สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(16)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	34
เอกสารอ้างอิง	35
2 การผลิตเซลล์ไลน์จากปลากะพงขาว	42
บทคัดย่อ	42
Abstract	43
บทนำ	44
วัตถุประสงค์	44

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีการวิจัย	45
ผลการวิจัย	49
วิจารณ์และสรุป	62
เอกสารอ้างอิง	65
3 การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้ออิริโดไวรัสที่แยกได้จากปลากะพงขาว	68
บทคัดย่อ	68
Abstract	69
บทนำ	70
วัตถุประสงค์	71
วิธีการวิจัย	71
ผลการวิจัย	77
วิจารณ์และสรุป	93
เอกสารอ้างอิง	95
4 การผลิตแอนติบอดีจากเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลากะพงขาว	98
บทคัดย่อ	98
Abstract	99
บทนำ	100
วัตถุประสงค์	101

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีการวิจัย	101
ผลการวิจัย	108
วิจารณ์และสรุป	116
เอกสารอ้างอิง	118
5 สรุปและข้อเสนอแนะ	121
ภาคผนวก	123
ประวัติผู้เขียน	136

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติของปลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	9
2	เซลล์ไลน์ที่นิยมใช้ในการศึกษาโรคไวรัส	11
3	โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดีและคุณสมบัติบางประการ	17
4	ชนิดของสัตว์ทดลองและความเหมาะสมสำหรับการผลิตแอนติบอดี	25
5	รูปแบบและความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอนติบอดีในกระต่าย	26
6	วิธีการ ชนิดและปริมาณของสารสำหรับการฉีดกระตุ้นกระต่ายในการผลิตแอนติบอดี	27
7	ชนิด รูปแบบและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนติบอดีจากหนูขาว (mice)	28
8	ไวรัสที่ใช้ในการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์จากปลากะพงขาว	47
9	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ชั้นต้นจากส่วนของครีบหางและส่วนไตของปลากะพงขาวในอาหารสังเคราะห์ 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแกงต่างกัน	53
10	ผลการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 9 ชนิดของเซลล์จากส่วนไตของปลากะพงขาวในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	57
11	คุณสมบัติทางชีวภาพและชีวเคมีบางประการของไวรัส SIV	82
12	ไวรัสที่ใช้ในการทดสอบการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีโดยวิธี indirect dot blot immunodetection	107

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	รูปร่างลักษณะภายนอกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)	5
2	ลักษณะปลากะพงขาวที่เป็นโรคลิมโฟซิสทิส (Lymphocystis) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส ครอบครัว (Family) Iridoviridae Genus *Lymphocystisvirus*	19
3	ลักษณะอาการของลูกปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ SIV ในโรงเพาะฟัก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ซึ่งบริเวณลำตัวมีลักษณะลีบแบน เปลี่ยนเป็นสีดำ ว่ายน้ำผิดปกติ และมีอาการเกร็ง	21
4	ลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง (250X)	50
5	ลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว ภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 (420X)	51
6	ลักษณะของเซลล์รูปกระสวยที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางของปลากะพงขาว ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (250X)	52
7	การเจริญเติบโตของเซลล์จากส่วนไตของปลากะพงขาว ที่อุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับ คือ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส	55
8	จำนวนโครโมโซม ของเซลล์จากส่วนไตของปลากะพงขาว	56
9	ลักษณะของเซลล์จากส่วนไตปลากะพงขาวที่ถูกเชื้อไวรัส SIV เข้าทำลาย (CPE) ทำให้เซลล์มีลักษณะบวมและหลุดออกจากพื้นฟลาสต์ ภายหลังการบ่มเลี้ยง 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (630X)	58
10	ลักษณะของเชื้อไวรัส SIV ซึ่งเพิ่มจำนวนในเซลล์จากไตปลากะพงขาว เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 140 -160 นาโนเมตร (Uranyl acetate & Lead citrate ; Bar = 1.5 ไมโครเมตร)	59

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	ลักษณะของเซลล์ปลากะพงขาวที่ปราศจากการปนเปื้อนของไมโคพลาสมา ซึ่งไม่พบการเรืองแสงของไมโคพลาสมาบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ เมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสงบิสเบนซาไมล์และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (1,680X)	60
12	อัตรารอดของเซลล์ไตปลากะพงขาวหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสและไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 เดือน	61
13	ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของไวรัส SIV ในเซลล์ SK (MOI = 0.1)	78
14	การเพิ่มจำนวนของไวรัส SIV ในเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (MOI = 0.1)	79
15	การเจริญเติบโต (growth curve) ของไวรัส SIV ในเซลล์ SK ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (MOI = 1.0)	80
16	ลักษณะอินคลูชันบอดี (inclusion bodies) ซึ่งติดสีเขียวอ่อน บริเวณส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ SK เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Acridine orange stain ; 1,680X)	83
17	สภาพความคงทนของไวรัส SIV ต่อการแช่แข็ง (-80 องศาเซลเซียส) และการหลอมละลาย ซึ่งมีผลทำให้อัตรารอดของไวรัสลดต่ำลง	85
18	อนุภาคไวรัส SIV มีรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ประมาณ 140-160 นาโนเมตร ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ SK (Uranyl acetate & Lead citrate ; Bar = 320 นาโนเมตร)	86

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	ไวรัสสร้างผนังหุ้ม (envelope) โดยแทรกตัวผ่านพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์ SK ซึ่งจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่สมบูรณ์ประมาณ 200-220 นาโนเมตร (Uranyl acetate & Lead citrate ; Bar = 350 นาโนเมตร)	87
20	แถบอนุภาคไวรัสที่แยกด้วยสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่องความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ ความเร็ว 90,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	88
21	ลักษณะของอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ ภายหลังการแยกด้วยสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง ความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Uranyl acetate ; Bar = 250 นาโนเมตร)	89
22	ลักษณะของแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (marker protein) (Bio-rad) ซึ่งประกอบด้วย phosphorelase B (101,000) bovine serum albumine (79,000) ovalbumin (50,100) carbonic anhydrase (34,700) soybean trypsin inhibitor (28,400) และ lysozyme (20,800) ตามลำดับ (Coomassie blue R-250 stain)	91
23	เปรียบเทียบลักษณะแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV กับแถบโครงสร้างโปรตีน ไวรัสที่แยกได้จากปลาและกบ (Silver stain)	92
24	อนุภาคไวรัส SIV ที่ใช้สำหรับการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกระต่าย ซึ่งเตรียมโดยวิธีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ SK และทำให้บริสุทธิ์ในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่องความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Uranyl acetate ; Bar = 300 นาโนเมตร)	109
25	การทดสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้กับสารละลายไวรัส SIV บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect dot blot immunoassay บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยมีชุดควบคุม ซึ่งใช้ซีรัมกระต่ายปกติและชุดทดลอง ซึ่งใช้แอนติบอดีที่มีค่าการเจือจางครั้งละ 2 เท่าคือ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200,.... 1:51,200 ตามลำดับ	110

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
26	เปรียบเทียบลักษณะของแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV (Comassie blue R-250 stain) (A) กับปฏิกริยารวมตัวของแอนติบอดีกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (western blotting and protein immunodetection using peroxidase (POD) conjugate) (B)	112
27	เปรียบเทียบปฏิกริยารวมตัวข้ามกลุ่มของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV ต่อแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสที่แยกได้จากปลาและกบ	113
28	การทดสอบความไวของแอนติบอดีที่ระดับการเจือจาง 100 เท่าในการตรวจหาเชื้อไวรัส SIV ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยวิธี indirect dot blot immunodetection	114
29	การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีโดยวิธี indirect dot blot immunodetection ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	115

ตัวย่อและสัญลักษณ์

CPE	=	การเข้าทำลายเซลล์
^{o}C	=	องศาเซลเซียส
DMSO	=	ไดเมธิลซัลโฟไซด์ (dimethyl sulphoxide)
DNA	=	ดีเอ็นเอ
FBS	=	ซีรัม
g	=	ค่าแรงโน้มถ่วงโลก
HBSS	=	สารละลายปรับสมดุลย์เกลือ (Hank's balance salt solution)
IU	=	หน่วยสากล
kDa	=	กิโลดาลตัน
L-15	=	อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 (Leibovitze –15)
M	=	โมลาร์
µg	=	ไมโครกรัม
µl	=	ไมโครลิตร
M-199	=	อาหารเลี้ยงเซลล์ M-199 (medium –199)
MEM	=	อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (minimum essential medium)
MOI	=	ค่าความสามารถในการเข้าทำลายเซลล์
ml	=	มิลลิลิตร
N	=	นอร์มอล

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

nm	=	นาโนเมตร
O.D.	=	ค่าการดูดกลืนแสง
PBS	=	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
ppt	=	ส่วนในหนึ่งพันส่วน
SDS	=	โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)
PAGE	=	โพลีอคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซีส (polyacrylamide gel electrophoresis)
$TCID_{50}$	=	ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์
TEMED	=	เตตราเมธิลีนไดอะมีน (N, N, N' , N' –tetramethylethylenediamine)
v	=	ปริมาตร
w	=	น้ำหนัก
4CN	=	4 คลอโร 1 เนพธอล (4 chloro-1-naphthol)