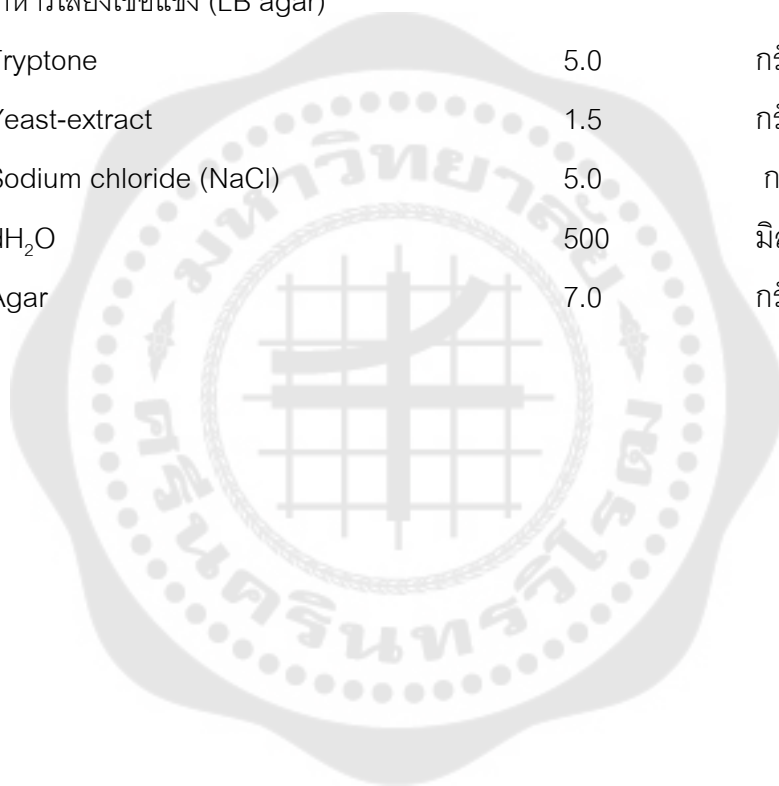
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

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

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	1.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
dH ₂ O	500	มิลลิลิตร
Agar	7.0	กรัม





บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 100mM IPTG		
IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
2. 100mM PMSF		
PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol	1.0	มิลลิลิตร
3. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2		
NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร
4. 5% Blotto		
นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS	100.0	มิลลิลิตร
1% Merthiolate (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร
5. 1% Merthiolate		
Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร



สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา RPMI medium		
RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6	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 (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) (Sigma)	5.9525	กรัม
Penicillin G	20,000	unit
Streptomycin G	200.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized Millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร		
2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 20%		
RPMI medium	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)		
เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%		
ใน RPMI medium	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร
4. สารละลายเพื่อใช้ในการหลอมรวมเซลล์ (40% Polyethylene glycol)		
Polyethylene glycol	2.0	กรัม
RPMI medium	3.0	มิลลิลิตร

5. สารละลายเพื่อใช้ในการแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (12% Dimethyl sulfoxide)

Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium	88.0	มิลลิลิตร





สารเคมีสำหรับ 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 (tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		

1.3 4X Stacking gel buffer (tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มิลลิลิตร

1.4 SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10%

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		
Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร
1.7 2x treatment buffer		
Tris ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
β -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
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.75	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	20.0	ไมโครลิตร
2.2 4% stacking gel		
Monomer solution (1.1)	2.66	มิลลิลิตร
Tris ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	10.0	ไมโครลิตร

3. Running buffer

4X Tank buffer	12.0	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมโปรตีน และล้างสีส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมโปรตีน (Coomassie blue)

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

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain (สี Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01%)

Stain stock	50.0	มิลลิลิตร
Methanol	250.0	มิลลิลิตร
Acetic acid	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain)

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

Methanol	550.0	มิลลิลิตร
Acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

5. Towbin transfer buffer pH 8.8 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Western blotting

Tris	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร





สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ class และ Subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

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, concentrated (10x) (1M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H_2O_2)
12. ABTS substrate, concentrated (50x) (2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid))
13. Blocking solution, concentrated (50x) (25% BSA and 0.05% NaN_3)
14. HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), concentrated (50x)
15. Goat anti- Mouse IgGAM, concentrated (50x) (0.5 mg/ml containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
16. 50% Tween 20



บัฟเฟอร์และสารเคมีในงาน Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

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

2. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 0.5%

สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%	50.0	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	950.0	มิลลิลิตร

3. Citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

Sodium citrate	28.41	กรัม
1% Merthiolate	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N (H_2SO_4)

Sulfuric acid conc. (H_2SO_4)	27.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.0	มิลลิลิตร

5. O-Phenylenediamine (OPD)



ภาคผนวก ช

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ immunohistochemistry (IHC)

1. coated slide solution

Gelatin	1.0	กรัม
$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	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% (P1+)

Fetal bovine serum	10.0	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร

4. สี Enrilich's acid hematoxylin

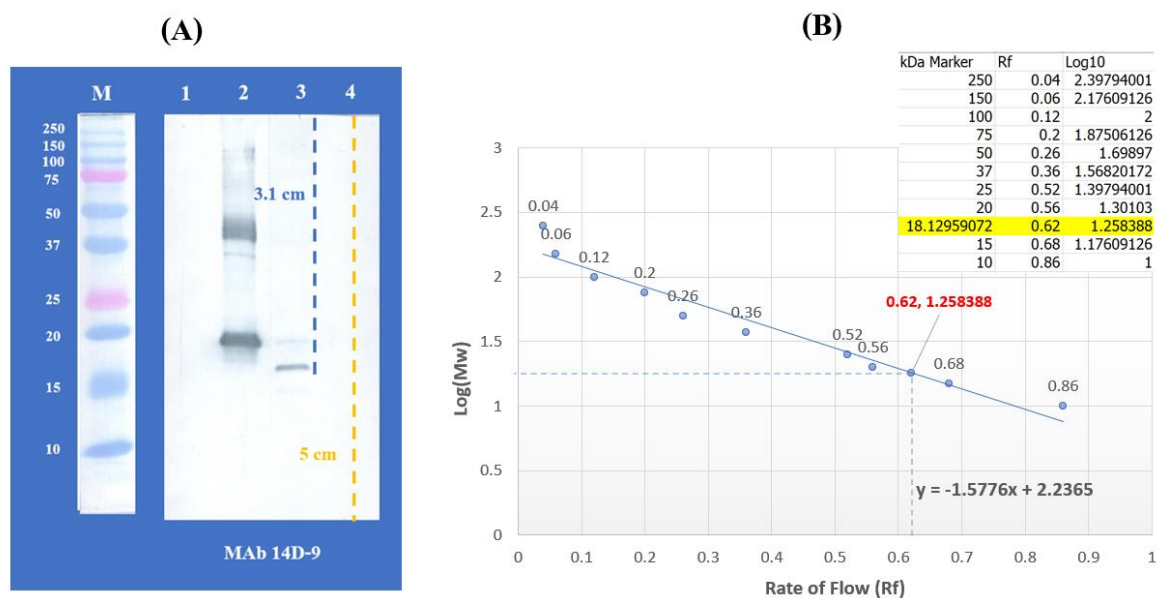
Hematoxylin	8.0	กรัม
95% ethanol	400.0	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.0	กรัม
Glycerine	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร

5. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร



การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเชื้อไวรัส TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ



ภาพประกอบ 31 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ

โดยหา ค่า R_f จากแถบโปรตีนของเชื้อไวรัส TiLV ของสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อซึ่งเท่ากับ $3.1 \div 5 = 0.62$ (A) จากนั้นนำค่า R_f ของแถบโปรตีนของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของค่า R_f ของแถบโปรตีนมาตรฐานกับค่า Log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดซึ่งจะได้ค่าสมการ $y = -1.5776x + 2.2365$ (B)

จากนั้นนำค่า R_f ของแถบโปรตีนของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อ ไปแทนในสมการ จะได้ค่า $y = -1.5776 (0.62) + 2.2365$

เมื่อแทนค่าในสมการแล้วจะได้ค่า $\text{Log}(Mw) = 1.258388$

และเมื่อกลับค่า Log จะได้ค่า $Mw = 18.12959072$

ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของเชื้อ TiLV จากสารสกัดเนื้อเยื่อปลาติดเชื้อจะมีค่าอยู่ที่ประมาณ 18 kDa

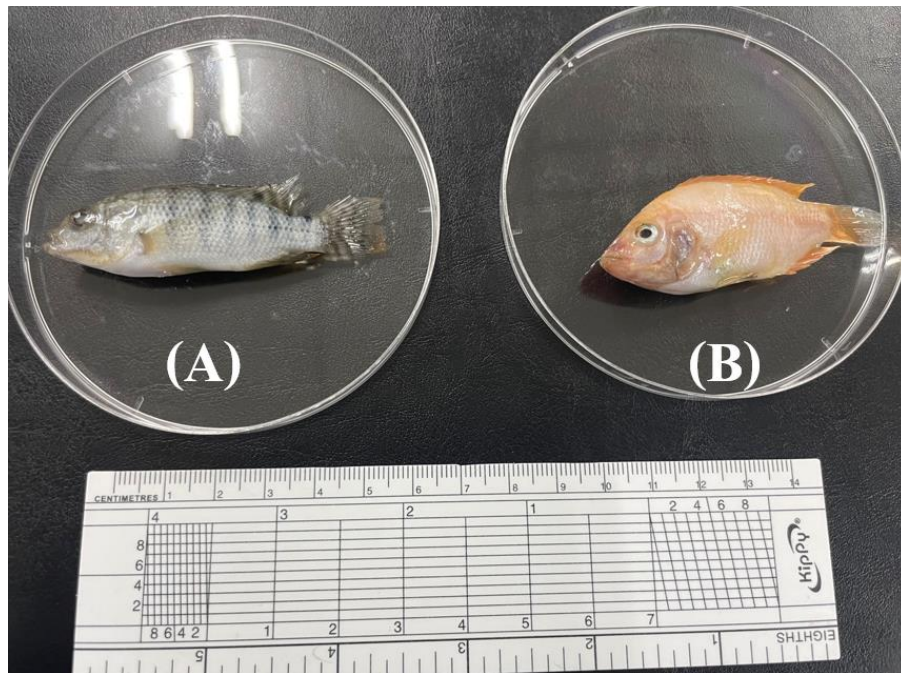
การคำนวณเปรียบเทียบค่าความไวของวิธี dot blotting เทียบกับวิธี RT-PCR

ทำโดยคำนวณความไวจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 14D-9 ผสมกับ 8H-3 ซึ่งสามารถตรวจตัวอย่างปลาติดเชื้อที่เจือจางได้ 1:16 เท่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting ส่วนการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ TiLV จากสารสกัด RNA ที่ทำการเจือจาง 1:100 เท่า

ดังนั้นการตรวจสอบด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิด มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ $100 \div 16 = 6.25$ เท่า







ภาพประกอบ 32 ภาพตัวอย่างปลานิลและปลาทับทิมที่นำมาใช้ในการศึกษานี้

โดยปลานิลและปลาทับทิมที่นำมาใช้ในการทดลองมีขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยประมาณ 5-7 เซนติเมตร

A) ตัวอย่างปลาที่ไม่ติดเชื้อ

B) ตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ มีอาการเห็งอกบวมและมีเลือดออกบริเวณเหงือกและลำตัว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทัชพงศ์ ไสภา
วัน เดือน ปี เกิด	24 มกราคม 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2561 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

