



การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินชนิด M ของปลากะพงขาว
สำหรับการติดตามการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังจากการได้รับวัคซีน

DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO IMMUNOGLOBULIN M
OF ASIAN SEABASS, LATES CALARIFER FOR MONITORING IMMUNE RESPONSE
AFTER VACCINATION

ธนพนธ์ สุนทรสีมะ

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินชนิด M ของปลากะพงขาวสำหรับการติดตามการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังการได้รับวัคซีน



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO
IMMUNOGLOBULIN M OF ASIAN SEABASS, LATES CALARIFER FOR
MONITORING IMMUNE RESPONSE AFTER VACCINATION



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Biotechnology)
Faculty of Science Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินชนิด M ของปลากะพงขาว

สำหรับการติดตามการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังจากการได้รับวัคซีน

ของ

ธนพนธ์ สุนทรสีมะ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญ
พร)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทาง
กูร)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินชนิด M ของปลากะพงขาวสำหรับการติดตามการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังจากการได้รับวัคซีน
ผู้วิจัย	ธนพนธ์ สุนทรสีมะ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศีวาพร ลงยันต์

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวผลิตโดยเตรียมตะกอน Ig/BSA complex จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาด้วยโปรตีน BSA แล้วนำซีรัมปลา มาตกตะกอนกับ BSA ด้วยวิธี immunoprecipitation จากนั้นนำตะกอน Ig/BSA complex มาปลุกภูมิคุ้มกันในหนูขาว และทำการเก็บซีรัมจากหนูมาตรวจสอบความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาด้วยวิธี Western blot แล้วทำการแยกม้ามจากหนูตัวที่ตอบสนองได้ดีที่สุดมาหลอมรวมกับเซลล์ไมเอโลมาเพื่อทำการผลิตเซลล์ลูกผสม จากการทดสอบด้วยวิธี dot blot และ Western blot พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 8 โคลน แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (6H7, 6H8 และ 15C8) จำเพาะกับโปรตีนสายยาว กลุ่มที่ 2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (6H11) จำเพาะกับโปรตีนสายสั้น และกลุ่มที่ 3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (4C7, 9D4, 11C9 และ 15G7) จำเพาะกับโปรตีนสายยาว และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของปลา นิลได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดอยู่ในคลาส IgG เมื่อตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blot พบว่าโคลน 6H7 และ 6H8 มีความไวในการจับกับอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมปลาได้มากที่สุด ดังนั้นจึงนำไปใช้ในการตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันจำเพาะในปลากะพงขาว หลังจากการได้รับการปลุกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* จำนวน 2 ครั้ง ด้วยวิธี triple antibody indirect ELISA พบว่าปลาที่ได้รับการปลุกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อแบคทีเรียมีระดับแอนติบอดีที่จำเพาะเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงคาดว่าจะสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจ ELISA สำหรับตรวจภูมิคุ้มกันจำเพาะในปลากะพงขาว หลังจากการได้รับวัคซีนต่อไป

คำสำคัญ : โมโนโคลนอลแอนติบอดี, อิมมูโนโกลบูลิน, ปลากะพงขาว, immunoprecipitation, ELISA



Title	DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO IMMUNOGLOBULIN M OF ASIAN SEABASS, LATES CALARIFER FOR MONITORING IMMUNE RESPONSE AFTER VACCINATION
Author	TANAPON SOONTHONSRIMA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Associate Professor SIWAPORN LONGYANT , Ph.D.

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to immunoglobulin (Ig) of Asian sea bass were generated using an Ig/BSA complex as immunogen. The Ig/BSA complex was obtained by the immunization of the fish with BSA and then the reactive fish anti-BSA antisera were mixed with BSA to produce the fish Ig/BSA complex. After the Ig/BSA complex was immunized in to mice, serum from each mouse was collected to determine the specificity of the immunoglobulin of the fish by the Western blot method. One of the mice with the best responses was used as spleen donor for hybridoma production. The selection of hybridoma cells was performed by dot blot and Western blot methods. The eight hybridoma clones specific to the immunoglobulin of Asian sea bass were obtained. They were classified into three groups as follows: group one (6H7, 6H8 and 15C8) specific to heavy chain of immunoglobulin, group two (6H11) specific to light chain of immunoglobulin and group three (4C7, 9D4, 11C9 and 15G7) specific to heavy chain of immunoglobulin but demonstrated cross reaction with tilapia serum. All MAbs were in the IgG class. The 6H7 and 6H8 demonstrated the highest sensitivity levels. These MAbs may be used for the determination of specific immune responses in Asian sea bass after immunization with *Vibrio vulnificus* by indirect ELISA method. Therefore, these MAbs could be used to develop an ELISA test kit for determination of the specific fish immune response after vaccination.

Keyword : monoclonal antibody, immunoprecipitation, immunoglobulin, Asian sea bass,

ELISA



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และแนะนำของที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์เล่มนี้ คือ รศ. ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้ได้คำปรึกษา และชี้แนะในการทำวิจัยตลอดมา ตั้งแต่ระดับปริญญาตรี จนถึงระดับปริญญาโท ความคิดเห็นของอาจารย์มีประโยชน์ในการทำวิจัยนี้ อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานวิจัยด้วย ขอขอบพระคุณ ศ. ดร. ไพศาล สติกรกุล ที่ถึงแม้ไม่ได้เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์โดยตรง แต่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องในงานวิจัยโดยตลอดมา นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณ ดร.ประดิษฐ์ หวังมาน และดร. อรรคพล วณิกสัมพันธ์ ที่ให้คำปรึกษา และแนะนำเมื่อเกิดปัญหาระหว่างการดำเนินวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณตัวผู้วิจัยเองที่อดทน และพยายามดำเนินงานวิจัยให้ลุล่วงไปได้ ในที่สุด และขอขอบคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุนการศึกษาตลอดมา

ธนพนธ์ สุนทรสีมะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ฌ
สารบัญตาราง.....	ท
สารบัญรูปภาพ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง และความสำคัญของการวิจัย.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย	3
สมมุติฐานในการวิจัย.....	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	5
1. ชีววิทยาของปลากะพงขาว	5
1.1 อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของปลากะพงขาว.....	6
1.2 โครงสร้าง และลักษณะทั่วไป	6
1.3 วงชีวิต	7
2. การเพาะเลี้ยงและการเกิดโรคระบาดในปลากะพงขาว	7
2.1 การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว	7
2.2 การเกิดโรคระบาดในปลากะพงขาว.....	9
3. วัคซีน และการป้องกันโรคระบาดในปลา	10

4. ระบบภูมิคุ้มกันในปลากระดุกแข็ง	12
4.1 ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ	13
4.2 ภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ	13
5. อิมมูโนโกลบูลินในปลากระดุกแข็ง	14
6. โมโนโคลนอลแอนติบอดี	16
7. การผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระดุกแข็ง	17
8. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	24
อุปกรณ์และสารเคมี	24
1. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง	24
1.1 หนูขาว (Swiss mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม	24
1.2 ปลากระพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>) จากฟาร์มในจังหวัดสมุทรสงคราม	24
1.3 ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>) จากฟาร์มในจังหวัดสมุทรสงคราม	24
2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
3. สารเคมี	25
1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาว	28
1.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากระพงขาวด้วยโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ..	28
1.2 การทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลากระพงขาวด้วยวิธี ดับเบิลอิมมูโน ดิฟฟิชั่น	28
1.3 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนอิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาวด้วยวิธี immunoprecipitation	29
1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ Ig/BSA complex ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	29

2. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว	29
3. การผลิต การคัดเลือก และการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	30
3.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	30
3.2 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม.....	30
3.2.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blot.....	30
3.2.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blot.....	31
3.2.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blot.....	31
3.2.3.1 การตรวจความจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot	31
3.2.3.2 การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซีรัมปลานิลด้วยวิธี Western blot	31
3.2.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี Limited dilution	32
3.2.4 การเก็บเซลล์ลูกผสม	32
4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	32
4.1 การตรวจสอบอิพิโทปที่ทับซ้อนของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	32
4.2 การจำแนก Class และ Subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID (HRP)	33
4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blot.....	34
5. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลากะพงขาว	35
5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio vulnificus</i>	35
5.2 การปลูกภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยเชื้อ <i>V. vulnificus</i>	35

5.3 การตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากะพงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA และ Western blot	35
5.3.1 การตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากะพงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Triple antibodies indirect ELISA.....	35
5.3.2 การตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากะพงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	38
1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว	38
1.1 การทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิชั่น.....	38
1.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตะกอน Ig/BSA complex ด้วยวิธี SDS-PAGE	38
2. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว	40
3. การผลิต การคัดเลือก และการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	40
4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	44
4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	44
4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	45
4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลาโดยวิธี dot blot.....	45
5. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบภูมิคุ้มกันจำเพาะหลังจากการปลูกภูมิคุ้มกัน	47
5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio vulnificus</i> สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในปลา	47
5.2 การตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันจำเพาะในปลาหลังได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Triple indirect ELISA และ Western blot	47
บทที่ 5 สรุป และวิเคราะห์ผลการทดลอง	50

บรรณานุกรม	55
ประวัติผู้เขียน.....	67



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สรุปการผลิตแอนติบอดีต่ออิมูโนโกลบูลินของปลากระดุกแข็งชนิดต่างๆ	20
ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	24
ตาราง 3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	25
ตาราง 4 การตรวจสอบอิทธิพลของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมูโนโกลบูลินของปลากระดุก ด้วยวิธี INDIRECT ELISA.....	44
ตาราง 5 ความจำเพาะ และความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้.....	46



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 LATES CALCARIFER.....	5
ภาพประกอบ 2 การกระจายตัวของปลากะพงขาวในธรรมชาติ	6
ภาพประกอบ 3 การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดิน และในกระชัง.....	8
ภาพประกอบ 4 แสดงตำแหน่งอวัยวะในระบบน้ำเหลืองของปลากะดุกแดง T; ต่อมไทมัส, RLT; เนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณไต และ S; ม้าม	12
ภาพประกอบ 5 อิมมูโนโกลบูลินที่มีลักษณะ 4 แขน (TETRAMER) ในซีรัมปลากะดุกแดง ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ได้แก่ IGM และ IGT เปรียบเทียบกับอิมมูโนโกลบูลินที่มีลักษณะ 5 แขน (PEMTAMER) ในซีรัมมนุษย์ ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยโปรตีน J (J CHAIN)	15
ภาพประกอบ 6 สรุปลขั้นตอน ในการดำเนินงานวิจัย	28
ภาพประกอบ 7 การตรวจสอบอิมมูโนโกลบูลินของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี INDIRECT ELISA (A ถึง D แสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด)	33
ภาพประกอบ 8 การจำแนก CLASS และ SUBCLASS ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	34
ภาพประกอบ 9 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลากะพงขาว.....	37
ภาพประกอบ 10 การทดสอบความจำเพาะของซีรัมของปลาจากการปลูกภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลากะพงขาวด้วยโปรตีน BSA ทดสอบด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น โดยใส่ซีรัมของปลาแต่ละตัวลงในหลุมต่างๆ (หมายเลข 1-6) และใส่โปรตีน BSA ใส่ไว้ในหลุมตรงกลาง (B) และทำการย้อมแถบตะกอนด้วยสีย้อมหลังจากการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีของปลา กับโปรตีน BSA พบแถบตะกอนสีน้ำเงิน (หัวลูกศร) ของซีรัมปลาที่มีการตอบสนองสูงปรากฏขึ้น (หลุมที่ 1, 5 และ 6) ส่วนซีรัมปลาที่ไม่มีการตอบสนองต่อโปรตีน BSA หรือมีการตอบสนองน้อยไม่พบแถบตะกอนเกิดขึ้น (หลุมที่ 2, 3 และ 4).....	39
ภาพประกอบ 11 การตรวจสอบองค์ประกอบของตะกอน IG/BSA COMPLEX ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำ (1) IG/BSA COMPLEX (2) โปรตีน BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ (3) ซีรัมของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้นทำการย้อมสีเจลด้วยสี COOMASSIE BLUE R-250 M; โปรตีนมาตรฐาน H; โปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลิน L; โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินและ B; โปรตีน BSA.....	39
ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยตะกอน IG/BSA COMPLEX ด้วยวิธี WESTERN BLOT ทำโดยนำ (1) ซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน (2) ตะกอน IG/BSA COMPLEX และ (3) โปรตีน BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นทำการย้ายแถบโปรตีนจากเจลลงกระดาษไนโตรเซลลูโลส และบ่มด้วยแอนติซีรัมจากหนูขาวแต่ละตัว (MOUSE 1-4) M; โปรตีนมาตรฐาน H; โปรตีนสายยาวของ อิมมูโนโกลบูลิน L; โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลิน, B; โปรตีน BSA และ *; โปรตีนอื่นๆ ในซีรัม	41
ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลากะพงขาวด้วยวิธี DOT BLOT โดยการหยดตัวอย่างต่างๆ คือ ซีรัมปลากะพงขาว โปรตีน BSA ตะกอน IG/BSA COMPLEX หรือซีรัมปลานิล ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับ (1) แอนติซีรัมจากหนูขาวที่ทำการดูดซับด้วยโปรตีน BSA หรือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ ดังนี้ (2) 6H7, (3) 6H8, (4) 15C8, (5) 6H11, (6) 4C7, (7) 9D4, (8) 11C9 และ (9) 15G7 ตามลำดับ.....	41
ภาพประกอบ 14 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี WESTERN BLOT โดยนำ(A) ซีรัมของปลากะพงขาว และ (B) ตะกอน IG/BSA COMPLEX มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15%SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่กระดาษไนโตร	

เซลล์โลส นำไปบ่มกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ (1) 6H7 (2) 6H8 (3) 15C8 (4) 6H11 (5) 4C7 (6) 9D4 (7) 11C9 และ (8) 15G7 M; โปรตีนมาตรฐาน	43
ภาพประกอบ 15 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี WESTERN BLOT โดยนำ(A) ซีรัมของปลากะพงขาว และ(B) ซีรัมของปลานิลมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15% SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ (1) 6H7 (2) 6H8 (3) 15C8 (4) 6H11 (5) 4C7 (6) 9D4 (7) 11C9 และ (8) 15G7 M; โปรตีนมาตรฐาน	43
ภาพประกอบ 16 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลากะพงขาวด้วยวิธี DOT BLOT โดยการหยดซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันที่เจือจางด้วย PBS ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1:100 ถึง 1:256,000 เท่า ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับแอนติบอดีต่างๆ ได้แก่ (1) แอนติซีรัมจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยตะกอน Ig/BSA COMPLEX และ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้คือ (2) 6H7, (3) 6H8, (4) 15C8, (5) 6H11, (6) 4C7, (7) 9D4, (8) 11C9 และ (9) 15G7 ตามลำดับ	46
ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบยืนยันชนิดของ V. VULNIFICUS ด้วยวิธี SDS-PAGE (1) และ WESTERN BLOT (2) และการตรวจสอบความจำเพาะของซีรัมของปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรียโดยวิธี TRIPLE ANTIBODY-WESTERN BLOT (3) ทำโดยนำเชื้อ V. VALNIFICUS ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วตัดเจลมาย้อมสี COOMASSIE BLUE (1) เจลส่วนที่เหลือทำการย้ายโปรตีนลงกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้วบ่มด้วย (2) โมโนโคลนอลแอนติบอดี 20D4 ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย V. VULNIFICUS หรือบ่มกับ (3) ซีรัมของปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย V. VULNIFICUS และตามด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6H8 ที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว M; โปรตีนมาตรฐาน.....	48
ภาพประกอบ 18 การติดตามแอนติบอดีจากซีรัมของปลากะพงขาวที่มีความจำเพาะกับเชื้อ V. VULNIFICUS ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 1 (วันที่ 14) และครั้งที่ 2 (วันที่ 28) เทียบกับซีรัมจากปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันวันที่ 0 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6H8 ในการติดตามด้วยวิธี INDIRECT ELISA ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN $\pm$ SE).....	49

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง และความสำคัญของการวิจัย

ปลากะพงขาว หรือ Asian sea bass (*Lates calcarifer*) เป็นปลาน้ำกร่อย กินเนื้อเป็นอาหาร และในธรรมชาติสามารถพบได้ตามบริเวณชายฝั่ง ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากได้รับความนิยมในการบริโภคสูง ทำให้เป็นสัตว์สำคัญทางเศรษฐกิจในหลายๆ ประเทศ เช่น ประเทศไทย และประเทศออสเตรเลีย ในระหว่างปี ค.ศ. 2007-2009 ประเทศไทยมีการส่งออกเนื้อปลากะพงขาวถึง 104 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 12 ล้านบาท และยังมีการส่งออกลูกปลาประมาณ 38 ล้านตัว หรือคิดเป็นมูลค่าประมาณ 61 ล้านบาท (Thipduang, 2012) จากมูลค่าที่เพิ่มสูงขึ้นของปลากะพงขาวทำให้เกษตรกรสนใจหันมาเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้มากขึ้น และมีการเพาะเลี้ยงอย่างหนาแน่น ทั้งนี้การขาดความเอาใจใส่ในการรักษาความสะอาดของบ่อเลี้ยงทำให้เกิดการระบาดของโรคซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย และไวรัสหลายชนิด (Azad, Jithendran, Shekhar, Thirunavukkarasu, & de la Pena, 2006; Azad, Shekhar, Thirunavukkarasu, & Jithendran, 2007; Azad et al., 2005; Azad, Thirunavukkarasu, Kailasam, & Rajan, 2004; Sharma, Rathore, Verma, Sadhu, & Philipose, 2013) ดังนั้นการผลิตและให้วัคซีนต่อเชื้อแบคทีเรีย และไวรัสที่ก่อโรสดังกล่าวจะช่วยลดความสูญเสียที่จะเกิดขึ้นได้ ทำให้การตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้จึงมีความจำเป็นอย่างมาก (Chettri et al., 2015)

สำหรับวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีนได้มีการพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาในการตรวจสอบโดยผลิตแอนติบอดี (antibody) ในรูปโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) ที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากะตักแดงหลายชนิด (Soonthonsrima, Wangman, Sithigorngul, & Longyant, 2017; Yang, Tang, Sheng, Xing, & Zhan, 2018) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้วิธีการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินเพื่อใช้เป็นแอนติเจน (antigen) สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวทำโดยการใช่วิธีโครมาโทกราฟีคอลัมน์ต่างๆ ในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี immunoprecipitation ทำโดยใช้โปรตีน bovine serum albumin (BSA) ฉีดให้กับปลากะตักแดง เพื่อเป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ BSA ให้เพิ่มสูงขึ้น และเก็บซีรัมมาทำการตกตะกอน

อิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งวิธีการนี้มีความสะดวก และง่ายในขั้นตอนการเตรียม รวมถึงมีราคาต่ำเมื่อเทียบกับการใช้คอลัมน์ในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน จากนั้นนำอิมมูโนโกลบูลินของปลามาปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเพื่อทำการผลิต และคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว และคาดว่าจะสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะด้วยวิธี indirect ELISA ได้ และอาจจะสามารถใช้แอนติบอดีดังกล่าวในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส หรือแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดนี้แบบทางอ้อมได้ด้วย

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำโดยนำบีเซลล์ (B-lymphocyte) และเซลล์มะเร็ง (myeloma) มาหลอมรวมกัน เพื่อให้ได้เซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่มีคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการจากบีเซลล์ และความอมตะของเซลล์มะเร็ง ทำให้ได้ผลผลิตของแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะ และสามารถทำได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมที่ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการเก็บน้ำเลี้ยงมาใช้ในการทดสอบด้วยกระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่างๆ ซึ่งสามารถนำไปใช้กับงานวิจัยพื้นฐาน (Y. Li et al., 2015) จนถึงนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่น การนำไปใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส (Wangman et al., 2012) หรือแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง (Pengsuk et al., 2010) เป็นต้น ดังนั้นจึงคาดว่าจะการผลิต และพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวจะสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในการศึกษาและตรวจสอบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดนี้ได้ ทั้งนี้ในปลากะตักซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกาย โดยสามารถสร้างแอนติบอดี (อิมมูโนโกลบูลิน) มาต่อต้านและส่งเสริมการทำลายสิ่งแปลกปลอมของภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติได้ ซึ่งการพัฒนาและใช้วัคซีนสำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านเชื้อโรคที่อาจเกิดการระบาดในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น วัคซีนต่อเชื้อไวรัส (Buonocore et al., 2017) และแบคทีเรีย (Chettri et al., 2015) โดยรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนเหล่านี้ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคในปลาที่ได้รับวัคซีนนั้นทำโดยวิธีการฉีดเชื้อเป็นให้กับปลาที่ได้รับวัคซีน แล้วทำการเก็บผลอัตราการรอดชีวิตของปลาเทียบกับกลุ่มควบคุม (LaFrentz & Shoemaker, 2015; Soto et al., 2016) ซึ่งวิธีนี้ทำให้ต้องสูญเสียปลาไปจำนวนมากในการศึกษาแต่ละครั้ง และอาจเกิดการตายของปลาจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ หรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในการทดลองได้ ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณที่เพิ่มขึ้นของอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมของปลาที่ได้รับวัคซีนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะมากกว่าเนื่องจากอิมมูโนโกลบูลินของปลาเป็นส่วนที่ตอบสนอง

ต่อเชื้อโรคโดยตรง (Chettri et al., 2015; Jaafar et al., 2017; Villumsen, Neumann, Ohtani, Strøm, & Raida, 2014)

สำหรับการศึกษานี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินทั้งโปรตีนสายยาว หรือโปรตีนสายสั้นของปลากะพงขาว รวมไปถึงคาดว่าจะได้แอนติบอดีที่มีความไวสูงในการจับกับอิมมูโนโกลบูลิน เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจสอบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะที่เพิ่มขึ้นหลังจากปลาชนิดนี้ได้รับวัคซีน หรือติดเชื้โรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายดังนี้

1. เพื่อแยกอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวจากซีรัมของปลาสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลากะพงขาว

ขอบเขตการวิจัย

1. การแยกอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมปลากะพงขาว และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนอิมมูโนโกลบูลินสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว
3. การคัดเลือกและการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา
4. การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลากะพงขาวด้วยวิธี ELISA

สมมุติฐานในการวิจัย

สามารถเตรียมแอนติเจน Ig/BSA complex ด้วยวิธี immunoprecipitation เพื่อใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวได้ และสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ได้ภูมิโนโกลบูลินของปลากะพงขาวที่บริสุทธิ์บางส่วนจากวิธี immunoprecipitation
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับภูมิโนโกลบูลินของปลากะพงขาวในรูปแบบธรรมชาติ
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลากะพงขาวต่อเชื้อที่ปลุกภูมิคุ้มกันได้



บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

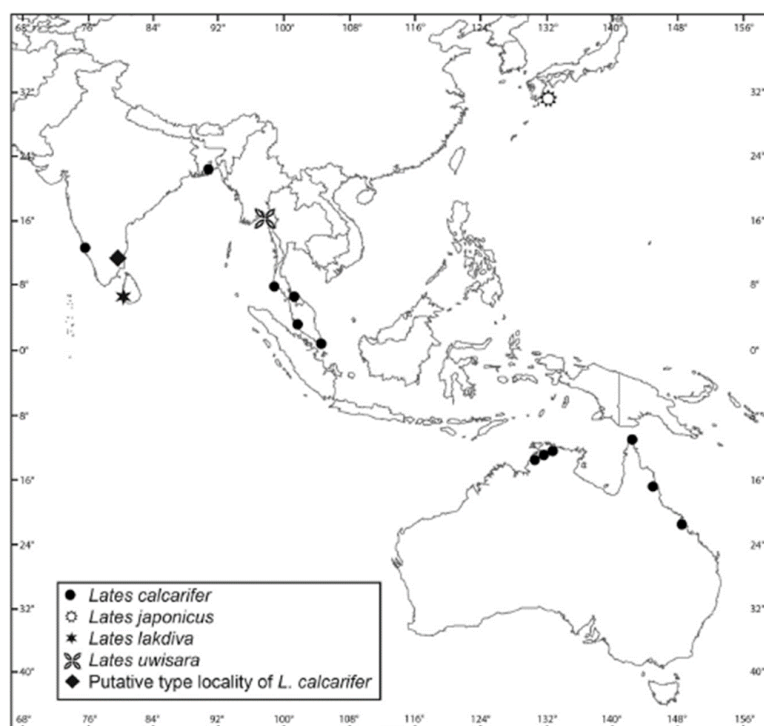
1. ชีวิตวิทยาของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว หรือ Asian sea bass หรือ Giant sea perch หรือ Barramundi (Mathew, 2009) (ภาพประกอบ 1) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศในทวีปเอเชีย และออสเตรเลีย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* (Bloch, 1970) ปลาชนิดนี้มีขนาดกลางถึงใหญ่มากอาศัยอยู่ก้นพื้นของชายฝั่ง หรือปากแม่น้ำ ลึกลงไปประมาณ 10-50 เมตร กินสัตว์น้ำขนาดเล็ก เช่น กุ้ง ปู และปลาขนาดเล็กเป็นอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นปลาที่นิยมล่าเป็นเกมกีฬาของประเทศออสเตรเลีย เนื่องจากมีราคา และความต้องการจากตลาดสูง รวมไปถึงมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ในประเทศแถบทวีปเอเชียรู้จักปลากะพงขาวในชื่อ sea bass แต่ในประเทศออสเตรเลียเรียกปลาชนิดนี้ว่า barramundi ในอดีตที่ผ่านมา ปลาชนิดนี้ถูกจัดจำแนกอยู่ในหลายตระกูล (family) เช่น Serranidea เป็นต้น แต่ในปัจจุบันถูกจัดอยู่ในตระกูล Centropomidea และพบว่ามี การแพร่กระจายตามธรรมชาติในบริเวณมหาสมุทรอินเดีย ตอนกลาง จนถึงฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิกที่ละติจูด 24 องศาเหนือถึง 25 องศาใต้ และลองติจูด 50 องศาตะวันออกถึง 160 องศาตะวันตก (Jerry, 2014; Mathew, 2009) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 1 *Lates calcarifer*

ที่มา: (Jerry, 2014)



ภาพประกอบ 2 การกระจายตัวของปลากะพงขาวในธรรมชาติ

ที่มา: (Jerry, 2014)

1.1 อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของปลากะพงขาว

Phylum: Chordata

Class: Pisces

Subclass: Teleostomi

Order: Percomorphi (Perciformes)

Suborder: Percoidei

Family: Centropomidae (Latidae)

Genus: *Lates*

Species: *Lates calcarifer* (Bloch, 1790)

ที่มา: (Jerry, 2014; Mathew, 2009; วิมล เหมะจันทร์, 2556)

1.2 โครงสร้าง และลักษณะทั่วไป

ปลากะพงขาวได้รับความนิยมนำมาบริโภคเป็นจำนวนมากในประเทศแถบเอเชีย และประเทศออสเตรเลีย มีการบันทึกขนาด และน้ำหนักที่เลี้ยงได้สูงสุดถึง 44 กิโลกรัม สามารถมี

ความยาวได้ถึง 1.3 เมตร (Mathew, 2009) ลักษณะลำตัวของปลาชนิดนี้ ค่อนข้างยาว และแบนข้าง มีปากขนาดกว้างโดยที่ขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรด้านบนเล็กน้อย มีฟันละเอียดรูปกรวยเล็กกระจายตัวทั้งขากรรไกรบนและล่าง มีตาขนาดกลางอยู่ชิดกับส่วนของจมูก บริเวณช่องปิดเหงือก (operculum) พบขอบหยักที่กระดูกส่วน preopercle และมีกระดูกพุงเยื่อฐานช่องเหงือก (branchiostegal ray) จำนวน 7 ชิ้นยึดติดกันด้วยเยื่อฐานช่องเหงือก (branchiostegal membrane) ครีบหลัง (dorsal fin) อยู่ตำแหน่งขนานกับครีบท้อง (pelvic fin) มีเงี่ยง 7 ถึง 9 ชิ้น ก้านอ่อน (soft rays) อยู่ถัดจากครีบหลังเล็กน้อย มีจำนวน 10 ถึง 14 ชิ้น ครีบก้น (anal fin) มีเงี่ยง 3 ชิ้น และก้านอ่อน 7 ถึง 9 ชิ้น มีครีบทหางชนิด homocercal tail แบบกลม (rounded tail) นอกจากนี้ปลากะพงขาวมีขนาดความยาวมาตรฐานลำตัวเท่ากับ 28-34% ซึ่งใหญ่กว่าปลากะพง *L. lakdiva* แต่มีจำนวนเกล็ด 6 แถวอยู่ระหว่างครีบหลังกับเส้นกลางลำตัว (lateral line) ซึ่งน้อยกว่าปลากะพง *L. japonicas* (มีเกล็ด 7-8 แถว) (Jerry, 2014; Mathew, 2009; นิสรารณณ์ เพ็ชรสุทธิ, 2551; วิมล เหมะจันทร์, 2556)

1.3 วงชีวิต

ปลากะพงขาววัยเจริญพันธุ์จะวางไข่จากแหล่งน้ำจืดที่อาศัยอยู่มาผสมพันธุ์ในน้ำทะเล บริเวณที่มีความเค็มของน้ำประมาณ 30-32 ppt และมีการปฏิสนธิแบบภายนอก (external fertilization) โดยปลาตัวเมียที่ไข่แก่จะทำการวางไข่ และปลาตัวผู้จะทำการปล่อยน้ำเชื้อมาผสมกับไข่ ภายในเวลา 24 ชั่วโมงไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจะฟักตัว จากนั้นตัวอ่อน (fry) จะว่ายน้ำเจริญเติบโตในบริเวณของป่าชายเลนจนกระทั่งเมื่อเจริญเติบโตได้ในระยะหนึ่งจะว่ายทวนกระแสน้ำขึ้นไปอาศัยในแหล่งน้ำจืด และใช้ระยะเวลาอีกประมาณ 3-4 ปีในการเจริญเติบโตจนมีระบบสืบพันธุ์เจริญเติบโตสมบูรณ์ แล้วจึงว่ายออกสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์และวางไข่อีกครั้ง (Jerry, 2014; Mathew, 2009)

2. การเพาะเลี้ยงและการเกิดโรคระบาดในปลากะพงขาว

2.1 การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว

การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวมีอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย และประเทศออสเตรเลีย ในอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการเลี้ยง และเพิ่มผลผลิตจนเป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่สำคัญในหลายๆ ประเทศ โดยที่ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยที่สามารถเลี้ยงได้ทั้งในกระชัง บ่อดิน และบ่อปูน (Aldon, 1997; Tookwinas, 1989) เลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตเร็ว ในการเลี้ยงปลาชนิดนี้สามารถทำได้หลากหลายวิธีตั้งแต่การเลี้ยงในกระชังตามแหล่งน้ำไหล จนถึง

การเลี้ยงในบ่อที่ขุดขึ้น และไม่จำเป็นต้องเลี้ยงภายในบริเวณใกล้ชายฝั่ง สามารถเลี้ยงในจังหวัดหรือพื้นที่ที่ถัดเข้ามาในแผ่นดินได้ การเลี้ยงแบบนี้อาศัยความรู้ในการปรับสภาพน้ำให้เหมาะสม โดยสามารถเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 0-31 ppt สำหรับประเทศไทยในปีค.ศ. 2009 จังหวัดฉะเชิงเทรา ปัตตานี และสงขลา เป็นจังหวัดที่มีการเพาะเลี้ยงได้ผลผลิตรวมมากที่สุดถึง 8,697 ตัน (Jerry, 2014)



ภาพประกอบ 3 การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดิน และในกระชัง

ที่มา: (Aldon, 1997)

การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงอยู่ด้วยกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงในบ่อ และการเลี้ยงในกระชัง (ภาพประกอบ 3) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในบ่อยังคงมีความหลากหลายที่ต่างกันอย่างสิ้นเชิงตามสภาพของเกษตรกร และพื้นที่ของเกษตรกร สามารถแบ่งได้ดังนี้ 1. การเลี้ยงในนาข้าว เป็นวิธีของเกษตรกรที่สามารถเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นรายได้เสริมนอกจากการปลูกข้าว ข้อดีของการเลี้ยงแบบนี้คือสามารถใช้น้ำจากนาข้าวเลี้ยงปลาไปด้วได้ แต่ข้อเสียคือต้องใช้พันธุ์ปลากะพงขาวที่อาศัยในน้ำจืดได้ และต้องกินอาหารที่อยู่ในแหล่งนาข้าวได้ เช่น ลูกปลา ลูกกุ้ง และแมลง เป็นต้น 2. การเพาะเลี้ยงในนาทุ่ง วิธีนี้เหมือนกับการเพาะเลี้ยงในนาข้าว แตต่างกันตรงที่ไม่ได้เลี้ยงกุ้ง และปลาพร้อมกัน เมื่อเลี้ยงกุ้งเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงค่อยทำความสะอาดบ่อ แล้วจึงนำปลาลงมาเลี้ยง ข้อดีคือไม่ต้องขุดบ่อใหม่สำหรับเลี้ยงปลา แต่สามารถใช้บ่อทุ่งที่ใช้งานเสร็จแล้วมาเลี้ยงต่อได้เลย นอกจากนี้การเลี้ยงในบ่อทุ่งยังมีพื้นที่มากกว่าการเลี้ยงในนาข้าว ทำให้ปลาที่มีพื้นที่ในการว่ายน้ำ และอาศัยอยู่ในบ่อ แต่ข้อเสียคือหากบ่อทุ่งนั้นทำความสะอาดไม่ดี หรือมีการระบาดของโรคที่มีมาก่อนหน้านี้แล้วโรคนั้นสามารถติดต่อสู่ปลาได้ก็จะส่งผลให้ปลาเกิดความเสียหายได้เช่นเดียวกัน 3. การเลี้ยงในบ่อดินแบบพัฒนา โดยอาศัยองค์ความรู้ในการบริหารจัดการน้ำ และการตรวจสอบโรคเข้ามาช่วยในการจัดการ ส่วนใหญ่

การเลี้ยงแบบนี้เป็นระบบปิด คือไม่มีน้ำจากแหล่งธรรมชาติที่ไม่ได้รับการบำบัดเข้ามาเจือปน และไม่มีน้ำจากภายในที่ปราศจากการบำบัดออกสู่ธรรมชาติ นอกจากนี้การเลี้ยงแบบนี้มีการเสริมอาหารให้กับปลา และมีการตรวจสอบคุณภาพอาหาร และสารอาหารให้เหมาะสมกับปลาก่อน เพื่อป้องกันโรคที่อาจปนเปื้อนมากับอาหาร ข้อดีของวิธีการเลี้ยงแบบนี้คือมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ได้ผลผลิตของปลาคงที่ และไม่เกิดโรคระบาดรุนแรง ข้อเสียคือมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูง (นิสราภรณ์ เพ็ชรสุทธิ, 2551)

การเพาะเลี้ยงในกระชัง เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวกันอย่างแพร่หลาย วิธีนี้นิยมทำกันในพื้นที่ที่มีแหล่งน้ำไหล เช่น แม่น้ำ ปากแม่น้ำ และชายฝั่งทะเล ปลาที่สามารถเลี้ยงด้วยวิธีนี้ได้ต้องมีขนาดความกว้างลำตัวมากกว่าความกว้างของตาข่ายที่ใช้เลี้ยง วิธีนี้มีอัตราการรอดของปลาสูงเนื่องจากไม่เกิดปัญหาเรื่องน้ำเสียมากนัก เพราะของเสียถูกพัดพาไปกับกระแสน้ำ หรือตกลงก้นแหล่งน้ำ ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของวิธีนี้คือไม่จำเป็นต้องให้อาหารบ่อย หรือตลอดเวลา เนื่องจากได้แหล่งอาหารที่ถูกพามากับกระแสน้ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็มีข้อเสียอยู่ได้แก่อาหารบางส่วนที่ให้กับปลานั้นอาจหลุดลอยตาข่ายไปได้ ทำให้ปลาได้รับอาหารไม่เพียงพอ หรือไม่ได้เต็มที่ และอาจเกิดการระบาดของโรคจากแหล่งน้ำที่เลี้ยงได้ (Jerry, 2014; นิสราภรณ์ เพ็ชรสุทธิ, 2551)

2.2 การเกิดโรคระบาดในปลากะพงขาว

ในปัจจุบันความต้องการในการบริโภคปลากะพงขาวในตลาดที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดแรงจูงใจให้เกษตรกรจำนวนมากสนใจหันมาเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ในบ่อในปริมาณมากขึ้น และมีการปล่อยปลาที่มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิตจำนวนมากและรวดเร็ว การขาดการจัดการดูแลความสะอาด รวมไปถึงคุณภาพน้ำทำให้เกิดปัญหาที่สำคัญตามมาคือการป่วยของปลา และการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการตายของปลา และความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปแล้วอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อที่ก่อโรคเช่น ไวรัส และแบคทีเรียในแหล่งน้ำตามธรรมชาติอยู่แล้ว แต่ความรุนแรงของการระบาดของโรคขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความหนาแน่นของปลา ความเครียดของปลา อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของน้ำ เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้ภูมิคุ้มกันของปลาลดลง ส่งผลให้ปลาอ่อนแอและทำให้เกิดการติดเชื้อโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น สำหรับโรคที่เกิดกับปลากะพงขาวมีสาเหตุมาจากทั้งไวรัส แบคทีเรีย ฟังไจ และปรสิต ไวรัสที่มีบทบาทในการสร้างความเสียหายให้กับปลาในชนิดนี้ได้แก่

Nodaviridea และ Iridoviridea ส่วนแบคทีเรียที่ก่อโรคสำคัญได้แก่ *Vibrio*, *Streptococcus* และ *Flexibacter* (Jerry, 2014)

แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์น้ำตายเป็นจำนวนมาก (Flegel, 2012; Hjerde et al., 2008) โดยแบคทีเรียในสกุลนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) รูปร่างเป็นแท่ง (rod) และมีแฟลเจลลัมที่ขั้วของเซลล์ (polar flagella) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรค Vibriosis ในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง หอย และปลาทะเล โดย *Vibrio spp.* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคนี้ได้แก่ *V. salmonicida* โดยสายพันธุ์นี้มีรายงานการระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาแซลมอน ประเทศนอร์เวย์ ส่งผลให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก (Bruno, Noguera, & Poppe, 2013), *V. parahaemolyticus* เป็นสายพันธุ์ที่เกิดการระบาด และส่งผลอันตรายต่อมนุษย์แล้วยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Acute hepatopancreatic necrosis ส่งผลให้มีการตายและอัตราการเจริญเติบโตช้าในกุ้งขาวอีกด้วย (De Schryver, Defoirdt, & Sorgeloos, 2014), *V. harveyi* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำหลายชนิด ก่อให้เกิดการตายอย่างเฉียบพลันในตัวอ่อนของกุ้ง หอย และเป็นเชื้อฉวยโอกาสในปลาทะเลได้ด้วย (Mohamad et al., 2019) และ *V. vulnificus* เป็นสาเหตุให้เกิดการตายในมนุษย์สูงถึงร้อยละ 50 และพบว่าการติดเชื้อในปลาทะเล และปลาน้ำจืดในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ปลาไหลญี่ปุ่น, ปลาไหลยุโรป ปลาเทราต์ และปลากะพง เป็นต้น (Austin & Austin, 2016) ลักษณะอาการของโรค Vibriosis ในปลาได้แก่ มีการอักเสบบวมแดงบริเวณท้องและด้านข้างของลำตัว มีอาการครีบเน่า และมีเลือดคั่งบริเวณครีบ ช่องปาก ทวารหนัก และทางเดินอาหาร นอกจากนี้อาจพบตุ่มหนองตามบริเวณลำตัว และโคนหางของปลาดังกล่าว โดยอาการของโรคนี้นักพบอาการของโรค gastroenteritis ประกอบด้วย นั่นคือมีอาการอักเสบของทางเดินอาหาร และยังพบว่าการอักเสบของอวัยวะภายใน เช่น ตับ ม้าม และไตร่วมด้วย การระบาดของโรค Vibriosis สามารถส่งผ่านได้แบบ horizontal transmission เนื่องจากเชื้อสามารถติดต่อผ่านปลาที่เป็นโรคสู่ปลาปกติได้ โดยน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเป็นตัวนำพาโรคไปนั่นเอง ดังนั้นการตรวจสอบ และรักษาความสะอาดของบ่อเลี้ยงจึงมีความสำคัญในการป้องกันปลาจากโรคนี้ได้ (Mohamad et al., 2019)

3. วัคซีน และการป้องกันโรคระบาดในปลา

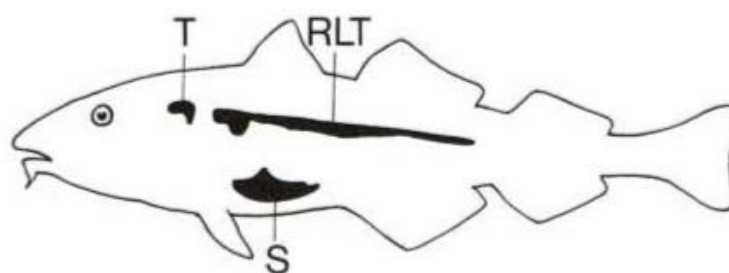
ปลากะพงขาวมีระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะซึ่งมีความสามารถในการจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เคยเข้ามาุกรานในร่างกายได้ รวมทั้งสามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาครั้งที่ 2 ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นนักวิจัยจึงใช้ความสามารถนี้มาใช้ประโยชน์ใน

การปลูกภูมิคุ้มกันโดยอาศัยวัคซีน (vaccine) เป็นเครื่องมือในการสร้างภูมิต่อเชื้อที่ปลาจะเผชิญในสภาพการเลี้ยง

มีรายงานการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อชนิดต่างๆ ที่สามารถก่อโรคในปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ตัวอย่างเช่นในปลากะพงขาว ในปี ค.ศ. 2007 Kumer และคณะได้ทำการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อ *Vibrio anguillarum* ด้วยวัคซีนชนิดใช้ดีเอ็นเอ (DNA vaccine) โดยใช้รหัสพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียในส่วน of outer membrane porin (OMP) ที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารของแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในการทำวัคซีน และทำการให้วัคซีนนี้โดยวิธีการแช่ (immersion) และการฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อ (intramuscular injection) แล้วทำการตรวจสอบภูมิคุ้มกันแบบหลังแอนติบอดี (humoral immune response) ด้วยวิธี ELISA หรือ enzyme-linked immunosorbent assay (Kumar, Parameswaran, Ahmed, Musthaq, & Hameed, 2007) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาสำหรับการตรวจสอบ ซึ่งปัญหาของการใช้แอนติบอดีแบบโพลีโคลนอลแอนติบอดีคือในแต่ละครั้งของการผลิตประสิทธิภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีอาจไม่คงที่ โดยมีความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) บนผิวแอนติเจนหลากหลาย จึงอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อโรคอื่นๆ ได้แก่ วัคซีนต่อ *Flavobacterium columnare* (Shoemaker, Klesius, Drennan, & Evans, 2011), วัคซีนที่ให้ทางปาก และทวารหนัก (oral and anal vaccination) ต่อเชื้อ *Yersinia ruckeri* ที่ก่อให้เกิดโรค Enteric redmouth disease (ERM) ในปลาเทราส์ (Villumsen et al., 2014), วัคซีนจากชีรุมปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน หรือวัคซีนเชื้อตาย (Collado, Fouz, Sanjuan, & Amaro, 2000) ต่อเชื้อ *V. vulnificus* ในปลานิล และปลาไหล (Esteve-Gassent, Fouz, & Amaro, 2004; Fouz et al., 2001; LaFrentz & Shoemaker, 2015), วัคซีนต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (Soto et al., 2016), วัคซีนแบบแช่ต่อโรค ERM (Chettri et al., 2015; Jaafar et al., 2017), วัคซีนต่อไวรัส Betanodavirus (Buonocore et al., 2017), วัคซีนต่อเชื้อ *Aeromonas salmonicida* (Rønneseth, Haugland, Colquhoun, Brudal, & Wergeland, 2017) และวัคซีนแบบแช่ต่อเชื้อ *F. psychrophilum* (Hoare, Ngo, Bartie, & Adams, 2017) เป็นต้น อย่างไรก็ตามนอกจากการให้วัคซีนกับปลาเพื่อต้านทานต่อโรคแล้ว ปัจจุบันนิยมที่ใช้พืชสมุนไพร หรือพืชในท้องถิ่นมาผสมอาหารแล้วให้ปลากินเป็นอาหารเพื่อให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้น (Ali, Ambasankar, Saiyad Musthafa, & Harikrishnan, 2017; Mahmoud, Al-Sagheer, Reda, Mahgoub, & Ayyat, 2017; Talpur & Ikhwanuddin, 2013)

4. ระบบภูมิคุ้มกันในปลากระดูกแข็ง

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1. ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ (innate immunity) และ 2. ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) ทั้งนี้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) เช่น ฟองน้ำ กุ้ง ปู พบเฉพาะภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้ ในทางตรงกันข้ามสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) สามารถพบได้ทั้งภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกระจายตัวอยู่ตามทางเดินอาหาร ในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง (teleost fish) สามารถพบอวัยวะในระบบน้ำเหลืองได้แก่ ต่อมไทมัส (thymus gland), ไขกระดูก (bone marrow) และเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณไต (renal lymphoid tissue) (ภาพประกอบ 4) (Van Muiswinkel, 1995; ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) ทั้งนี้ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ และภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะสามารถจำแนกลงไปได้อีก คือภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่เข้ามาทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และภูมิคุ้มกันแบบไม่พึ่งเซลล์ (humoral immunity) เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารคัดหลั่งที่ผลิตจากเซลล์มากำจัด หรือส่งเสริมการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ ทั้งแบบจำเพาะกับสิ่งแปลกปลอม เช่น แอนติบอดี และไม่จำเพาะกับสิ่งแปลกปลอม เช่น complement เป็นต้น (Male, Brostoff, Roth, & Roitt, 2006; วัชรพร กิตติวัชร, 2556)



ภาพประกอบ 4 แสดงตำแหน่งอวัยวะในระบบน้ำเหลืองของปลากระดูกแข็ง T; ต่อมไทมัส, RLT; เนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณไต และ S; ม้าม

ที่มา: (Van Muiswinkel, 1995)

4.1 ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ

สำหรับภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติในปลากระดูกแข็งพบแนวป้องกันทางกายภาพ (physical barrier) และแนวป้องกันทางสรีรวิทยา (physiological barrier) เป็นปราการด่านแรกที่สามารถใช้ในการป้องกันไม่ให้เชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายได้ หรือหากเข้ามาสู่ร่างกายก็สามารถทำลาย หรือหยุดยั้งการเจริญเติบโต และความรุนแรงที่ส่งผลเสียต่อร่างกายของปลาได้ แนวป้องกันนี้ประกอบด้วยเกล็ดของปลา เยื่อเมือกผิวหนังบริเวณเหงือก และเยื่อบุทางเดินอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการหลั่งสารคัดหลั่งออกมาบริเวณเยื่อเมือกต่างๆ ทั้งในทางเดินอาหาร และผิวหนังภายนอก ตัวอย่างเช่น สาร transferin ช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ โดยการศึกษาในปลาแซลมอล *Oncorhynchus kisutch* พบว่าสาร transferin สามารถยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณไตได้ (Van Muiswinkel, 1995), สาร lectins ช่วยส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis, C-reactive protein, interferon, complement และ IgM ที่หลั่งออกมาบริเวณเยื่อเมือก (Magnadottir, 2006) ในปัจจุบันมีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือก (mucosal immunity) เนื่องจากเป็นบริเวณที่ได้สัมผัสกับเชื้อโดยตรง และมีการตอบสนองเป็นบริเวณแรกๆ ดังนั้นในการตรวจสอบประสิทธิภาพของอาหารเสริม หรือวัคซีนต่อโรคต่างๆ จึงนิยมทำการตรวจวัดการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบนี้มากขึ้น (Hoare et al., 2017; Salinas, Zhang, & Sunyer, 2011; Talpur & Ikhwannuddin, 2013; Yang, Tang, Sheng, Xing, & Zhan, 2017; Yang et al., 2018)

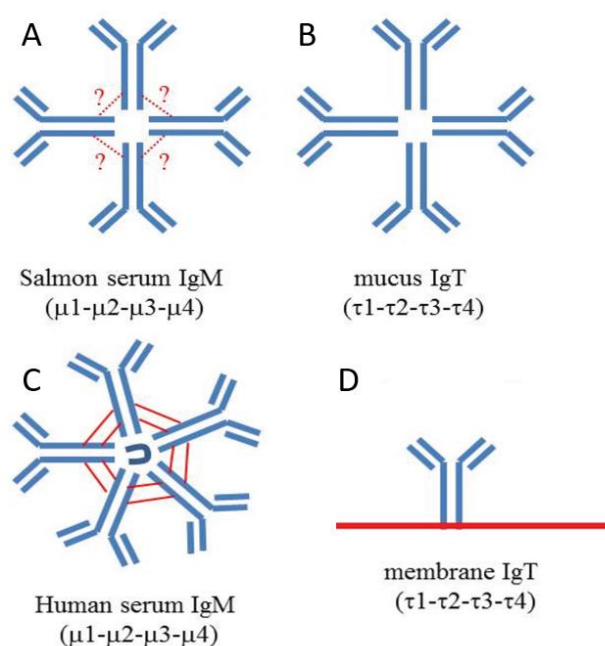
4.2 ภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ

ภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะชนิดหลังแอนติบอดีถือว่าเป็นวิธีการต่อต้าน และกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่สำคัญ มีประสิทธิภาพ ความจำเพาะ และสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาได้ เมื่อเกิดการรุกรานซ้ำจะสามารถทำงานเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นได้รวดเร็วขึ้น ทั้งนี้การศึกษาในปลากระดูกแข็ง เช่น ปลาม้าลายพบว่าบี-ลิมโฟไซต์มีการพัฒนาในตับอ่อน (pancreas) ในระยะแรกของการเจริญ แล้วจึงเคลื่อนที่ไปพัฒนา และเพิ่มจำนวนอย่างถาวรที่ไขกระดูก เมื่อพัฒนาเป็นระยะที่สมบูรณ์แล้ว บี-ลิมโฟไซต์จะเคลื่อนที่ไปอยู่ในอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ในร่างกายของปลา (Lieschke & Trede, 2009) บนผิวเซลล์ของบี-ลิมโฟไซต์ของปลากระดูกแข็งสามารถพบอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ ได้แก่ พบทั้ง IgM และ IgD, พบเฉพาะ IgM หรือ IgD และพบเฉพาะ IgT (Secombes & Wang, 2012) แต่ปลากระดูกแข็งบางชนิดพบบี-ลิมโฟไซต์ที่มีรูปแบบอิมมูโนโกลบูลินที่ปรากฏบนผิวดังกล่าวเป็น IgM ร่วมกับ IgD และ IgT เท่านั้น เช่น ในปลาเรนโบว์เทราล์ (Y. A. Zhang et al., 2010)

5. อิมมูโนโกลบูลินในปลากระดูกแข็ง

อิมมูโนโกลบูลิน หรือแอนติบอดี เป็นสารชีวโมเลกุลชนิดไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีคุณสมบัติในการจับกับแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะ ถูกสร้างมาจากลิมโฟไซต์ชนิดบี และทำหน้าที่ช่วยในการกำจัด และสลายแอนติเจน (neutralization) หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ (Male et al., 2006)

อิมมูโนโกลบูลินประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนสายยาว (heavy chain; IgH) และโปรตีนสายสั้น (light chain; IgL) อย่างละ 1 คู่ โปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีส่วนแปรปรวน (variable region) และส่วนคงที่ (constant region) ประกอบกันอยู่ในอัตราส่วนที่ต่างกัน บริเวณที่มีความแปรปรวนนี้ทำให้แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมประกอบด้วย โปรตีนสายยาว และโปรตีนสายสั้นที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ทำให้มีรูปร่างสองมิติเหมือนรูปตัวอักษร “Y” อิมมูโนโกลบูลินสามารถจำแนกออกเป็นไอโซไทป์ (isotype) ชนิดต่างๆ ได้จากส่วนของโปรตีนสายยาว ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบไอโซไทป์ของอิมมูโนโกลบูลินอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ IgM, IgG, IgA, IgD และ IgE แต่สำหรับปลากระดูกแข็งพบเพียง 3 ชนิด ได้แก่ IgM, IgD และ IgT/Z ส่วนของ IgM และ IgD มีลักษณะใกล้เคียงกันระหว่างสัตว์มีกระดูกสันหลัง สำหรับ IgT/Z พบเฉพาะในปลากระดูกแข็ง (T หมายถึง teleost fish และ Z หมายถึง ปลาม้าลาย หรือ zebra fish) ทั้งนี้ IgM ถือเป็นอิมมูโนโกลบูลินที่เก่าแก่มากที่สุด และในปลา อิมมูโนโกลบูลินชนิดนี้ ทำหน้าที่หลักในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ส่วน IgD เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและส่งเสริมภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ สำหรับ IgT/Z มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเยื่อเมือก ซึ่งพบว่าการหลั่ง และทำงานในทางเดินอาหาร โดยสามารถถูกกระตุ้นให้มีการผลิตและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในทางเดินอาหารได้ (Mashoof & Criscitiello, 2016; Secombes & Wang, 2012; Y. A. Zhang et al., 2010)



ภาพประกอบ 5 อิมมูโนโกลบูลินที่มีลักษณะ 4 แขน (tetramer) ในซีรัมปลากระดูกแข็ง ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ได้แก่ IgM และ IgT เปรียบเทียบกับอิมมูโนโกลบูลินที่มีลักษณะ 5 แขน (pentamer) ในซีรัมมนุษย์ ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยโปรตีน J (J chain)

ดัดแปลงจาก: Hordvik, 2015 (Hordvik, 2015)

IgM ที่พบในซีรัมของปลากระดูกแข็งมีการแสดงออกตั้งแต่ช่วงแรกของระยะการเจริญเติบโตประมาณ 4 วันหลังจากการปฏิสนธิ (Secombes & Wang, 2012) และเป็นแอนติบอดีชนิดแรกที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่พบ โครงสร้างของ IgM มีขนาดใหญ่ประกอบด้วย 4 แขน (tetramer) (ภาพประกอบ 5A) แต่ในปลาบางชนิดสามารถพบ IgM ในรูปแขนเดี่ยว (monomer) ได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น กลุ่มปลากะรัง (grouper fish) และกลุ่มปลาเทราต์เป็นต้น (Mashoof & Criscitiello, 2016) ซึ่งแตกต่างจาก IgM ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่มีโครงสร้างประกอบด้วย 5 แขน (pentamer) ที่มีโปรตีน J (J chain) เชื่อมแขนทั้งหมดของอิมมูโนโกลบูลินเข้าไว้ด้วยกัน (ภาพประกอบ 5C) ส่วนในปลาจะยึดกันโดยใช้พันธะไดซัลไฟด์ในการเชื่อมกันแทน (Kaattari et al., 2006) ในปลาสามารถพบปริมาณความเข้มข้นของ IgM ในซีรัมได้ระหว่าง 800-9,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Ye, Kaattari, Ma, & Kaattari, 2013) ซึ่งนอกจากมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะแล้ว ยังมีส่วนร่วมที่สำคัญในระบบคอมพลีเมนต์

และการเกิด opsonization ได้อีกด้วย นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2005 Hansen และคณะได้ค้นพบอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgT ในทางเดินอาหารของปลาที่มีการติดเชื้อปรสิตโดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีบทบาทไปตลอดการติดเชื้อปรสิตในทางเดินอาหารนั้น ทั้งนี้โครงสร้างของ IgT จะมีลักษณะเป็นแขนเดี่ยวบนผิวเซลล์ (ภาพประกอบ 5D) และเป็นโครงสร้าง 4 แขนในบริเวณเยื่อเมือก (ภาพประกอบ 5B) ดังนั้น IgT จึงเป็นกุญแจสำคัญในการศึกษาภูมิคุ้มกันเยื่อเมือกร่วมกับ IgM ด้วย (Hansen, Landis, & Phillips, 2005)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโครงสร้าง และการจำแนกอิมมูโนโกลบูลินของปลากะดุกแข็งหลายชนิด เช่น ปลากะพง (European seabass), ปลากะพงแดง (gilthead sea bream) (Palenzuela, Sitjà-Bobadilla, & Alvarez-Pellitero, 1996), ปลานิล (Smith, Gebhard, Housman, Levy, & Noga, 1993), ปลาแซลมอล, ปลาฮาติงบัค (halibut), ปลาทุเลา (haddock), ปลาคอด (cod) (Magnadottir, 1998), ปลากะพงขาว (Choudhury & Pani Prasad, 2011) เป็นต้น โดยพบว่าปลาส่วนใหญ่มีอิมมูโนโกลบูลินที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 600-900 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 2 สาย โดยโปรตีนสายยาวมีขนาดอยู่ที่ 60-77 และโปรตีนสายสั้นมีขนาดอยู่ระหว่าง 22-26 กิโลดาลตันตามลำดับ (Van Muiswinkel, 1995)

6. โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นเครื่องมือที่ดีสำหรับการติดตามเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจน-แอนติบอดีทำให้สามารถพัฒนาไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อโรคและปรสิตขนาดเล็กได้ ซึ่งนอกจากนำไปใช้ในการทางแพทย์แล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาชีววิทยาของภูมิคุ้มกันในปลากะดุกแข็งได้ด้วย โดยการนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน หรือตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีเมื่อปลาติดเชื้อ หรือได้รับวัคซีน และยังสามารถนำไปใช้ในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินของปลาเพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินได้อีกด้วย (Palenzuela et al., 1996)

สำหรับการผลิตแอนติบอดีในรูปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีอาศัยหลักการของการหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) เริ่มต้นจากนำบีเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์โดยอาศัยพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol ; PEG) ทำให้ได้เซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมาเป็นผลผลิต โดยเซลล์ลูกผสมที่ได้จะมีคุณสมบัติจากเซลล์ดั้งเดิมมาด้วยคือ คุณสมบัติการสร้างแอนติบอดีของบีเซลล์ และ

คุณสมบัติสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ตลอดของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์ลูกผสมสามารถสร้างแอนติบอดี และแบ่งตัวได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด อย่างไรก็ตามบีเซลล์และเซลล์มะเร็งไม่สามารถหลอมรวมกันได้ทุกเซลล์ เนื่องจากการหลอมรวมกันของเซลล์เกิดขึ้นอย่างสุ่ม แล้วอาจมีบีเซลล์ หรือเซลล์มะเร็งหลอมรวมกันเอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีสภาวะที่เหมาะสมกับเซลล์ลูกผสมเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือการใช้เซลล์มะเร็งของเม็ดเลือดขาวที่มีความบกพร่องในการสร้างเอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์นิวคลีโอไทป์ในกระบวนการ salvage pathway จึงทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้หลอมรวมกับบีเซลล์ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมไฮโปแซนทีน (hypoxanthine), อะมิโนอปเทอริน (aminopterin) และ ไทมิดีน (thymidine) หรือ HAT medium เซลล์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมกันของบีเซลล์ และเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตใน HAT medium ได้ เพราะได้เอนไซม์ HGPRT จากบีเซลล์ ส่วนบีเซลล์ที่หลอมรวมกันเองสามารถรอดชีวิตเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปในที่สุด การใช้ HAT medium ในการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมอาศัยความสามารถในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทป์ด้วย 2 กระบวนการ คือ *de novo* pathway และ salvage pathway โดยอะมิโนอปเทอรินจะยับยั้งกระบวนการ *de novo* pathway เซลล์จึงถูกบังคับให้เปลี่ยนมาใช้ salvage pathway อาศัยไฮโปแซนทีน และไทมิดีนในการเจริญปกติต่อไปได้ นอกจากนี้เซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์นอกจากจะบกพร่องเอนไซม์ HGPRT แล้ว จะต้องไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินอีกด้วย เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีที่เกิดขึ้นนั้นมาจากเซลล์ลูกผสมเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ลูกผสมแล้ว ต้องมีขั้นตอนในการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมีเพียงบางเซลล์เท่านั้นที่หลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ เช่น ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) หรือการทดสอบด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น วิธี Western blot, dot blot, immunohistochemistry และวิธีอื่นๆ เมื่อคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้แล้ว ต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ลูกผสมโคลนนั้นมาจากเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเซลล์เดียวเท่านั้น จากนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

7. การผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะตักเข็ง

จากรายงานการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลาพบว่ามีการผลิตแอนติบอดีทั้งในรูปแบบโพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปลากะตักเข็ง

ชนิดต่างๆ ดังตาราง 1 ทั้งนี้การผลิตแอนติบอดี บางส่วนได้มีการพัฒนาออกมาในเชิงการค้าแล้ว เพื่อใช้ศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะของปลา หรือนำไปประยุกต์ใช้ในการติดตาม ภูมิโมโนโคลนบูลินด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Western blot, ELISA, immunohistochemistry และ immunofluorescence เป็นต้น (Shelby, Shoemaker, Evans, & Klesius, 2001; Sood, Chaudhary, Singh, & Rathore, 2012; Suresh Babu, 2015; Suresh Babu, Shankar, Honnananda, & Abhiman, 2014; W. Zhang, Tang, Sheng, Xing, & Zhan, 2017)

ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อภูมิโมโนโคลนบูลินของปลานั้นมีขั้นตอนที่สำคัญคือการเตรียมแอนติเจนให้มีความบริสุทธิ์สูง และมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการ ปลูกภูมิคุ้มกัน วิธีการเตรียมภูมิโมโนโคลนบูลินของปลาเพื่อใช้เป็นแอนติเจนนั้นมีอยู่หลากหลาย รูปแบบ วิธีที่ได้รับความนิยมคือการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี (chromatographic column) เช่น คอลัมน์ BSA agarose (Bag, Makesh, Rajendran, & Mukherjee, 2009; Rathore, Kumar, Sood, Kapoor, & Lakra, 2008; Sood et al., 2012), คอลัมน์ anti-mouse IgG agarose (Smith et al., 1993), คอลัมน์ mannan-binding protein (Al-Harbi, Truax, & Thune, 2000), คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนประจุ CM Gel blue column (Magnadottir, 1998; Magnadottir, Kristjansdottir, & Gudmundsdottir, 1996) และ gel filtration (Romestand, Breuil, Bourmaud, Coeurdacier, & Bouix, 1995; Shelby et al., 2001; van der Heijden, Rooijackers, Booms, Rombout, & Boon, 1995; Vesely, Reschova, Pokorová, Hulova, & Smržová, 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการทำให้บริสุทธิ์ ภูมิโมโนโคลนบูลินด้วยวิธี immunoprecipitation (Miyadai, Ootani, Tahara, Aoki, & Saitoh, 2004; Soonthonsima et al., 2017) รายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ภูมิโมโนโคลนบูลินของปลาชนิดต่างๆ มีดังนี้

ในปี ค.ศ. 2004 Miyadai และคณะได้รายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ จำเพาะกับภูมิโมโนโคลนบูลินที่อยู่ในซีรัม และบนผิวเซลล์ของปลาปักเป้า โดยแยกภูมิโมโนโคลนบูลินจากซีรัมของปลาชนิดนี้ด้วยคอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนประจุ รวมทั้งเตรียมภูมิโมโนโคลนบูลินจากการ ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยไวรัสให้กับปลา แล้วทำการแยกภูมิโมโนโคลนบูลินที่มีความจำเพาะกับไวรัส ด้วยคอลัมน์ที่ตรึงส่วนของไวรัสไว้ภายใน จากนั้นทำการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว และทำการ หลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มะเร็งเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี 16F3 สามารถจับกับภูมิโมโนโคลนบูลินทั้งรูปแบบที่เสถียรภาพ และรูปแบบธรรมชาติที่ทำ

การแยกจากวิธีทั้ง 2 วิธี แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดี 4H5 สามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาชนิดนี้ได้เฉพาะรูปแบบธรรมชาติเท่านั้น (Miyadai et al., 2004)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Li และคณะได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาฮาติบัคญี่ปุ่นโดยเตรียมอิมมูโนโกลบูลินจากการกระตุ้นปลาด้วยเชื้อไวรัสที่ตายแล้ว เพื่อเพิ่มปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลาให้มากขึ้น ซึ่งวิธีการนี้ได้มีการรายงานการศึกษาจำนวนมาก เช่น การใช้โปรตีน BSA ปฏิกิริยาคู่กันกับปลา แล้วทำการเก็บเลือดบริเวณโคนหางของปลามาทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินด้วยคอลัมน์ BSA-CI agarose (Rathore et al., 2008) หรือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย BSA ในปลานิล แต่ใช้คุณสมบัติการทำปฏิกิริยาของอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะกับ BSA ในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี immunoprecipitation (Soonthonsrima et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินจากเลือดของปลาโดยตรง เช่นจากรายงานของ Li และคณะ ทำโดยการเก็บเลือดจากปลาฮาติบัคญี่ปุ่น แล้วนำซีรัมที่ได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลิน และใช้คอลัมน์ DEAE ในการแยกบริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน แล้วนำไปปฏิกิริยาคู่กันกับในหนู และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับโปรตีนสายยาวของปลาชนิดนี้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blot และสามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ของลิมโฟไซต์ได้ (Q. Li, Zhan, Xing, & Sheng, 2007) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Rathore และคณะ (Rathore et al., 2008)

Purcell และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM ของปลาเฮอริง แล้วทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ IgM เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ศึกษา (Purcell et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของโปรตีนสายยาวเพื่อใช้ในการปฏิกิริยาคู่กันกับในหนู (Jirapongpairaj, Hirano, & Kondo, 2017; Tang, Liu, Sheng, Xing, & Zhan, 2017)

จากรายงานการวิจัยในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgM ของปลาที่ผ่านมาพบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายยาว (Q. Li et al., 2007; Purcell et al., 2012; Rathore et al., 2008; Shin et al., 2006; Sood et al., 2012; Vesely et al., 2006; Yang et al., 2018; W. Zhang et al., 2017) หรือสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนสายยาวหรือโปรตีนสายสั้น (Jang, Woo, Cho, Kyong, & Choi, 2004; Magnadottir et al., 1996; Miyadai et al., 2004; Romestand et al., 1995; N. M. S. Santos, Taverne, Taverne-Thiele,

de Sousa, & Rombout, 1997; Scapigliati et al., 1996; Suresh Babu et al., 2014; van der Heijden et al., 1995; Yang et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายสั้น มีความไวต่ำกว่าแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายยาว (Yang et al., 2017)

ตาราง 1 สรุปการผลิตแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระดูกแข็งชนิดต่างๆ

ชื่อ/ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปแบบของแอนติบอดี	ความจำเพาะต่อ Ig	คณะผู้วิจัย
ปลากะพง <i>Dicentrarchus labrax</i>	MAb	H or L chain	(Romestand et al., 1995; N. M. S. Santos et al., 1997; Scapigliati et al., 1996)
ปลาไหล <i>Anguilla anguilla</i>	MAb	H or L chain	(van der Heijden et al., 1995)
ปลาแซลมอล <i>Salmo salar</i>	MAb	H or L chain	(Magnadottir et al., 1996)
ปลานิล <i>Oreochromis niloticus</i>	MAb & PAb	H chain	(Al-Harbi et al., 2000; Shelby et al., 2001; Soonthonsrima et al., 2018),
ปลากะพงขาว <i>Lates calcarifer</i>	PAb	H & L chain	(Crosbie & Nowak, 2002)
ปลาฮาติบัคญี่ปุ่น <i>Paralichthys olivaceus</i>	MAb & PAb	H or L chain	(Jang et al., 2004; Kim et al., 2017; Tang et al., 2017) (Jirapongpairaj et al., 2017; Q. Li et al., 2007; M. D. Santos et al., 2009)
ปลาปักเป้า <i>Takifugu rubripes</i>	MAb	H or L chain	(Miyadai et al., 2004)
ปลาคาร์พ <i>Cyprinus carpio</i>	MAb	H chain	(Vesely et al., 2006)
ปลาหิ้น	MAb	H chain	(Shin et al., 2006; W. Zhang et

<i>Sebastes schlegeli</i>			al., 2017)
ปลาเยือกเทศ	MAb	H chain	(Bag et al., 2009; Rathore et
<i>Labeo rohita</i>			al., 2008; Suresh Babu, 2015;
			Suresh Babu et al., 2014)
ปลาดุก	MAb	H chain	(Sood et al., 2012)
<i>Clarias batrachus</i>			
ปลาเฮวริง	MAb	H chain	(Purcell et al., 2012)
<i>Clupea pallasii</i>			
ปลาดุก	PAb	H & L chain	(Kreutz, Canova, Nied,
<i>Rhamdia quelen</i>			Bortoluzzi, & Frandoloso,
			2016)
ปลาลิ้นหมา	MAb	H or L chain	(Yang et al., 2017)
<i>Cynoglossus</i>			
<i>semilaevis</i>			
ปลากะพงญี่ปุ่น	MAb	H chain	(Yang et al., 2018)
<i>Lateolabrax</i>			
<i>japonicas</i>			

PAb หมายถึง โพลีโคลนอลแอนติบอดี

MAb หมายถึง โมโนโคลนอลแอนติบอดี

8. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยพื้นฐานทางชีววิทยา การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย รวมถึงสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างแพร่หลาย สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลาชนิดต่างๆ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะหลังจากปลาได้รับเชื้อ หรือได้รับวัคซีนต่อเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ได้ โดยนำมาประยุกต์ใช้ในวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาแบบต่างๆ เช่น dot blot, Western blot, immunohistochemistry, immunofluorescent และ ELISA เป็นต้น ซึ่งมีรายงานการศึกษา ดังนี้

Shelby และคณะในปี ค.ศ. 2001 ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการตอบสนองต่อเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลานิลด้วยวิธีการ indirect ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิล ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Rathore และคณะได้ทำการพัฒนาวิธีตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะต่อเชื้อ *Edwardsiella tarda* ในปลายี่สกเทศด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาชนิดนี้ (Rathore et al., 2008) เช่นเดียวกับการตรวจสอบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะต่อเชื้อ *E. tarda* ในปลาดุก (Sood et al., 2012) และปลาหิน (W. Zhang et al., 2017) จากรายงานการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะของปลาเมื่อได้รับเชื้อด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการพื้นฐานได้ง่าย อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทดสอบยังต้องใช้ระยะเวลาในการทำที่มากกว่าวิธี ELISA แบบปกติ เนื่องจากต้องใช้แอนติบอดีที่เกี่ยวข้องถึง 3 ชนิด ได้แก่ แอนติบอดีของปลาที่จำเพาะกับแอนติเจน แอนติบอดีตัวที่ 2 ที่จำเพาะกับแอนติบอดีของปลา และแอนติบอดีตัวที่ 3 ที่จำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 2 ทำให้มีการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น ดังนั้นในปี ค.ศ. 2015 Casini และคณะได้รายงานการพัฒนาวิธี ELISA ความไวสูง โดยอาศัยระยะเวลาประมาณ 30 นาทีในการบ่มแอนติบอดีทั้งหมด โดยมีความแตกต่างจากวิธี ELISA ปกติคือการผสมแอนติบอดีตัวที่ 2 และ 3 เข้าด้วยกันในหลอดทดลอง ก่อนที่นำมาบ่มกับแอนติบอดีตัวที่ 1 ที่จับกับแอนติเจนที่ตรึงไว้ในเพลท ELISA (Casini, Fontani, Ruggiero, Balducci, & Berti, 2015) นอกจากการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวยังสามารถใช้ในการศึกษาอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ในเนื้อเยื่อ หรือในหลอดเลือดของปลาได้ เช่น Tang และคณะในปี ค.ศ. 2017 ใช้วิธี immunofluorescence ในการศึกษา IgD ในหลอดเลือดของปลาลิ้นเสือ (Tang et al., 2017) หรือ Yang และคณะในปี ค.ศ. 2017 และ 2018 ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการศึกษาความเกี่ยวข้องของกระบวนการฟาโกไซโทซิส และ IgM บนผิวเซลล์ของลิมโฟไซต์ (Yang et al., 2017, 2018)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวได้ คาดว่าจะสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ในการตรวจภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลากะพงขาวหลังจากการได้รับวัคซีนของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาชนิดนี้ได้ โดยจะทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งวิธี ELISA นี้ เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนภายในซีรัม เช่น การตรวจแอนติบอดีที่จำเพาะกับไวรัส HIV ในมนุษย์ โดยทำการตรึงไวรัสที่ก้นหลุมของเพลท ELISA แล้วทำการบ่มด้วยซีรัมจาก

ผู้ป่วย จากนั้นใส่แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีของผู้ป่วย เมื่อใส่สารละลาย
 ซับสเตรตทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย ทำการวัดค่าสีที่ปรากฏขึ้นเพื่อใช้วิเคราะห์ผล
 ต่อไป (Barnum, 2005) ซึ่งหลักการ ELISA สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับตรวจสอบการตอบสนอง
 ภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะของปลาต่อเชื้อโรคที่ได้รับ โดยตรึงแอนติเจนของเชื้อนั้นที่ก้นหลุม และบ่ม
 ด้วยซีรัมของปลาที่ได้รับเชื้อ จากนั้นบ่มซ้ำด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ
 อิมมูโนโกลบูลินของปลา และบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สามที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่
 จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลา



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 หนูขาว (Swiss mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม

1.2 ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) จากฟาร์มในจังหวัด
สมุทรสงคราม

1.3. ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จากฟาร์มในจังหวัด
สมุทรสงคราม

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 2

ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่อง electrophoresis apparatus	Bio-Rad
2. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad
3. เครื่อง microcentrifuge รุ่น 7M	Spectrafuge
4. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	Scientific industries
5. ตู้ปลอดเชื้อ (horizontal laminar flow cabinets)	NUAIRE
6. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO ₂ incubator)	NUAIRE
7. เครื่องชั่ง รุ่น A200S	Sartorius
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น HA-36	Hirayama
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanyo
10. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	Sanyo

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ดังตาราง 3

ตาราง 3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. fetal bovine serum	Hyclone
2. polyethylene glycol (PEG)	Sigma
3. dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma
4. hypoxanthine	Sigma
5. aminopterin	Gibco
6. nitrocellulose membrane	GE healthcare
7. diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
8. goat anti – mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad
9. goat anti – rabbit horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP)	Bio-Rad
10. ชุด Zymed's Mouse MonoAb (HRP)	Zymed
11. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	Gibco
12. ยาปฏิชีวนะ ampicillin	Sigma
13. ยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin	Corning
14. sodium pyruvate	Sigma
15. sodium hydrogen carbonate	Amresco
16. HEPES	Amresco
17. HT supplement	Gibco
18. sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad
19. acrylamide	GE healthcare
20. bis acrylamide	Bio basic INC.
21. glycine	Research Organics

22. tris aminomethane	Promega
23. mercaptoethanol	Sigma

ตาราง 2 (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
24. thimerosal	Sigma
25. triton X-100	Sigma
26. ammonium sulfate	Promega
27. TEMED	Sigma
28. hydrogen peroxide	Sigma
29. coomassie brilliant blue R-250	Bio-Rad
30. protein standards	Bio-Rad

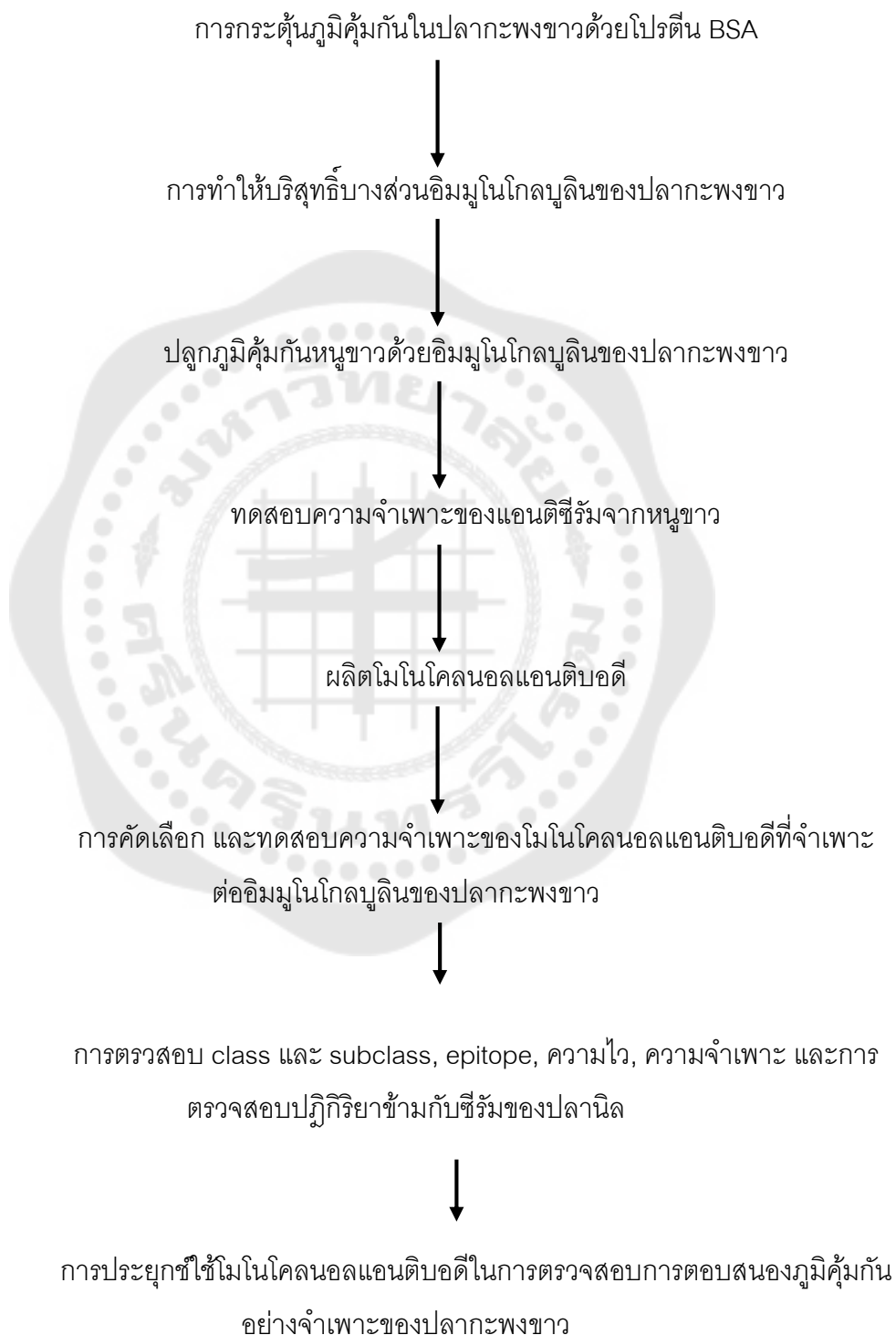
วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว
2. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
3. การผลิต การคัดเลือก และการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
4. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน

อย่างจำเพาะในปลากะพงขาว

ซึ่งขั้นตอนต่างๆ สามารถสรุปได้ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 สรุปขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว

1.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยโปรตีน bovine serum albumin (BSA)

นำปลากะพงขาว 30 ตัว ขนาด 15-30 เซนติเมตร มาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงขนาด 1 X 1 X 0.5 เมตร บ่อละ 5 ตัว เป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้ปลาปรับสภาพกับสิ่งแวดล้อม จากนั้นนำสารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้อง (intraperitoneal cavity) ของปลาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว และทำการฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งทุกๆ 3 สัปดาห์โดยใช้สารละลาย BSA ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (IFA) แทน หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดบริเวณโคนหางของปลาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิว (microcentrifuge tube) หลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่เป็นซีรัมเก็บเอาไว้เพื่อนำมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ BSA ด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) คัดเลือกซีรัมที่มีอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะต่อ BSA สูงสำหรับใช้ในการแยกอิมมูโนโกลบูลินในขั้นตอนต่อไป

1.2 การทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน

เตรียมวุ้น 1% ละลายใน PBS (phosphate buffered saline pH 7.2) ที่อุณหภูมิ 55-60 °C เทวุ้นปริมาตร 5-6 มิลลิลิตรลงบนแผ่นสไลด์กระจายให้สม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว เจาะวุ้นให้เป็นหลุมกลม และดูดเศษวุ้นในหลุมออก ใส่สารละลาย BSA ลงหลุมตรงกลางและซีรัมของปลาที่ต้องการทดสอบลงในหลุมรอบๆ บ่มแผ่นสไลด์ในกล่องขึ้นที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมของปลากะพงขาวกับ BSA โดยสังเกตเส้นของการตกตะกอน นำแผ่นสไลด์ไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมงเพื่อล้างโปรตีนส่วนที่เหลือออก นำไปย้อมด้วยสีย้อม (0.1% coomassie blue R-250 เมทานอล 50% กรดอะซิติก 10%) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำยาล้างสี I (เมทานอล 50% กรดอะซิติก 10%) เป็นเวลา 30 นาที และน้ำยาล้างสี II (เมทานอล 5% กรดอะซิติก 7%) ตามลำดับ จนกระทั่งวุ้นในส่วนที่ไม่มีตะกอนใส แล้วตากให้แห้ง (Smith et al., 1993; Soonthonsrima et al., 2017; ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

1.3 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวด้วยวิธี

immunoprecipitation

นำซีรัมของปลากะพงขาวที่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับ BSA ในข้อ 1.2 มารวมกัน แล้วผสมกับ BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 1:1, 1:2, 1:3, 3:1 และ 2:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกตะกอน Ig/BSA complex โดยปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาทีและล้างตะกอนด้วย PBS 3 ครั้ง นำตะกอน Ig/BSA complex ที่ได้มาเติม PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) เก็บไว้ที่ -20°C จนกระทั่งนำไปใช้ตรวจสอบองค์ประกอบด้วยวิธี SDS-PAGE และใช้ในการปลูกหมั้ค้่มกันในหนูขาวต่อไป

1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ Ig/BSA complex ด้วยวิธี sodium

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตะกอน Ig/BSA complex จากการตกตะกอนในข้อ 1.3 BSA และซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้ปลูกหมั้ค้่มกัน มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที ผ่าน 15% SDS-PAGE จากนั้นนำแผ่น SDS-PAGE ที่มีโปรตีนที่แยกตามขนาดโมเลกุลแล้วมาย้อมสี coomassie blue R-250 เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำยาล้างสี I และน้ำยาล้างสี II ตามลำดับจนกว่าสีส่วนเกินหลุดออกหมด ตรวจสอบผลโดยการเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่แยกได้

2. การปลูกหมั้ค้่มกันในหนูขาว

นำหนูขาว จำนวน 4 ตัว มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยทำการฉีดด้วย Ig/BSA complex ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ CFA ในอัตราส่วน 1:1 ทำการฉีดกระตุ้นหนูซ้ำอีก 3 ครั้ง ในทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยใช้แอนติเจนที่ฉีดหนูผสมกับ IFA ในอัตราส่วน 1:1 เช่นเดียวกัน หลังการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการเก็บซีรัมของหนูขาวแต่ละตัวมาตรวจสอบการตอบสนองที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมของปลากะพง โดยวิธี Western blot โดยนำซีรัมปลาที่ไม่ได้รับการปลูกหมั้ค้่มกัน ตะกอน Ig/BSA complex และโปรตีน BSA มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน SDS-PAGE แล้วทำการย้ายโปรตีนจากแผ่น SDS-PAGE สู่วัสดุไนโตรเซลลูโลส คัดเลือกหนูที่มีการตอบสนองดีที่สุด เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

3. การผลิต การคัดเลือก และการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำหนูที่ให้ผลตอบสนองกับแอนติเจนได้ดีที่สุดมาใช้ในการผลิตเซลล์ลูกผสมโดยทำการผ่าตัดนำม้ามมาบดแยกกระจายให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นนำเซลล์ม้ามหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line ด้วย 50% polyethylene glycol (PEG) บ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้าง PEG ออก และนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี HAT (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine) ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum และเมดิเล็ดแดง 1% ใน 96 wells microculture plate จำนวน 15 เพลต บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 7-10 วัน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ลูกผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีเซลล์ลูกผสมมาคัดเลือกโคลนที่มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมปลากระพงขาวด้วยวิธี dot blot และ Western blot

3.2 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลากระพงขาวทำ 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกด้วยวิธี dot blot และขั้นตอนที่ 2 ด้วยวิธี Western blot

3.2.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blot

นำซีรัมจากปลากระพงขาวหรือ BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่เจือจาง 1:1,000 เติ้าด้วย PBS แล้วนำมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสในจุดแรก และจุดที่ 2 ตามลำดับ ประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที ล้างใน PBS 3 ครั้ง ตัดแบ่งกระดาษไนโตรเซลลูโลส และใส่ลงใน microculture plate จากนั้นใส่แอนติซีรัมจากหนูขาวที่ให้ผลตอบสนองต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาวดีที่สุดเจือจาง 1:5,000 เติ้า หรือน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบ โดยเจือจาง 1:8 เติ้าด้วย 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วย Goat anti – mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1:3,000 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง แช่ในสารละลายซับสเตรทประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H₂O₂, 0.05% CoCl₂ ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที นำไป

ล้างน้ำประปาหลายๆ ครั้ง เลือกน้ำเลี้ยงของเซลล์ลูกผสมที่มีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อซีรัมของปลากะพงขาว แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน BSA ไปทำการคัดเลือกต่อในขั้นตอนที่ 2

3.2.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blot

นำซีรัมจากปลากะพงขาว หรือ โปรตีน BSA หรือ ตะกอน Ig/BSA complex หรือ ซีรัมปลานิล นำมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสในจุดที่ 1, 2, 3 และจุดที่ 4 ตามลำดับ จุดละประมาณ 1 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งแล้ว นำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที ล้างใน PBS 3 ครั้ง แล้วตัดแบ่งกระดาษไนโตรเซลลูโลส และใส่ลงใน microculture plate จากนั้นนำไปบ่มกับแอนติซีรัมจากหนูขาว หรือน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบ และผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เลือกเซลล์ลูกผสมที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของปลากะพงขาว และตะกอน Ig/BSA complex หรือซีรัมของปลานิล แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน BSA ไปทำการคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blot

3.2.3.1 การตรวจความจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot

นำซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย BSA หรือโปรตีน BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เจือจาง 1:100 เท่า ใน PBS มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15% SDS-PAGE แล้วทำการย้ายโปรตีนสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส บ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบเจือจาง 1:20 เท่าใน 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนล้าง PBS 3 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:3,000 เท่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้าง PBS เติมสารละลายซับสเตรตเช่นเดียวกับวิธี dot blot ในข้อ 3.2.1

3.2.3.2 การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซีรัมปลานิล ด้วยวิธี Western blot

นำซีรัมปลากะพงขาว หรือปลานิล มาเจือจาง 1:50 เท่าใน PBS แล้วนำมาแยกโปรตีนใน 15% SDS-PAGE เช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.3.1 จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบเจือจาง 1:20 เท่าใน 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย PBS 3 ครั้ง บ่มซ้ำด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:3,000 เท่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตเช่นเดียวกับวิธี dot blot ในข้อ 3.2.1

3.2.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี Limited dilution

นำโคลนของเซลล์ลูกผสมที่มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับซีรัมปลากะพงขาวที่ได้จากการคัดเลือกข้างต้น มาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution โดยการกระจายเซลล์ลูกผสมในหลุมของเพลท 96 หลุม เริ่มจากดูดเซลล์จากหลุมที่ต้องการลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ให้มีประมาณ 100 เซลล์ แล้วทำการเติมอาหาร RPMI ที่ผสมกับ 20% fetal bovine serum และ เม็ดเลือดแดง 1% ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน microculture plate 32 หลุมแรก (แถวที่ 1-4) หลุมละ 120 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาหาร RPMI เพิ่มลงไปอีก 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน microculture plate (แถวที่ 5-8) หลุมละ 120 ไมโครลิตร และทำเช่นเดียวกันกับแถวที่ 9-12 จากนั้นนำบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ลูกผสม นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ลูกผสมขึ้นเพียง 1 โคลนมาทดสอบด้วยวิธีการ dot blot ก่อนขยายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป

3.2.4 การเก็บเซลล์ลูกผสม

ทำการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมในอาหาร RPMI ที่เติม 20% fetal bovine serum ให้อยู่ในระยะ log phase แล้วทำการเก็บเซลล์ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร บั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนออกให้เหลือเพียงตะกอนของเซลล์ แล้วเติม 12% dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอาหาร RPMI ผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (cryopreservation tube) หลอด 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาเซลล์ในถังไนโตรเจนเหลว

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.1 การตรวจสอบอิพิโทปที่ทับซ้อนของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

นำซีรัมของปลากะพงขาวความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมมาใส่ในหลุม 96 หลุมของเพลท ELISA บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย 0.1% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบเจือจาง 1:20 เท่าใน 0.5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดเดียว หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิดผสมกัน บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1% blotto เช่นเดิม ตามด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 เท่า ในสารละลาย 0.5% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วย PBS จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที

ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม เติมสารละลายซับสเตรตประกอบด้วย O-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ในสารละลาย 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยเครื่อง microplate reader (ภาพประกอบ 7)

MAb	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

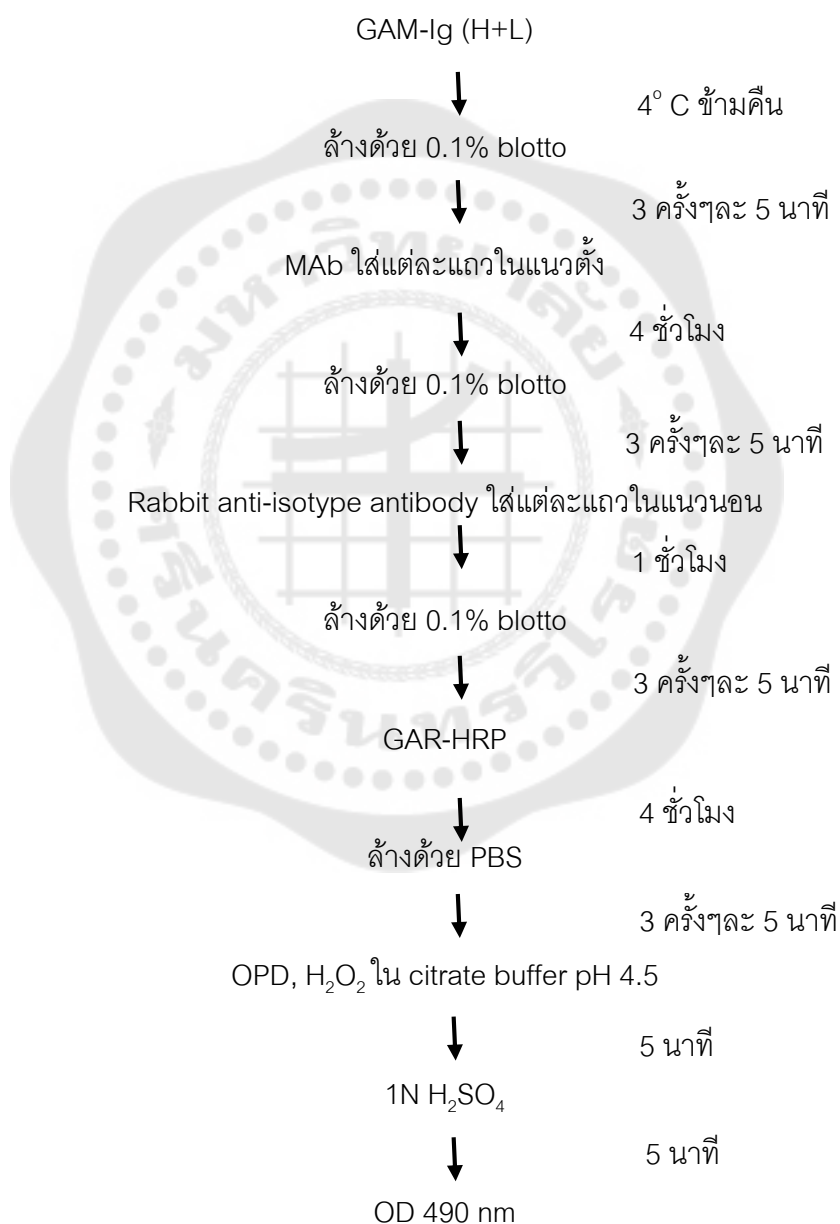
ภาพประกอบ 7 การตรวจสอบอิทธิพลของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA (A ถึง D แสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด)

4.2 การจำแนก Class และ Subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID (HRP)

นำ goat anti-Mouse Ig heavy and light chain specific antibody (GAM Ig-H+L) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมตรึงในหลุมของเพลท ELISA บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างด้วย 0.1% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม เป็นจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 เท่า ใน 0.5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.1% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1:50 เท่า ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถว บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.1% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นเติม goat anti-rabbit IgG heavy chain and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1:1,500 เท่า ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.1% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมสารละลายซับสเตรต และผ่านกระบวนการเช่นเดียวกันกับหัวข้อ 4.1 (ภาพประกอบ 8)

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blot

นำซีรัมปลากะพงขาวมาทำการเจือจางแบบ two fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสจากนั้นทำการบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบเจือจาง 1:20 เท่า ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ตรวจสอบปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาในระดับการเจือจางต่ำที่สุด ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า



ภาพประกอบ 8 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

5. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลากะพงขาว

5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus*

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* (จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (tryptic soy broth) เสริมด้วย 0.5% NaCl บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ของแบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ มาปรับค่าให้มีปริมาณของแบคทีเรียเท่ากับ 10^9 CFU/มิลลิลิตรแล้วนำไปตรวจสอบชนิดของ *Vibrio* sp. ด้วยวิธี Western blot เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus* (Surasilp, 2012) จากนั้นนำมาเตรียมเชื้อตายด้วยวิธี heat-killed โดยนำเชื้อไปอบในตู้อบความร้อน 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเก็บตะกอนใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C และทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อด้วยวิธี spread plate technique ถ้าไม่มีโคโลนีของแบคทีเรียปรากฏขึ้น จึงนำเชื้อที่ได้ไปฉีดปลาต่อไป

5.2 การปลูกภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยเชื้อ *V. vulnificus*

นำปลากะพงขาวจำนวน 20 ตัวมาเลี้ยง และทำการเก็บเลือดบริเวณโคนหาง (วันที่ 0) จากนั้น 1 สัปดาห์แบ่งปลาออกเป็นกลุ่ม 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุมฉีดด้วย PBS และกลุ่มทดลองฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ทำให้ตายแบบ heat-killed ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตรโดยผสมกับ CFA แล้วฉีดเข้าทางช่องท้องปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ทำการเจาะเก็บเลือด (วันที่ 14) เพื่อใช้ในการตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันปฐมภูมิ และฉีดซ้ำ (booster) ในอีก 1 สัปดาห์ต่อมา (วันที่ 21) โดยผสมกับ IFA ทำการเจาะเก็บเลือดหลังการฉีดครั้งที่ 2 แล้ว 1 สัปดาห์ (วันที่ 28) นำซีรัมมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะด้วยวิธี indirect ELISA และ Western blot

5.3 การตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากะพงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA และ Western blot

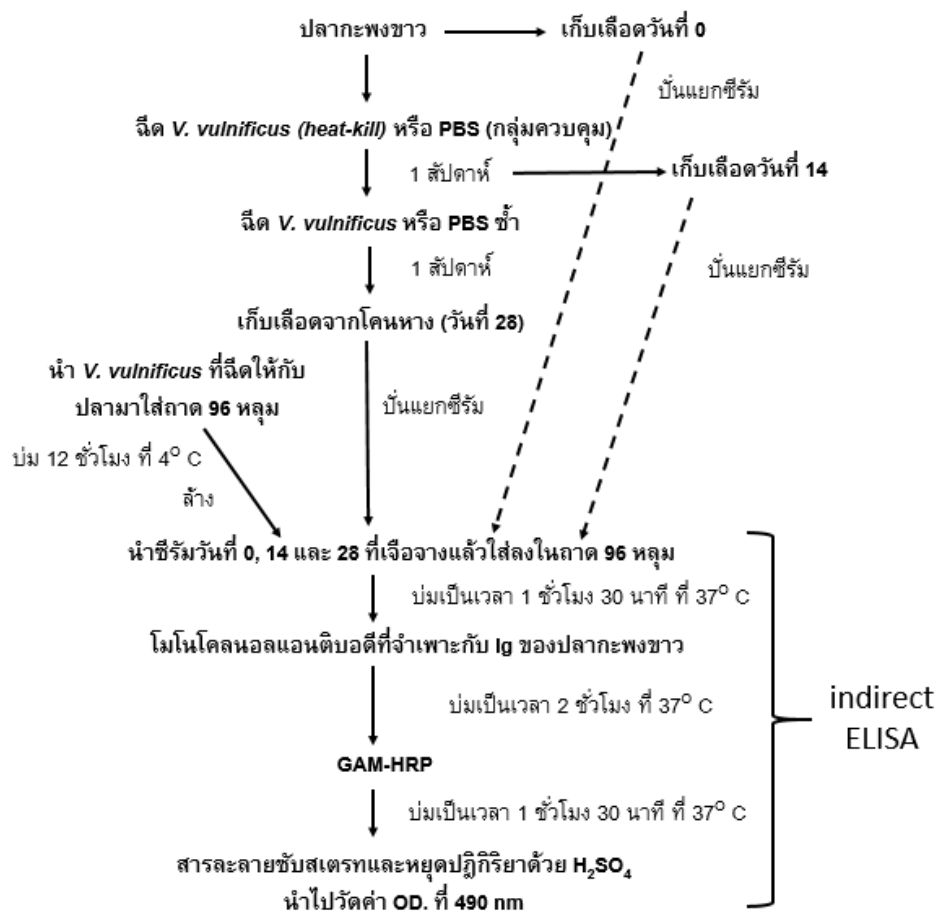
5.3.1 การตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากะพงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Triple antibodies indirect ELISA

นำสารละลายแบคทีเรีย *V. vulnificus* ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตรใส่ลงในถาด 96 หลุม (50 ไมโครลิตร/หลุม) บ่มไว้ที่ 4 °C ซ้ำมคืน ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บ่มกับ 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร/หลุม เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำซีรัมจากปลาตัวอย่างก่อน (วันที่ 0) และหลังการฉีด PBS หรือเชื้อแบคทีเรีย (วันที่ 14 และ 28) เจือจางที่ความ

เข้มข้นต่างๆ โดยเจือจางแบบ two fold dilution ด้วย 1% blotto ใส่ลงไปในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย 0.5% blotto แล้วเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาว (โคลน 6H8) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง แล้วเติม GAM-HRP จากนั้นล้างด้วย PBS แล้วเติมสารละลายซับสเตรตประกอบด้วย OPD 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H₂O₂ ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1N H₂SO₄ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับซีรัมจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทำการฉีดเชื้อ (ภาพประกอบ 9)

5.3.2 การตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากระพงด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot

นำเชื้อ *V. vulnificus* มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15% SDS-PAGE แล้วทำการย้ายโปรตีนสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยวิธี Western blot จากนั้นบ่มด้วยซีรัมของปลาที่ให้ผลดีจากข้อ 5.3.1 หรือซีรัมปลาที่ฉีด PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง บ่มต่อด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6H8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย PBS 3 ครั้ง บ่มซ้ำด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:3,000 เท่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตเช่นเดียวกับวิธี dot blot ในข้อ 3.2.1



ภาพประกอบ 9 การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ
จำเพาะในปลากะพงขาว

บทที่ 4

ผลการทดลอง

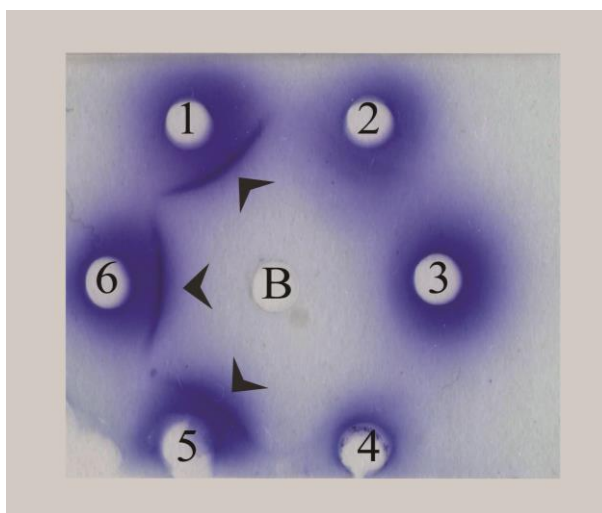
1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว

1.1 การทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยวิธี ดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน

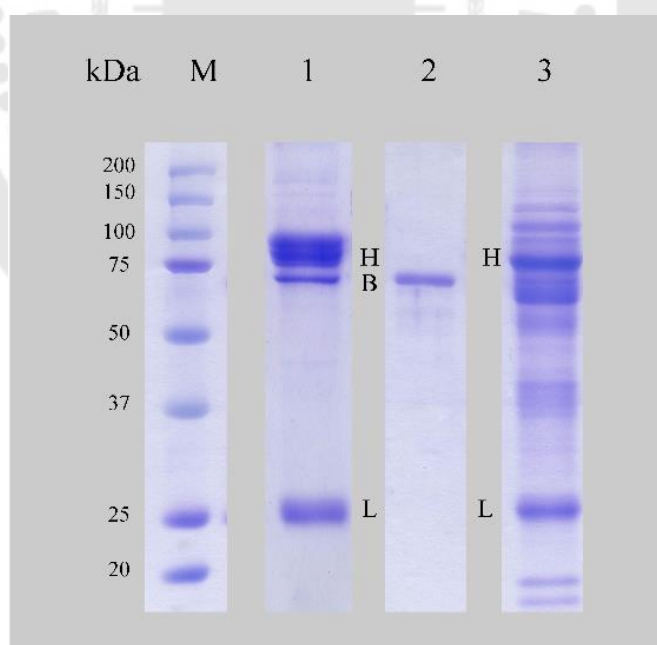
หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยโปรตีน BSA ครั้งที่ 4 แล้ว ทำการเก็บซีรัมจากโคนหางของปลา มาทำการตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันพบว่าปลาจำนวน 20 จาก 30 ตัวให้ผลแถบตะกอนหลังจากการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R-250 ชัดเจนระหว่างหลุมที่ใส่โปรตีน BSA และหลุมที่ใส่ซีรัมของปลาแต่ละตัว (ภาพประกอบ 10) จากนั้นจึงทำการรวบรวมซีรัมของปลาทั้งหมดที่ให้ผลบวกกับโปรตีน BSA เพื่อใช้ในการแยกอิมมูโนโกลบูลินของปลาต่อไป

1.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตะกอน Ig/BSA complex ด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำซีรัมปลาที่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับโปรตีน BSA ในหัวข้อ 1.1 มารวมกันแล้ว ผสมกับโปรตีน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในอัตราส่วนต่างๆ กันเพื่อทำการหาสัดส่วนการตกตะกอนที่ดีที่สุด พบว่าได้ปริมาณตะกอนจากอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, 3:1 และ 2:1 ปริมาตร/ปริมาตร ดังนี้ 0.711, 0.201, 0.025, 3.880 และ 2.474 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบองค์ประกอบของตะกอน Ig/BSA complex โดยการแยกโปรตีนผ่าน 15% SDS-PAGE พบว่าอัตราส่วนการตกตะกอนระหว่างซีรัมปลา และโปรตีน BSA ที่ให้ผลแถบโปรตีนสายยาว และสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินของปลาได้ชัดเจน คืออัตราส่วน 3:1 จึงนำซีรัมที่ให้ผลบวกกับโปรตีน BSA มาตกตะกอนในอัตราส่วน 3:1 เพื่อผลิตตะกอน Ig/BSA complex และทำการตรวจสอบองค์ประกอบของตะกอนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับซีรัมปลาที่ไม่ได้ทำการตกตะกอน และโปรตีน BSA พบว่าตะกอน Ig/BSA complex ประกอบด้วยโปรตีนสายยาวมีขนาดประมาณ 80 กิโลดาลตัน โปรตีนสายสั้นมีขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน และโปรตีน BSA ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ในแถวของตะกอน Ig/BSA complex ไม่พบโปรตีนอื่นๆ ปะปนมาเมื่อเทียบกับแถวของซีรัมปลา (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 10 การทดสอบความจำเพาะของซีรัมของปลาจากการปลูกภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยโปรตีน BSA ทดสอบด้วยวิธีดัดเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชันโดยใช้ซีรัมของปลาแต่ละตัวลงในหลุมต่างๆ (หมายเลข 1-6) และใส่โปรตีน BSA ใส่ไว้ในหลุมตรงกลาง (B) และทำการย้อมแถบตะกอนด้วยสีย้อมหลังจากการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีของปลา กับโปรตีน BSA พบแถบตะกอนสีน้ำเงิน (หัวลูกศร) ของซีรัมปลาที่มีการตอบสนองสูงปรากฏขึ้น (หลุมที่ 1, 5 และ 6) ส่วนซีรัมปลาที่ไม่มีการตอบสนองต่อโปรตีน BSA หรือมีการตอบสนองน้อยไม่พบแถบตะกอนเกิดขึ้น (หลุมที่ 2, 3 และ 4)



ภาพประกอบ 11 การตรวจสอบองค์ประกอบของตะกอน Ig/BSA complex ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำ (1) Ig/BSA complex (2) โปรตีน BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ (3) ซีรัมของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้นทำการย้อมสีเจลดด้วยสี

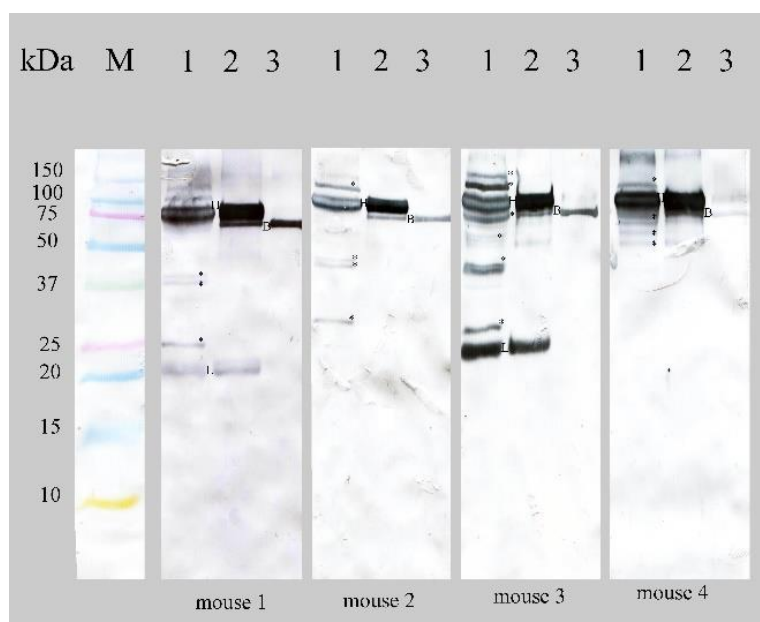
coomassie blue R-250 M; โปรตีนมาตรฐาน H; โปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลิน L; โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินและ B; โปรตีน BSA

2. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

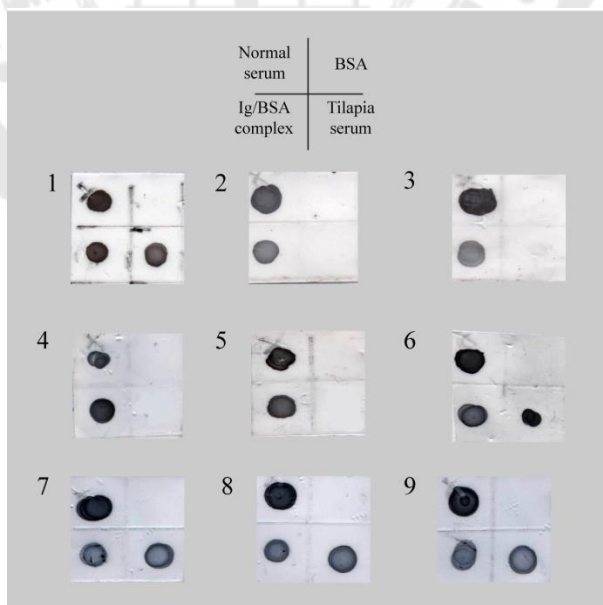
หลังจากนำตะกอน Ig/BSA complex ที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว และทำการเก็บซีรัมจากหนูแต่ละตัวมาทดสอบความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาด้วยวิธี Western blot พบว่าหนูทั้งหมดสามารถตอบสนองต่อโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลาได้อย่างจำเพาะ แต่มีเพียงหนู 2 ตัวที่สามารถจับจำเพาะกับทั้งโปรตีนสายยาว และสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินของปลาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนอื่นๆ ที่พบในซีรัมของปลาได้บ้าง และมีบางส่วนที่จับจำเพาะต่อโปรตีน BSA ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ Ig/BSA complex (ภาพประกอบ 12) จากนั้นนำหนูที่มีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อโปรตีนสายยาว และสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินได้ดีที่สุดไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3. การผลิต การคัดเลือก และการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมเบื้องต้นด้วยวิธี dot blot โดยการหยดซีรัมของปลากะพงขาว และโปรตีน BSA พบว่ามีน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมของเซลล์ลูกผสมประมาณ 45 หลุมให้ผลบวกจาก 1,500 หลุม แต่ละหลุมที่ให้ผลบวกเฉพาะกับซีรัมปลา มีโคลนของเซลล์ลูกผสมประมาณ 4-5 โคลน เมื่อทำการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blot อีกครั้งโดยหยดตัวอย่างของตะกอน Ig/BSA complex และซีรัมของปลานิล พบว่ามีเซลล์ลูกผสมจำนวน 8 โคลนที่ให้ผลบวกกับซีรัมปลากะพงขาว และตะกอน Ig/BSA complex นอกจากนี้เซลล์ลูกผสมจำนวน 4 จาก 8 โคลนสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 13) ส่วนโคลนที่สร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับซีรัมของปลากะพงขาวได้ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับตะกอน Ig/BSA complex หรือสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน BSA ถูกคัดทิ้งไป โดยเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมจากหนูขาวในหัวข้อ 2 ที่ทำการดูดซับ (absorb) ด้วยโปรตีน BSA (ภาพประกอบ 13-1)



ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย ตะกอน Ig/BSA complex ด้วยวิธี Western blot ทำโดยนำ (1) ซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการ ปลูกภูมิคุ้มกัน (2) ตะกอน Ig/BSA complex และ (3) โปรตีน BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมาแยก โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นทำการย้ายแถบโปรตีนจากเจลลงกระดาษไนโตรเซลลูโลส และ บ่มด้วยแอนติซีรัมจากหนูขาวแต่ละตัว (mouse 1-4) M; โปรตีนมาตรฐาน H; โปรตีนสายยาวของ อิมมูโนโกลบูลิน L; โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลิน, B; โปรตีน BSA และ *; โปรตีนอื่นๆ ใน ซีรัม



ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบอิมมูโน โกลบูลินในซีรัมของปลากะพงขาวด้วยวิธี dot blot โดยการหยดตัวอย่างต่างๆ คือ ซีรัมปลากะพง ขาว โปรตีน BSA ตะกอน Ig/BSA complex หรือซีรัมปลานิล ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

(1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปป้อนกับ (1) แอนติซีรัมจากหนูขาวที่ทำการดูดซับด้วยโปรตีน BSA หรือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ ดังนี้ (2) 6H7, (3) 6H8, (4) 15C8, (5) 6H11, (6) 4C7, (7) 9D4, (8) 11C9 และ (9) 15G7 ตามลำดับ

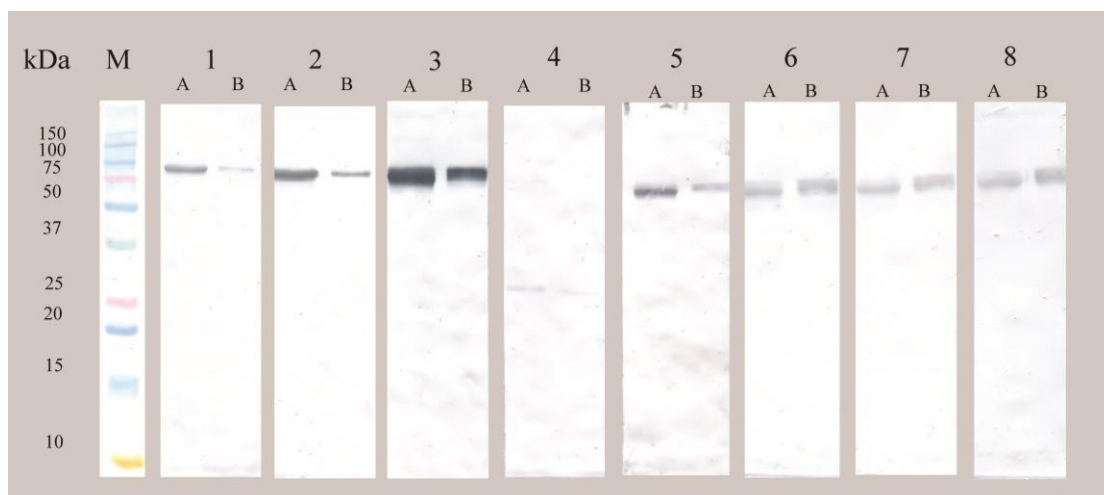
จากการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ลูกผสมทั้ง 8 โคลนมาทำการทดสอบด้วยวิธี dot blot และ Western blot สามารถคัดแยกเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนสายยาวของ อิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิล ประกอบด้วยแอนติบอดี 3 โคลน ได้แก่ 6H7, 6H8, และ 15C8 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าทั้ง 3 โคลนสามารถจับกับโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 กิโลดาลตันได้ในรูปเสียสภาพ (denature form) (ภาพประกอบ 14-1 ถึง 14-3) และแอนติบอดีทั้ง 3 โคลนไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนใดๆ ในซีรัมของปลานิล (ภาพประกอบ 15-1 ถึง 15-3) นอกจากนี้เมื่อทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับอิมมูโนโกลบูลินในรูปธรรมชาติ (natural form) ด้วยวิธี dot blot แอนติบอดีทั้ง 3 โคลนสามารถจับกับซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน และตะกอน Ig/BSA complex ได้ รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน BSA และซีรัมของปลานิล (ภาพประกอบ 13-2 ถึง 13-4)

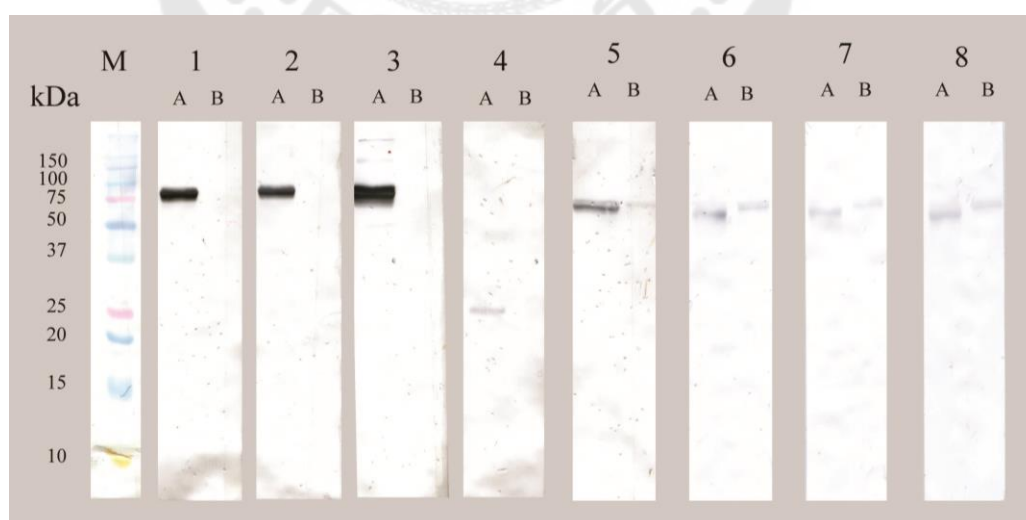
กลุ่มที่ 2 คือโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6H11 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าสามารถจับกับโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินในปลากะพงขาวได้ในรูปเสียสภาพ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 14-4) แอนติบอดีดังกล่าวไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนใดๆ ในซีรัมของปลานิล (ภาพประกอบ 15-4) และสามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินในรูปธรรมชาติด้วยวิธี dot blot กับซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน และตะกอน Ig/BSA complex ได้ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน BSA และซีรัมของปลานิล (ภาพประกอบ 13-5)

กลุ่มที่ 3 คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายยาวของ ปลากะพงขาว และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของปลานิลได้ ประกอบด้วยแอนติบอดี 4 โคลน ได้แก่ 4C7, 9D4, 11C9 และ 15G7 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าสามารถจับกับโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 กิโลดาลตันได้ในรูปเสียสภาพ เช่นเดียวกันกับโปรตีนสายยาวของปลานิล (ภาพประกอบ 14-5 ถึง 14-8 และ 15-5 ถึง 15-8) และเมื่อทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับอิมมูโนโกลบูลินในรูปธรรมชาติด้วยวิธี dot blot พบว่าแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนสามารถจับกับซีรัมของปลากะพงขาวที่

ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน ซีรัมปลานิล และตะกอน Ig/BSA complex ได้ (ภาพประกอบ 13-6 ถึง 13-9)



ภาพประกอบ 14 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot โดยนำ(A) ซีรัมของปลากะพงขาว และ(B) ตะกอน Ig/BSA complex มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15%SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส นำไปปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ (1) 6H7 (2) 6H8 (3) 15C8 (4) 6H11 (5) 4C7 (6) 9D4 (7) 11C9 และ (8) 15G7 M; โปรตีนมาตรฐาน



ภาพประกอบ 15 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot โดยนำ(A) ซีรัมของปลากะพงขาว และ(B) ซีรัมของปลานิลมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15% SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส นำไปปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล

แอนติบอดี ได้แก่ (1) 6H7 (2) 6H8 (3) 15C8 (4) 6H11 (5) 4C7 (6) 9D4 (7) 11C9 และ (8)

15G7 M; โปรตีนมาตรฐาน

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปที่จับของแอนติเจนที่ถูกจับด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ ที่ผลิตได้ โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 โคลนมาผสมรวมกันทีละคู่ (combine) แล้วทดสอบกับซีรัมของปลากระพงขาว ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 โคลนจับแอนติเจนที่ต่างกันอยู่ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ โคลน 6H7, 6H8, และ 15C8 กลุ่มที่ 2 คือ โคลน 6H11 และกลุ่มที่ 3 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ 3.1 คือ โคลน 4C7 และกลุ่มที่ 3.2 คือ โคลน 9D4, 11C9 และ 15G7 โดยเมื่อนำแอนติบอดีภายในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน และทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA แล้วไม่พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสง แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันจับกับอิพิโทปของแอนติเจนบริเวณเดียวกัน หรือคาบเกี่ยวกัน (ตาราง 4)

ตาราง 4 การตรวจสอบอิพิโทปที่จับของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาวด้วยวิธี indirect ELISA

		กลุ่มที่ 1			กลุ่มที่ 2		กลุ่มที่ 3		
							กลุ่มที่ 3.1	กลุ่มที่ 3.2	
แอนติบอดี		6H7	6H8	15C8	6H11	4C7	9D4	11C9	15G7
กลุ่มที่ 1	6H7	1.497	1.479	1.478	1.556	1.725	1.561	1.527	1.571
	6H8		1.453	1.471	1.543	1.287	1.594	1.544	1.616
	15C8			0.302	0.645	1.125	0.686	0.622	0.669
กลุ่มที่ 2	6H11				0.586	1.287	0.931	0.894	0.880
กลุ่มที่ 3.1	4C7					1.067	1.235	1.273	1.252
กลุ่มที่ 3	9D4						0.608	0.589	0.618
กลุ่มที่ 3.2	11C9							0.554	0.597
	15G7								0.591

หมายเหตุ พิจารณาความแตกต่างของค่าดูดกลืนจากทศนิยมตำแหน่งที่หนึ่งมีค่าต่างกันมากกว่า

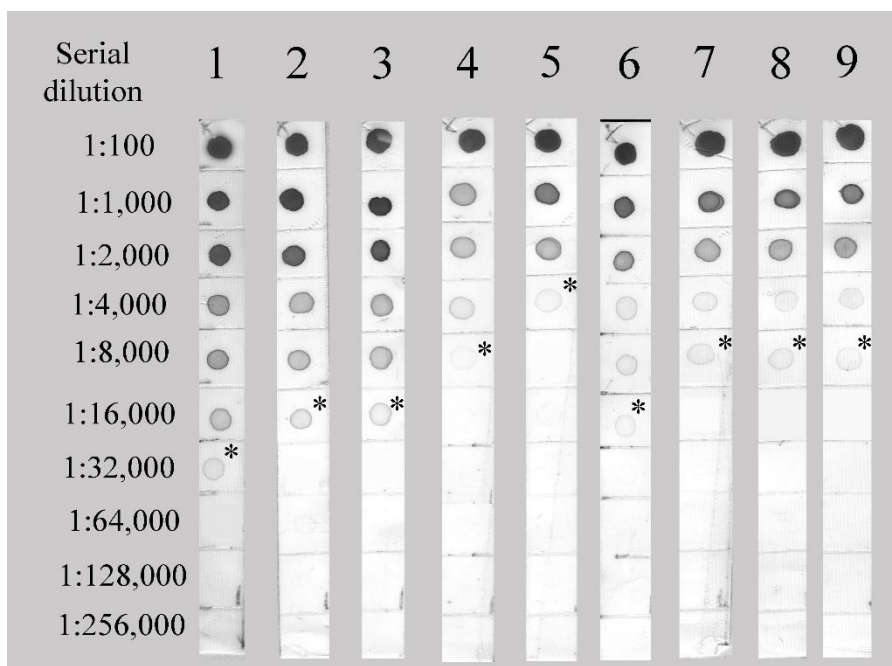
0.1 ถือว่ามีค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกัน

4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก Class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 โคลนมี class เป็น IgG และมี subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a} และ IgG_{2b} ส่วน light chain เป็น kappa (K) (ตาราง 5)

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบ ภูมิโนโกลบูลินในซีรัมของปลาโดยวิธี dot blot

จากการนำซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100 ถึง 1:256,000 และหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้วทำการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ 6H7 และ 6H8 มีความไวในการจับกับซีรัมเจือจางที่ระดับ 1:16,000 เท่ากัน และโคลน 15C8 มีความไวในการจับกับซีรัมที่เจือจางได้เพียง 1:8,000 เท่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ 6H11 สามารถจับกับซีรัมในระดับการเจือจาง 1:4,000 สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 สามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มที่ 3.1 ได้แก่ 4C7 สามารถจับกับซีรัมที่ระดับการเจือจาง 1:16,000 เท่า และกลุ่มที่ 3.2 ได้แก่ 9D4, 11C9 และ 15G7 สามารถจับกับซีรัมที่ระดับการเจือจาง 1:8,000 เท่ากันโดยโคลน 6H11 ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จับจำเพาะต่อโปรตีนสายสั้นของภูมิโนโกลบูลินได้นั้นมีความไวต่ำที่สุดสำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายยาวในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ 6H7 และ 6H8 มีความไวในการเกิดปฏิกิริยากับซีรัมปลาได้มากกว่า 15C8 ซึ่งเป็นแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันอยู่ 2 เท่า และแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนนี้ (6H7 และ 6H8) มีความไวสูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 (6H11) อยู่ 4 เท่า และมีความไวสูงกว่าแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3.2 (9D4, 11C9 และ 15G7) ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายยาว และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของปลานิลได้อยู่ 2 เท่า แต่อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 โคลนมีความไวในการจับกับซีรัมปลานิลต่ำกว่าแอนติซีรัมจากหนูขาว (1:32,000) (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบภูมิโนไกลบู

ลินในซีรัมของปลากระพงขาวด้วยวิธี dot blot โดยการหยดซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูก
ภูมิคุ้มกันที่เจือจางด้วย PBS ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1:100 ถึง 1:256,000 เท่า ลงบนกระดาษ
ไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับแอนติบอดีต่างๆ ได้แก่ (1) แอนติซีรัมจากหนูที่
ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยตะกอน Ig/BSA complex และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้คือ (2) 6H7,
(3) 6H8, (4) 15C8, (5) 6H11, (6) 4C7, (7) 9D4, (8) 11C9 และ (9) 15G7 ตามลำดับ

* แสดงความเข้มข้นที่เจือจางมากที่สุดที่แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนได้

ตาราง 5 ความจำเพาะ และความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

กลุ่มที่	MAb	Class subclass	H-chain specific	L-chain specific	Sensitivity 1 :	Cross- reaction with tilapia
1	6H7	IgG _{2a}	✓		16,000	
	6H8	IgG _{2a}	✓		16,000	
	15C8	IgG ₁	✓		8,000	
2	6H11	IgG _{2b}		✓	4,000	
3	3.1 4C7	IgG ₁	✓		16,000	✓

3.2	9D4	IgG _{2b}	✓	8,000	✓
	11C9	IgG _{2a}	✓	8,000	✓
	15G7	IgG _{2a}	✓	8,000	✓

5. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบภูมิคุ้มกันจำเพาะ หลังจากการปลูกภูมิคุ้มกัน

5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในปลา

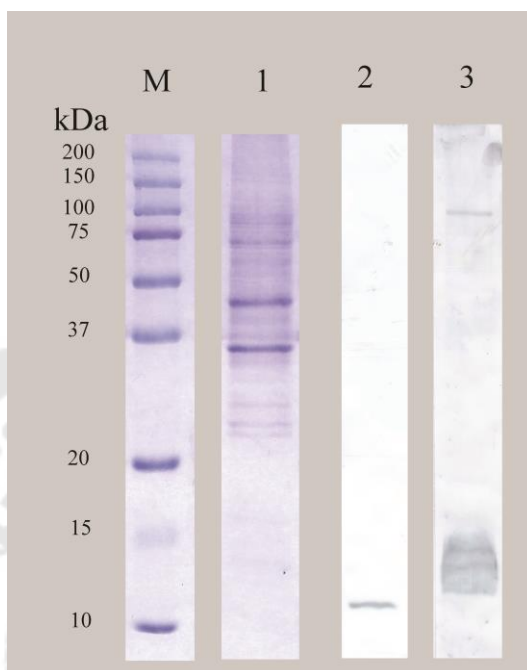
หลังจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อมาตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ โดยหลังจากการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 20D4 ที่จำเพาะกับ *V. vulnificus* พบว่าสามารถจับอย่างจำเพาะกับโปรตีนขนาด 10 กิโลดาลตันของ *V. vulnificus* ที่เตรียมได้จากการทดลอง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ (Surasilp, 2012) จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในปลาต่อไป (ภาพประกอบ 17-1 และ 17-2)

5.2 การตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันจำเพาะในปลาหลังได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Triple indirect ELISA และ Western blot

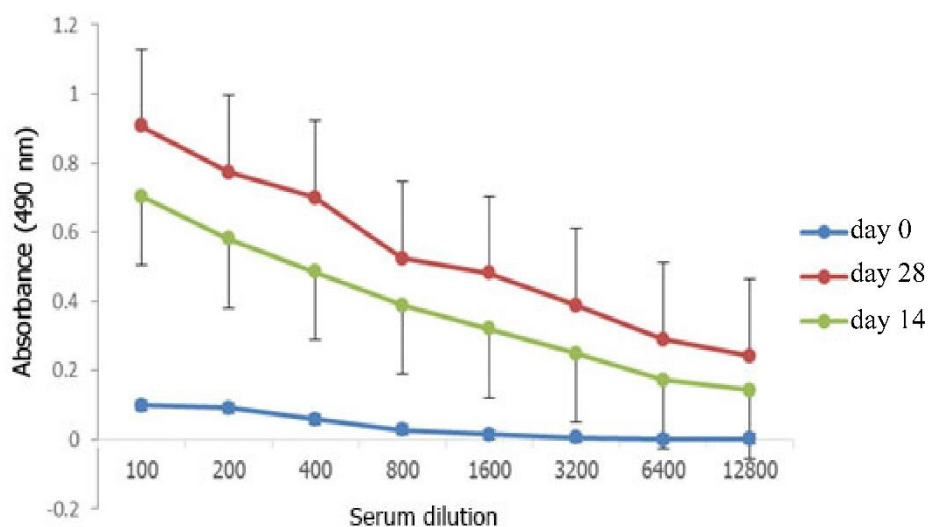
หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาด้วย *V. vulnificus* ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แล้วทำการเก็บตัวอย่างซีรัมปลาจากโคนหางของปลา (วันที่ 14 และ 28) หลังจากการฉีดกระตุ้น เพื่อตรวจสอบระดับแอนติบอดีเปรียบเทียบกับตัวอย่างซีรัมปลา วันที่ 0 และกลุ่มควบคุม (ฉีด PBS) ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าซีรัมของปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อแบคทีเรียจำนวน 8 ใน 10 ตัวให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าในทุกๆ ระดับการเจือจางของซีรัม (1:100 ถึง 1:12,800) เมื่อเทียบกับตัวอย่างซีรัมปลา วันที่ 0 (ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.001 ± 0.040 ถึง 0.109 ± 0.040) (ภาพประกอบ 18) และกลุ่มควบคุมที่ฉีด PBS (วันที่ 14 และ 28) ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.001 ± 0.022 ถึง 0.099 ± 0.022 ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับตัวอย่างซีรัมปลาวันที่ 0 ก่อนฉีด PBS (ไม่ได้แสดงผลในภาพประกอบ) นอกจากนี้พบว่าซีรัมจากปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันซ้ำด้วยเชื้อ *V. vulnificus* ครั้งที่ 2 (วันที่ 28) ให้ค่าการดูดกลืนแสง (0.417 ± 0.222 ถึง 1.208 ± 0.222) สูงกว่าซีรัมจากปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 1 (วันที่ 14) ให้ค่าการดูดกลืนแสง (0.260 ± 0.199 ถึง 1.041 ± 0.199) อยู่ประมาณ 2 เท่า (ภาพประกอบ 18)

จากการสุ่มซีรัมของปลาที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. vulnificus* ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด และซีรัมของปลาที่ฉีด PBS มาทำการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยวิธี Western

blot พบว่าซีรัมของปลาที่ตอบสนองกับเชื้อ *V. vulnificus* จากวิธี ELISA สามารถจับกับโปรตีนของ *V. vulnificus* ที่มีขนาดประมาณ 10-15 กิโลดาลตันได้ (ภาพประกอบ 17-3) ในขณะที่ซีรัมจากปลาที่ฉีดด้วย PBS ไม่พบแถบโปรตีนเกิดขึ้น (ไม่ได้แสดงผล)



ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบยืนยันชนิดของ *V. vulnificus* ด้วยวิธี SDS-PAGE (1) และ Western blot (2) และการตรวจสอบความจำเพาะของซีรัมของปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรียโดยวิธี triple antibody-Western blot (3) ทำโดยนำเชื้อ *V. vulnificus* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วตัดเจลมาย้อมสี coomassie blue (1) เจลส่วนที่เหลือทำการย้ายโปรตีนลงกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้วบ่มด้วย (2) โมโนโคลนอลแอนติบอดี 20D4 ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *V. vulnificus* หรือบ่มกับ (3) ซีรัมของปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. vulnificus* และตามด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6H8 ที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว M; โปรตีนมาตรฐาน



ภาพประกอบ 18 การติดตามแอนติบอดีจากซีรัมของปลากะพงขาวที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *V. vulnificus* ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 1 (วันที่ 14) และครั้งที่ 2 (วันที่ 28) เทียบกับซีรัมจากปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันวันที่ 0 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 6H8 ในการติดตามด้วยวิธี indirect ELISA ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean $\pm$ SE)

บทที่ 5

สรุป และวิเคราะห์ผลการทดลอง

การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลาให้มีความบริสุทธิ์สูงสามารถทำได้หลากหลายวิธีซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น อุปกรณ์ และ/หรือ ต้นทุนในการวิจัยนั้นๆ จากรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากระดุกแข็งนั้น พบว่ามีการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินให้มีความบริสุทธิ์โดยวิธีการใช้ระบบโครมาโทกราฟี (chromatographic system) ซึ่งเป็นวิธีที่งานวิจัยส่วนมากเลือกใช้ ตัวอย่างเช่น คอลัมน์ BSA agarose (Bag et al., 2009; Rathore et al., 2008; Sood et al., 2012), คอลัมน์ anti-mouse IgG agarose (Smith et al., 1993), คอลัมน์ mannan-binding protein affinity (Al-Harbi et al., 2000), คอลัมน์ mannan-binding protein affinity และคอลัมน์ staphylococcal protein A (Crosbie & Nowak, 2002), หรือคอลัมน์ DEAE Sepharose (Q. Li et al., 2007) เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินมีความสำคัญมากในกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อโปรตีนเป้าหมาย ถ้าสามารถเตรียมอิมมูโนโกลบูลินที่มีความบริสุทธิ์ และมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นๆ ในซีรัมน้อย เมื่อนำไปใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวก็ทำให้มีโอกาสผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนสายยาว และโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินได้มากขึ้นไปด้วย

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยอีกจำนวนหนึ่งที่อาศัยการปลูกภูมิคุ้มกันในปลาเพื่อให้ปลามีระดับอิมมูโนโกลบูลินที่เพิ่มสูงขึ้น และมีความจำเพาะต่อแอนติเจนก่อนทำการเก็บซีรัมมาใช้ (W. Zhang et al., 2017) เช่น การใช้โปรตีน BSA ในการปลูกภูมิคุ้มกันในปลาก่อน แล้วใช้คอลัมน์ที่ทำการตรึงโปรตีน BSA ไว้ภายในแล้วใช้คัดแยกอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะกับโปรตีน BSA ออกจากโปรตีนอื่นๆ ในซีรัมของปลาได้ (Choudhury & Pani Prasad, 2011; Kreutz et al., 2016) ทั้งนี้วิธีการใช้ระบบโครมาโทกราฟีมีราคาสูง จึงมีรายงานการวิจัยอีกส่วนหนึ่งที่เลือกใช้วิธีที่มีราคาถูก และขั้นตอนในการเตรียมที่ง่ายแทนโดยใช้แอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในปลา เช่น โปรตีน BSA แล้วทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี immunoprecipitation ซึ่งเมื่อนำตะกอนของอิมมูโนโกลบูลินมาทดสอบพบว่ามีค่าความบริสุทธิ์สูง พบโปรตีนอื่นๆ ที่ปะปนอยู่ในซีรัมของปลาค่อนข้างน้อย และสามารถใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูขาวให้ตอบสนองต่อโปรตีนสายยาว และสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินได้ดี (Soonthonsrima et al., 2018) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินของ Crosbie และ Nowak ที่ทำการแยกอิมมูโนโกลบูลินโดยอาศัย

คอลัมน์ mannan-binding protein affinity และคอลัมน์ staphylococcal proteinA พบโปรตีนอื่นๆ ที่ปะปนในซีรัมของปลาที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 108 และ 55 กิโลดาลตันออกมาด้วยเช่นกัน (Crosbie & Nowak, 2002) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้วิธีการ immunoprecipitation ในการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์บางส่วนจากการปลูกภูมิคุ้มกันปลากะพงขาวด้วยโปรตีน BSA แล้วนำซีรัมของปลาที่ได้มาทำการตรวจสอบการตอบสนองด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิชั่น พบแนวตะกอนที่เกิดจากการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจน-แอนติบอดีชัดเจน ทั้งนี้พบแถบตะกอนที่เกิดใกล้กับหลุมที่ใส่ซีรัมของปลาเพราะอาจเกิดจาก 1) ความเข้มข้นของโปรตีน BSA มีมากกว่าแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน BSA ในซีรัมของปลา และ/หรือ 2) อาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างของแอนติบอดีของปลามีขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินในปลากะพงขาวที่เป็นชนิด IgM และมีโครงสร้างเป็น Tetramer มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 860 กิโลดาลตัน (Crosbie & Nowak, 2002) จึงส่งผลให้เคลื่อนที่ผ่านช่องว่างของวุ้นได้ช้ากว่าโปรตีน BSA ที่มีโครงสร้างเล็กกว่า ผลการทดลองนี้มีความใกล้เคียงกับการทดลองก่อนหน้านี้ในการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะกับโปรตีน BSA ในปลานิล (Shelby et al., 2001; Soonthonsima et al., 2017) ซึ่งวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิชั่น ดังกล่าวใช้อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการในการทดสอบ จึงเป็นวิธีที่ง่าย รวมทั้งเหมาะกับการตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมาก จากนั้นจึงนำซีรัมปลาที่ให้ผลตะกอนที่ชัดเจนระหว่างโปรตีน BSA และซีรัมปลา มาทำการตกตะกอนกับโปรตีน BSA พบว่าได้ตะกอนของอิมมูโนโกลบูลินของปลา และโปรตีน BSA หรือเรียกว่า Ig/BSA complex เมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าตะกอนที่ได้มีการปรากฏของแถบโปรตีน 3 แถบ คือ โปรตีนสายยาว โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลิน และโปรตีน BSA และยังพบโปรตีนอื่นๆ น้อยกว่าเมื่อเทียบกับซีรัมของปลาปกติ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสายยาวที่ได้มีขนาดแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการเตรียม SDS-PAGE และโปรตีนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน (Choudhury & Pani Prasad, 2011; Crosbie & Nowak, 2002) นอกจากนี้วิธี immunoprecipitation ทำให้ได้อิมมูโนโกลบูลินเพียงบางส่วนจากอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมดในซีรัมของปลา แต่วิธีนี้ให้ผลการแยกโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินได้ชัดเจนกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแยกอิมมูโนโกลบูลินออกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Choudhury & Pani Prasad, 2011; Rathore et al., 2008)

เมื่อนำตะกอน Ig/BSA complex ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเพื่อทำการผลิตแอนติซีรัม และทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูมีความจำเพาะกับโปรตีนสาย

ยาว และโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินในปลาทั้งจากตัวอย่างซีรัมปลาที่ไม่ได้รับการปลูก ภูมิคุ้มกัน และตะกอนของ Ig/BSA complex โดยแอนติซีรัมที่ผลิตได้ยังสามารถจับกับโปรตีนอื่นๆ ที่ปรากฏในซีรัมได้บางส่วน และโปรตีน BSA ที่เป็นส่วนประกอบของตะกอน Ig/BSA complex ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน ดังนั้นวิธีการเตรียมแอนติเจนข้างต้นเพื่อนำมาใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว นั้นดีเช่นเดียวกับการใช้คอลัมน์ในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ (Crosbie & Nowak, 2002; Kreutz et al., 2016) และมีโอกาสที่สามารถผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะกับโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินในปลาได้ดีกว่าการใช้ อิมมูโนโกลบูลินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Choudhury & Pani Prasad, 2011; Rathore et al., 2008) และการใช้วิธีการสังเคราะห์เพปไทป์ของโปรตีนสายยาวของ อิมมูโนโกลบูลินของปลาเพื่อใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (Jirapongpairaj et al., 2017)

หลังจากนำหนูขาวที่แสดงการตอบสนองได้ดีที่สุดมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี และทำการคัดเลือกด้วยวิธี dot blot และวิธี Western blot พบว่าสามารถคัดเลือก เซลล์ลูกผสมได้ 8 โคลน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 (6H7, 6H8 และ 15C7) สร้าง แอนติบอดีที่จับกับโปรตีนสายยาว กลุ่มที่ 2 (6H11) สร้างแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนสายสั้น และ กลุ่มที่ 3 (4C7, 9D4, 11C9 และ 15G7) สร้างแอนติบอดีที่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน สายยาวของอิมมูโนโกลบูลินในปลานิลได้ ซึ่งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน สายยาวของอิมมูโนโกลบูลินในปลากระดุกแข็งนั้นทำได้ง่ายกว่าโปรตีนสายสั้น เนื่องจากมีขนาดใหญ่ และมีความเป็นแอนติเจนมากกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยในการผลิตแอนติบอดีต่อ อิมมูโนโกลบูลินของปลากระดุกแข็งหลายๆ ชนิด (Al-Harbi et al., 2000; Soonthonsrima et al., 2018; Yang et al., 2017) สำหรับในการศึกษารุ่นนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินในปลากะพงขาวได้อย่างจำเพาะ ถึงแม้ว่ามีโอกาส น้อยที่สามารถผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินของปลาได้ แต่ อย่างไรก็ตามโคลน 6H11 ที่ได้มีความไวต่ำในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนสายสั้นเมื่อทดสอบด้วย วิธี Western blot สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายสั้น ในปลากะพง (sea bass, *Dicentrarchus labrax*) (Scapigliati et al., 1996) สำหรับการศึกษา ครั้งนี้สามารถผลิตเซลล์ลูกผสมโคลน 6H7 และ 6H8 ที่มีความไวสูงในการจับจำเพาะกับโปรตีน สายยาวของอิมมูโนโกลบูลินภายในซีรัมของปลาได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blot อย่างไรก็ตามทั้ง 2 โคลนยังมีความไวต่ำกว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูขาวอยู่เพียงเล็กน้อย แต่มีความไวสูงกว่า โคลนอื่นๆ ดังนั้นโคลน 6H7 และ 6H8 จึงเหมาะสมที่จะสามารถนำไปพัฒนา หรือใช้ในการ

ตรวจสอบปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลาด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น dot blot, Western blot และ ELISA เพื่อใช้ในการติดตามหรือตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลากระพงขาวหลังจากการได้รับวัคซีนต่อเชื้อก่อโรคที่สำคัญต่างๆ อย่างไรก็ตามเมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 8 โคลนไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของปลานิล พบว่าโคลน 4C7, 9D4, 11C9 และ 15G7 มีการแสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของปลานิลได้ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิล ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถแสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาวได้เช่นกัน (Soonthonsrima et al., 2018) ทั้งนี้การคัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของปลากระดุกแข่งขันได้อื่นๆ ได้นั้นมีโอกาสเกิดขึ้นได้ เพราะอิมมูโนโกลบูลินของปลากระดุกแข่งขันชนิดต่างๆ มีส่วนของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสายยาวคล้ายกัน (Kreutz et al., 2016; Phuyindee, Unajak, & Srisapoom, 2015; Soonthonsrima et al., 2018) นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 8 โคลนนี้อาจจับกับโปรตีนส่วนคงที่ (constant region) ของอิมมูโนโกลบูลิน โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดสามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากระพงขาวปกติที่ไม่ได้ทำการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน BSA ได้ ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ไปใช้ในการติดตามอิมมูโนโกลบูลินจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลาหลังจากได้รับวัคซีนหรือติดเชื้อต่างๆ ได้

สำหรับการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินในการติดตามการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของปลาได้มีการศึกษาและพัฒนาในปลาหลายๆ ชนิด เช่น การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจสอบการตอบสนองต่อโปรตีน BSA ด้วยวิธี Triple antibody indirect ELISA (Soonthonsrima et al., 2018) หรือตอบสนองต่อการได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรียที่ทำให้ตาย หรือทำให้อ่อนแรงลง (Chettri et al., 2015; Rathore et al., 2008; Shelby et al., 2001; Sood et al., 2012; Suresh Babu, 2015; W. Zhang et al., 2017) การศึกษาค้นคว้าได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6H8 มาใช้ในการตรวจสอบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะที่เพิ่มขึ้นในปลากระพงขาวหลังจากได้รับการฉีดเชื้อ *Vibrio vulnificus* เนื่องจากมีความไวสามารถใช้ในการติดตามอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี ELISA ทั้งนี้แอนติบอดีโคลนนี้ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับโคลน 6H7 และมีอิทธิพลที่จำเพาะกับแอนติเจนเหมือนกัน โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้จากโคลน 6H8 เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ในวิธีการ indirect ELISA ผลการทดลองหลังจากที่ปลาได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตาย 1 ครั้งพบว่าแอนติบอดีที่

จำเพาะของปลาที่สามารถตอบสนองต่อเชื้อที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และซีรัมก่อนที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ (W. Zhang et al., 2017) และเมื่อตรวจสอบซีรัมของปลาที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันซ้ำ (ครั้งที่ 2) พบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *V. vulnificus* มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับซีรัมของปลาจากกลุ่มควบคุม (ฉีด PBS) และซีรัมปลาจากปลาที่รับการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Rathore et al., 2008; Sood et al., 2012; Soonthonsrima et al., 2018) จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการติดตามแอนติบอดีของปลาด้วยวิธี ELISA นั้นมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้แอนติซีรัมจากกระต่ายที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยอิมมูโนโกลบูลินของปลาจากเพปไทป์สังเคราะห์ เนื่องจากแอนติบอดีจากกระต่ายที่ไม่สามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินในรูปแบบธรรมชาติได้ ทำให้ไม่สามารถใช้ตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ได้ (Jirapongpairaj et al., 2017) นอกจากนี้การตรวจสอบแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมของปลาด้วยวิธี ELISA มีข้อดี และได้เปรียบคือใช้ซีรัมปริมาณน้อยจากตัวอย่าง รวมถึงใช้เวลาในการตรวจสอบรวดเร็วกว่าวิธีการตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agglutination (Shelby et al., 2001)

จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวได้โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาด้วยโปรตีน BSA เพื่อให้ปลามีระดับอิมมูโนโกลบูลินที่สูงขึ้น และมีความจำเพาะต่อโปรตีน BSA เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี immunoprecipitation ทำให้ได้ตะกอน Ig/BSA complex ที่สามารถนำไปใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวได้ จากการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตเซลล์ลูกผสมได้ 8 โคลนแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 (6H7, 6H8 และ 15C7) สร้างแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนสายยาว กลุ่มที่ 2 (6H11) สร้างแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนสายสั้น และกลุ่มที่ 3 (4C7, 9D4, 11C9 และ 15G7) สร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับโปรตีนสายยาว และเกิดปฏิกิริยาข้ามโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินในปลาไนด ทั้ง 8 โคลนสามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินทั้งในรูปแบบธรรมชาติและรูปเสียสภาพได้ ทั้งนี้แอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาในวิธีการตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของปลาต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA ได้ดี จึงคาดหวังว่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะต่อเชื้อก่อโรค หรือสำหรับทดสอบผลของวัคซีนในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- Al-Harbi, A. H., Truax, R., & Thune, R. L. (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin. *Aquaculture*, 188(3), 219-227. doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00347-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00347-1)
- Aldon, E. T. (1997). The culture of seabass. *SEAFDEC Asian Aquaculture*, 19(4), 14-17.
- Ali, S. S. R., Ambasankar, K., Saiyad Musthafa, M., & Harikrishnan, R. (2017). Jerusalem artichoke enriched diet on growth performance, immuno-hematological changes and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Shellfish Immunol*, 70, 335-342. doi:10.1016/j.fsi.2017.09.025
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* (6 ed. Vol. XXVIII).
- Azad, I. S., Jithendran, K. P., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., & de la Pena, L. D. (2006). Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)—A case study. *Aquaculture*, 255(1), 39-47. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.076>
- Azad, I. S., Shekhar, M., Thirunavukkarasu, A. R., & Jithendran, K. P. (2007). Viral nerve necrosis in hatchery-produced fry of Asian seabass *Lates calcarifer*: Sequential microscopic analysis of histopathology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73, 123-130. doi:10.3354/dao073123
- Azad, I. S., Shekhar, M., Thirunavukkarasu, A. R., Poornima, M., Kailasam, M., Rajan, J. J., . . . Pitchaiyappan, R. (2005). Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: First report from India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 113-118. doi:10.3354/dao063113
- Azad, I. S., Thirunavukkarasu, A. R., Kailasam, M., & Rajan, J. J. (2004). Virulence and histopathology of *Vibrio anguillarum* like (VAL) bacterium isolated from hatchery produced juveniles of *Lates calcarifer* (Bloch). *Asian Fisheries Science*, 17, 101-110.
- Bag, M. R., Makesh, M., Rajendran, K. V., & Mukherjee, S. C. (2009). Characterization of

- IgM of Indian major carps and their cross-reactivity with anti-fish IgM antibodies. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(2), 275-278.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.009>
- Barnum, S. R. (2005). *Biotechnology an introduction*. singapore: Thomson Brooks/Cole.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bruno, D., Noguera, P., & Poppe, T. (2013). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*.
- Buonocore, F., Nuñez-Ortiz, N., Picchietti, S., Randelli, E., Stocchi, V., Guerra, L., . . . Scapigliati, G. (2017). Vaccination and immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) against betanodavirus. *Fish & Shellfish Immunology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.039>
- Casini, D., Fontani, P., Ruggiero, P., Balducci, E., & Berti, D. (2015). A Rapid ELISA Method to Improve the Automated Test Throughput. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*(12). doi:10.4172/2155-9872.S13-005
- Chettri, J. K., Jaafar, R. M., Skov, J., Kania, P. W., Dalsgaard, I., & Buchmann, K. (2015). Booster immersion vaccination using diluted *Yersinia ruckeri* bacterin confers protection against ERM in rainbow trout. *Aquaculture*, 440, 1-5.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.027>
- Choudhury, M., & Pani Prasad, K. (2011). Isolation and characterization of immunoglobulin M of Asian sea bass, *Lates calcarifer* and its level in serum. *Central European Journal of Biology*, 6, 180-187. doi:10.2478/s11535-010-0109-y
- Collado, R., Fouz, B., Sanjuan, E., & Amaro, C. (2000). Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 91-101.
doi:10.3354/dao043091
- Crosbie, P. B. B., & Nowak, B. F. (2002). Production of polyclonal antisera against barramundi (*Lates calcarifer* Bloch) serum immunoglobulin derived from affinity columns containing mannan-binding protein or staphylococcal protein A.

- Aquaculture*, 211(1), 49-63. doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00136-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00136-9)
- De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLOS Pathogens*, 10(4), e1003919. doi:10.1371/journal.ppat.1003919
- Esteve-Gassent, M. D., Fouz, B., & Amaro, C. (2004). Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(2), 93-105. doi:10.1016/s1050-4648(03)00036-6
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Fouz, B., Esteve Gassent, M. D., Barrera, R., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., & Amaro, C. (2001). Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45(3), 183-189.
- Hansen, J. D., Landis, E. D., & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6919-6924. doi:10.1073/pnas.0500027102
- Hjerde, E., Lorentzen, M. S., Holden, M. T. G., Seeger, K., Paulsen, S., Bason, N., . . . Thomson, N. R. (2008). The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. *BMC Genomics*, 9(1), 616. doi:10.1186/1471-2164-9-616
- Hoare, R., Ngo, T. P. H., Bartie, K. L., & Adams, A. (2017). Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Onchorynchus mykiss* L.). *Veterinary Research*, 48(1), 43. doi:10.1186/s13567-017-0448-z
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177. doi:10.3390/biom5010166
- Jaafar, R. M., Al-Jubury, A., Chettri, J. K., Dalsgaard, I., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2017). Secondary immune response of rainbow trout following repeated immersion

- vaccination. *Journal of Fish Diseases*, 41(1), 117-123. doi:10.1111/jfd.12682
- Jang, H. N., Woo, J. K., Cho, Y., Kyong, S. B., & Choi, S. H. (2004). Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of founder (*Paralichthys olivaceus*) Immunoglobulin. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 37, 314-319. doi:10.5483/BMBRep.2004.37.3.314
- Jerry, D. R. (2014). *Biology and culture of Asian seabass Lates calcarifer*: CRC Press.
- Jirapongpairoj, W., Hirono, I., & Kondo, H. (2017). Development and evaluation of polyclonal antisera for detection of the IgM heavy chain of multiple fish species. *Journal of immunological methods*, 449. doi:10.1016/j.jim.2017.06.011
- Kaattari, S., Evans, D., Klemer, J., Kaattari, S., Evans, D., & Kieraer, J. (2006). Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity? *Immunological Reviews*, 166(1), 133-142. doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01258.x
- Kim, Y. K., Lee, J. S., Jung, J. W., Hikima, J. I., Ohtani, M., Jang, H. B., . . . Jung, T. S. (2017). Characterization of a specific monoclonal antibody against immunoglobulin light kappa/L1 chain in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 88-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.023>
- Kreutz, L. C., Canova, R., Nied, C. O., Bortoluzzi, M., & Frandoloso, R. (2016). Characterization of an IgM-like immunoglobulin from silver catfish (*Rhamdia quelen*) serum and its use for the production of polyclonal antibodies and development of immunoassays. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(9), 819-825. doi:10.1590/s0100-736x2016000900005
- Kumar, S. R., Parameswaran, V., Ahmed, V. P. I., Musthaq, S. S., & Hameed, A. S. S. (2007). Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(2), 316-326. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.005>
- LaFrentz, B. R., & Shoemaker, C. A. (2015). Passive transfer of serum from tilapia vaccinated with a *Vibrio vulnificus* vaccine provides protection from specific pathogen challenge. *Aquaculture*, 442, 16-20. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.02.025
- Li, Q., Zhan, W., Xing, J., & Sheng, X. (2007). Production, characterisation and applicability

- of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 982-990. doi:10.1016/j.fsi.2007.03.008
- Li, Y., Tao, M., Ma, F., Pan, G., Zhou, Z., & Wu, Z. (2015). A Monoclonal Antibody That Tracks Endospore Formation in the Microsporidium *Nosema bombycis*. *PLoS ONE*, 10(3), e0121884. doi:10.1371/journal.pone.0121884
- Lieschke, G. J., & Trede, N. S. (2009). Fish immunology. *Curr Biol*, 19(16), R678-682. doi:10.1016/j.cub.2009.06.068
- Magnadottir, B. (1998). Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. *Icelandic Agriculture Science*, 12, 51-63.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, 20(2), 137-151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Magnadottir, B., Kristjansdottir, H., & Gudmundsdottir, S. (1996). Characterisation of monoclonal antibodies to separate epitopes on salmon IgM heavy chain. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(3), 185-198. doi:<https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0019>
- Mahmoud, H. K., Al-Sagheer, A. A., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2017). Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 475, 16-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.043>
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., B., & Roitt, I. (2006). *Immunology*: Elsevier Ltd.
- Mashoof, S., & Criscitiello, F. M. (2016). Fish Immunoglobulins. *Biology*, 5(4). doi:10.3390/biology5040045
- Mathew, G. (2009). *Taxonomy, identification and biology of Seabass (Lates calcarifer)*.
- Miyadai, T., Ootani, M., Tahara, D., Aoki, M., & Saitoh, K. (2004). Monoclonal antibodies recognising serum immunoglobulins and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*). *Fish Shellfish Immunol*, 17(3), 211-222. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.005
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., . . . Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512, 734289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>

- Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Alvarez-Pellitero, P. (1996). Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 6, 81–94. doi:10.1006/fsim.1996.0010
- Pengsuk, C., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2010). Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *V. cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. *Aquaculture*, 300, 17-24. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.12.023
- Phuyindee, C., Unajak, S., & Srisapoome, P. (2015). Diversity analysis of the immunoglobulin M heavy chain gene in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *African Journal of Biotechnology*, 14(29), 2282-2299. doi:10.5897/ajb2014.14001
- Purcell, M. K., Bromage, E. S., Silva, J., Hansen, J. D., Badil, S. M., Woodson, J. C., & Hershberger, P. K. (2012). Production and characterization of monoclonal antibodies to IgM of Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Fish Shellfish Immunol*, 33(3), 552-558. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.006
- Rathore, G., Kumar, G., Sood, N., Kapoor, D., & Lakra, W. S. (2008). Development of monoclonal antibodies to rohu [*Labeo rohita*] immunoglobulins for use in immunoassays. *Fish Shellfish Immunol*, 25(6), 761-774. doi:10.1016/j.fsi.2008.02.014
- Romestand, B., Breuil, G., Bourmaud, C., Coeurdacier, J. I., & Bouix, G. (1995). Development and characterization of monoclonal antibodies against sea bass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 347-357. doi:10.1006/fsim.1995.0033
- Rønneseth, A., Haugland, G. T., Colquhoun, D. J., Brudal, E., & Wergeland, H. I. (2017). Protection and antibody reactivity following vaccination of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 383-391. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.040>
- Salinas, I., Zhang, Y. A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1346-1365. doi:10.1016/j.dci.2011.11.009

- Santos, M. D., Saito-Taki, T., Takano, T., Kondo, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2009). Characterization of polyclonal antibodies against Japanese flounder IgM derived from recombinant IgM constant region proteins. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 374-378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.008>
- Santos, N. M. S., Taverne, N., Taverne-Thiele, A. J., de Sousa, M., & Rombout, J. H. W. M. (1997). Characterisation of monoclonal antibodies specific for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(3), 175-191. doi:<https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0073>
- Scapigliati, G., Romano, N., Picchietti, S., Mazzini, M., Mastrolia, L., Scalia, D., & Abelli, L. (1996). Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax*(L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(5), 383-401. doi:<https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0038>
- Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 3-68).
- Sharma, S. R. K., Rathore, G., Verma, D., Sadhu, N., & Philipose, K. K. (2013). *Vibrio alginolyticus* infection in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch) reared in open sea floating cages in India. *Aquaculture Research*, 44, 86-92. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.03013.x
- Shelby, R. A., Shoemaker, C. A., Evans, J. J., & Klesius, P. H. (2001). Development of an Indirect ELISA to Detect Humoral Response to *Streptococcus iniae* Infection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 11(3), 35-44. doi:10.1300/J028v11n03_03
- Shin, G., Lee, H., Palaksha, K. J., Kim, Y., Lee, E., Shin, Y., . . . Jung, T. (2006). Production of monoclonal antibodies against serum immunoglobulins of black rockfish (*Sebastes schlegeli* Higendorf). *Journal of Veterinary Science*, 7(3), 293-295. doi:10.4142/jvs.2006.7.3.293
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Drennan, J. D., & Evans, J. J. (2011). Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish & Shellfish*

- Immunology*, 30(1), 304-308. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.001>
- Smith, S. A., Gebhard, D. H., Housman, J. M., Levy, M. G., & Noga, E. J. (1993). Isolation, Purification, and Molecular-Weight Determination of Serum Immunoglobulin from *Oreochromis aureus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5(1), 23-35.
doi:10.1577/1548-8667(1993)005<0023:IPAMWD>2.3.CO;2
- Sood, N., Chaudhary, D. K., Singh, A., & Rathore, G. (2012). Monoclonal antibody to serum immunoglobulins of *Clarias batrachus* and its application in immunoassays. *Gene*, 511(2), 411-419. doi:10.1016/j.gene.2012.09.044
- Soonthonsrima, T., Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2018). Generation of mouse monoclonal antibodies specific to tilapia immunoglobulin using fish immunoglobulin/BSA complex for monitoring of the immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 50(1), 277-283. doi:10.1111/are.13894
- Soonthonsrima, T., Wangman, P., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2017). Production of Polyclonal Antibody Against Immunoglobulin of Tilapia *Oreochromis niloticus*. (in Thai). *Burapha Science Journal*, 22(3), 596-605.
- Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., & Dennis, M. M. (2016). Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. *Journal of Comparative Pathology*, 155(4), 339-345. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.09.003>
- Surasilp, T. (2012). *Development of immunological-based assay and Loop-Mediated Isothermal Amplification method for specific detection of Vibrio vulnificus in marine animals*. (Ph.D. (Biotechnology)), Srinakharinwirot University,
- Suresh Babu, P. P. (2015). Application of monoclonal antibody based ELISA for determining circulating specific antibody in Rohu (*Labeo rohita*). *Fishery Technology*, 52, 202-204.
- Suresh Babu, P. P., Shankar, K. M., Honnananda, B. R., & Abhiman, P. B. (2014). Monoclonal antibody-based immunodot for evaluating serum immunoglobulin

- levels in rohu (*Labeo rohita*). *Aquaculture International*, 22(4), 1451-1456.
doi:10.1007/s10499-014-9758-6
- Talpur, A. D., & Ikhwanuddin, M. (2013). *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1), 254-264.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.003>
- Tang, X., Liu, F., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2017). Production, characterization and application of monoclonal antibody against immunoglobulin D heavy chain of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 64, 401-406.
doi:10.1016/j.fsi.2017.03.043
- Thipduang, T. (2012). *The Concept of the Imported and Exported Seabass Control which passed the Southern Fish Inspection station in 2007-2009*. Retrieved from Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives
- Tookwinas, S. (1989). *Review of grow-out techniques under tropical conditions: Experience of Thailand on seabass (Lates calcarifer) and grouper (Epinephelus malabaricus)*.
- van der Heijden, M. H. T., Rooijackers, J. B. M. A., Booms, G. H. R., Rombout, J. H. W. M., & Boon, J. H. (1995). Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45(1), 151-164. doi:[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)05335-P](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)05335-P)
- Van Muiswinkel, W. B. (1995). *The piscine immune system: innate and acquired immunity*.
- Vesely, T., Reschova, S., Pokorová, D., Hulova, J., & Smržová, Z. (2006). Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni Medicina*, 51. doi:10.17221/5549-VETMED
- Villumsen, K. R., Neumann, L., Ohtani, M., Strøm, H. K., & Raida, M. K. (2014). Oral and Anal Vaccination Confers Full Protection against Enteric Redmouth Disease (ERM) in Rainbow Trout. *PLoS ONE*, 9(4), e93845. doi:10.1371/journal.pone.0093845

- Wangman, P., Senapin, S., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., & Sithigorngul, P. (2012). Production of monoclonal antibodies specific to *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus using recombinant capsid protein. *Diseases of Aquatic Organisms*, 98, 121-131. doi:10.3354/dao02431
- Yang, S., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2017). Development of monoclonal antibodies against IgM of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and analysis of phagocytosis of fluorescence microspheres by mIgM+ lymphocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 66, 280-288. doi:10.1016/j.fsi.2017.05.019
- Yang, S., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2018). Development of monoclonal antibodies against IgM of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and analysis of phagocytosis by mIgM+ lymphocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 78, 372-382. doi:10.1016/j.fsi.2018.04.042
- Ye, J., Kaattari, I. M., Ma, C., & Kaattari, S. (2013). The teleost humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1719-1728. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015>
- Zhang, W., Tang, X. Q., Sheng, X. Z., Xing, J., & Zhan, W. B. (2017). Development and application of monoclonal antibodies against IgM of black rockfish *Sebastes schlegeli*. *J Fish Biol*, 90(4), 1668-1675. doi:10.1111/jfb.13279
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., . . . Sunyer, O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11, 827. doi:10.1038/ni.1913<https://www.nature.com/articles/ni.1913#supplementary-information>
- ไพศาล สติธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษาค้นคว้าเพื่อการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- นิสราภรณ์ เพ็ชรสุทธิ. (2551). การผลิตสัตว์น้ำ : การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. In 1 (Ed.), (pp. 189).
- รับพร กิตติวัชร. (2556). เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิมล เหมะจันทร์. (2556). ปลา ซีววิทยาและอนุกรมวิธาน: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธนพนธ์ สุนทรสීමະ
วัน เดือน ปี เกิด	20 กันยายน 2537
วุฒิการศึกษา	เกียรตินิยม อันดับ 1 (วท.บ.) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	26 อุดมสุข49 สุขุมวิท103 บางจาก พระโขนง กทม. 10260
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลชมเชยการนำเสนอในงานวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 11 จากเรื่อง Generation and characterization of monoclonal antibody against Asian sea bass (<i>Lateolabrax niloticus</i>) immunoglobulin heavy chain

