ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเซลล์ไลน์และการประยุกต์ใช้ในการศึกษาเชื้ออิริโดไวรัสในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

ผู้เขียน นายเรวัตร คงประดิษฐ์

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลากะพงขาว ในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสังเคราะห์ พบว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว (SK) สามารถเจริญได้ดีอย่างต่อเนื่อง ในอาหารสังเคราะห์ Leibovitze-15 ที่มีส่วนผสมของซีรัม (fetal bovine serum) 10 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ SK มีลักษณะรูปร่างเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial-like cells) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ 75 ครั้งในระยะเวลา 24 เดือน และมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 42 ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย รา และไมโคพลาสมา ทนต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส และไนโตรเจนเหลวได้นานกว่า 24 เดือน โดยมีอัตราการเจริญกลับคืนมาใหม่ร้อยละ 83.20 และ 74.50 ตามลำดับ เซลล์ที่ผลิตได้ยอมรับเชื้อไวรัส sand goby virus (SGV), chub reovirus (Chub), snake-head rhabdovirus (SHRV), red sea bream iridovirus (RSIV), seabass iridovirus (SIV) และ grouper iridovirus-2 (GIV-2) ได้

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของไวรัส SIV โดยการเพิ่มจำนวนอนุภาคในเซลล์ SK ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าไวรัสมีรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) ผนังมีองค์ประกอบของไขมันหุ้ม (lipid envelope) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 200-220 นาโนเมตร (nm) มีกรดนิวคลีอิกชนิด DNA เพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์ SK ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าไตเตอร์ประมาณ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร และการเพิ่มจำนวนอนุภาคของไวรัสจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือ pH 3 เป็นเวลา 30 นาที สามารถแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ได้ในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอนุภาคไวรัสมีน้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 1,700 กิโลดาลตัน (kDa) จากโครงสร้างโปรตีนรวม 27 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 21-120

กิโลดาลตัน เมื่อนำไวรัส SIV มาฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกระต่าย พบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเชื้อ SIV ที่ค่าการเจือจางประมาณ 25,600 เท่า ตรวจสอบด้วยวิธี indirect dot blot immunoassay อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่มีคุณสมบัติในการลบล้างฤทธิ์ (neutralization) ต่อเชื้อไวรัส SIV เมื่อทดสอบปฏิกริยาการจับของแอนติบอดีกับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสด้วยวิธี western blotting พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับแถบโครงสร้างโปรตีนหลักของเชื้อไวรัส SIV ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26, 28, 29, 32, 38, 40, 45, 49, 54, 65, 70, 90, 102 และ 113 กิโลดาลตันได้เป็นอย่างดี และสามารถจับข้ามกลุ่มกับแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส GIV-2, tiger frog iridovirus (TFIV) และ grouper iridovirus–1 (GIV-1) ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้ออิริโดไวรัสที่มีการระบาดในปลาและกบ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับแถบโครงสร้างโปรตีน ของไวรัส SIV ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 และ28 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่พบในเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆที่ทำการทดสอบ จากผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคต่อไป

Thesis Title Establishment of a Cell Line and Its Application for Iridovirus Studies in Seabass, (*Lates calcarifer* Bloch)

Author Mr. Raewat Khongpradit

Major Program Aquatic Science

Academic Year 2001

Abstract

A fish cell line was established from seabass (*Lates calcarifer* Bloch) kidney using the mincing method. Seabass kidney (SK) cells grew well in Leibovitze-15 medium containing 10 % FBS with an optimum temperature at 25°C. Over a period of 24 months, SK cells were subcultured more than 75 passages and exhibited epithelial-like cell morphology. The chromosome number of SK cells was 42 at the 75th passage. The cells were found free from bacterial, fungal and mycoplasma contamination, and were stored at -80°C or in liquid nitrogen (-196°C) for at least 24 months with a recovery rate of 83.20 and 74.50 %, respectively. Susceptibility of SK cells to nine viruses was tested and six viruses, sand goby virus (SGV), chub reovirus (Chub), snake-head rhabdovirus (SHRV), red seabream iridovirus (RSIV), seabass iridovirus (SIV) and grouper iridovirus (GIV-2) were susceptible to SK cells.

Characterization of the seabass iridovirus (SIV) was carried out in SK cells. Transmission electron microscopy revealed the presence of 200-220 nm icosahedral virions surrounded by an lipid envelope. The virus grew well in the SK cell at 25 °C, productivity a titer of $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/ml. The virus titer was reduced after a freeze-thaw cycle and was completely inactivated at 56 °C or pH 3 within 30 minutes. The virus was also sensitive to chloroform and the replication was suppressed by IUdR, indicating the presence of essential lipids in the envelope and a DNA genome. SIV was able to separate and purify in 10-60 % sucrose continuous gradient and the estimated molecular weight was

determined to be 1,700 kDa. In sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SIV exhibited 27 structural proteins with a size ranging from 21 to 120 kDa. Polyclonal antibody against SIV was produced, giving the highest titer of 1:25,000 in indirect dot blot immunoassay. No neutralizing antibodies against SIV and other three fish and amphibian viruses, grouper iridovirus-1 (GIV-1), GIV-2 and tiger frog iridovirus (TFIV) were observed. In Western blotting, this polyclonal antibody was bound with structural proteins of SIV at the molecular weight of 26, 28, 29, 32, 38, 40, 45, 49, 54, 65, 70, 90, 102 and 113 kDa. Cross antibody reaction against GIV-1, GIV–2 and TFIV were observed in western blotting analysis. Even though the cross antibody reaction was demonstrated among fish and amphibian iridovirus, however these polyclonal antibodies showed the specific binding with structural proteins of SIV at 26 and 28 kDa, which may serve as useful diagnostic tools for detection of seabass iridovirus in the future.