การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลานิล

Production of Polyclonal Antibody Against Immunoglobulin of Tilapia *Oreochromis niloticus*

ธนพนธ์ สุนทรสีมะ[1] ประดิษฐ์ หวังมาน[2] ไพศาล สิทธิกรกุล[1] ศิวาพร ลงยันต์[1]*

Tanapon Soonthonsrima[1], Pradit Wangman[2], Paisarn Sithigorngul[1], Siwaporn Longyant[1]*

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[2]*ศูนย์เพื่อความเป็นเลิศทางวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ พืชและปรสิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[2]Center of Excellence in Animal, Plant and Parasite Biotechnology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

Received : 30 May 2017

Accepted : 29 November 2017

Published online : 1 December 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตแอนติซีรัมจากหนูขาวที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิลด้วยโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ซีรัมของปลานิลที่ได้สามารถตกตะกอน BSA โดยนำซีรัมของปลานิลไปผสมกับโปรตีน BSA ได้ตะกอนของ Ig/BSA complex และนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวสามารถผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะและมีแรงจับสูงกับ Ig ของปลานิลทั้งบริเวณของโปรตีนสายยาว (heavy chain) ขนาดประมาณ 78 กิโลดาลตันและโปรตีนสายสั้น (light chain) ขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตันเมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting แต่อย่างไรก็ตามแอนติซีรัมที่ได้ยังมีแอนติบอดีที่สามารถจับกับโปรตีน BSA ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตันและองค์ประกอบอื่นๆ ของซีรัมปลานิลปะปนอยู่ด้วย จึงจำเป็นต้องผลิตแอนติบอดีต่อ Ig ในรูปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงในปริมาณที่ไม่จำกัดสำหรับในการวิจัยต่อไป

คำสำคัญ : แอนติซีรัม ปลานิล อิมมูโนโกลบูลิน ดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น Western blotting

Abstract

Mouse antiserum against immunoglobulin (Ig) of tilapia (*Oreochromis niloticus*) was produced by using tilapia Ig/BSA complex. Tilapia anti-bovine serum albumin was produced first by peritoneal injection of bovine serum albumin (BSA) and then used for preparation of tilapia Ig/BSA complex by immunoprecipitation. The complex was then used for immunization into mice for production of mouse anti-tilapia Ig antiserum. The mouse anti-tilapia Ig antiserum demonstrated high affinity on both heavy chain (78 kDa) and light chain (23 kDa) as determined by Western blotting, however, the mouse antiserum still contained antibodies that slightly recognized BSA (60 kDa) and other components in tilapia serum as well. Therefore, further development of monoclonal antibody should be performed to obtain high specific antibody without limited quantity.

Keywords : antiserum, *Oreochromis niloticus*, immunoglobulin, double immunodiffusion, Western blotting

***Corresponding author. E-mail** : siwaporn@g.swu.ac.th

บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงชนิดหนึ่ง นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 จนถึงปัจจุบันมีการเลี้ยงปลานิลกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากเลี้ยงง่าย กินพืชเป็นอาหารและมีราคาถูก (Department of Fisheries, 2016a) นอกจากนี้ปลานิลยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญ อาทิ โปรตีน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม รวมถึงมีวิตามินบี-12 อยู่มาก (Mjoun & Rosentrater, 2010) ปลานิลอยู่ในวงศ์ Cichlidae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกาบริเวณแม่น้ำไนล์ พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน อูแกนดา (Department of Fisheries, 2016b) เนื่องจากปลาชนิดนี้เลี้ยงง่ายและเติบโตเร็วจึงมีผู้สนใจเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ถึงแม้ปลานิลมีความทนทานต่อโรคสูงแต่ก็มีการรายงานการระบาดและการติดเชื้อโรคในปลานิลที่เลี้ยงแบบหนาแน่น เช่น แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ภายหลังจากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะแล้ว พบว่าเชื้อดังกล่าวมีความไวต่อยา Enrofloxacin, Oxytetacycline, Salphamethoxazole+Trimethoprime และยาอีกหลายชนิด (Kitancharoen *et al*., 2006; Mian *et al*., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *Edwardsiella tarda* (Bullock *et al*., 1985) และ *Lactococcus garvieae* (Vendrell *et al*., 2006) สามารถทำให้เกิดโรคและสร้างความเสียหายต่อปลานิลเลี้ยงเช่นเดียวกัน เกษตรกรส่วนใหญ่พยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิด แต่ไม่สามารถหยุดยั้งการตายของปลาได้ พบว่าปลายังคงมีอัตราการตายอย่างต่อเนื่องและรุนแรงจนทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบภาวะขาดทุนอย่างหนัก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวัคซีนในการต่อต้านเชื้อโรคเหล่านี้ เช่น การพัฒนาวัคซีนต่อต้านเชื้อ *E. tarda* (Kwon *et al.,* 2006) เป็นต้น พบว่าหลังจากการให้วัคซีนสามารถตรวจสอบปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินชนิด M (immunoglobulin M - IgM) ของปลาที่จำเพาะต่อเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการตรวจสอบปริมาณของ IgM ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีความจำเป็นต้องอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ IgM ของปลาเหล่านั้น จากรายงานที่ผ่านมาพบมีการผลิตแอนติบอดีในรูปโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody - PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody - MAb) ที่จำเพาะกับ IgM ของปลากระดูกแข็งหลายชนิด ตัวอย่าง เช่น โพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ IgM ของปลาแฮลิบัตญี่ปุ่น (Santos *et al.,* 2009; Li *et al.,* 2007), ปลา rohu (Rathore *et al.,* 2008), ปลา Carp (Vesely *et al.,* 2006) และปลานิล เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังคงมีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนสายยาว (heavy chain) ของปลาเท่านั้นและมีราคาขายค่อนข้างสูงมาก (Al-Harbi *et al.,* 2000) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตแอนติซีรัมต่อโปรตีนสายยาวและสายสั้น (light chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ของปลานิลโดยอาศัยการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะต่อ BSA ซึ่งสามารถทำให้อิมมูโนโกลบูลินของปลานิลบริสุทธิ์ได้ง่ายแทนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งผลิตแอนติบอดีในรูปของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลานิลต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมซีรัมจากปลานิล

นำปลานิล 30 ตัวน้ำหนักประมาณ 300 - 500 กรัม มาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงขนาด 1 X 1 X 0.5 เมตร บ่อละ 5 ตัว เป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้ปลาปรับสภาพกับสิ่งแวดล้อม จากนั้นนำสารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้อง (intraperitoneal cavity) ของปลาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว และทำการฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งทุกๆ 3 สัปดาห์โดยใช้สารละลาย BSA ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant แทน หลังจากการฉีดกระตุ้นเข็มที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ทำการเก็บเลือดบริเวณโคนหางของปลา

ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวหลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่เป็นซีรัมเก็บเอาไว้เพื่อนำมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ BSA และใช้แยกอิมมูโนโกลบูลินต่อไป

การทดสอบการตอบสนองของการปลูกภูมิคุ้มกันในปลานิลด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (double immunodiffusion)

เตรียมวุ้น 1% ละลายใน PBS (phosphate buffered saline pH 7.2) ที่อุณหภูมิ 55-60 °C เทวุ้นปริมาตร 5-5.5 มิลลิลิตรลงบนแผ่นสไลด์กระจายให้สม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว เจาะวุ้นให้เป็นหลุมกลมๆ และดูดเศษวุ้นในหลุมออก ใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรลงหลุมตรงกลางและซีรัมของปลาที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมรอบๆ จำนวน 6 หลุม บ่มแผ่นสไลด์ในกล่องชื้นที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมของปลานิลกับ BSA โดยสังเกตเส้นของการตกตะกอน นำแผ่นสไลด์ไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อล้างโปรตีนส่วนที่เหลือออก นำไปย้อมด้วยสีย้อม (0.1% Coomassie blue R-250 เมทานอล 50% กรดอะซีติก 10%) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำยาล้างสี I (เมทานอล 50% กรดอะซีติก 10%) และน้ำยาล้างสี II (เมทานอล 5% กรดอะซีติก 7%) ตามลำดับ จนกระทั่งวุ้นในส่วนที่ไม่มีตะกอนใสแล้วตากให้แห้ง

การตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมของปลานิล

นำซีรัมของปลานิลที่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับ BSA มารวมกันแล้วผสมกับ BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในอัตราส่วน 1 : 1 บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกตะกอน Ig/BSA complex โดยปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาทีและล้างตะกอนด้วย PBS 3 ครั้ง นำตะกอน Ig/BSA complex ที่ได้มาเติม PBS แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C จนกระทั่งนำไปใช้ตรวจสอบองค์ประกอบและใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวต่อไป

การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

นำตะกอน Ig/BSA complex ที่ละลายใน PBS มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดสารผสมเข้าที่บริเวณช่องท้องของหนูขาวเพศเมียอายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ (ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว จากนั้นทำการฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งโดยผสมสารละลาย Ig/BSA complex กับ incomplete Freund's adjuvant แทนเว้นระยะการฉีดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งที่ 4 แล้ว 1 สัปดาห์ เก็บเลือดจากหนูแต่ละตัวนำมาปั่นแยกซีรัม และนำมาทดสอบการตอบสนองและความจำเพาะด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

ทำการเตรียมวุ้น เจาะหลุมและดูดเศษวุ้นออกแล้วนำซีรัมจากปลานิลที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA หรือซีรัมจากปลาที่ไม่ได้ปลูกภูมิคุ้มกันปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ในหลุมตรงกลาง และใส่ซีรัมที่ได้จากหนูขาวแต่ละตัวที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลุมรอบๆ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และทำการย้อมสีและล้างสีย้อมวุ้นซึ่งมีขั้นตอนในการทำเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

การดูดซับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน BSA

นำแอนติซีรัมจากหนูขาวมาทำการดูดซับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน BSA โดยทำการผสมแอนติซีรัมของหนูขาวกับสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในอัตราส่วน 1 : 1 บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอนที่เกิดขึ้นด้านล่างของหลอดทิ้ง เก็บสารละลายด้านบนไว้ที่ -20 °C สำหรับใช้ในการทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blotting

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

นำซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย BSA หรือตะกอนของ Ig/BSA complex ที่ละลายใน PBS และโปรตีน BSA มาทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)(Laemmli, 1970) โดยให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตัดบางส่วนของเจลนำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R–250 และบางส่วนนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ Transblot apparatus (BioRad) ด้วยกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ nitrocellulose membrane ที่ได้แช่ใน 5% blotto (นมปราศจากมันเนย 5% ละลายใน PBS, 0.1%Triton X-100) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในแอนติซีรัมของหนูขาวแต่ละตัวที่ต้องการทดสอบ (ใช้ซีรัมที่ทำการดูดซับด้วย BSA แล้ว โดยเจือจางซีรัมที่ได้ที่ 1 : 5,000 ด้วย 1% blotto) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที บ่มต่อใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM–HRP; BioRad) เจือจาง 1 : 3,000 ด้วย 1% blotto เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่ในสารละลายซับสเตรทประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05 % cobalt chloride ($CoCl_2$) ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที นำไปล้างน้ำประปาหลายๆ ครั้ง ตรวจสอบตำแหน่งโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูขาวเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

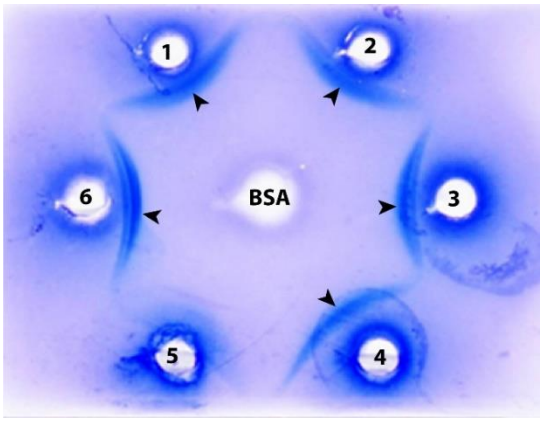
การทดสอบความไวในการจับแอนติบอดีของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี dot blotting

นำซีรัมของปลานิลที่ไม่ได้ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA และโปรตีน BSA มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย PBS แล้วหยดลง nitrocellulose membrane ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มกับแอนติซีรัมจากหนูที่เจือจาง 1 : 5,000 ด้วย 1% blotto หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgM ของปลานิลที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ (Aquatic Diagnostic Ltd.) เจือจาง 1 : 200 ด้วย 1% blotto บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที บ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1 : 3,000 ด้วย 1% blotto เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับการทำ Western blotting ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุดสีสุดท้ายที่สังเกตได้ชัดเจน

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

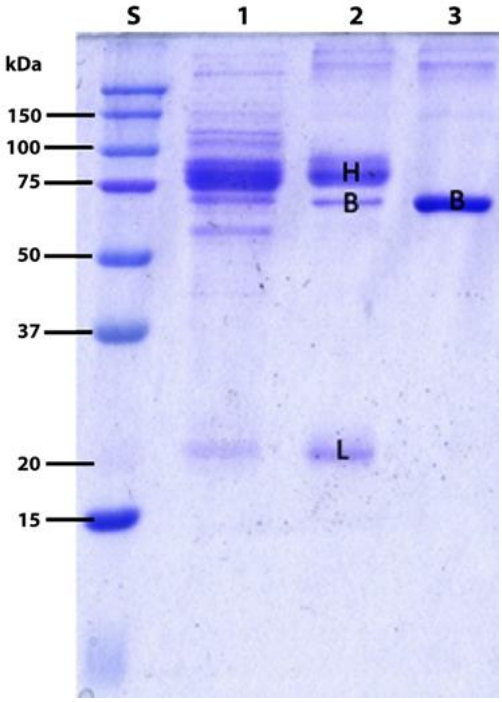
จากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิลด้วยโปรตีน BSA ซึ่งเป็นโปรตีนแปลกปลอมมีผลทำให้ปลามีการตอบสนองโดยการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจำเพาะต่อโปรตีนนี้ เมื่อเก็บรวบรวมซีรัมของปลานิลแล้วนำมาตรวจสอบการตอบสนองด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น พบว่าซีรัมจากปลาจำนวน 16/30 ตัวให้ผลบวกอย่างชัดเจน สังเกตจากการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนบนวุ้น โดยปลาที่มีการตอบสนองที่ดีพบแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมของปลานิล (หลุมหมายเลข 1-6) กับหลุมตรงกลางที่ใส่ BSA ยกเว้นซีรัมหลุมหมายเลข 5 (ภาพที่ 1) ทั้งนี้พบแถบตะกอนที่เกิดขึ้นใกล้กับหลุมที่ใส่ซีรัมของปลานิล เนื่องจากสารละลาย BSA ที่ใช้อาจมีความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะในซีรัมของปลานิล นอกจากนี้อิมมูโนโกลบูลินส่วนใหญ่ที่พบในซีรัมของปลานิลเป็นชนิด IgM ที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 780 -788 กิโลดาลตัน (Smith *et al.,* 1993) ทำให้เคลื่อนที่ผ่านวุ้นได้ช้ากว่าโปรตีน BSA ที่มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน กรณีที่ปลาบางตัวไม่สามารถตอบสนองต่อโปรตีน BSA ได้อาจเนื่องจากความแปรปรวนของสภาพทางสรีรวิทยาของปลาแต่ละตัวแตกต่างกัน และการตรวจสอบด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่นเป็นวิธีที่มีความไวต่ำจึงสามารถตรวจสอบอิมมูโนโกลบูลินที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน BSA ได้ดีมากเท่านั้น ส่วนปลาที่มีการ

ตอบสนองในระดับต่ำจึงไม่สามารถสังเกตเห็นแนวตะกอนระหว่างปฏิกิริยาได้ทำให้สามารถคัดเลือกซีรัมที่มีการตอบสนองต่อโปรตีน BSA ได้ดีเท่านั้น



ภาพที่ 1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากปลานิลที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น นำสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรปริมาณ 10 ไมโครลิตรใส่ลงในหลุมตรงกลาง และใส่ซีรัมจากปลานิลที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA แต่ละตัวที่ต้องการทดสอบ (หลุมรอบๆ 1-6)
หัวลูกศร = แนวตะกอนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมจากปลานิลกับ BSA

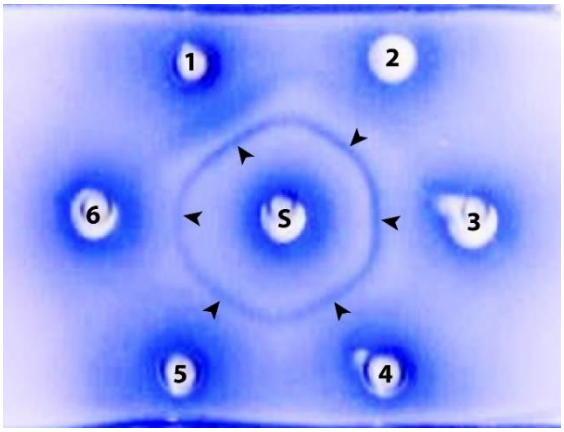
เมื่อนำซีรัมของปลานิลที่ให้ผลการตอบสนองดีมาผสมกับ BSA พบว่ามีตะกอนของ Ig/BSA complex สีขาวเกิดขึ้น และจากการนำไปทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าในตะกอนมีแถบโปรตีนสายยาว (heavy chain - H) ขนาด 78 และสายสั้น (light chain - L) ขนาด 23 กิโลดาลตันของอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลเป็นหลัก (ภาพที่ 2-2) ซึ่งตรงกับแถบโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่ได้ตกตะกอนด้วย BSA (ภาพที่ 2-1) และพบแถบโปรตีน BSA (B) ขนาด 60 กิโลดาลตันเป็นแถบบางๆ (ภาพที่ 2-2) เทียบกับแถบโปรตีน BSA (ภาพที่ 2-3) ซึ่งคล้ายกับรายงานการทดลองของ Smith และคนอื่นๆ (Smith *et al.,* 1993) จากการใช้วิธีการดังกล่าวนี้ทำให้สามารถผลิตอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมของปลานิลได้ในปริมาณที่มากพอสำหรับใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูได้โดยไม่มีความจำเป็นต้องทำการแยกอิมมูโนโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยการนำซีรัมของปลามาแยกผ่านคอลัมน์ mannan-binding protein (MBP) (Al-Harbi *et al.,* 2000; Lim *et al.,* 2009)



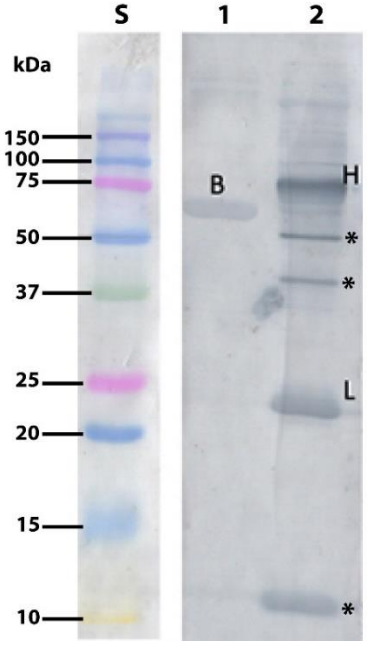
ภาพที่ 2 แถบโปรตีนจากซีรัมของปลานิลที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA โดยนำ 1) ซีรัมของปลานิลที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA 2) ตะกอนของ Ig/BSA complex และ 3) โปรตีน BSA มาทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วยสี Coomassie blue เทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (S) H = heavy chain ของอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลขนาดประมาณ 78 กิโลดาลตัน L = light chain ของอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน และ B = โปรตีน BSA ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน

สำหรับการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของหนูขาวที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยตะกอนของ Ig/BSA complex ด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูขาวสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของปลานิลได้ โดยพบแถบตะกอนเกิดขึ้นระหว่างหลุมที่ใส่แอนติซีรัมของหนูขาวจำนวน 6/8 ตัว (ภาพที่ 3) จึงรวมซีรัมจากหนูที่ให้ผลบวกเข้าด้วยกันและนำไปทำการดูดซับ (pre-absorb) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ซึ่งปะปนอยู่โดยผสมกับ BSA ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี Western blotting

ส่วนการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ทำการดูดซับด้วย BSA ด้วยวิธี Western blotting พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีจากหนูขาวกับซีรัมปลานิลได้ โดยแอนติซีรัมจากหนูขาวสามารถจับได้ทั้งโปรตีนสายยาวขนาด 78 และสายสั้นขนาด 23 กิโลดาลตันของอิมมูโนโกลบูลินจากปลานิล (ภาพที่ 4-2) แต่อย่างไรก็ตามแอนติซีรัมที่ได้ยังสามารถจับกับโปรตีน BSA (ภาพที่ 4-1) และโปรตีนอื่นๆ ของปลาได้ (ภาพที่ 4-2) เนื่องจากตะกอน Ig/BSA complex ที่ใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนั้นมีโปรตีน BSA ปะปนอยู่ด้วยและอาจมีโปรตีนอื่นๆ จากซีรัมของปลานิลติดมาด้วยเล็กน้อย ซึ่งในกรณีของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ที่ปะปนมานั้นสามารถกำจัดออกได้ด้วยวิธีการดูดซับโดยการใช้ BSA ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถดูดซับออกได้หมดแต่ตามธรรมชาติในซีรัมของปลาไม่พบโปรตีน BSA เป็นองค์ประกอบและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยวิธีนี้สามารถทำให้ได้สะดวก ลดความยุ่งยากและขั้นตอนในการเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์หรือลดระยะเวลาในการเตรียมแอนติเจนในรูปแบบอื่นๆ เช่น การใช้รีคอมบิเนนท์โปรตีนสำหรับใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน (Santos *et al.*, 2009) ส่วนกรณีของแอนติบอดีต่อโปรตีนบางชนิดจากซีรัมของปลาที่ปะปนอยู่นั้นไม่สามารถกำจัดทิ้งได้จึงยังคงเป็นข้อจำกัดของการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินจากซีรัมของปลานิลด้วยวิธีการตกตะกอนนี้

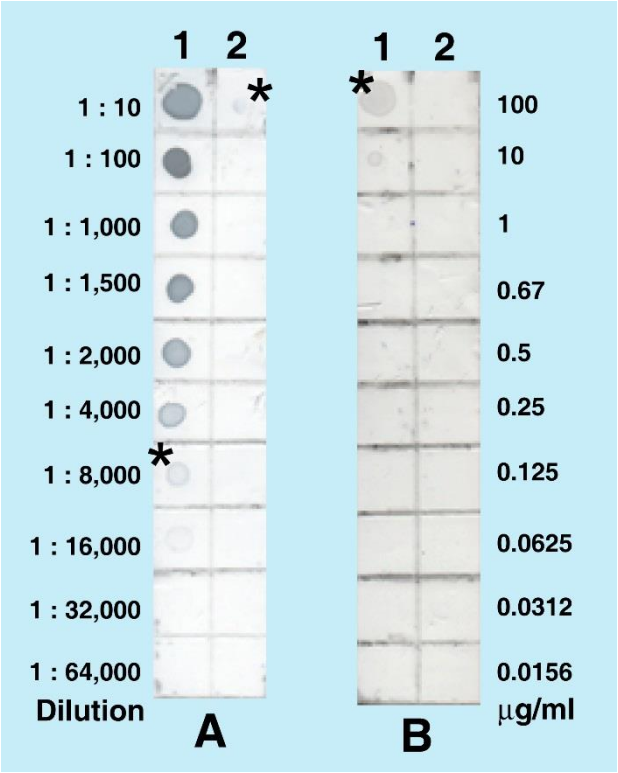


ภาพที่ 3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยซีรัมของปลานิลในรูปของสารละลายตะกอน Ig/BSA complex โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น นำซีรัมของปลานิล (S) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ในหลุมตรงกลาง และใส่ซีรัมที่ได้จากหนูขาวแต่ละตัวที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลุมรอบๆ (1-6) หัวลูกศร = แนวตะกอนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมจากหนูขาวกับซีรัมของปลานิล



ภาพที่ 4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลานิลด้วยวิธี Western blotting โดยนำ 1) โปรตีน BSA และ 2) ซีรัมของปลานิลที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA มาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้ายแถบโปรตีนสู่ nitrocellulose membrane แล้วนำมาบ่มกับแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว โดยเทียบแถบโปรตีนกับโปรตีนมาตรฐาน (S) B = แถบโปรตีน BSA ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน H = heavy chain ขนาดประมาณ 78 กิโลดาลตัน L = light chain ขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน และ * = แถบโปรตีนอื่นๆ ที่พบในซีรัมของปลานิล

นอกจากนี้จากการทดสอบความไวของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ผลิตได้เทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ IgM ของปลานิลที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ด้วยวิธี dot blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ผลิตได้มีความไวสูงในการจับกับอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมจากปลาที่ไม่ได้ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย BSA ที่เจือจาง 1 : 8,000 แต่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามโปรตีน BSA เล็กน้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไม่จับกับ BSA ที่มีระดับการเจือจางสูงๆ เนื่องจากแอนติซีรัมที่ใช้ในการทดสอบได้ทำการดูดซับด้วยโปรตีน BSA แล้ว (ภาพที่ 5A) ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ IgM ของปลานิลที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์สามารถเกิดปฏิกิริยากับอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลานิลที่ระดับความเจือจางสูงสุดได้เพียง 1 : 10 แต่ไม่เกิดปฏิกิยาข้ามกับ BSA (ภาพที่ 5B) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgM ของปลานิลที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้ในการวิจัยนี้มีแอนติบอดีที่มีความไวมากกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ถึง 800 เท่า เนื่องจากแอนติซีรัมที่ได้ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวนมากที่มีความจำเพาะต่อหลายอิพิโทปของแอนติเจนทำให้สามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินได้ดีกว่า



ภาพที่ 5 การทดสอบความไวของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลานิลที่ผลิตได้เทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ด้วยวิธี dot blotting โดยนำ 1) ซีรัมของปลานิลที่ไม่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย BSA เจือจางด้วย PBS ที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 1 :10 ถึง 1 : 64,000 เท่าและ 2) สารละลาย BSA เจือจางที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ตั้งแต่ 100 ถึง 0.0156 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาหยดบน nitrocellulose membrane แล้วนำมาบ่มกับ A) แอนติซีรัมที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลานิลที่ผลิตได้หรือ B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์

* แสดงค่าการเจือจางสูงสุดที่สามารถเห็นปฏิกิริยากับแอนติบอดี

แอนติซีรัมจากหนูขาวที่ได้จากการทดลองนี้ถึงแม้จะทำการกำจัดแอนติบอดีที่จำเพาะกับ BSA ออกไปแล้วก็ตาม แต่เนื่องจากแอนติซีรัมที่ได้ยังมีแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับโปรตีนอื่นๆ ของซีรัมจากปลาอยู่ด้วย ดังนั้นจึงยังมีความจำเป็นต้องทำการผลิตแอนติบอดีในรูปโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเฉพาะกับทั้งโปรตีนสายยาวและสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลเท่านั้นสำหรับใช้ในการพัฒนาเครื่องมือในตรวจอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลเพื่อใช้ในการศึกษาภูมิคุ้มกันในปลาชนิดนี้ต่อไป ซึ่งการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานั้นมีความสำคัญอย่างมากในการประยุกต์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจสอบระดับการตอบสนองของปลาที่ได้รับวัคซีนต่อเชื้อโรคต่างๆ จากรายงานก่อนหน้านี้ได้มีคณะวิจัยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาอย่างกว้างขวาง เช่น การผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อ IgM ของปลานิลในรูปแบบของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและการจำหน่ายเชิงพาณิชย์แล้ว แต่โมโนโคลนอแอนติบอดีที่ได้นั้นส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อโปรตีนสายยาวของ IgM ของปลานิลเท่านั้น (Al-Harbi *et al.,* 2000) และยังมีความไวในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ มีราคาแพง ดังนั้นจึงยังคงมีความจำเป็นต้องผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะและความไวสูงขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องมือและพัฒนาวิธีการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ตรวจวัดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้สามารถผลิตแอนติซีรัมจากหนูขาวที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลานิล (*O. niloticus*) ได้โดยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูขาวด้วยตะกอนของ Ig/BSA complex ที่เตรียมจากการใช้ซีรัมของปลานิลที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารละลาย BSA มาตกตะกอนโดยผสมกับโปรตีน BSA แอนติซีรัมจากหนูขาวที่ผลิตได้มีความจำเพาะและแรงจับสูงกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลโดยสามารถจับทั้งบริเวณของโปรตีนสายยาวและสายสั้น แต่มีข้อจำกัดคือยังสามารถจับกับโปรตีน BSA ได้เล็กน้อย และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆ ที่ปะปนอยู่ในซีรัมของปลานิลด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2559 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สัญญาเลขที่ 653/2559 ภายใต้โครงการศูนย์เพื่อความเป็นเลิศทางวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ พืช และปรสิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

Al-Harbi, A.H., Truax, R. & Thune, R.L. (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin. *Aquaculture*, *188* (3-4), 219-227.

Bullock, G. L. & Herman, R.L. (1985). "EDWARDSIELLA INFECTIONS OF FISHES". *US Fish & Wildlife Publications*, 1-6.

Department of Fisheries. (2016a). Nile tilapia. Retrieved April 1, 2016, from http://www.fisheries.go.th/ if-phayao/ cultivate/c_nile.htm. (in thai)

Department of Fisheries. (2016b). Biology of Nile tilapia. Retrieved April 1, 2016, from http://www.fisheries.go.th/sf-mukdahan/web2/%5Cimages/planine/chwa.pdf. (in thai)

Kitancharoen, N., Hanjavanij, C. & Suwannapeng, N. (2006). Efficiency of Vaccination with Streptococcus agalactiae bacterin on Streptococcosis Prevention in Nile tilapia. *Khon Kaen University Research Journal*, *11*, 53-61. (in thai).

Kwon, S.R., Nam. Y.K., Kim. S.K. & Kim. K.H. (2006). Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghost. *Fish and Shellfish Immunology*, 621-626.

Laemmli, UK. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature, 227,* 680-685.

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*, 982-990.

Lim, S., Ho, H., Khader, S. M., & Kwang, J. (2009). First report on the isolation of immunoglobulin M of guppy, *Poecilia reticulata*, for the production of polyclonal antibodies. *Aquaculture, 295* (1-2), 134-137.

Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M. & Figueiredo, H.C.P. (2008). Aspects of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, *136 (1–2)*, 180–183.

Mjoun, K. & Rosentrater, K. (2010). TILAPIA: Profile and Economic importance. South Dakota Cooperative Extension Service. Fact Sheets.

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 Immunology*, 761-774.

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*, 374–378.

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,* 23–35.

Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. & Múzquiz. J.L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish : A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *29* (4), 177–198.

Vesely, T., Reschova, S., Pokorova, D., Hulova, J. & Nevorankova, Z. (2006). Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni Medicina*, *51* (5), 296–302.