การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว

Production of Monoclonal Antibody Specific to Immunoglobulin of Asian Sea Bass *Lates calcarifer*

ธนพนธ์ สุนทรสีมะ[1], ประดิษฐ์ หวังมาน[2], ชลินันท์ เพ็งสุข[3], ไพศาล สิทธิกรกุล[1], ศิวาพร ลงยันต์[1*]

Tanapon Soonthonsrima[1], Pradit Wangman[2], Chalinan Pengsuk[3], Paisarn Sithigorngul[1], Siwaporn Longyant[1*]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[2]*ศูนย์เพื่อความเป็นเลิศทางวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ พืชและปรสิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[3]*คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์*

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

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

[3]*Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University*

Received : 24 May 2019

Revised : 25 July 2019

Accepted : 30 July 2019

บทคัดย่อ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน (Ig) ของปลากะพงขาว ทำโดยการปลูกภูมิคุ้มกันปลาด้วยโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) จากนั้นนำซีรัมปลาที่ได้ไปตกตะกอนกับ BSA ด้วยวิธี immunoprecipitation นำตะกอน Ig/BSA complex ที่ได้ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว แล้วคัดเลือกหนูที่ตอบสนองต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลาดีที่สุดไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังการหลอมรวมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวกับบีเซลล์ของหนู ทำการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี dot blot และ Western blot สามารถเลือกเซลล์ลูกผสมได้ 3 โคลนที่สามารถหลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินสายยาวขนาดประมาณ 80 กิโลดาลตันของปลากะพงขาว คือ 4C7, 6H7 และ 15C8 โดยโคลน 4C7 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลได้เล็กน้อย

คำสำคัญ : โมโนโคลนอลแอนติบอดี, ปลากะพงขาว, อิมมูโนโกลบูลิน, ดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น, เวสเทิร์น บล็อท

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

Abstract

Production of monoclonal antibodies (MAbs) specific to Asian sea bass immunoglobulin (Ig) was prepared by peritoneal injection the Asian sea bass with Bovine serum albumin (BSA) first. Then the fish anti-BSA antiserum was used to precipitate with BSA by immunoprecipitation method. The Ig/BSA complex was then immunized into mice. The mouse that showed the strongest immune response against Asian sea bass Ig was used for monoclonal antibody production. After fusion of myeloma with B cells of mice, 3 hybridoma clones (4C7, 6H7 and 15C8) producing monoclonal antibody specific to heavy chain (~80 kDa) of Asian sea bass Ig were selected by dot blot and Western blot, however the MAb (4C7) showed slightly cross reaction with tilapia serum.

Keywords: monoclonal antibody, *Lates calcarifer*, immunoglobulin, double immunodiffusion, Western blot

บทนำ

อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) หรือแอนติบอดี (antibody) เป็นไกลโคโปรตีนที่ถูกสร้าง และหลั่งโดยบีเซลล์ ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ ช่วยกำจัด และสลายแอนติเจน (neutralization) ที่เข้ามาสู่ร่างกายของสัตว์ สำหรับปลากระดูกแข็ง (bony fish) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรกที่สามารถพบอิมมูโนโกลบูลินได้ ในปลาสามารถพบอิมมูโนโกลบูลินได้ 3 ชนิด ได้แก่ IgM, IgD และ IgT ต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่สามารถพบได้ 5 ชนิด (IgM, IgG, IgD, IgA และ IgE) โดย IgM เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่เก่าแก่มากที่สุด อิมมูโนโกลบูลินชนิดนี้ในปลาทำหน้าที่หลักในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมและพบปริมาณมากที่สุดในซีรัมของปลา (Mashoof & Criscitiello, 2016; Ye *et al*., 2013) สำหรับเทคโนโลยีในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAb) ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่อการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในสัตว์น้ำ (Pengsuk *et al*., 2010; Wangman *et al*., 2016) นอกจากนี้ MAb ยังเป็นเครื่องที่มีประสิทธิภาพในการติดตามการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหรือตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีเมื่อปลามีการติดเชื้อ หรือได้รับวัคซีน และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำอิมมูโนโกลบูลินของปลาให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางชีวโมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินได้อีกด้วย (Palenzuela *et al.,* 1996) จากรายงานที่ผ่านมามีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลานิล (Al-Harbi *et al*., 2000; Soonthonsrima *et al*., 2017, 2018) มีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนสายยาว (heavy chain) ของ IgM ทั้งในรูปของ PAb และ MAb เช่น ปลาลิ้นหมา (Yang *et al*., 2017) ปลาดุก (Kreutz *et al*., 2016) และปลาคราฟ (Vesely *et al*., 2006) เป็นต้น สำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer* เป็นปลาน้ำกร่อยกินเนื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกมากกว่า 70 ล้านบาท ในปีพ.ศ. 2552 (Thipduang, 2012) ในปัจจุบันมีการรายงานการเกิดโรคระบาดจากไวรัส และแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก (de Groof *et al*., 2015; Kayansamruaj *et al*., 2015) ดังนั้นการผลิตและให้วัคซีนต่อเชื้อไวรัส และแบคทีเรียอาจช่วยลดความสูญเสียที่จะเกิดขึ้นได้ โดยการตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีนจึงมีความจำเป็นอย่างมาก (Chettri *et al*., 2015) และที่ผ่านมามีเพียงรายงานการผลิต PAb ที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวเท่านั้น (Crosbie & Nowak, 2002) สำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาว และสามารถคัดเลือก

แอนติบอดีที่มีความไวสูงในการจับกับอิมมูโนโกลบูลินได้ เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจสอบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะที่เพิ่มขึ้นหลังจากปลาได้รับวัคซีนต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ปลากะพงขาว Asian sea bass *Lates calcarifer* ซื้อจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดสมุทรสาคร และหนูขาวซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม วิธีการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภายใต้ทุนวิจัยเลขที่ 087/2562

การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวโดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

ปลากะพงขาว 45 ตัวขนาด 15-30 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม นำมาเลี้ยงในบ่อขนาด 1x1x0.5 เมตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม จากนั้นทำการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร : ปริมาตร) ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal cavity) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 2 ครั้งทุกๆ 3 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนเท่าเดิมแต่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (IFA) หลังจากการกระตุ้นครั้งสุดท้าย เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดปลาแต่ละตัวจากบริเวณโคนหาง นำไปปั่นแยกเพื่อทำการเก็บซีรัมที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำซีรัมที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C (Soonthonsrima *et al*., 2018)

การทดสอบการตอบสนองของการปลูกภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (double immunodiffusion)

นำซีรัมที่เก็บได้จากปลาแต่ละตัวมาทำการทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีน BSA ด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น โดยการเตรียมวุ้น 1% ละลายใน PBS (phosphate buffered saline pH 7.2) ที่อุณหภูมิ 55-60 °C เทวุ้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์สะอาดกระจายให้สม่ำเสมอ ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องให้แข็งตัว เจาะวุ้นให้เป็นหลุมกลม ดูดเศษวุ้นในหลุมออก จากนั้นใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมตรงกลางและซีรัมของปลาแต่ละตัวลงในหลุมรอบๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มสไลด์ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตเส้นของการตกตะกอนของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีของปลากับ BSA ทำการย้อมโปรตีนด้วยสีย้อม (0.1% Coomassie blue R-250 เมทานอล 50% กรดอะซีติก 10%) (Smith *et al*., 1993; Soonthonsrima *et al*., 2018)

การเตรียม Ig/BSA complex ด้วยวิธี immunoprecipitation

นำซีรัมของปลากะพงขาวที่แสดงปฏิกิริยาตกตะกอนกับ BSA จากวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น มารวมกันแล้วผสมกับสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 3:1 (ปริมาตร : ปริมาตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นแยกตะกอน Ig/BSA complex ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำตะกอนที่ได้มาเติม PBS แล้วทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C และนำมาตรวจองค์ประกอบของ Ig/BSA complex ด้วย 15% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

นำหนูขาวมาปลูกภูมิคุ้มกันด้วย Ig/BSA complex ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมกับ CFA ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร : ปริมาตร) ฉีดบริเวณช่องท้องของหนูขาวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ทำการฉีดกระตุ้นหนูซ้ำอีก 3 ครั้ง ในทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยใช้แอนติเจนความเข้มข้นเท่าเดิมแต่ผสมกับ IFA ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร : ปริมาตร) หลังจากการกระตุ้นครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการเก็บซีรัมของหนูขาวแต่ละตัวมาตรวจสอบความจำเพาะกับซีรัมปลากะพงขาวด้วยวิธี Western blot เก็บรักษาซีรัมของหนูขาวไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C คัดเลือกหนูที่มีการตอบสนองต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำหนูขาวที่ตอบสนองดีที่สุดกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวมาใช้ในการผลิตเซลล์ลูกผสมโดยทำการผ่าตัดแยกม้ามมาบดแยกกระจายให้เป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นนำเซลล์ม้ามที่ได้มาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line ด้วย 50% polyethylene glycol (PEG) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร RPMI ที่ผสม HAT (Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine) เสริมด้วยเม็ดเลือดแดง 1% และ 20% fetal bovine serum ใน 96 wells microculture plate บ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีเซลล์ลูกผสมอยู่มาคัดเลือกด้วยวิธีการ dot blot โดยการนำซีรัมจากปลากะพงขาว หรือ BSA ที่เจือจาง 1:500 เท่าด้วย PBS มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 0.5 ไมโครลิตรต่อจุด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการแช่ในสารละลาย 5% blotto (5% นมปราศจากไขมันใน PBS) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตัดแบ่งกระดาษไนโตรเซลลูโลส บ่มกับน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตามด้วย goat-anti-mouse IgG heavy and light chain-specific horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP, BioRad) เจือจาง 1:3,000 เท่าใน 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลายซับสเตรทประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที นำไปล้างน้ำประปาหลายๆ ครั้ง คัดเลือกหลุมที่ปรากฏจุดสีดำจากบริเวณที่หยดซีรัมปลากะพงขาวไปทำการตรวจสอบความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินต่อไปด้วยวิธี Western blot จากนั้นทำการโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution แล้วทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาใช้ในการจำแนก class และ subclass ด้วยชุด Zymed's Mouse MonoAb ID (HRP) (Zymed, S. San Francisco, CA, USA) และทำการเก็บรักษาเซลล์ลูกผสมใน 12% dimethyl sulfoxide (DMSO) ละลายในอาหาร RPMI และเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -196 °C

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blot

นำซีรัมปลากะพงขาวมาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ด้วย PBS แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบเจือจาง 1:20 เท่าใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:3,000 เท่าใน 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเช่นกัน ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วแช่ด้วยสารละลายซับสเตรทเช่นเดียวกับวิธีการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot

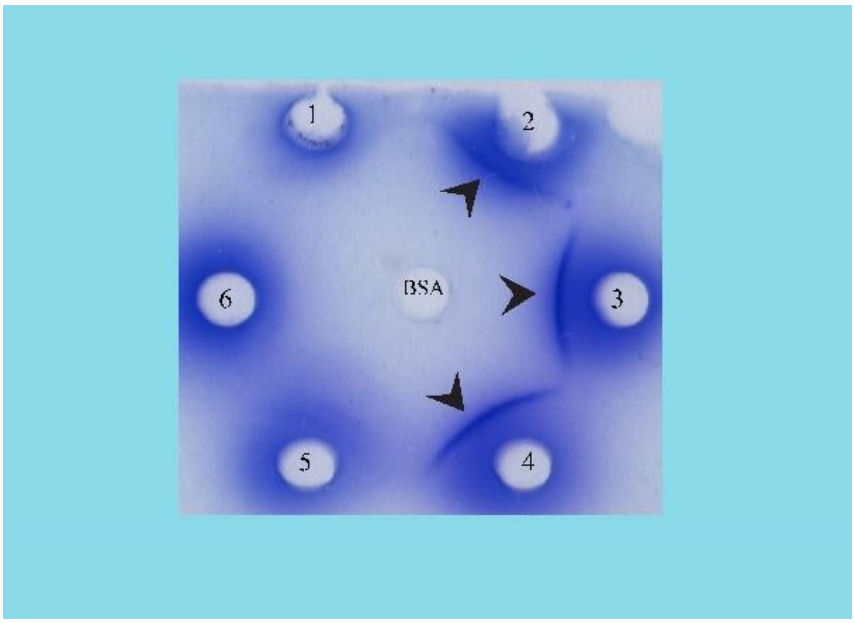
นำซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือซีรัมของปลานิลเจือจาง 1:100 เท่าใน PBS มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 15% SDS-PAGE เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 80 โวลต์ แบ่งเจลส่วนหนึ่งทำการย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 เจลอีกส่วนหนึ่งทำการย้ายแถบโปรตีนสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ใน 5%

blotto เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบเจือจาง 1:20 เท่าใน 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนล้าง PBS 3 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:3,000 เท่าใน 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้าง PBS เติมสารละลายซับสเตรตเช่นเดียวกับวิธี dot blot

ผลการวิจัย

การตรวจสอบการตอบสนองการปลูกภูมิคุ้มกันปลากะพงขาวด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

หลังจากทำการเก็บซีรัมจากปลามาทำการตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน BSA พบว่าปลาจำนวน 20 จาก 45 ตัว ให้ผลแถบตะกอนชัดเจนระหว่างหลุมที่ใส่โปรตีน BSA และหลุมที่ใส่ซีรัมของปลาแต่ละตัว (ภาพที่ 1) ทำการรวมซีรัมของปลาทั้งหมดที่ให้ผลบวกกับโปรตีน BSA มารวมกันเพื่อใช้ในการแยกอิมมูโนโกลบูลินของปลาต่อไป

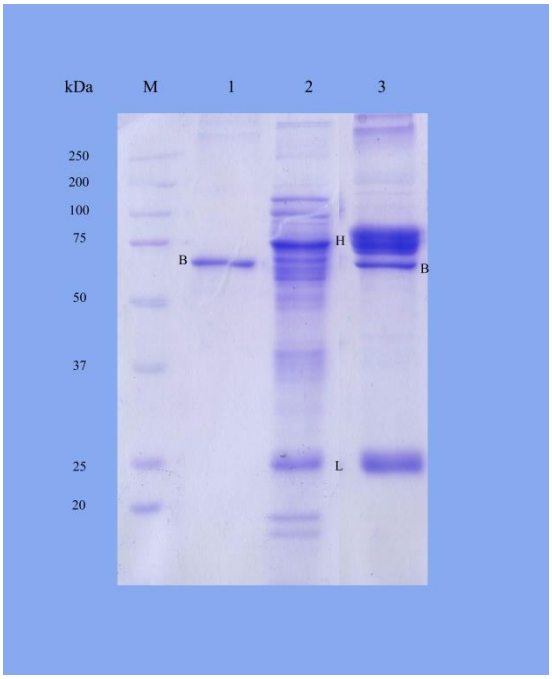


ภาพที่ 1 การทดสอบความจำเพาะของซีรัมจากปลากะพงขาวที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน BSA โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น ซีรัมของปลาแต่ละตัวถูกใส่ในหลุมต่างๆ (1-6) และโปรตีน BSA ใส่ไว้ในหลุมตรงกลาง หลังจากเกิดปฏิกิริยา และทำการย้อมสีแถบตะกอนระหว่างแอนติบอดีของปลากับโปรตีน BSA ซีรัมของปลาที่มีการตอบสนองสูงพบแถบตะกอน (หัวลูกศร) เกิดขึ้นระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมของปลากับหลุมที่ใส่โปรตีน BSA (หลุมที่ 2, 3 และ 4) และซีรัมของปลาที่มีการตอบสนองต่ำต่อโปรตีน BSA ไม่พบแถบตะกอนเกิดขึ้นระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมและโปรตีน BSA (หลุมที่ 1, 5 และ 6)

การตรวจสอบ Ig/BSA complex ด้วย SDS-PAGE

จากการนำซีรัมปลาที่ให้ผลบวกจากวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่นมาผสมกับโปรตีน BSA พบว่าได้ตะกอน Ig/BSA complex ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 3.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่า Ig/BSA

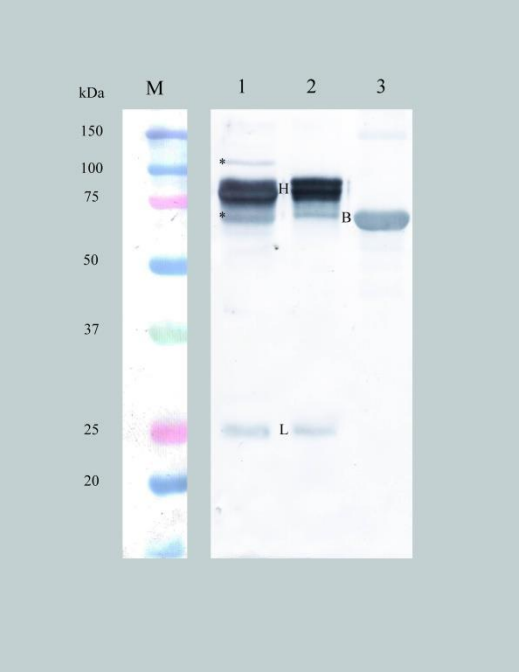
complex ประกอบด้วยโปรตีนสายยาวมีขนาดประมาณ 80 กิโลดาลตัน โปรตีนสายสั้นมีขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน และโปรตีน BSA ขนาด 60 กิโลดาลตัน และยังพบว่าในแถวของตะกอน Ig/BSA complex มีโปรตีนอื่นๆ ที่อยู่ในซีรัมของปลาปะปนบ้างเล็กน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแถวของซีรัมปลา (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การตรวจสอบองค์ประกอบของโปรตีนโดย SDS-PAGE (1) โปรตีน BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2) ซีรัมของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน และ (3) Ig/BSA complex M; โปรตีนมาตรฐาน H; โปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลิน L; โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลิน และ B; โปรตีน BSA

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blot

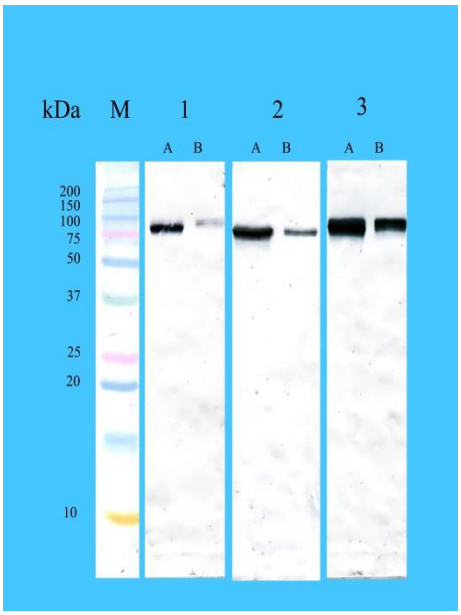
เมื่อนำตะกอน Ig/BSA complex ที่เตรียมได้ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว แล้วทำการเก็บซีรัมมาทำการทดสอบความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาด้วยวิธี Western blot พบว่าหนูทั้งหมดสามารถตอบสนองต่อโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลาได้อย่างจำเพาะ แต่มีหนูเพียง 2 ตัวที่สามารถจับจำเพาะกับโปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินของปลาได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการตอบสนองกับโปรตีนอื่นๆ ที่พบอยู่ในซีรัมของปลาและตอบสนองต่อโปรตีน BSA ที่เป็นส่วนประกอบของ Ig/BSA complex ด้วย (ภาพที่ 3) หนูที่มีการตอบสนองต่อโปรตีนสายยาวและสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลินได้ดีที่สุดถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี



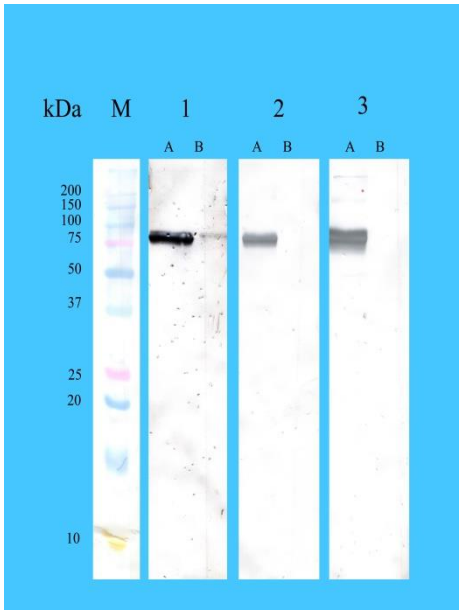
ภาพที่ 3 การตรวจสอบการตอบสนองของหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยตะกอน Ig/BSA complex ด้วยวิธี Western blot (1) ซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน (2) ตะกอน Ig/BSA complex และ (3) โปรตีน BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร M; โปรตีนมาตรฐาน H; โปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลิน L; โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลิน และ B; โปรตีน BSA *; โปรตีนอื่นๆ ภายในซีรัมปลา

<u>การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี</u>

จากการหลอมรวมบีเซลล์ของหนูกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวพบว่ามีเซลล์ลูกผสมจำนวน 3 โคลน สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลา ได้แก่ 4C7, 6H7 และ 15C8 โดยโคลน 4C7 และ 15C8 อยู่ในคลาส IgG1 และโคลน 6H7 อยู่ในคลาส IgG2a ทั้งสามโคลนสามารถจับจำเพาะกับโปรตีนสายยาวขนาดประมาณ 80 กิโลดาลตันของอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวได้ทั้งในซีรัมของปลาที่ไม่ได้ปลูกภูมิคุ้มกัน และตะกอน Ig/BSA complex (ภาพที่ 4) และพบว่าโคลน 4C7 สามารถแสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลานิลได้เล็กน้อย (ภาพที่ 5)



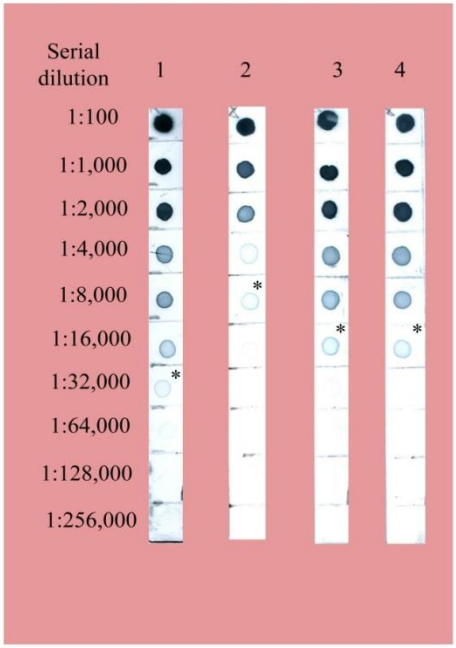
ภาพที่ 4 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวด้วยวิธี Western blot โดยทำการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวที่ผลิตได้ ได้แก่ (1) 4C7, (2) 6H7 และ (3) 15C8 M; โปรตีนมาตรฐาน A; ซีรัมของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน B; ตะกอน Ig/BSA complex



ภาพที่ 5 การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวกับซีรัมของปลานิล ด้วยวิธี Western blot โดยบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) 4C7, (2) 6H7 และ (3) 15C8 M; โปรตีนมาตรฐาน A; ซีรัมปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน B; ซีรัมปลานิล

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blot

เมื่อทำการเจือจางซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกัน และหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้วทำการบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ชนิดต่างๆ พบว่า โคลน 4C7, 6H7 และ 15C8 สามารถจับกับซีรัมของปลาที่เจือจางได้เท่ากับ 1:8,000, 1: 16,000 และ 1:16,000 ตามลำดับ โดยโคลน 6H7 และ 15C8 มีความไวในการจับกับซีรัมของปลาสูงกว่าโคลน 4C7 อยู่ 2 เท่า (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลากะพงขาวด้วยวิธี dot blot โดยทำการเจือจางซีรัมของปลาที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วบ่มด้วยโมโนโคลนแอนติบอดีแต่ละตัวดังนี้ (2) 4C7, (3) 6H7 และ (4) 15C8 เปรียบเทียบกับ (1) แอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว * แสดงระดับการเจือจางมากที่สุดที่แอนติซีรัมหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลาได้

วิจารณ์ผลการวิจัย

สำหรับกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อโปรตีนเป้าหมายนั้น ขั้นตอนในการเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์ถือว่ามีความสำคัญมาก ถ้าสามารถเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวให้มีความบริสุทธิ์สูงก็จะส่งผลให้มีโอกาสในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะและความไวในการจับกับแอนติเจนที่ต้องการได้ดีมากขึ้นไปด้วย ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวครั้งนี้จึงได้ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของอิมมูโนโกลบูลินออกจากโปรตีนอื่นๆ ในซีรัมของปลาก่อนแล้วนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว จากรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระดูกแข็งหลายชนิดพบว่ามีการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ได้หลากหลายวิธี โดยวิธีที่นักวิจัยเลือกใช้เป็นส่วนมากคือการอาศัยหลักการ chromatographic system (Al-Harbi *et al*., 2000; Crosbie &

Nowak, 2002; Yang *et al*., 2017, 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่อาศัยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทำให้ปลาสร้างอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ปลูกภูมิคุ้มกัน เพื่อให้ปลามีระดับของอิมมูโนโกลบูลินที่เพิ่มขึ้นก่อนทำการเก็บตัวอย่างเลือดมาใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ที่จำเพาะกับแอนติเจนเหล่านั้นได้ (Zhang *et al*., 2017) เช่น การปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน BSA แล้วใช้คอลัมน์ที่ทำการตรึงโปรตีน BSA ไว้ภายใน เพื่อทำการคัดแยกอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะกับโปรตีน BSA ออกจากโปรตีนอื่นๆ ในซีรัมของปลาได้ (Choudhury & Pani Prasad, 2011; Kreutz *et al*., 2016) ซึ่งวิธีการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินโดยอาศัยคอลัมน์โครมาโทรกราฟีนั้นมีราคาสูง การทดลองนี้จึงมีการใช้วิธีการ immunoprecipitation โดยใช้แอนติเจนทำการปลูกภูมิคุ้มกันในปลา เช่น โปรตีน BSA แล้วอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจน-แอนติบอดีมาใช้ในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของอิมมูโนโกลบูลินจากโปรตีนอื่นๆ ในซีรัมได้เช่นกัน (Soonthonsrima *et al*., 2017, 2018) ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีข้อดีคือราคาถูกและมีขั้นตอนในการเตรียมง่าย สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการ immunoprecipitation ในการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์บางส่วนจากการปลูกภูมิคุ้มกันปลาด้วยโปรตีน BSA แล้วนำซีรัมของปลาที่ได้มาทำการตรวจสอบการตอบสนองต่อด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น ซึ่งวิธีนี้ใช้อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการในการทดสอบจึงเป็นวิธีที่ง่าย รวมทั้งเหมาะสมกับการตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมาก จากนั้นจึงนำซีรัมปลาที่ให้ผลตะกอนที่ชัดเจนระหว่างโปรตีน BSA และซีรัมปลามาทำการตกตะกอนกับโปรตีน BSA พบว่าได้ตะกอนของอิมมูโนโกลบูลินของปลาและโปรตีน BSA หรือ Ig/BSA complex และเมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE พบว่าตะกอนที่ได้มีการปรากฏของแถบโปรตีน 3 แถบ ได้แก่ โปรตีนสายยาว โปรตีนสายสั้นของอิมมูโนโกลบูลิน และโปรตีน BSA ขนาดประมาณ 80, 25 และ 60 กิโลดาลตันตามลำดับ และพบโปรตีนอื่นๆ น้อยกว่าเมื่อเทียบกับซีรัมของปลา โดยโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับอิมมูโนโกลบูลินชนิด M ของปลากะพงขาวที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Choudhury & Pani Prasad, 2011) เมื่อนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเพื่อทำการผลิตแอนติซีรัมและทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลาทั้งจากตัวอย่างซีรัมปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันและตะกอนของ Ig/BSA complex โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้ยังสามารถจับกับโปรตีนอื่นๆ ที่ปรากฏในซีรัมได้บางส่วนและโปรตีน BSA ที่เป็นส่วนประกอบของตะกอน Ig/BSA complex ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน ดังนั้นวิธีการเตรียมแอนติเจนข้างต้นเพื่อนำมาใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวนั้นดีเช่นเดียวกับการใช้คอลัมน์ในการทำให้บริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ (Crosbie & Nowak, 2002)

หลังจากนำหนูขาวที่แสดงการตอบสนองได้ดีที่สุดมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และทำการคัดเลือกด้วยวิธี dot blot และวิธี Western blot พบว่าสามารถคัดเลือกเซลล์ลูกผสมได้ 3 โคลนที่สร้างแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนสายยาวจากตัวอย่างซีรัมของปลาที่ไม่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันและจากตะกอน Ig/BSA complex ซึ่งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินในปลากระดูกแข็งนั้นทำได้ง่ายกว่าโปรตีนสายสั้น เนื่องจากมีขนาดที่ใหญ่และมีความเป็นแอนติเจนมากกว่าสอดคล้องกับงานวิจัยในการผลิตแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของปลากระดูกแข็งหลายๆ ชนิด (Al-Harbi *et al*., 2000; Soonthonsrima *et al*., 2018; Yang *et al*., 2017) โดยเซลล์ลูกผสมโคลน 6H7 และ 15C8 มีความไวสูงในการจับจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลากระพงขาว อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตได้จากทั้ง 2 โคลนยังมีความไวต่ำกว่าความไวของแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากหนูขาวอยู่เล็กน้อยแต่สูงกว่าโคลน 4C7 ดังนั้นโคลน 6H7 และ 15C8 จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาหรือใช้ในการตรวจสอบปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินในซีรัมของปลาด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น dot blot, Western blot และ ELISA เพื่อใช้ในการติดตามหรือตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะในปลา

กะพงขาวหลังจากการได้รับวัคซีนต่อเชื้อก่อโรคที่สำคัญต่างๆ และเมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้จากทั้ง 3 โคลนไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของปลานิล พบว่าโคลน 4C7 มีการแสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของปลานิลได้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของปลานิล ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถแสดงปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนสายยาวของอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวได้เช่นกัน (Soonthonsrima *et al*., 2018)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้มีการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวโดยการปลูกภูมิคุ้มกันในปลาด้วยโปรตีน BSA ทำให้ปลามีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่เพิ่มสูงขึ้นและมีความจำเพาะต่อโปรตีน BSA เพื่อนำมาใช้ในการทำอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี immunoprecipitation ซึ่งตะกอน Ig/BSA complex ที่ได้มีความบริสุทธิ์และปริมาณมากพอสำหรับใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว จากการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตเซลล์ลูกผสมได้ 3 โคลนได้แก่ 4C7, 6H7 และ 15C8 ซึ่งมีความไวในการจับกับอิมมูโนโกลบูลินสูง สามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลินทั้งในรูปธรรมชาติและรูปเสียสภาพได้ จึงคาดว่าจะสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 โคลนไปพัฒนาวิธีการตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะหลังจากปลากะพงขาวได้รับวัคซีนต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2561 สัญญาเลขที่ 087/2562

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), 219-227. doi:https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00347-1

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

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

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

de Groof, A., Guelen, L., Deijs, M., van der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., van Grinsven, L., Simmerlink,B., Biermann, Y., Grisez, L., van Lent, J., de Ronde, A., Chang, S.F., Schrier, C. & van der Hoek, L. (2015). A Novel Virus Causes Scale Drop Disease in *Lates calcarifer*. *PLoS Pathog, 11*(8), e1005074. doi:10.1371/journal. ppat.1005074

Kayansamruaj, P., Dong, H. T., Nguyen, V. V., Le, H. D., Pirarat, N., & Rodkhum, C. (2015). Susceptibility of freshwater rearing Asian seabass (*Lates calcarifer*) to pathogenic *Streptococcus iniae*. *Aquaculture Research, 48*(2), 711-718. doi:10.1111/are.12917

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

Mashoof, S., & Criscitiello, F. M. (2016). Fish Immunoglobulins. *Biology, 5*(4). doi:10.3390/biology5040045

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

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

Soonthonsrima, T., Wangman, P., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2017). Production of Polyclonal Antibody Against Immunoglobulin of Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Burapha Science Journal, 22*(3), 596-605. (in Thai).

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

Thipduang, T. (2012). *The Concept of the Imported and Exported Seabass Control which passed theSouthern Fish Inspection station in* 2007-2009. Retrieved from Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives

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

Wangman, P., Siriwattanarat, R., Longyant, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2016). High sensitivity immunochromatographic strip test (ICP11 strip test) for white spot syndrome virus detection using monoclonal antibodies specific to ICP11 non-structural protein. *Aquaculture, 470*, 25-31. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.12.004

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