บทที่ 4

การผลิตแอนติบอดีจากเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลากะพงขาว

บทคัดย่อ

ทดลองผลิต polyclonal antibody ต้านเชื้อไวรัส seabass iridovirus (SIV) ในกระต่าย พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถทำปฏิกริยาได้พอดีกับเชื้อไวรัส 1:25,600 เท่า โดยวิธี indirect dot blot immunoassay แอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ (neutralization test) ต่อเชื้อไวรัส SIV และไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ข้ามกลุ่ม (cross neutralization) ต่อเชื้อไวรัส grouper iridovirus-1 (GIV-1), grouper iridovirus-2 (GIV-2) และ tiger frog iridovirus (TFIV) แต่สามารถจับกับแถบโครงสร้างโปรตีนหลักของเชื้อไวรัส SIV บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (western blotting) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26, 28, 29, 32, 38, 40, 45, 49, 54, 65, 70, 90, 102 และ 113 kDa ตามลำดับ และสามารถทำปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับแถบโครงสร้างโปรตีนหลักของเชื้อไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV ได้ เช่นเดียวกับผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV โดยวิธี indirect dot blot immunodetection ซึ่งพบว่าแอนติบอดีสามารถตรวจจับเชื้อไวรัส SIV และเชื้ออิริโดไวรัสที่มีการระบาดในปลาและกบ

CHAPTER IV

Development of an Antibody Against the Seabass Iridovirus (SIV)

Abstract

A polyclonal antibody against seabass iridovirus (SIV) was produced from rabbit. The antibody titer was 1:25,600 determined by indirect dot blot immunoassay. The neutralization assay was tested against four iridoviruses isolated from fish and amphibian. No neutralization against SIV was observed. There was no sign of cross neutralization among grouper iridovirus-1 (GIV-1), grouper iridovirus-2 (GIV-2) and tiger frog iridovirus (TFIV) against SIV's polyclonal antibody. The antibody can combine with major structural proteins of SIV on nitrocellulose membrane using peroxidase conjugate with the molecular weight of 26, 28, 29, 32, 38, 40, 45, 49, 54, 65, 70, 90, 102 and 113 kDa, respectively. The cross reaction was found with homologous proteins of GIV-1 and GIV–2 and TFIV. By indirect dot blot immunodetection, the antibodies show cross reaction to fish and amphibian iridoviruses.

บทนำ

โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในสัตว์น้ำนับวันจะทวีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็น systemic infection ซึ่งมีความรุนแรงสูงและสามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว หนึ่งในจำนวนดังกล่าวก็คือไวรัสในครอบครัว Iridoviridae ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีการระบาดในสัตว์น้ำหลายชนิดทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการเพาะเลี้ยงปลาทะเลเศรษฐกิจของไทย เช่น ปลากะพงขาว และปลากะรัง เป็นต้น (เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์, 2539 ; จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2539 ; เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2540) ลักษณะสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ไวรัสกลุ่มดังกล่าวสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากไวรัสสามารถแพร่กระจายในแนวดิ่ง (vertical transmission) โดยถ่ายทอดผ่านทางระบบสืบพันธุ์ จึงมีการแพร่กระจายจากพ่อแม่พันธุ์สู่ลูกได้ และมีการแพร่กระจายในแนวนอน (horizontal transmission) โดยผ่านน้ำ (Murphy *et al.*, 1995) จึงทำให้การควบคุมและป้องกันโรคทำได้ค่อนข้างยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความจำเป็นต้องอาศัยลูกพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติ เช่น ปลากะรัง เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ การสร้างพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อและการเฝ้าระวังการติดเชื้อ จึงมีความจำเป็นเพื่อลดปัญหาการระบาดของโรค อย่างไรก็ตามปัญหาต่างๆ ดังกล่าวจะประสบความสำเร็จไปไม่ได้หากขาดเทคนิคและวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่แม่นยำ รวดเร็ว และส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของพ่อแม่พันธุ์น้อยที่สุด

การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV และการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยแอนติบอดี จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการตัดสินใจในการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรค นอกจากนี้การศึกษาทางไวรัสวิทยายังใช้ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสในการจำแนกกลุ่มทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของไวรัสอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตแอนติบอดีต่อไวรัส SIV ซึ่งแยกได้จากปลากะพงขาว เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรค
2. ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV กับเชื้อไวรัส GIV-1, GIV-2 และไวรัส TFIV เพื่อการจัดจำแนกกลุ่มทางอนุกรมวิธาน
3. เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV โดยวิธี dot blot immunodetection

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ไวรัสและเซลล์ไลน์ (virus and cell line)

ไวรัสที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดีคือเชื้อ SIV (เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์, 2539) ซึ่งทำการเพิ่มจำนวนในเซลล์ SK (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2539) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ L-15 ผสมรวมกับซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 100 IU และสเตรพโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับไวรัสที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) ของแอนติบอดีที่ผลิตได้แก่เชื้อ GIV-1 (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2539) และ GIV-2 (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2540) ซึ่งเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ทำการเพิ่มจำนวนในเซลล์ GF (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2537) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ L-15 เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีเชื้อ TFIV สายพันธุ์ AV9803 (สมเกียรติ กาญจนาคาร และคณะ, 2542) ซึ่งเพิ่มจำนวนในเซลล์ EPC (Fijan *et al.*, 1983) และมีการจัดจำแนกไว้ในกลุ่มของ Frog virus 3 (FV-3) สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของแถบโปรตีนโดยอาศัยปฏิกริยาของแอนติบอดี เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกสกุลของเชื้อไวรัส SIV

นอกจากนี้ยังมีเชื้อ red seabream iridovirus (RSIV) (Nakajima and Sorimachi, 1994), snake head rhabdovirus (SHRV) (Kasornchandra *et al.*, 1991), sand gobyvirus (SGV) (Hedrick *et al.*, 1986), channel catfish virus (CCV) (Fijan *et al.*, 1970) และ chub reovirus (Chub) (Ahne and Holbl, 1988) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการการตรวจหาเชื้อไวรัส

การหาปริมาณของเชื้อไวรัส (titration of virus)

ปริมาณของเชื้อไวรัส หรือค่าไตเตอร์ ใช้วิธีการคำนวณจากระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($TCID_{50}$/ml) (Rovozzo and Burke, 1973) ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยค่าที่ได้คำนวณตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938)

1. การผลิตแอนติบอดี (antibody production)

1.1 การเตรียมแอนติเจน (antigen preparation)

ทำการเพิ่มจำนวนของเชื้อ SIV ในเซลล์ SK โดยคำนวณค่า MOI = 0.1 บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์ถูกทำลายหมด นำสารละลายทั้งหมดตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยงที่ 5,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาเศษเซลล์ออก นำส่วนของสารละลายไวรัสตกตะกอนซ้ำอีกครั้ง ด้วยแรงเหวี่ยงที่ 90,000 x g เป็นเวลา 35 นาที ละลายตะกอนไวรัสที่ได้ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมล pH 7.5 ก่อนนำมาแยกให้บริสุทธิ์ในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่องความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการของ Hedrick และคณะ (1992) ไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้จะถูกละลายด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ก่อนเก็บรักษาให้คงสภาพไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สารละลายไวรัสบริสุทธิ์ส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) และอีกส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งออกเพื่อเตรียมตัวอย่างบนแผ่นตะแกรงตัวอย่างชนิดเคลือบสำเร็จด้วยแผ่นฟิมล์พิเศษของสารฟอร์มวาร์และคาร์บอน แล้วจึงนำมาย้อมด้วยสารละลายยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และตรวจลักษณะของอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Joel, JEM 100 CXII) ที่กำลังเร่ง 80 กิโลโวลท์ (kv)

1.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunization)

ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายเพศผู้ อายุ 4 เดือน จำนวน 5 ครั้ง โดยการฉีดครั้งแรกทำการผสมสารละลายไวรัสบริสุทธิ์กับ Freund's complete adjuvant (Sigma) ในอัตราส่วน 1:1 โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 เข็มๆ ละ 0.8-1.0 มิลลิลิตร เข้าบริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous) (Harlow and Lane, 1988) ฉีดกระตุ้นซ้ำในครั้งที่ 2, 3, 4 และ 5 โดยมีระยะเวลาห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ ด้วยสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีน 1,000 ไมโครกรัม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เข้าเส้นเลือดดำบริเวณหู ภายหลังการกระตุ้นด้วยสารละลายไวรัสในครั้งที่ 4 เป็นเวลา 3 วัน จะทำการเก็บตัวอย่างเลือด โดยวิธีการเจาะจากเส้นเลือดแดงบริเวณหู เพื่อตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายโดยวิธี dot blot immunoassay ก่อนกระตุ้นซ้ำอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 5 จึงเก็บซีรัมทั้งหมดภายหลังการกระตุ้นครั้งสุดท้าย 3 วัน โดยการเจาะเลือดจากหัวใจตามวิธีการของ ปานเทพ รัตนากร (2535)

1.3 การแยกซีรัมของกระต่าย

นำเลือดที่เก็บได้จากสัตว์ทดลองใส่ขวดวางทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำน้ำเลือดส่วนใสใส่หลอด ตกตะกอนซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 500 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำแอนติบอดีที่ได้ใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกริยาข้ามกับสารละลายเซลล์ SK ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส SIV แอนติบอดีที่ผลิตได้จะถูกดูดซับ (absorb) ด้วยเซลล์ SK ซึ่งเตรียมในสารละลายอะซิโตน (acetone) ตามวิธีการของ Harlow และ Lane (1988) ก่อนนำไปใช้

1.4 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี

ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีโดยวิธี indirect dot blot immuno assay โดยเตรียมตัวอย่างสารละลายไวรัส SIV บริสุทธิ์ความเข้มข้นโปรตีนประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ที่อิ่มตัวในสารละลาย PBS ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แช่ในสารละลาย PBS-Tween 20 นาน 45 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ก่อนบ่มด้วยสารละลายแอนติบอดีต่อเชื้อ SIV ซึ่งเจือจางในสารละลาย PBS-Tween –20 ครั้งละ 2 เท่า ที่ระดับความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600,...., 1:51,200 เท่า ตามลำดับเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที บ่มซ้ำในสารละลาย goat anti-rabbit IgG (Sigma) ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในสารละลาย PBS-Tween 20 ความ

เข้มข้น 1:1,000 เท่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ก่อนทำปฏิกริยากับสารละลาย 4-chloro-1-naphthol (4CN) ใน PBS ซึ่งจะแสดงผลโดยปรากฏสีภายในระยะเวลา 15 นาที ก่อนล้างออกด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตรวจเช็คระดับความเข้มข้นสูงสุดของแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกริยากับสารละลายไวรัสบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสได้

2. การศึกษาประสิทธิภาพของแอนติบอดี

2.1 การทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ (neutralization test)

เตรียมถาดหลุมขนาดเล็ก (96 well plate) เติมสารละลายไวรัส SIV ที่ระดับความเข้มข้น 100 เท่าของค่า $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ผสมรวมกับแอนติบอดีที่ผลิตได้ ซึ่งเจือจางด้วยสารละลาย HBSS ครั้งละ 2 เท่า ที่ระดับการเจือจาง 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320,.....1:10,240 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (อัตราส่วน 1:1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงหยดสารละลายเซลล์ SK ในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ซึ่งมีส่วนผสมของซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบค่าการเจือจางของแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50 เปอร์เซ็นต์

2.2 การทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ข้ามกลุ่ม (cross – neutralization test)

ทดสอบการเกิดปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ข้ามกลุ่มของแอนติบอดีที่ผลิตได้ กับไวรัส GIV-1 GIV-2 และ TFIV ตามวิธีการทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ข้างต้น เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อไวรัส

2.3 การทดสอบปฏิกริยารวมตัวกับแถบโปตีนไวรัสบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (western blotting)

แยกแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV ด้วยชุด polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำไวรัส SIV บริสุทธิ์ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (2x sample buffer : 0.5 M tris-buffer pH 6.8, 10% v/v glycerol, 10% w/v SDS, 0.2% w/v 2-mercaptoethanol, 0.05% w/v bromphenol blue) อัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที ก่อนนำมาแยกโครงสร้างโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ บนแผ่นเจลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยชุดเจลส่วนต้นมีความเข้มข้นของเนื้อเจล 4.75 เปอร์เซ็นต์ และเจลส่วนแยกมีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แถบโปรตีนบนแผ่นเจลที่ได้จะถูกย้ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ด้วยชุดย้ายแถบ

โปรตีนแบบกึ่งแห้ง (trans-blot semi-dry electrophoresis transfer cell) (Bio-rad) ซึ่งใช้กระแสไฟ 15 โวลท์ เป็นเวลา 35 นาที แช่ในสารละลาย PBS-Tween 20 เป็นเวลา 45 นาที และล้างด้วยสารละลาย PBS-Tween 20 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ก่อนทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ผลิตได้ ซึ่งมีค่าการเจือจางประมาณ 100 เท่า ในสารละลาย PBS-Tween-20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย PBS-Tween 20 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บ่มซ้ำด้วยสารละลาย goat anti rabbit IgG ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 1:1,000 เท่า ในสารละลาย PBS-Tween 20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ก่อนทำปฏิกริยากับสาร 4CN ซึ่งจะแสดงผลโดยปรากฏสีภายในระยะเวลา 15 นาที ก่อนล้างออกด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ผลจากปฏิกริยาบนแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสด้วยเครื่อง Image analyzer (Bio-rad) และโปรแกรม Bio-rad multi-analyst-/PC version 1.1

2.4. การทดสอบปฏิกริยารวมตัวข้ามกลุ่มกับแถบโปตีนไวรัสบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

ทดสอบปฏิกริยารวมตัวข้ามกลุ่มของแอนติบอดีที่ผลิตได้ กับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV ตามวิธีการข้างต้น เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยปฏิกริยารวมตัวกับแอนติบอดีซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ ในการจัดจำแนกกลุ่มทางอนุกรมวิธาน

2.5. การทดสอบความไวของแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อไวรัส โดยวิธี indirect dot blot immunodetection

เตรียมตัวอย่างเชื้อไวรัส SIV ซึ่งมีค่าไตเตอร์ประมาณ 10^6 $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ให้เจือจางลดลงครั้งละ 10 เท่า ก่อนนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่อิ่มตัวในสารละลาย PBS ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้แช่ในสารละลาย PBS-Tween 20 นาน 45 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ก่อนบ่มด้วยสารละลายแอนติบอดีต่อเชื้อ SIV ซึ่งเจือจางในสารละลาย PBS-Tween –20 ที่ระดับความเข้มข้น 1:100 เท่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย PBS-Tween –20 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที บ่มซ้ำในสารละลาย goat anti-rabbit IgG ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในสารละลาย PBS-Tween–20 ความเข้มข้น 1:1,000 เท่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ก่อนทำปฏิกริยากับสารละลาย 4CN ใน PBS ซึ่งจะแสดงผลโดยปรากฏสีภายในเวลา 5-15 นาที ก่อนล้างออกด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณต่ำสุดของเชื้อไวรัส SIV ที่แอนติบอดีสามารถตรวจจับได้ จากการติดสีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนในการทดสอบ

3. การประยุกต์ใช้แอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อไวรัส โดยวิธี indirect dot blot immunodetection

ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV โดยวิธี indirect dot blot immunodetection ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) กับสารละลายไวรัส 9 ชนิด ซึ่งทำการเพิ่มจำนวนในเซลล์ไลน์ ดังตารางที่ 12 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้สารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสแต่ละชนิด โดยเตรียมสารละลายทั้ง 2 ชุด ที่ระดับการเจือจาง 10 เท่าปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งอิ่มตัวในสารละลาย PBS ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการทดสอบโดยวิธี indirect dot blot immunodetection ตามวิธีการข้างต้น

ตารางที่ 12 ไวรัสที่ใช้ในการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัส ด้วยปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี โดยวิธี indirect dot blot immunodetection

Viruses	Virus titer ($logTCID_{50}$ /ml)	Cell line / Media	Source of virus
Iridovirus			
seabass iridovirus (SIV)	5.33	SK /L-15	เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์ (2539)
grouper iridovirus-1 (GIV-1)	4.33	GF /L-15	จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์ (2538)
grouper iridovirus-2 (GIV-2)	7.33	GF /L-15	เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ (2540)
tiger frog iridovirus (TFIV)	8.50	EPC /MEM	สมเกียรติ์ กาญจนาคาร และคณะ (2542)
red seabream iridovirus (RSIV)	7.50	SK /L-15	Nakajima และ Sorimachi (1994)
Rhabdovirus			
snake-head rhabdovirus (SHRV)	5.33	EPC /MEM	Kasornchandra และคณะ (1991)
Birnavirus			
sand goby virus (SGV)	5.66	BF-2 /L-15	Hedrick และคณะ (1986)
Herpesvirus			
channel catfish virus (CCV)	5.33	CCO /MEM	Fijan และคณะ (1970)
Reovirus			
chub reovirus (Chub)	5.66	BF-2 /L-15	Ahne และ Holbl (1988)

ผลการวิจัย

1. การผลิตแอนติบอดี

สามารถเตรียมสารละลายไวรัส SIV โดยวิธีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ SK และทำให้บริสุทธิ์ในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่องความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ได้ (รูปที่ 24) เมื่อนำมาทดลองผลิตแอนติบอดีโดยวิธีการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่าย พบว่าระบบภูมิคุ้มกันกระต่ายสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัส SIV ซึ่งผสมรวมกับสารแอดจูแว้นท์ (adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 ในครั้งแรก และสารละลายไวรัสบริสุทธิ์อีก 4 ครั้งตามวิธีการข้างต้นได้เป็นอย่างดี จากการตรวจสอบค่าการเจือจางของแอนติบอดีภายหลังการกระตุ้นซ้ำด้วยสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ในครั้งที่ 3 สามารถตรวจพบปฏิกริยาของแอนติบอดีซึ่งมีความเข้มข้น 1:25,600 เท่า (รูปที่ 25) โดยวิธี indirect dot blot immonoassay และพบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีไม่เพิ่มขึ้นภายหลังการกระตุ้นซ้ำด้วยสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ในครั้งสุดท้าย จากการเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมดและตกตะกอนพบว่ากระต่ายทดลองซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม สามารถผลิตและแยกแอนติบอดีได้ 40 มิลลิลิตร

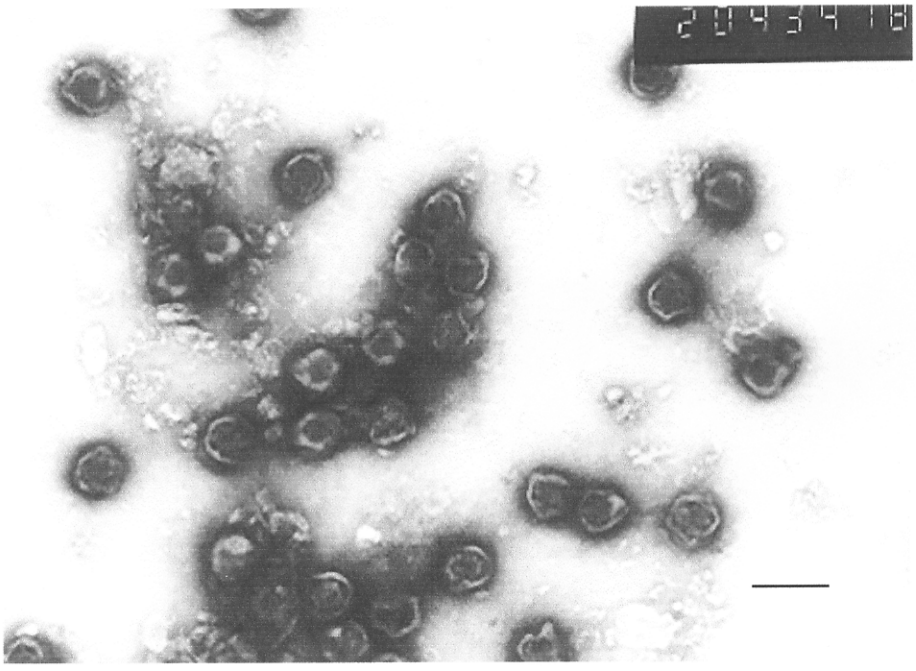
2. ประสิทธิภาพของแอนติบอดี

2.1. การทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์

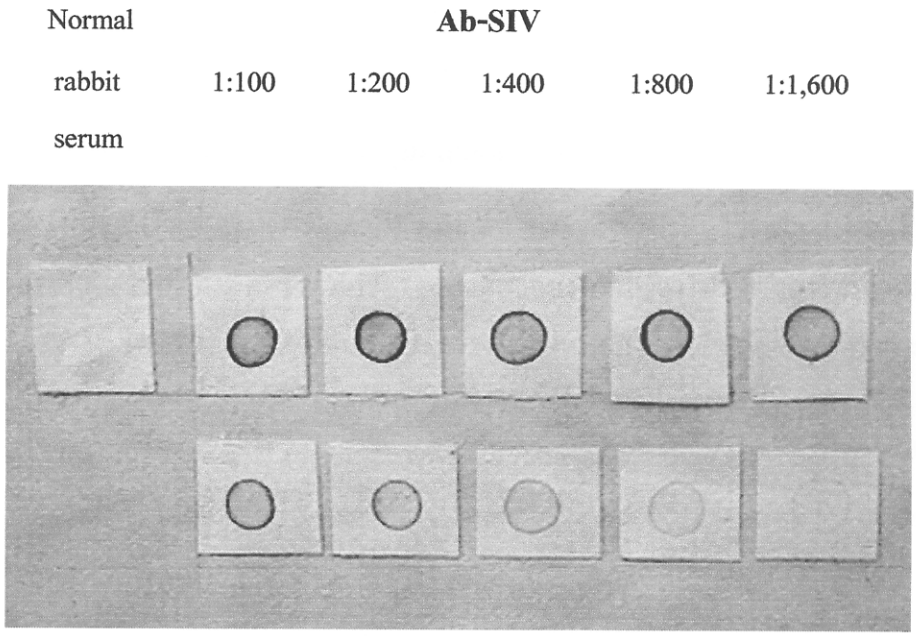
การทดลองสามารถตรวจพบการเข้าทำลายเซลล์ (CPE) ของเชื้อไวรัส SIV ทั้ง 2 ชุดการทดลอง แม้ที่ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงสุด (1:20) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีจากกระต่ายที่ผลิตได้ในครั้งนี้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส SIV ได้ ภายหลังการบ่มเลี้ยงนาน 14 วัน หรืออาจกล่าวได้ว่าแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV ที่ผลิตได้ไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์

2.2. การทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ข้ามกลุ่ม

การทดสอบปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์กับข้ามกลุ่มกับไวรัสอีก 3 ชนิดคือ เชื้อไวรัส GIV-1 GIV-2 และ TFIV ให้ผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือพบการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด แม้ที่ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงสุด (1:20) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV ไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ข้ามกลุ่มต่อเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 24 อนุภาคไวรัส SIV ที่ใช้สำหรับการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกระต่าย ซึ่งเตรียมโดยวิธีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ SK และทำให้บริสุทธิ์ในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่องความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Uranyl acetate ; Bar = 300 นาโนเมตร)



รูปที่ 25 การทดสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้กับสารละลายไวรัส SIV บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect dot blot immunoassay บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยมีชุดควบคุมซึ่งใช้ซีรัมกระต่ายปกติและชุดทดลองซึ่งใช้แอนติบอดีที่มีค่าการเจือจางครั้งละ 2 เท่า คือ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200,....1:51,200 ตามลำดับ

2.3. การทดสอบปฏิกริยาการรวมตัวกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส

จากการทดสอบพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถรวมตัว กับแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV ได้เป็นอย่างดี ที่ระดับการเจือจางของแอนติบอดีประมาณ 100 เท่า โดยสามารถสังเกตเห็นการเกิดสีจากปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับแถบโครงสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัส SIV โดยเฉพาะแถบโครงสร้างโปรตีนหลักของไวรัสซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26, 28, 29, 32, 38, 40, 45, 49, 54, 65, 70, 90, 102 และ 113 kDa (รูปที่ 26)

2.4. การทดสอบปฏิกริยาการรวมตัวข้ามกลุ่มกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส

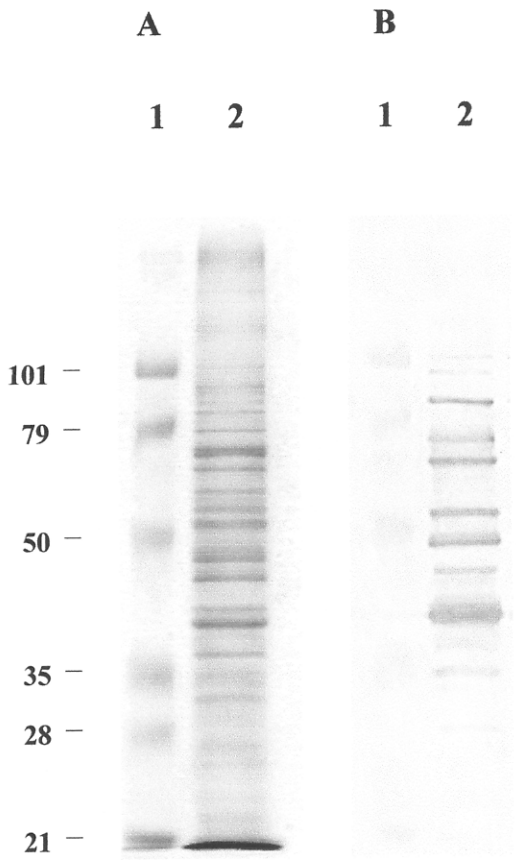
เมื่อทำการทดสอบปฏิกริยาการรวมตัวกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ สามารถรวมตัวกับแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแถบโครงสร้างโปรตีนหลัก ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40, 49, 54, 65, 70 และ 90 kDa (รูปที่ 27) ซึ่งหากพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสทั้ง 4 ชนิด จากปฏิกริยาของแอนติบอดีต่อแถบโครงสร้างโปรตีน อาจกล่าวได้ว่าแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV มีความคล้ายคลึงกับไวรัส GIV-2 และ TFIV ในขณะที่ GIV-1 พบว่ามีปฏิกริยาการจับของแอนติบอดีน้อยที่สุด

2.5. การทดสอบความไวของแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อไวรัส

ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect dot blot immunodetection พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ ซึ่งมีค่าการเจือจางประมาณ 100 เท่า สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อไวรัสต่ำสุดประมาณ 10^4 $TCID_{50}$/มิลลิลิตรได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 28)

3. การประยุกต์ใช้แอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อไวรัส

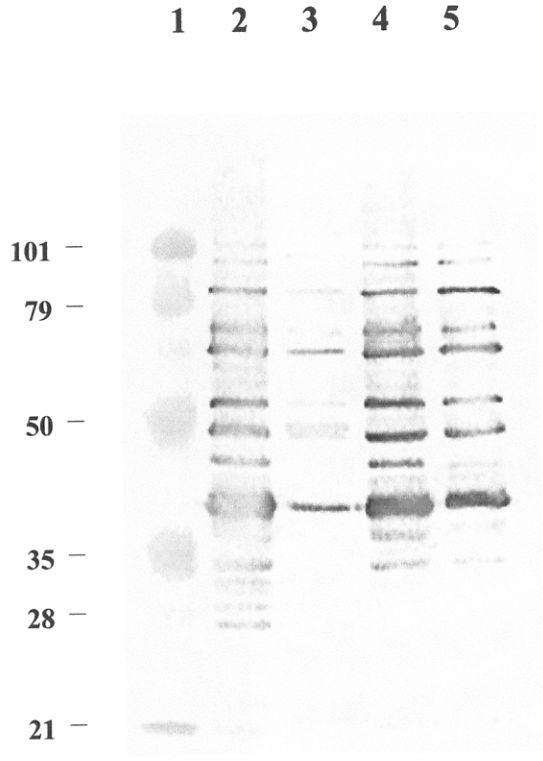
การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อไวรัส โดยวิธี indirect dot blot immuno detection กับเชื้อไวรัสทั้ง 9 ชนิด พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถเกิดปฏิกริยารวมตัวกับเชื้อไวรัส SIV, GIV-1, GIV-2, TFIV และ RSIV ได้ (รูปที่ 29) โดยไม่เกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อไวรัสในครอบครัวอื่น เช่น SHRV (Rhabdovirus), SGV (Birnavirus), CCV (Herpesvirus) และ Chub (Reovirus) เป็นต้น และไม่เกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับชุดควบคุมซึ่งเป็นสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสแต่ละชนิด



รูปที่ 26 เปรียบเทียบลักษณะของแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV (Comassie blue R-250 stain) (A) กับปฏิกริยารวมตัวของแอนติบอดีกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (western blotting) (B)

แถวที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐาน (marker protein)(Bio-rad) ซึ่งประกอบด้วย phosphorylase B (101,000), bovine serum albumine (79,000), ovalbumine (50,100), carbonic anhydrase (34,700), soybean trypsin inhibitor (28,400) และ lysozyme (20,800) หน่วย : ดาลตัน (dalton) ตามลำดับ

แถวที่ 2 แถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV



รูปที่ 27 เปรียบเทียบปฏิกริยารวมตัวข้ามกลุ่มของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV ต่อแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสที่แยกได้จากปลาและกบ

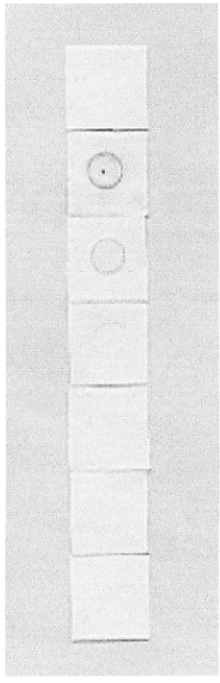
แถวที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐาน (marker protein) (Bio-rad)

แถวที่ 2 SIV

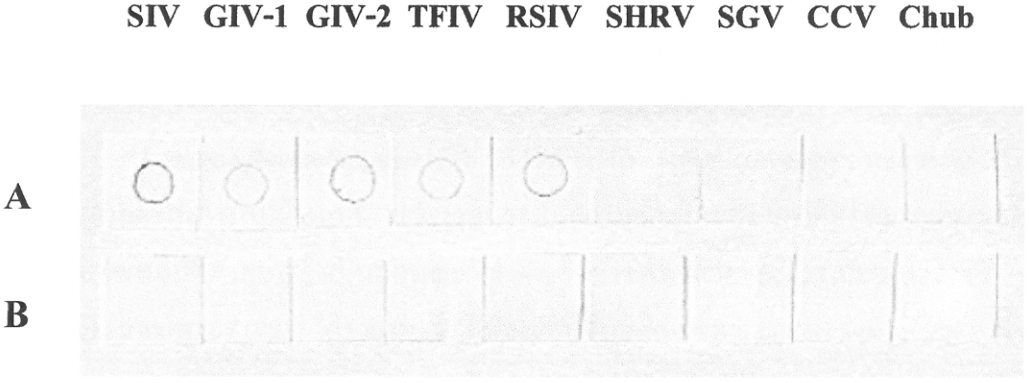
แถวที่ 3 GIV-1

แถวที่ 4 GIV-2

แถวที่ 5 TFIV



รูปที่ 28 การทดสอบความไวของแอนติบอดีที่ระดับการเจือจาง 100 เท่า ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยวิธี indirect dot blot immunodetection



รูปที่ 29 การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี โดยวิธี indirect dot blot immunodetection ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

A ชุดทดลอง ซึ่งใช้สารละลายไวรัสชนิดต่างๆ ที่เพิ่มจำนวนในเซลล์

B ชุดควบคุม ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

วิจารณ์และสรุป

สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV โดยวิธีการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วยสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ผสมรวมกับแอดจูแว้นท์ (adjuvant) ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนครั้งสุดท้าย 500 ไมโครกรัม และกระตุ้นซ้ำด้วยสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีน 1,000 ไมโครกรัม ในระยะเวลา 35 วัน กระต่ายทดลองสามารถผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV ซึ่งมีค่าความเข้มข้น 1:25,600 เท่า เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี indirect dot blot immunoassay การศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้ไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ (neutralization) ต่อเชื้อไวรัส SIV แต่มีคุณสมบัติหรือสามารถเกิดปฏิกริยารวมตัวกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hedrick และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายต่อเชื้อ EHNV (epizootic hematopoietic necrosis virus) ที่แยกได้จากปลา redfin perch (*Perca fluviatilis*), sheatfish iridovirus-like agent และ catfish iridovirus-like agent ไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ แม้จะเพิ่มระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีมากเกินพอก็ตาม ดังนั้นคุณสมบัติดังกล่าวจึงเป็นลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดี ซึ่ง Francki และคณะ (1991) ได้รายงานว่ามีเพียงแอนติบอดีต่อเชื้อ tipula iridescant virus ซึ่งจำแนกอยู่ในสกุล small iridescent ของครอบครัว Iridoviridae เท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ดังกล่าว เนื่องจากอิริโดไวรัสเป็นกลุ่มไวรัสซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อน (complex virus) หน่วยพันธุกรรมซึ่งมีขนาดใหญ่ (large genome) และเป็นไวรัสซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนเฉพาะ (specific polypeptide) ตั้งแต่ 22-35 หน่วย (Hedrick *et al.*, 1992) จึงทำให้แอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่สามารถรวมตัวหรือเกิดปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์

อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้ สามารถรวมตัวกับแถบโครงสร้างโปรตีนหลักของเชื้อไวรัส SIV บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26, 28, 29, 32, 38, 40, 45, 48, 54, 65, 70, 90, 102 และ 113 kDa ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ผลการทดสอบปฏิกริยารวมตัวข้ามกลุ่มของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัส SIV มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างโปรตีนไวรัส GIV-2 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแผลพุพองในปลากะรัง (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2540) ไวรัส TFIV ซึ่งแยกได้จากกบนาที่ป่วยเป็นแผล (สมเกียรติ์ กาญจนาคาร และคณะ, 2542) และ GIV-1 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคครีบดำในลูกปลากะรัง (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2539) ตามลำดับ และการทดลองดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถเกิดปฏิกริยา

เฉพาะต่อแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 และ 28 kDa โดยไม่ปรากฏปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นจึงอาจใช้ปฏิกริยาจำเพาะของแอนติบอดีต่อแถบโครงสร้างโปรตีนดังกล่าว ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส SIV ออกจากกลุ่มอิริโดไวรัสชนิดอื่นๆ ที่มีการระบาดในสัตว์น้ำได้

Hengstberger และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างทางชีวเคมีของเชื้อไวรัส EHNV (epizzootic hematopoietic necrosis virus) ที่แยกได้จากปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และปลา redfin perch (*Perca fluviatilis*) กับ ไวรัส BIV (Bohle virus) ซึ่งแยกได้จากกบ ornate burrowing (*Limnodynastes ornatus*) พบว่าไวรัสดังกล่าวมีลักษณะและองค์ประกอบทางชีวเคมีที่คล้ายคลึงกัน จึงน่าจะมีการจำแนกไว้ในกลุ่มเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ Hedrick และคณะ (1992) ซึ่งได้มีการศึกษาไว้เช่นเดียวกัน ดังนั้นผลการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างโปรตีนไวรัสโดยอาศัยความสัมพันธ์ของปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนในครั้งนี้ จึงน่าจะเป็นพื้นฐานในการจำแนกชนิดของไวรัส ซึ่งมีการระบาดในประเทศไทยได้ในโอกาสต่อไป

สำหรับการประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธี dot blot immunodetection ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในครั้งนี้ พบว่าแอนติบอดีสามารถเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับไวรัส GIV-1, GIV-2, TFIV และ RSIV ได้ โดยสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยวิธี western blotting ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้จึงไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV ที่มีการระบาดในสัตว์น้ำได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาปฏิกริยาของแอนติบอดีต่อแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีสามารถเกิดปฏิกริยาแบบจำเพาะต่อแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 และ 28 kDa ได้ ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนี้จึงสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคซึ่งเกิดจากไวรัส SIV ได้ในอนาคต โดยการผลิต monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 และ/หรือ 28 kDa เป็นต้น