

ลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852) ที่เป็นโรค



นางสาวผ่องพรรณ ประสารก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0640-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF VIRUS ISOLATED FROM DISEASED
MARBLE GOBY

Oxyeleotris marmoratus (Bleeker, 1852)



Miss Pongpun Prasankok

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0640-5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852) ที่เป็นโรค

โดย

นางสาวผ่องพรรณ ประสารก

สาขาวิชา

สัตววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาลินี ฉัตรมงคลกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


ดร. สมเกียรติ กาญจนาคาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิชิตน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

๘ ..... ประธานกรรมการ

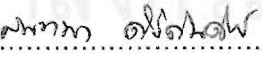
(ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาลินี ฉัตรมงคลกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. สมเกียรติ กาญจนาคาร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สอนทนา ศิริตันติกร)

ผ่องพรรณ ประสารก : ลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852) ที่เป็นโรค. (CHARACTERIZATION OF VIRUS ISOLATED FROM DISEASED MARBLE GOBY *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852)) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. มาลินี ฉัตรมงคลกุล, อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม: ดร. สมเกียรติ์ กาญจนาคาร; 98 หน้า ISBN 974-17-0640-5

โรคของปลาบู่ทรายที่ทำให้มีการตายสูงได้เกิดระบาดขึ้นที่จังหวัดนครปฐมซึ่งอยู่ในเขตภาคกลางของประเทศไทยในเดือนมีนาคม 2545 ปลาที่เป็นโรคมักมีอาการเป็นแผลหลุมตื้นข้างตัว และบริเวณริมฝีปาก จากการตรวจโรคไม่พบปรสิตภายนอก และปรสิตในเลือด ไม่สามารถสกัดแบคทีเรียจากอวัยวะภายในต่างๆ ได้แก่ ตับ ไต และน้ำมูกได้ ดังนั้นจึงนำปลาที่มีอาการของโรคจำนวน 3 ตัว มาทำการศึกษาเรื่องไวรัส โดยการฆ่าปลาและนำเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ และบริเวณที่เป็นแผลมาตรวจรวมกัน กรองเนื้อเยื่อที่บดนี้ผ่านแผ่นกรอง ขนาด 0.45 μ แล้วนำไปใส่ในเซลล์ *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) ที่เพาะเลี้ยงไว้ที่ 25 °C ในระยะแรกของการติดเชื้อ ไวรัสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและการตายของเซลล์เป็นวงกว้าง เมื่อนำไวรัสไปบ่มด้วยสาร IUdR และคลอโรฟอร์ม ไวรัสไตเตอร์มากกว่า 6 และ 7 log₁₀ TCID₅₀/ ml แสดงว่าไวรัสมีจีโนมเป็นชนิดดีเอ็นเอและมีเปลือกหุ้ม จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน พบไวรัสมีนิวคลีโอแคปซิดเป็นรูป 6 เหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 132.49 ± 7.77 nm ซึ่งพบอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ จากลักษณะสมบัติเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าไวรัสชนิดใหม่ที่สุดที่สกัดได้นี้เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในวงศ์ *Iridoviridae* ไวรัสจากปลาบู่ทรายเจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลาได้แก่ bluegill fry (BF-2), EPC, fathead minnow (FHM), brown bullhead (BB), striped snakehead whole fry tissue (SSN-1), และ discuss tail (DT) และเซลล์เพาะเลี้ยงสัตว์เลื้อยคลาน 2 ชนิดได้แก่ soft-shelled turtle embryo (STE) และ Siamese crocodile embryo (SCE) ที่อุณหภูมิ 25-30 °C โดยเจริญได้ดีที่สุดในเซลล์เพาะเลี้ยง BF-2 โดยมีค่าไวรัสไตเตอร์สูงถึง 9.2 log₁₀ TCID₅₀/ml ไวรัสรุ่นลูกถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ หลังจากการติดเชื้อ 15 ชั่วโมง มีความไวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 56 °C จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน major capsid protein ของไวรัสสกุล *Ranavirus* พบว่า ได้ผลผลิตพีซีอาร์ เหมือนกับไวรัสในสกุล *Ranavirus* จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบของแถบโปรตีน รูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี และการเรียงลำดับเบสของยีน แสดงให้เห็นว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายคล้ายกับไวรัส *Rana trigrina ranavirus* จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า ไวรัสจากปลาบู่ทรายเป็น Iridovirus และอาจเป็นสาเหตุของโรคในปลาบู่ทรายและมีลักษณะสมบัติคล้ายกับไวรัสสกุล *Ranavirus* มากที่สุด และได้ตั้งชื่อไวรัสนี้ว่า *Oxyeleotris marmoratus ranavirus* หรือ OMRV

ภาควิชา ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา สัตววิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

KEY WORD: IRIDOVIRIDAE/ MARBLE GOBY/ RANAVIRUS

PONGPUN PRASANKOK: CHARACTERIZATION OF VIRUS ISOLATED FROM DISEASED MARBLE GOBY *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852). THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. DR. MALINEE CHUTMONGKONKUL, THESIS COADVISOR: DR. SOMKIAT KANCHANAKHAN. 98 pp. ISBN 974-17-0640-5

A high mortality disease of culture marble goby, *Oxyeleotris marmoratus* occurred in Nakorn Pathom province, Central Thailand in March 2000. The diseased fish exhibited minor ulcer lesions on the body and around mouth area. No external parasites and blood parasites were observed. No bacteria could be isolated from internal organs, livers, kidneys and spleen. Three diseased fish were used for virological investigation. Each fish was sacrificed and internal organs and ulcers were pooled as one extract sample. The tissue extracts were filtered through 0.45 micron then inoculated on to *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line at 25°C. The viruses induced round plaque in EPC line during early infection. Virus titres were decreased over 6 Log₁₀ TCID₅₀/ml when incubated with IUdR or chloroform indicating DNA genome and enveloped virus particle. Transmission electron micrograph indicated numerous icosahedral symmetry of nucleocapsid with 132.49 ± 7.77 nm in diameter, which located in cytoplasm. Above properties indicate the new virus isolate can be classified as a virus member of the Family *Iridoviridae*. This virus propagated well in fish cell lines namely, bluegill fry (BF-2), EPC, fathead minnow (FHM), brown bullhead (BB), striped snakehead whole fry tissue (SSN-1) and discuss tail (DT) and 2 reptile cell lines namely, Siamese crocodile embryo (SCE), soft-shelled turtle embryo (STE) at 25-30°C. The highest virus titres up to 9.2 Log₁₀ TCID₅₀/ml obtained from BF-2 line. New virions released from EPC cells about 15 hr. post-infection. The virus isolate was sensitive to heat at 56°C. The virus showed similar to genus *Ranavirus* strain FV3 using polymerase chain reaction (PCR) for which the primers designed from the major capsid protein gene. Comparison of viral protein profile, restriction endonuclease digestion pattern, antibody relationship and sequence analysis of the maior capsid protein gene showed that the virus isolate closely related to *Rana trigrina* ranavirus. Findings indicated that the virus is an Iridovirus, may be a causative agent and is most likely to be a strain of *Ranavirus*. This virus was temporally named as *Oxyeleotris marmoratus* ranavirus or OMRV.

Department BIOLOGY

Field of study ZOOLOGY

Academic year 2001

Student's signature.....

Advisor's signature

Co-Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์

ดร. มาลินี ฉัตรมงคลกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ ดร. สมเกียรติ กาญจนาคาร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำ ให้ข้อคิดเห็น ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือและความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนทนา ศิริตันติกร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาช่วยให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. สุปรานี ชินบุตร ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำที่กรุณาให้การสนับสนุนด้านเงินทุน เอื้อเพื่ออุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ทำให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ Government of Japan-Trust Fund (Fish Disease Project) ที่มีส่วนร่วมในการสนับสนุนด้านเงินทุนในการวิจัย

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงลัดดา ตรงวงศา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนในการทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณสมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ที่กรุณาให้ตัวอย่างไวรัสสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณเรวัต คงประดิษฐ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล จังหวัดสงขลา ที่กรุณาให้ตัวอย่างไวรัสสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอุมาลัย สะดวกดี และ คุณอรัญญา กรีธาชาติ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณธรรมบุญ จตุรพาหุ ที่กรุณาให้คำแนะนำในหลายๆเรื่องเกี่ยวกับการวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่น้อง ในภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เต็มใจให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดี

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ซึ่งให้การสนับสนุนด้านการศึกษาให้ค่าซึ่งเป็นที่ประโยชน์ สนับสนุนด้านการเงิน ความรัก และกำลังใจเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตการศึกษา.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 สํารวจเอกสาร	
ชีววิทยาของปลาบู่ทราย.....	3
โรคในปลาบู่ทราย.....	4
โครงสร้างของไวรัส.....	4
การจัดจำแนกไวรัส.....	5
เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา.....	8
ไวรัสวงศ์ <i>Iridoviridae</i>	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ	
อุปกรณ์.....	19
วัสดุ.....	19
สารเคมี.....	20
เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา.....	22
ไวรัสที่นำมาศึกษาสำหรับเปรียบเทียบกับไวรัสจากปลาบู่ทราย.....	22
การแยกสกัดเชื้อไวรัสออกจากปลาบู่ทราย.....	23
การทำไวรัสไตเตรชันเพื่อหาปริมาณของเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทราย.....	24
ศึกษาลักษณะสมบัติของไวรัสจากปลาบู่ทราย.....	25
1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไวรัสจากปลาบู่ทราย.....	25
2. ลักษณะสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของไวรัสจากปลาบู่ทราย.....	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. การศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิดของไวรัสจากปลาน้ำจืด (Identification).....	28
บทที่ 4 ผลการศึกษา	
การแยกสกัดเชื้อไวรัสจากปลาน้ำจืด.....	38
ลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาน้ำจืด	
1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไวรัส.....	38
2. ลักษณะสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของไวรัสจากปลาน้ำจืด.....	44
3. การศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิดของไวรัสจากปลาน้ำจืด.....	53
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการศึกษา.....	81
ข้อเสนอแนะ.....	82
รายการอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	91
ภาคผนวก ข.....	96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	98

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ปลาบู่ทราย <i>Oxyeleotris marmoratus</i> (Bleeker, 1852).....	3
ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของอนุภาคไวรัสในวงศ์ <i>Iridoviridae</i>	11
ภาพที่ 3 ตำแหน่งหลุมต่างๆในภาคหลุมชนิด 96 หลุม.....	24
ภาพที่ 4 ลักษณะของปลาบู่ทรายที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดนครปฐม.....	39
ภาพที่ 5 ลักษณะของปลาบู่ทรายที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดนครปฐม.....	40
ภาพที่ 6 การเกิด cytopathic effect ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC.....	41
ภาพที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านแสดงไวรัสกำลังปลดปล่อยจาก เซลล์เพาะเลี้ยง EPC.....	42
ภาพที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านแสดงไวรัสภายในไซโตพลาสซึม ของเซลล์เพาะเลี้ยง EPC.....	43
ภาพที่ 9 กราฟแท่งเปรียบเทียบการยอมรับการติดเชื้อของไวรัสจากปลาบู่ทรายต่อเซลล์เพาะ เลี้ยงชนิดต่างๆ; BB, FHM, BF-2, DT, SSN-1, EPC, STE และ SCE	45
ภาพที่ 10 การเกิด cytopathic effect จากเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด ต่างๆ.....	46
ภาพที่ 11 การเกิด cytopathic effect จากเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด ต่างๆ.....	47
ภาพที่ 12 ปริมาณไวรัสจากปลาบู่ทรายที่ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ที่ อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C	49
ภาพที่ 13 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายตั้งแต่เริ่มติดเชื้อจนถึงการปลดปล่อยเชื้อ ไวรัสจากเซลล์เจ้าบ้าน (One-Step Growth Cycle) ที่เวลาต่างๆ.....	52
ภาพที่ 14 รูปแบบโปรตีนของไวรัสชนิดต่างๆ เมื่อย้อมด้วยสี coomassie blue.....	55
ภาพที่ 15 ผลปฏิกิริยาจำเพาะโดยวิธี Western blot ของแอนติซีรัมต่อไวรัสจากปลาบู่ทรายกับ องค์ประกอบโปรตีนของไวรัสชนิดต่างๆที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE.....	57
ภาพที่ 16 ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 bp ของยีน major capsid protein ของเชื้อ ไวรัสจากปลาบู่ทราย ที่ปริมาณ DNA template ต่างกัน โดยมีความเข้มข้นของ MgCl ₂ 1.5 mM และ primer 0.4 μM บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide.....	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 17 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 300 bp ของยีน major capsid protein ของเชื้อไวรัสจาก ปลาบู่ทรายเมื่อปริมาณ primer ต่างกัน โดยมีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5 mM และ DNA template 0.435 $\mu g/\mu l$ บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide...	60
ภาพที่ 18 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 300 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆ มี ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5 mM และ primer 0.4 μM บน 1% agarose gel ย้อม ด้วย ethidium bromide.....	62
ภาพที่ 19 ลำดับเบสของยีน major capsid protein ขนาด 300 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร และไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด.....	63
ภาพที่ 20 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิด ต่างๆ มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5 mM และ primer 0.4 μM บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide.....	64
ภาพที่ 21 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamH I</i> และ <i>Msp I</i>	66
ภาพที่ 22 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Mbo II</i>	67
ภาพที่ 23 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Alu I</i>	68
ภาพที่ 24 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sau3A I</i>	69
ภาพที่ 25 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดจีโนมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamH I</i>	71
ภาพที่ 26 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดจีโนมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xba I</i>	72
ภาพที่ 27 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดจีโนมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoR I</i>	73
ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง electrophoretic mobility และ มวล โมเลกุลมาตรฐานชนิด Broad range	94
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง electrophoretic mobility และมวล โมเลกุลมาตรฐานชนิด Kaleidoscope prestain standard.....	95

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลสำหรับการหา 50% tissue culture infective dose (TCID ₅₀).....	9
ตารางที่ 2 สิ่งมีชีวิตที่พบไวรัสในวงศ์ <i>Iridoviridae</i>	13
ตารางที่ 3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อปริมาณ DNA template ต่างกัน.....	33
ตารางที่ 4 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อปริมาณ primer ต่างกัน.....	34
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของขนาดนิวคลีโอแคปซิด และแกนกลางของไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ ทราย.....	38
ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ย Log ₁₀ TCID ₅₀ / ml ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C (mean±SD).....	48
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่า Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml ของไวรัสจากปลาบู่ทรายที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30°C.....	50
ตารางที่ 8 ค่าความหนาแน่น (g/cm ³) ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus.....	53
ตารางที่ 9 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุด QIAamp DNA Mini kit.....	58

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปลานู๋ทราย *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852) จัดเป็นปลาที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่งและเป็นสินค้าออกอย่างหนึ่งที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศ เนื่องจากเป็นปลาที่ได้รับความนิยมจากประชาชนผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ มีราคาค่อนข้างสูง ให้ผลตอบแทนและคุ้มค่าต่อการลงทุน ปลานู๋เป็นปลาที่เลี้ยงเพื่อขายเป็นอาหาร หรือเลี้ยงเป็นปลาสวยงามก็ได้ ประเทศที่มีการนำเข้าปลานู๋ทรายจำนวนมากได้แก่ ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน ฮองกง สิงคโปร์ และมาเลเซีย (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์, 2543) พื้นที่ที่ทำการเพาะเลี้ยงส่วนมากอยู่ในเขตภาคกลาง ตั้งแต่จังหวัดนครสวรรค์ อุทัยธานี เรื่อยมาจนถึงปทุมธานี การเลี้ยงส่วนมากจะเลี้ยงในกระชังตามแม่น้ำต่างๆ ปัจจุบันการเพาะพันธุ์และการอนุบาลลูกปลานู๋ทรายยังประสบปัญหาอย่างมาก ส่วนใหญ่ลูกปลาที่นำมาเลี้ยงจะจับได้จากธรรมชาติ

ปลานู๋ทรายเป็นปลาที่สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย ในหลายประเทศโดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และหมู่เกาะมลายู ได้แก่ บอร์เนียว อินโดนีเซีย มาเลเซีย จีนและไทย (กำธร โพธิ์ทองคำ, 2514) สำหรับประเทศไทยพบทั่วไปตามแม่น้ำลำคลอง และ อ่างเก็บน้ำต่างๆทั่วทุกภาค เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา ปากน้ำโพ บึงบอระเพ็ด แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำลพบุรี อ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น อ่างเก็บน้ำเขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำเขื่อนสิริกิติ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ และ อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี (ไพศาล ต้นโพธิ์ และคณะ, 2519; สันติ หล่มระฤก และคณะ, 2522; เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, 2512; สันทนา ดวงสวัสดิ์ และคณะ, 2535)

เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมาเกษตรกรที่ทำการเพาะเลี้ยงปลานู๋ทรายได้ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคในหลายพื้นที่ ทำความเสียหายให้กับผู้เพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก ปลาที่ป่วยเป็นโรคจะมีอาการใกล้เคียงกันคือ เป็นแผลทั่วไปตามลำตัวและส่วนหัว มีสีซีด มีอาการซึม และตายในที่สุด เมื่อทำการเก็บตัวอย่างปลาที่ป่วยจาก จังหวัดนครปฐม เมื่อปี 2543 มาทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสที่สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ พบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากตัวอย่างปลาที่เก็บมา ในขณะที่ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ แสดงว่าการที่ปลาตายเป็นจำนวนมากอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลานู๋ทรายที่ป่วยจากจังหวัดนครปฐม คาดว่าข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบว่า ไวรัสที่พบเป็นไวรัสกลุ่มใด ความรู้ต่างๆที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวินิจฉัย เพื่อการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดขึ้นจากไวรัสชนิดนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทรายที่ป่วยจากจังหวัดนครปฐม
2. เปรียบเทียบลักษณะสมบัติบางประการของเชื้อไวรัสที่แยกจากปลาบู่ทรายกับไวรัสอื่นในวงศ์เดียวกัน

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852) ที่ป่วยเป็นแผลตามตัวจากจังหวัดนครปฐม
2. เปรียบเทียบลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกจากปลาบู่ทรายกับไวรัสอื่นในวงศ์เดียวกัน ที่แยกได้จากสัตว์ในประเทศ เช่น ไวรัส *Tiger frog iridovirus* (Kanchanakhan *et al.*, 1999), ไวรัส *Grouper iridovirus* (จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัตร คงประดิษฐ์, 2539) และไวรัส *Seabass iridovirus* (เรวัตร คงประดิษฐ์ และ จิราพร เกษรจันทร์, 2538)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบชนิดของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในปลาบู่ทราย
2. นำความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลช่วยในการศึกษาโรคที่เกิดขึ้นในปลาบู่ทราย โดยเฉพาะโรคติดเชื้อไวรัสและการพัฒนาหาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสในปลาได้อย่างรวดเร็วแทนการเพาะเชื้อในเซลล์ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของปลาบู่ทราย

ปลาบู่ทรายสามารถจำแนกตามลักษณะทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Nelson, 1994)

Phylum Chordata

Class Osteichthyes

Order Perciformes

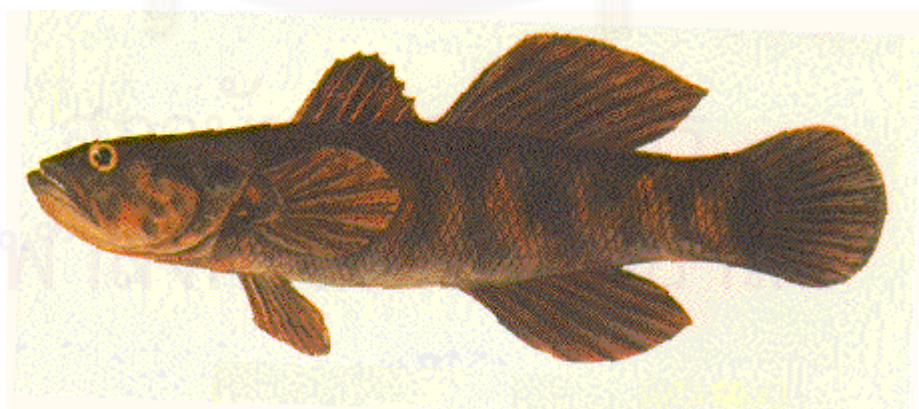
Suborder Gobioidi

Family Eleotridae

Genus *Oxyeleotris*

Species *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852)

ปลาบู่ทรายมีลักษณะลำตัวกลมยาว หัวค่อนข้างโตและด้านบนของหัวแบนราบ หัวมีจุดสีดำประปราย ปากกว้างใหญ่ ขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบน ครีบหูและครีบหางมีลักษณะกลมมนใหญ่ มีลวดลายดำสลับขาว ครีบหลังมี 2 ครีบ ครีบอันหน้าสั้นเป็นหนาม ครีบอันหลังเป็นก้านครีบอ่อน 11 ก้าน ครีบท้องหรือครีบอกอยู่แนวเดียวกับครีบหู และมีก้านครีบอ่อน 5 ก้าน ครีบอกของปลาบู่ทรายใน Family Eleotridae แยกจากกันอย่างสมบูรณ์ ครีบกันอยู่ในแนวเดียวกันกับครีบหลังอันที่ 2 มีก้านครีบอ่อน 7 ก้านและมีความยาวครีบเท่ากับครีบหลังอันที่ 2 ส่วนของครีบมีลายสีน้ำตาลดำแดงสลับขาวเป็นแถบๆ และมีจุดสีดำกระจายทั่วไป ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852)
(สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์, 2540)

2. โรคในปลาตู้ทราย

โรคที่เกิดในปลาตู้ทรายเกิดจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ โรคที่เกิดจากปรสิตภายนอกและปรสิตภายใน โรคจากปรสิตภายนอกเกิดจากสัตว์ใน Kingdom Animalia, Phylum Arthropoda, Phylum Mollusca, Phylum Plathyhelminthes และสิ่งมีชีวิตใน Kingdom Protista ได้แก่พวกโปรโตซัว เช่น *Lernaea* sp. เป็นพวก arthropod จะพบมากตามซอกเกล็ด ครีบ และในช่องปาก ดูดเลือดเป็นอาหารทำให้ปลาอ่อนแอ *Ergasilus* sp. เป็นพวก arthropod พบตามซี่เหงือก ถ้าเกาะนานๆ จะทำให้เหงือกกร่อน ก่อให้เกิดปัญหากับระบบหายใจ Glochidea เป็นตัวอ่อนของหอย 2 ฝา เกาะอยู่ตามซี่เหงือกทำให้ลดพื้นที่ในการแลกเปลี่ยนออกซิเจน *Henneguya* sp. เป็นพวกโปรโตซัว โดยปกติพบเป็น cyst ลักษณะเป็นเม็ดสีขาวขุ่น รูปร่างกลมฝังตัวบริเวณซี่เหงือก *Dactylogyrus* sp. เป็นปรสิตปลิงใสพบเกาะตามผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบพวกโปรโตซัวอื่นๆ เช่น *Epistylis* sp. และ *Chilodonella* sp. ส่วนโรคจากปรสิตภายในเกิดจากสัตว์ใน Phylum Nematoda และ Acanthocephala ได้แก่ พยาธิตัวกลม พยาธิหัวหนาม อาการของปลาตู้ทรายที่มีพยาธิเหล่านี้ คือ เกล็ดหลุด เหงือกซีด บางครั้งพบจุดขาวๆ กระจายทั่วไป นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *Saprolegnia* sp. ขึ้นเป็นกระจุก มีแขนงมากมาย บริเวณผิวหนัง เชื้อรานี้จะฝังลึกเข้าไปในเนื้อเยื่อ ทำให้เกล็ดหลุด เกิดบาดแผล (ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, 2525) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปลาตู้ทรายตายเป็นจำนวนมากได้แก่ *Aeromonas hydrophila* (สุปราณี ชินบุตร และคณะ, 2529) ลักษณะอาการที่พบ คือ ท้องบวม ตาโปน มีแผลเป็นตามลำตัว เกิดน้ำเหลืองในช่องท้อง ไตบวม นอกจากนี้ยังพบโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองและโรคตับโต ลักษณะอาการที่พบ คือ แผ่นปิดเหงือกเริ่มกางออกเนื่องจากโคนครีบบวมพองขึ้นมาคล้ายกับก้อนเนื้อ (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ สุปราณี ชินบุตร, 2527) นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อไวรัส สกุล *Birnavirus* (Hedrick *et al.*, 1986) อีกด้วย

3. โครงสร้างของไวรัส (พิไลพันธ์ พุรวัดนะ, 2540)

อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย

1. จีโนม (genome) ซึ่งมีกรดนิวคลีอิกทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม ไวรัสมีกรดนิวคลีอิกเพียงชนิดเดียว คือ เป็น ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid) หรือ อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid)
2. แคปซิด (capsid) เป็นส่วนที่หุ้มจีโนมของไวรัสประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีน แคปซิดและกรดนิวคลีอิกรวมกันเรียกว่า นิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) และคำว่าแกนกลางของไวรัส (core) หมายถึงส่วนที่ประกอบด้วยแคปซิดล้อมรอบจีโนมซึ่งขดรวมอยู่กับโปรตีนที่อยู่ภายในไวรัส (internal protein)

3. เปลือกหุ้ม (envelope) พบในไวรัสบางชนิด เปลือกหุ้มของไวรัสมีองค์ประกอบของไขมันและโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งพัฒนามาจากผนังเซลล์ของเจ้าบ้าน โดยทั่วไปจะมีไกลโคโปรตีนของไวรัสแทรกอยู่ในเยื่อหุ้มนั้น
4. โปรตีนที่อยู่ภายในไวรัส (internal protein) ประกอบด้วยเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับกลไกการเพิ่มจำนวนของไวรัส

4. การจัดจำแนกไวรัส

การจัดจำแนกไวรัสออกเป็นหมวดหมู่ได้ถูกพัฒนาให้มีหลักเกณฑ์การจัดจำแนกตาม

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (พิไลพันธ์ พุทธิวัฒน์ และคณะ, 2540) ซึ่งมีลำดับลงไปดังนี้

1. Order เป็นการจัดไวรัสเป็นกลุ่มใหญ่ ประกอบด้วยไวรัสจากหลาย Family มีคำต่อท้ายว่า -virales ซึ่งมีลักษณะทั่วไปเหมือนกัน ปัจจุบันจัดได้ 1 อันดับ คือ *Mononegavirales* ซึ่งประกอบด้วย Family *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* และ *Filoviridae*
2. Family ซึ่งมีคำต่อท้ายว่า -viridae ไวรัสที่จัดอยู่ใน Family เดียวกัน จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน จีโนมเป็นกรดนิวคลีอิกชนิดเดียวกันและวิธีเพิ่มจำนวนแบบเดียวกัน จาก Family สามารถแบ่งย่อยได้เป็น Subfamily ซึ่งจะมีอักษรต่อท้ายว่า -virinae
3. Genus ชื่อของสกุลจะมีอักษรต่อท้ายว่า -virus ไวรัสที่อยู่ในสกุลเดียวกันจะมีลักษณะบางอย่างร่วมกัน
ชื่อของ Order, Family, Subfamily และ Genus จะเขียนด้วยอักษรตัวเอนโดยมีอักษรแรกของชื่อเป็นอักษรตัวใหญ่
4. Species การเรียกชื่อสปีชีส์มักจะใช้ชื่อสามัญและจำแนกตามชนิดของเจ้าบ้านและเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ

การจำแนกลักษณะทางอนุกรมวิธานของไวรัสอาศัยลักษณะดังนี้

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 - 1.1 รูปร่างและขนาดของไวรัส ไวรัสโดยทั่วไปมีขนาดเล็กตั้งแต่ 20-300 nm
 - 1.2 การเรียงตัวเป็นแคปซิด
 - 1.3 การมีหรือไม่มีเปลือกหุ้ม
 - 1.4 ส่วนยื่นออกไปโดยรอบเปลือกหุ้ม (spike)
2. ลักษณะสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของไวรัส
 - 2.1 น้ำหนักโมเลกุล buoyant density และ sedimentation coefficient

2.2 การทนต่อกรด ความร้อน ประจุ (cation) ผงซักฟอก รังสี และสารละลายต่างๆ
เมื่อไวรัสอยู่ภายนอกเซลล์ความสามารถในการติดเชื้อจะค่อยๆถูกทำลายไปใน
สิ่งแวดล้อม พวกที่มีเปลือกหุ้มจะสูญเสียสภาพได้ง่ายกว่าพวกที่ไม่มีเปลือกหุ้ม

2.3 ลักษณะของจีโนม ได้แก่

- การมีจีโนมเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ
- ขนาดและความยาวของจีโนม
- เป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่
- เป็นเส้นตรงหรือเป็นวงกลม
- ถ้าเป็นท่อนมีจำนวนและความยาวเท่าใด
- มีขั้วเป็นบวกหรือลบ
- ลำดับนิวคลีโอไทด์
- G-C content
- การมีเบสเรียงซ้ำๆกันบนสายดีเอ็นเอ (repetitive sequence elements)
- การมี isomerization
- การมีหรือไม่มีและชนิดของ 5'- terminal cap
- การมีหรือไม่มี 5'- terminal covalently -linked protein
- การมีหรือไม่มี 3'- terminal poly (A) tract

2.4 สมบัติของโปรตีน

โปรตีนพบที่เป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้มของเปลือกหุ้มแคปซิดและเอนไซม์ต่างๆ
สมบัติของโปรตีนที่ศึกษา ได้แก่

- จำนวน ขนาดและหน้าที่ของโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบกันเป็นอนุภาคของไวรัส
- จำนวน ขนาดและหน้าที่ของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างซึ่งเป็นโปรตีนของไวรัสที่พบได้ในเซลล์ขณะที่ไวรัสทำการเพิ่มจำนวน เช่น เอนไซม์ต่างๆ
- การมีโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษต่างๆ เช่น transcriptase, reverse transcriptase, hemagglutinin, neuraminidase และ fusion activities
- ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน
- การมี glycosylation และ phosphorylation
- epitope mapping

2.5 สมบัติของไขมัน ได้แก่ ปริมาณ ชนิดและอื่นๆ

ไขมันพบในส่วนของเปลือกหุ้ม

2.6 สมบัติของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ปริมาณ ชนิดและอื่นๆ

คาร์โบไฮเดรตคือ ส่วนที่เป็นน้ำตาลของไกลโคโปรตีนมักเป็น oligosaccharide ที่ประกอบด้วย monosaccharide 10-15 ตัว

2.7 การเรียงตัวของยีนในจีโนม (genome organization) และการเพิ่มจำนวน ได้แก่

- การจัดลำดับยีน
- วิธีการเพิ่มจำนวน
- จำนวนและตำแหน่งของ open reading frame
- การลอกทรานสคริปต์ (transcription) และการถอดรหัส (translation)
- Post-translational processing
- ตำแหน่งภายในเซลล์ที่ไวรัสประกอบเป็นอนุภาค (assembly)
- ตำแหน่งและวิธีการที่ไวรัสเกิดเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ (maturation) และการออกจากเซลล์

2.8 สมบัติของแอนติเจน ได้แก่ สมบัติทาง serology

2.9 สมบัติทางชีววิทยา ได้แก่

- ความจำเพาะต่อเจ้าบ้าน (host range) ในธรรมชาติ
- วิธีการติดต่อในธรรมชาติ การมีพาหะ
- สภาวะภูมิศาสตร์ที่พบไวรัส
- การก่อโรค (pathogenesis)
- ความสามารถของไวรัสที่จะติดเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อ (tissue tropism) พยาธิสภาพและพยาธิวิทยา

5. เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา

5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture หรือ tissue culture)

วิธีนี้ทำได้โดยนำเซลล์จากสัตว์มาทำการเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ในขั้นแรกทำการย่อยเซลล์จากเนื้อเยื่อสัตว์โดยใช้เอนไซม์ trypsin เซลล์เดี่ยวที่แยกได้นำมาเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม เซลล์ดังกล่าวสามารถเกาะบนพื้นผิว (substrate) ที่ใช้เลี้ยงเจริญเพิ่มจำนวน โดยการแบ่งเซลล์และแผ่ไปรอบด้านตามพื้นผิวภาชนะจนได้เป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) เซลล์เหล่านี้สามารถนำมาขยายให้มีจำนวนเซลล์มากขึ้น โดยการย้ายเซลล์ (subculture) บางส่วนออกไปอยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ใบใหม่ การย้ายเซลล์ดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ trypsin ย่อยรอยต่อระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ง่ายต่อการย้ายเซลล์ไปในภาชนะและอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เซลล์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีประโยชน์มากในด้านการตรวจแยกเชื้อไวรัส การผลิตวัคซีนและการศึกษาทางชีวเคมีของไวรัส

5.2 การตรวจหาการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

การเพิ่มจำนวนของไวรัสสามารถประเมินได้จากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เจ้าบ้านหรือ cytopathic effect ไวรัสโดยทั่วไปจะทำลายหรือฆ่าเซลล์ที่เข้าไปเจริญหรือเพิ่มจำนวน ดังนั้นเซลล์ที่มีไวรัสเข้าไปเพิ่มจำนวนจะค่อยๆมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ บริเวณที่ถูกทำลายจะค่อยๆขยายออกไปเมื่อไวรัสรุ่นลูกหลุดออกมาจากเซลล์ ซึ่งอนุภาคไวรัสที่สร้างใหม่ก็จะเข้าไปทำลายเซลล์อื่นๆต่อไป ลักษณะที่พบได้บ่อยในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสได้แก่ ลักษณะเซลล์ที่กลมขึ้น เซลล์ที่ตายจะหลุดออกจากผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังอาจพบแวคคิวโอลในไซโตพลาสซึมและพบสารสะสมภายในเซลล์ (inclusion body) โดยทั่วไปไวรัสส่วนใหญ่จะมีลักษณะ cytopathic effect ซึ่งค่อนข้างจำเพาะต่อกลุ่มของไวรัส

5.3 วิธีการคำนวณปริมาณไวรัสโดยใช้วิธีคำนวณของ Karber (1931)

การหาปริมาณไวรัสวิธีหนึ่งที่นิยมกันมากคือ การหาปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงตายหรือมีการเปลี่ยนแปลงไปครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด หรือ TCID₅₀ (tissue culture infected dose at 50%) ทำได้โดยเจือจางสารละลายไวรัสตั้งต้น (virus suspension) เป็นลำดับไป (serial dilution) ซึ่งอาจใช้วิธีการเจือจางครั้งละ 10 เท่า หลายๆความเจือจางแล้วนำผลที่ได้แต่ละความเจือจางมารวมกันเพื่อคำนวณ 50% end point (TCID₅₀) ซึ่งมีสมการดังนี้

$$\text{Mean Log}_{10} \text{TCID}_{50} = x + 1/2(d) - d [\sum(r/n)]$$

X = ค่า Log ของความเจือจางที่สูงที่สุด

d = ค่า Log ของระยะห่างระหว่างความเจือจาง

r = จำนวนหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ปรากฏ cytopathic effect ในแต่ละความเจือจาง

n = จำนวนหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละความเจือจาง

ยกตัวอย่างดังตารางที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ข้อมูลสำหรับการหา 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)

หลุมที่	ความเจือจาง					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	-

+ = หลุมที่เกิด cytopathic effect

- = หลุมที่ไม่เกิด cytopathic effect

Reciprocal dilution	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
ค่า Log ของความเจือจาง	1	2	3	4	5	6
r=จำนวนหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ปรากฏ cytopathic effect ในแต่ละความเจือจาง	0	0	0	2	4	5
n=จำนวนหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละความเจือจาง	5	5	5	5	5	5

$$\text{Mean log}_{10} \text{TCID}_{50} = 6 + 0.5 \cdot 1 \cdot (0/5 + 0/5 + 0/5 + 2/5 + 4/5 + 5/5)$$

$$= 6.5 \cdot 1 \cdot (11/5)$$

$$= 4.3$$

$$\text{ดังนั้นปริมาณไวรัส} = 10^{4.3} \text{TCID}_{50} / \text{ปริมาตรไวรัสที่นำมาทดสอบ}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 เทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับการจัดจำแนกไวรัส

5.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในการบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในหลอดทดลองแบบซ้ำกันหลายรอบ ซึ่งในปฏิกิริยาแต่ละรอบของพีซีอาร์ มี 3 ขั้นตอนได้แก่

1. Denaturation ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 °C
2. Primer annealing คือการที่ primer 2 สาย เข้าไปจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 °C
3. Primer extension การต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าไปที่ปลาย 3'-OH ของ primer โดยใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งต้องการอุณหภูมิพอเหมาะที่ 70-72 °C

เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดในแต่ละรอบจะได้ดีเอ็นเอต้นแบบเข้าสู่ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น (Saiki *et al.*, 1988) ปัจจุบัน ได้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในงานวิจัยเกือบทุกสาขาเพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง และสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง

5.4.2 การใช้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะ (restriction endonuclease digestion of viral DNA)

เทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นวิธีการศึกษาโดยใช้หลักการของการตัดดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสแบบจำเพาะ หรือตำแหน่งจดจำ (recognition site) เท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอในบริเวณจำเพาะถูกตัดออกจะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน และหากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในบริเวณจุดตัดจำเพาะเกิดขึ้น จะมีผลทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดและรูปแบบเปลี่ยนแปลงไป

เทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัด เนื่องจากสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างของสายดีเอ็นเอ และไวรัสแต่ละชนิดอาจมีการผ่าเหล่าของสายดีเอ็นเอ อันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆทั้งภายในและภายนอกซึ่งอาจทำให้เกิดการขาดหายไป (deletion) และเพิ่มขึ้นมา (insertion) ของชิ้นดีเอ็นเอ

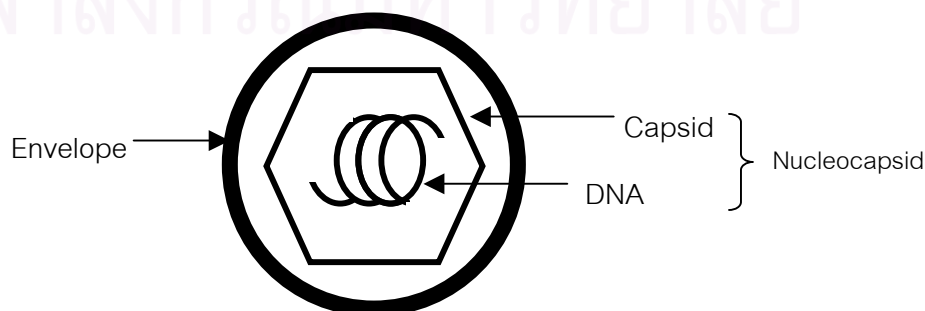
5.4.3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE คือ การแยกโปรตีนที่มีอัตราส่วนของประจุและขนาดที่แตกต่างกันในสนามไฟฟ้า โดยใช้ polyacrylamide gel เป็นตัวค้ำจุน เมื่อต้องการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย ทำได้โดยต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 95-100 °C ประมาณ 2-3 นาที ในสภาวะที่มี reducing agent เช่น β -mercaptoethanol เพื่อไปทำลายพันธะ disulfide (s-s bond) และสารซักฟอกที่มีชื่อว่า sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารซักฟอกแอนไอออนิก (anionic detergent) ที่มีประจุลบสามารถยึดจับกับโมเลกุลของโปรตีนในส่วนที่เป็น hydrophobic region ทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบทั้งหมดแล้วนำไปแยกในสนามไฟฟ้าโดยใช้ polyacrylamide gel เป็นตัวค้ำจุนดังกล่าว เพื่อศึกษาแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น

6. ลักษณะสมบัติและการก่อโรคของไวรัสวงศ์ Iridoviridae

ไวรัสในวงศ์ Iridoviridae พบว่า ทำให้เกิดโรคทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน (Hedrick *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 1997; Ahne *et al.*, 1997 และ Jancovich *et al.*, 1997) และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลง และ หอย 2 ฝา (Williams, 1996)

ลักษณะของไวรัสในวงศ์ Iridoviridae คือ มีเปลือกหุ้มและมีนิวคลีโอแคปซิด เป็นรูป 6 เหลี่ยม (icosahedral) เส้นผ่าศูนย์กลาง 125-300 nm (ภาพที่ 2) แกนกลางมีขนาด 70-100 nm แคปซิดประกอบด้วยแคปไซเมอร์ประมาณ 1892-2172 แคปไซเมอร์ ซึ่งเป็นกลุ่มโมเลกุลของโปรตีนจำนวนหลายหน่วยเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry อยู่รอบจีโนม สารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ขนาด 150-350 Kb มีโปรตีนโครงสร้างเป็นองค์ประกอบมากกว่า 20 ชนิด อนุภาคมีความไวต่อความร้อน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และสารซักฟอก แต่คงทนหรือเสถียรในช่วง pH กว้าง อนุภาคมีความหนาแน่น (virion buoyant density) 1.19-1.24 g / cm³ ใน CsCl gradient ทุกอนุภาคไวรัสมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสและการถอดรหัส เช่น RNA polymerase, Poly (A) polymerase และ mRNA capping enzyme เป็นต้น การประกอบเป็นอนุภาคไวรัสเกิดขึ้นที่ไซโตพลาสซึม อนุภาคไวรัสถูกปลดปล่อยโดยการแตกหน่อ (budding) หรือเซลล์เจ้าบ้านแตกออก (Murphy and Kingsburg, 1990)



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของอนุภาคไวรัสในวงศ์ Iridoviridae

ไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* จำแนกได้เป็น 5 สกุล คือ *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* และ *Goldfish virus like* สกุล *Iridovirus* และ *Chloriridovirus* เป็นไวรัสที่พบในแมลง ส่วนสกุล *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* และ *Goldfish virus-like* เป็นไวรัสที่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและปลา (ตารางที่ 2)

สกุล *Ranavirus* เป็นไวรัสที่พบครั้งแรกในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้แก่ Leopard frog, *Rana pipiens* (Granoff *et al.*, 1965) และพบกระจายทั่วไปทั้งใน เอเชีย (Hedrick and McDowell, 1995; Mao *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 1997 และ Kanchanakhan *et al.*, 1999) ออสเตรเลีย (Speare and Smith, 1992; Hengstberger *et al.*, 1993 และ Zupanovic *et al.*, 1998) ยุโรป (Ahne *et al.*, 1989; Fijan *et al.*, 1983; Mao *et al.*, 1997) และอเมริกา (Essani and Granoff, 1989; Zupanovic *et al.*, 1998 และ Plumb *et al.* 1999) ลักษณะอาการที่เกิดจากไวรัสสกุลนี้ คือ มีแผลอักเสบตามผิวหนัง และเป็นเนื้องอกที่ไต

สกุล *Lymphocystivirus* เป็นไวรัสที่พบในปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืดบางชนิด ลักษณะอาการของปลาที่เป็นโรคนี้นี้ คือ มีตุ่มตามตัว จากนั้นตุ่มนี้จะกลายเป็นแผลอักเสบบริเวณผิวหนัง ตามลำตัวและหาง เมื่อเป็นมากจะตายในที่สุด หรือบางตัวอาจเป็นเนื้องอกที่ลำตัวและหาง (Ahne, 1994)

สำหรับประเทศไทย พบว่าไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* ทำให้เกิดโรคในปลา เช่น ปลากระมัง ปลากระพงขาว และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่น กบ เป็นต้น ซึ่งจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน กล่าวคือ ในปลากระมัง ที่ติดเชื้อไวรัสมีอาการไม่ค่อยกินอาหาร เฉื่อยชา ลำตัวมักจะเป็นสีดำ โดยเฉพาะครีบและส่วนหาง ว่ายน้ำผิดปกติ และมีอาการเกร็ง ปลาที่ใกล้จะตายหรือตายใหม่ๆ มักจะจมลงก้นบ่อ (จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัตร์ คงประดิษฐ์, 2539) ในปลากระพงขาวที่ติดเชื้อไวรัสมีอาการดังนี้ ลูกปลาจะไม่กินอาหาร ลำตัวลีบแบนและเปลี่ยนเป็นสีดำ ว่ายน้ำผิดปกติ ชอบหลบแสง และซ่อนตัวรวมกันเป็นกลุ่มบริเวณมุมบ่อหรือที่มีมืด ก่อนจะลอยตัวสู่น้ำ และตายในที่สุด (เรวัตร์ คงประดิษฐ์ และ จิราพร เกษรจันทร์, 2538) ในกบที่ติดเชื้อไวรัส พบมีแผลหลุมที่ผิวหนังด้านหลัง บริเวณขา ลำตัวและส่วนหัว บางตัวมีฝีปากเป็นแผลแดง พบในกบอายุประมาณ 2 เดือน จนถึง 1 ปี (Kanchanakhan *et al.*, 1999)

ตารางที่ 2 สิ่งมีชีวิตที่พบไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* (ที่มา: Williams, 1996)

Genus	Vernacular	Host species	Member of genus
<i>Iridovirus</i>	Small iridescent insect virus	Diverse invertebrate taxa (mostly insects)	<i>Tipula paludosa</i> <i>Sericesthis pruinosa</i> <i>Chilo suppressalis</i> <i>Wiseana cervinata</i> <i>Witlesia sabulosella</i> <i>Costelytra zealandica</i> <i>Pterosticus madidus</i> <i>Opogonia</i> sp. <i>Odontria striata</i> <i>Simocephalus expinosus</i> <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Simulium</i> sp. <i>Heteronychus arator</i> <i>Apis cerana</i> <i>Tipula</i> sp. <i>Ephemopteran</i> <i>Nereis diversicolor</i> <i>Lethocerus columbiae</i> <i>Tenebrio molitor</i> <i>Helicoverpa zea</i> <i>Armadillidium vulgare</i> <i>Porcellio scaber</i>
<i>Chloriridovirus</i>	Large iridescent insect virus	Diptera (mosquitoes)	<i>Aedes taeniorhynchus</i> <i>Aedes cantans</i> <i>Aedes annulipes</i> <i>Simulium ornatum</i> <i>Culicoides</i> sp. <i>Aedes stimulans</i> <i>Aedes cantans</i> <i>Corethrella brakeleyi</i> <i>Aedes detritus</i> <i>Aedes detritus</i> <i>Chironomus plumosus</i>
<i>Ranavirus</i>	Frog virus	Amphibia	Frog virus 1,2 Frog virus 3 (FV3) Frog virus 5-24 Frog virus L2,L4,L5 Tadpole Edema Virus Lucke triturus virus LT1-LT4 Newt Virus T6-T20 Xenopus Virus T21
<i>Lymphocystivirus</i>	Lymphocystis disease virus	Many teleost (fish) Families	Lymphocystivirus type 1 (LCDV-1) Lymphocystivirus type 2(LCDV-2) Octopus vulgaris disease virus
<i>Goldfish virus-like</i>	Goldfish virus	Goldfish	Goldfish virus (GFV-1) Goldfish virus (GFV-2)

งานวิจัยเกี่ยวกับโรคไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* มีดังนี้

จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัตร คงประดิษฐ์ (2539) ได้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคครีบดำในลูกปลากะรัง จากการศึกษาพบว่า ไวรัสมีรูปร่างหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120-130 nm สามารถทำลายเซลล์เพาะเลี้ยง EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) นอกจากนี้ไวรัสยังถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและ IUdR (5'-iodo-deoxyuridine) ซึ่งแสดงว่า เป็นไวรัสชนิดมีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) และมีกรดนิวคลีอิกเป็นแบบดีเอ็นเอ เมื่อทดสอบการก่อโรคของไวรัสในลูกปลากะรังปกติ พบว่าปลาแสดงอาการของโรคและตายในที่สุด เมื่อนำปลาที่ตายไปตรวจก็พบเชื้อไวรัส จากลักษณะรูปร่างและสมบัติของไวรัส แสดงให้เห็นว่า ไวรัสชนิดนี้อยู่ในวงศ์ *Iridoviridae*

Kanchanakhan *et al*, 1999 พบโรคชนิดใหม่ในกบรุ่นพ่อแม่พันธุ์ในเขตภาคกลางของประเทศไทย กบที่ป่วยมีแผลหลุมที่ผิวหนังด้านหลังบริเวณขา ลำตัวและส่วนหัว เมื่อนำไปเพาะเชื้อไวรัส ในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC พบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (cytopathic effect) และไวรัสสูญเสียความสามารถในการทำลายเซลล์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการทำลายเซลล์เมื่ออยู่ในสารละลายอินทรีย์เช่น คลอโรฟอร์ม และเมื่ออยู่ในสารละลาย pH3 ไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ มีเปลือกหุ้ม อนุภาคไวรัสเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาดประมาณ 128 nm เพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง STE (soft-shelled turtle embryo), SSN-1 (striped snakehead whole fry tissue), SCE (Siamese crocodile embryo), BB (brown bullhead), BF-2 (bluegill fry), DT (discuss tail) และ FHM (fathead minnow) เพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 25-30°C และมีการปลดปล่อยอนุภาคใหม่ออกจากเซลล์ระหว่าง 4-7 ชั่วโมง จัดว่าเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* และให้ชื่อว่า Tiger frog Iridovirus หรือ TFIV

Langdon *et al*. (1986) สามารถแยกไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในปลา redfin, *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 ในประเทศออสเตรเลีย เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาดประมาณ 150-170 nm และสามารถทำลายเซลล์เพาะเลี้ยง FHM, BB, BF-2 และ RTG-2 (rainbow trout gonad) จากลักษณะดังกล่าวคาดว่าเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae*

Hyatt *et al.* (1991) ได้ศึกษาการใช้แอนติบอดีในการตรวจสอบ Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากปลา rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) ด้วยวิธีทาง Antigen-Capture-Immunsorbent Assay หรือ Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA), Immunohistochemistry และ Immunoelectron จากผลการทดลอง พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถใช้ตรวจหา EHNV ได้

Speare *et al.* (1991) ได้ศึกษาไวรัสที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์กล้ามเนื้อของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก *Bufo marinus* ในประเทศออสเตรเลียและคาดว่าเป็นไวรัส Iridovirus เนื่องจากอนุภาคไวรัสมีรูปร่างกลมเหลี่ยมขนาด 312 nm และมีเปลือกหุ้ม

Speare and Smith (1992) ได้ศึกษาไวรัสที่สกัดได้จาก ornate burrowing frog, *Limnodynastes ornatus* ทางเหนือของประเทศออสเตรเลียพบว่าเป็นดีเอ็นเอไวรัส มีเปลือกหุ้ม เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา (ค่า TCID₅₀ /ml ตั้งแต่ 10^{5.43} ถึง 10^{8.85}) เจริญได้น้อยในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลาแซลมอน (ค่า TCID₅₀ /ml เท่ากับ 10^{3.85}) และไม่เจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง การเจริญจะถูกยับยั้งเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 33 °C หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์ 24-42 ชั่วโมง เซลล์ที่ติดเชื้อ มีรูปร่างกลม หลุดจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ เซลล์ถูกทำลายเป็นวงกว้างสมบัติของไวรัสนี้คล้ายกับไวรัสสกุล *Ranavirus*

Nakajima and Sorimachi (1994) ได้ศึกษาสมบัติทางชีววิทยาและเคมีฟิสิกส์ของไวรัส Iridovirus ที่สกัดได้จาก ปลา red sea bream, *Pagrus major* พบว่า ไวรัสที่สกัดได้สามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง BF2, CHSE-214 (chinook salmon embryo), FHM, JSKG (Japanese striped knife jaw, *Oplegnathus fasciatus* Fernandez *et al.*, 1993), KRE-3 (hybrid of kelp and red spotted groupers, *Epinephelus moara* X *E. akaara*), RTG-2 และ YTF (yellowtail, *Seriola dumerili*) โดยสามารถเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยง BF2 และ KRE-3 ได้ดีกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงอื่น และเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C ส่วนที่อุณหภูมิ 37 °C ไวรัสไม่สามารถเจริญได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของไวรัสนี้ คือ 20 หรือ 25 °C อนุภาคไวรัสถูกทำลายในสารละลายกรดที่ pH3 คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ ส่วนสาร IUDR พบว่าสามารถลดการเจริญของไวรัสนี้ และได้ตั้งชื่อไวรัสนี้ว่า red sea bream iridovirus (RSIV)

Whittington *et al.* (1997) สามารถตรวจสอบแอนติบอดีต่อไวรัสสกุล *Ranavirus* (EHNV และ BIV) ในซีรัมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก *Bufo marinus* ด้วยวิธี ELISA

Jancovich *et al.* (1997) แยกไวรัสได้จาก tiger salamander, *Ambystoma tigrinum stebbinsi* ซึ่งเป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา และเมื่อนำชิ้นเนื้อซาลาแมนเดอร์มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน พบอนุภาคไวรัสรูปหกเหลี่ยม มีทั้งเปลือกหุ้มและไม่มีเปลือกหุ้มขนาดประมาณ 160 -180 nm อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและเซลล์ผิวหนังจำนวนมาก คาดว่าเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* และได้ตั้งชื่อว่า *Ambystoma tigrinum iridovirus* หรือ ATV

Tapiovara *et al.* (1998) สกัดแยกไวรัสได้จากปลา pike-perch, *Stizostedion lucioperca* พบว่าเป็นดีเอ็นเอไวรัส และประกอบเป็นอนุภาคภายในไซโตพลาสซึม นิวคลีโอแคปซิดเป็นรูปหกเหลี่ยม ขนาด 127 ± 3 nm มีเปลือกหุ้ม ขนาดของไวรัสเมื่อมีเปลือกหุ้มมีขนาดตั้งแต่ 147-187 nm จากลักษณะสมบัติดังกล่าว พบว่าเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* นอกจากนี้ยังได้ทดลองการก่อโรคในปลา rainbow trout พบว่าไวรัสที่สกัดได้จากปลา pike-perch ไม่ก่อโรคในปลา rainbow trout

He *et al.* (2000) ศึกษาสาเหตุการตายของปลา mandarin fish, *Siniperca chuatsi* ในประเทศจีน โดยการตรวจเนื้อเยื่อส่วนต่างๆด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีอนุภาคไวรัสจำนวนมากในเนื้อเยื่อไตและม้าม ไวรัสที่ก่อโรคในปลานี้ น่าจะเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae*

Lai *et al.* (2000) ได้ศึกษาลักษณะสมบัติของ Iridovirus ที่สกัดได้จากปลากะรัง พบว่าอนุภาคไวรัสมีขนาด 170 ± 10 nm รูปร่างหกเหลี่ยม จากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน พบอนุภาคไวรัสจำนวนมากอยู่ภายในไซโตพลาสซึม ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง GK (grouper kidney) และ GL (grouper liver) และทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิมที่เรียกว่า cytopathic effect มีค่า TCID₅₀/ml เท่ากับ 10^8 และ 10^6 ตามลำดับ

ได้มีการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในงานวิจัยไวรัส ตัวอย่างเช่น

Nishizawa *et al.* (1994) ทำการศึกษาชิ้นส่วน RNA-2 ของ Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในปลา Striped Jack, *Pseudocaranx dentex* ด้วยการทำเทคนิคพีซีอาร์

Gould *et al.* (1995) ยังได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อวินิจฉัย Epizootic haematopoietic necrosis virus และ Bohle iridovirus ซึ่งเป็นไวรัสในสกุล *Ranavirus*

Kurita *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน ATPase, DNA polymerase และ จีโนม ของ Iridovirus ในปลา red sea bream พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อ Iridovirus ได้ใน ม้าม และเลือดของปลาที่ทำการทดลองการก่อโรค และในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเลี้ยงไวรัสด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง GF

นอกจากนี้ Oshima *et al.* (1998) ได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อวินิจฉัย red sea beam iridovirus (RSIV) โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน ribonucleotide reductase small subunit (RNRS) gene จากม้ามของปลาที่ติดเชื้อไวรัส พบว่า เทคนิคนี้สามารถตรวจพบไวรัสในปลาที่ติดเชื้อแล้ว 3-5 วัน คือ ในวันที่ 1-2 วันหลังจากการติดเชื้อ ตรวจไม่พบไวรัส RSIV แต่ในวันที่ 3 ตรวจพบ ไวรัส RSIV ใน ปลา 3 ตัว จากปลาทั้งหมด 5 ตัว และในวันที่ 5 ตรวจพบไวรัส RSIV จากปลาทุกตัว

ได้มีการใช้เทคนิคการใช้เอ็นไซม์ตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะในงานวิจัยไวรัส ตัวอย่างเช่น

Ahne *et al.* (1998) ได้ทำการเปรียบเทียบรูปแบบ RFLP ของ Iridovirus ชนิดต่างๆ ได้แก่ไวรัส SFIR ที่สกัดได้จากปลา *Silurus glanis*, ไวรัส CFIR I, CFIR II, CFIR III ที่สกัดได้จากปลา *Ictalurus melas*, ไวรัส EHNV ที่สกัดได้จากปลา *Perca fluviatilis*, ไวรัส REIR ที่สกัดได้จากกบ *Rana esculenta* ในทวีปยุโรป และ ไวรัส FV-3 ที่สกัดได้จากกบ *Rana pipians* ในทวีปอเมริกา เมื่อตัดจีโนม ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ BamH I พบว่าได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 20 แถบ รูปแบบ RFLP ของไวรัส CFIR I, CFIR II, CFIR III และ SFIR เหมือนกันมาก นอกจากนี้ไวรัส CFIR III และ SFIR ยังมีแถบ ดีเอ็นเอที่เหมือนกันที่ 3.8 Kb ด้วย ในขณะที่ไวรัส CFIR I และ CFIR II ไม่มีแถบดีเอ็นเอนี้ ส่วนรูปแบบ RFLP ของไวรัส REIR, FV-3 และ EHNV พบว่าแตกต่างกัน

Mao *et al.* (1999) ได้เปรียบเทียบรูปแบบ RFLP ของไวรัส FV-3 ซึ่งเป็นไวรัสที่สกัดได้จากกบ ไวรัส SBV ซึ่งสกัดได้จากปลา stickleback และไวรัส 276, TV2, TV3 และ TV5 ซึ่งสกัดได้จากตัวอ่อน ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (tadpole) และเป็นไวรัส Iridovirus ในสกุล *Ranavirus* เมื่อตัดด้วย เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Hind III และ Xba I พบว่ารูปแบบ RFLP ของ ไวรัส FV-3 ต่างจากไวรัสชนิดอื่นได้ มีการใช้เทคนิค SDS-PAGE ในงานวิจัยไวรัส ตัวอย่างเช่น

Hedrick *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาขนาด รูปร่าง โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ และการศึกษา ทาง ภูมิคุ้มกันวิทยาของอนุภาคไวรัส กลุ่ม Iridovirus ที่แยกได้จากปลา 3 ชนิด คือ redfin, *Perca fluviatilis*, sheatfish, *Siluris glanis* และ catfish, *Ictalurus melas* พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา ขนาด จำนวน มวลโมเลกุลของโปรตีน และการตรวจสอบแอนติเจนด้วยแอนติบอดีของกระต่ายมี ลักษณะคล้ายกันในไวรัสทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ยังคล้ายกับไวรัสในสกุล *Ranavirus* ที่พบในกบอีกด้วย

Zupanovic *et al.* (1998) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ iridovirus ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก *Bufo marinus* ในประเทศเวเนซุเอลา พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 20 ชนิด และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 8-121 kDa และพบแถบโปรตีนที่มีค่ามวลโมเลกุลที่ 49 kDa ซึ่งเป็น major capsid protein

Mao *et al.* (1999) ศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสในสกุล *Ranavirus* ซึ่งสกัดได้จาก largemouth bass, *Micropterus salmoides* คือ ไวรัส LMBV เปรียบเทียบกับไวรัส FV-3 ที่สกัดได้จากกบ, ไวรัส DFV ที่สกัดได้จากปลา doctorfish และไวรัส GV 6 ที่สกัดได้จากปลา guppy พบว่าไวรัสทั้ง 4 ชนิด มีแถบโปรตีนที่ 50 kDa ซึ่งเป็น major capsid protein นอกจากนี้ major capsid protein ของไวรัส LMBV, DFV และ GV6 เคลื่อนที่ได้ช้ากว่า major capsid protein ของไวรัส FV-3 และจากรูปแบบโปรตีน พบว่าไวรัส LMBV ต่างจากไวรัส FV-3 แต่ไม่ต่างจากไวรัส DFV และ ไวรัส GV6

Mao *et al.* (1999) ได้เปรียบเทียบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสสกุล *Ranavirus* คือ ไวรัส SBV ซึ่งสกัดได้จากปลา stickleback และไวรัส 276, TV2, TV3 และ TV5 ซึ่งสกัดได้จากตัวอ่อนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (tadpole) และไวรัส FV-3 ที่สกัดได้จากกบ โดยการติดฉลาก S³⁵ ใน methionine พบว่า รูปแบบของแถบโปรตีนของไวรัสทั้ง 6 ชนิด คล้ายกันมาก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์

	บริษัท	ประเทศ
กล้อง polaroid	Spectroline	USA
Agarose gel electrophoresis chamber	Bio-Rad	USA
Electrophoresis chamber	Bio-Rad	USA
Gel dryer Model 543	Bio-Rad	USA
Incubator	Gallenkamp	UK
Inverted microscope	Olympus	Japan
Laminar flow	INC	UK
Microcentrifuge	ALC international Srl.	Italy
Microwave	Olympiathai	Thailand
Multichannel pipette	Labsystem	Finland
Mini-Protein II dual slab cell	Bio-Rad	USA
Power supply	Bio-Rad	USA
Spectrophotometer	Denley	UK
Trans-blot semidry transfer cell	Bio-Rad	USA
Thermal cycler	Hybaid Omnigene	UK
UV transilluminator	Bio-version	USA
Ultracentrifuge	Beckman	USA
Vortex	Fisons	UK
Water bath	Grant	UK

2. วัสดุ

ขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 25, 75 และ 175 ซม ²	NUNC	Denmark
กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน	Sartorius minsart	Germany
ฟิล์ม polaroid	Fabrique' Royaume-	UK
	Uni Par polaroid	

	บริษัท	ประเทศ
ถาดหลุมกันแบน ชนิด 24 และ 96 หลุม	NUNC	Denmark
กระบอกฉีดยา	Nipro	Thailand
กระดาษกรอง	Bio-Rad	USA
แผ่นไนโตรเซลลูโลส	Bio-Rad	USA

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

- FCS (Fetal calf serum)	Seromed	Germany
- Glutamine	Sigma	Germany
- HBSS (Hank's balance salt solution)	Biochrom	Germany
- Leibovitz-15	Biochrom	Germany
- Penicillin/ Streptomycin	Sigma	USA
- PBS (phosphate buffer saline)	Biochrom	Germany
- Trypsin	Gibco BRL	USA

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุล

- Absolute ethanol	Merck	Germany
- Acetic acid	J.T. Barker	USA
- Acetone	Fisher chemical	UK
- Acrylamide	Bio-Rad	USA
- Agarose	Bio-Rad	USA
- Ammoniumpersulfate	Merck	Germany
- Boric acid	Merck	Germany
- Butanol	Fisher chemical	UK
- Bromophenol blue	Merck	Germany
- 3',3' dianimobenzidine tetrahydrochloride	Sigma	USA
- Chloroform	Merck	Germany
- Di-sodium hydrogen phosphate	Ajax chemicals	Australia
- DNA marker	SibEnzyme	Russia
- Enzyme <i>BamH I</i>	Promega	USA

- Enzyme <i>Msp</i> I	Promega	USA
	บริษัท	ประเทศ
- Enzyme <i>EcoR</i> I	Promega	USA
- Enzyme <i>Xba</i> I	Promega	USA
- Ethidium bromide	Gibco BRL	USA
- Ethylene diamine tetraacetic acid	Amresco	USA
- Freund' s Adjuvant	Sigma	USA
- Glycine	Fisher chemical	UK
- Glycerol	Sigma	USA
- Glutaraldehyde	BHD Analar	UK
- Gene Amp PCR core reagent	Qiagen	Germany
<i>Taq</i> DNA polymerase		
dNTPs		
25 mM MgCl ₂		
10x PCR buffer (100 mM		
Tris-Hcl pH8.3, 500mM KCl)		
- Hydrochloric acid	CARLO ERBA	France
- 5'- iodo deoxyuridine	Amresco	USA
- Isoamyl alcohol	CARLO ERBA	France
- Kaleidoscope prestained standard	Bio-Rad	USA
- SDS-PAGE Broad rang standard	Bio-Rad	USA
- Methanol	Fisher chemical	UK
- β-mercaptoethanol	Bio-Rad	USA
- Mineral oil	Sigma	USA
- Phenol	Amresco	USA
- Proteinase K	Qiagen	Germany
- RNase	Sigma	USA
- Sodium dihydrogen phosphate	Merck	Germany
- Sodium acetate	Amresco	USA
- Sodium dodecyl sulfate	Bio-Rad	USA
- Sodium chloride	BDH Analar	UK

- Sucrose	มิตรผล	Thailand
	บริษัท	ประเทศ
- TEMED	Bio-Rad	USA
- Tris-base	Bio-Rad	USA
- Tween-20	Sigma	USA
- QIAamp DNA Mini kit	Qiagen	Germany

4. เซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับทดสอบการยอมรับการติดเชื้อของไวรัสจากปลาตู้ทราย

- BB (Brown bullhead caudal trunk) (Wolf and Quimby, 1969)
- BF-2 (Bluegill fry)(Wolf *et al.*, 1966)
- EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) (Fijian *et al.*, 1983)
- FHM (Fathead minnow tail)(Gravell and Malsberger, 1965)
- SSN-1 (Striped snakehead whole fry tissue)(Frerichs *et al.*, 1991)
- STE (Soft-shelled turtle embryo) จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
- DT (Discuss tail) จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
- SCE (Siamese crocodile embryo) จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ

5. ไวรัสที่นำมาศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับไวรัสจากปลาตู้ทราย

- Tiger frog iridovirus (TFIV)(Kanchanakhan *et al.* 1999) จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
- ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร สายพันธุ์ AV 9922 จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
- ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา สายพันธุ์ FK-2 จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา
- ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด สายพันธุ์ AV 9944 จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
- ไวรัส Seabass iridovirus (เรวัตร์ คงประดิษฐ์ และ จิราพร เกษรจันทร์, 2538) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล จังหวัดสงขลา
- ไวรัส Grouper iridovirus (จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัตร์ คงประดิษฐ์, 2539) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล จังหวัดสงขลา

6. การแยกสกัดเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทราย

ไวรัสจากปลาบู่ทรายเป็นไวรัสที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ซึ่งแยกสกัดได้จากปลาบู่ทรายที่ป่วยโดยกลุ่มวิจัยไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

6.1 การแยกสกัดเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทราย

6.1.1 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจาก ไต ม้าม เหงือก กล้ามเนื้อ และบริเวณที่เป็นแผลจากปลาบู่ทรายที่ป่วยเป็นโรค จำนวน 3 ตัว รวมกันประมาณ 1 g บดให้ละเอียดในครกบดยาที่สะอาดและแช่เย็น โดยใส่ทรายละเอียดเล็กน้อยเพื่อช่วยในการบดให้เซลล์แตก

6.1.2 เติมน้ำฟอสเฟต HBSS (2% FCS) ปริมาตร 9 ml (เจือจาง 1:10) ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต โดยการดูดขึ้นลง นำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

6.1.3 ดูดสารละลายชั้นบน 1 ml เจือจางด้วย HBSS (2% FCS) ปริมาตร 4 ml (เจือจาง 1:50) แล้วกรองผ่านชุดกรองชนิดใช้ครั้งเดียวที่ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาและไส้กรองมีขนาด 0.45 μ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆ

6.1.4 นำสิ่งสกัดที่กรองได้ เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อรอการเพาะแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไป

6.2 เตรียมเซลล์สำหรับเพาะแยกไวรัส

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² ในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 (10% FCS Penicillin 100 unit และ Streptomycin 100 μ g/ml) จนได้เซลล์แผ่นเต็มพื้นที่ผิวเรียงเป็นชั้นเดียว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 วัน เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างผิวหน้าแผ่นเซลล์ด้วย PBS ประมาณ 5-7 ml แล้วเทออก เติม trypsin 1 ml เพื่อย่อยเซลล์ให้หลุดจากกัน เท trypsin ทิ้ง เคาะให้เซลล์หลุดเต็มอาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitz 15 หรือ L-15 (ภาคผนวก) 25-28 ml ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์หลุดจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆแบ่งเซลล์ใส่ภาตหลุมชนิด 24 หลุม (24 well plate) ทุกหลุมหลุมละ 1 ml เพื่อใช้เพาะแยกไวรัสต่อไป

6.3 การเพาะแยกไวรัสและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เจ้าบ้าน

เติมสิ่งสกัดที่กรองได้จากข้อ 6.1 ลงในภาตหลุมเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 6.2 หลุมละ 200 μ l จำนวนไม่น้อยกว่า 2 หลุม หรือ 2 ซ้ำ บ่มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C ตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เจ้าบ้าน (cytopathic effect) ทุกๆวันเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมคือเซลล์ในหลุมที่ไม่ได้ใส่ไวรัสและทำการส่งถ่าย (blind passage) อาหารเลี้ยงเซลล์ในภาตหลุมเดิมไปสู่ภาตหลุมที่มีเซลล์ใหม่ทุกๆ 7-10 วัน จำนวน 2-3 ครั้ง ถ้าเซลล์เกิด cytopathic effect แสดงว่าสามารถแยกเพาะ

เชื้อไวรัสได้จากตัวปลา จากนั้นเพิ่มจำนวนไวรัสในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² เพื่อเก็บไว้ศึกษา ลักษณะสมบัติต่อไป

7. การทำไวรัสไตเตรชันเพื่อหาปริมาณของเชื้อไวรัส

ในการหาปริมาณไวรัสที่สามารถก่อให้เกิดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงทำได้โดยการทำให้ไวรัสไตเตรชัน เพื่อคำนวณหาปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงครึ่งหนึ่งหรือ 50% Tissue culture infectious dose (TCID₅₀) ตามวิธีการดังนี้

7.1 เชื้อจางไวรัสในถาดหลุมชนิด 96 หลุม

- แบ่งหลุมต่างๆในถาดหลุมชนิด 96 หลุมกั้นแบน (ภาพที่ 3) ดังนี้ 7 แถวบน A-G (A1-A6, G1-G6) สำหรับทำ virus dilution และแถว H (H1-H6) เป็นกลุ่มควบคุม

- ทำการเจือจางไวรัส 1:10 โดย

- ใช้ 6-channel pipette ดูด L-15 (2% FCS Penicillin 100 unit และ Streptomycin 100 µg/ml) จำนวน 90 µl ใส่ลงในหลุมของ 7 แถวบน (A1-A6, G1-G6)

- ใช้ single channel pipette ดูด ไวรัส 10 µl จากขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสในข้อ 6.3 (stock) ใส่ลงในแถว A (A1-A6)

- ใช้ 6 – channel pipette ปรับที่ 10 µl ทำการผสมไวรัสในหลุมแรกให้เข้ากันดี ในแถวนี้จะมีความเจือจาง 10⁻¹ เท่าของไวรัสตั้งต้น แล้วดูด 10 µl จาก A1-A6 ส่งต่อ ยังแถวถัดไป คือ B1-B6 ทำเช่นนี้จนถึงแถวที่ G ตามลำดับในแถว G จะมีความเจือจาง 10⁻⁷ เท่าของปริมาณไวรัสตั้งต้น

หมายเหตุ: การทำไตเตรชันอาจทำให้ไวรัสเจือจางที่ 10⁻¹-10⁻¹² ของปริมาณไวรัสตั้งต้น โดยวางถาดหลุมในแนวนอน

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ภาพที่ 3 ตำแหน่งหลุมต่างๆในถาดหลุมชนิด 96 หลุม

7.2 การเติมเซลล์ลงภาดหลุมชนิด 96 หลุมที่ใส่ไวรัสที่ความเจือจางต่างๆแล้ว

- เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² เมื่อมีอายุประมาณ 2-3 วัน เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย 5-7 ml ของสารละลาย PBS แล้วเทออก ทำการย่อยรอยต่อระหว่างเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin 1 ml เคาะให้เซลล์หลุด แล้วเติม L-15 (2% FCS Penicillin 100 unit และ Streptomycin 100 µg/ml) ปริมาตร 12 ml ทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลง
- เทเซลล์เดี่ยวลงในกล่อง (reservoir) ใช้ 6 – channel pipette ดูด 100 µl ใส่ลงในหลุมทุกหลุมของ 8 แถวบน (A1-A6, H1-H6)
- ระวังอย่าให้ปลาย tipแตะกับขอบหลุม ถ้า tipแตะขอบหลุมให้เปลี่ยน tip ใหม่ ทั้ง 6 tip ปิดฝาและปิดด้วย parafilm ให้สนิทอีกครั้ง นำภาดหลุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C

7.3 บันทึกผล

ทำการบันทึกผลทุกๆวันเป็นเวลา 5-7 วัน ดังนี้ หลุมใดที่เกิด cytopathic effect ให้ทำเครื่องหมายไว้บนฝาแล้วคำนวณหาปริมาณไวรัสในหน่วย TCID₅₀/ml ตามวิธีของ Karber (1931)

8. การศึกษาลักษณะสมบัติของไวรัสจากปลาบู่ทราย

8.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไวรัส

เพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C จนเกิด cytopathic effect ประมาณ 30% เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้มากที่สุด เติมน้ำ 3 ml ของ 2.5% glutaraldehyde ใช้ที่ดูดเซลล์ดูดเซลล์ออกทันที นำเซลล์ที่ดูดได้ไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้งไป เติมน้ำ 3 ml ของ 2.5% glutaraldehyde พร้อมทั้งพลิกขึ้นเซลล์แล้วนำไปปั่นอีกครั้ง เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นนำขึ้นเซลล์ไปผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน ตามวิธีของ Hayat (1989) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

8.2 ลักษณะสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของไวรัสจากปลาบู่ทราย

8.2.1 ชนิดของกรดนิวคลีอิกของไวรัส (Type of nucleic acid)

การทดสอบชนิดของกรดนิวคลีอิกทำได้โดยใช้สาร IUdR (5'-iodo deoxyuridine) ซึ่งสารนี้เป็น base analog กับ thymidine จึงไปยับยั้งการเจริญของดีเอ็นเอไวรัสแต่ไม่ยับยั้งการเจริญของอาร์เอ็นเอไวรัส โดยดำเนินการทดลองตามวิธีของ Rovozzo and Burke (1973) ดังนี้ เลี้ยงเซลล์เพาะ

เลี้ยง EPC ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จนเซลล์เพาะเลี้ยงแผ่เต็มพื้นที่ผิวใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ทำการถ่ายเทเซลล์ลงในภาดหลุมชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C จนเซลล์แผ่เต็มพื้นผิวของหลุม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แบ่งภาดหลุมเป็น 2 ส่วนเท่ากัน คือ ส่วนที่ 1 หลุมที่ 1-6 ของแถว A-H ใส่ IUdR ทุกหลุมๆละ 50 µl และส่วนที่ 2 หลุมที่ 7-12 ของแถว A-H ใส่ HBSS หลุมละ 50 µl (กลุ่มควบคุม) นำไวรัสจากปลาบู่ทรายมาเจือจางด้วย HBSS ให้มีความเจือจางที่ 10⁻¹-10⁻⁸ เท่าของไวรัสเริ่มต้น นำไวรัสที่ความเจือจางต่างๆที่เตรียมนี้ใส่ในหลุมต่างๆของแถว A-H ตามลำดับ ยกเว้นหลุมที่ 7-12 ของแถว H ไม่ใส่ไวรัสแต่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 แทน เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จำนวน 50 µl ทุกหลุม นำภาดหลุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ประมาณ 4-6 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออกให้หมด เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ L-15 จำนวน 200 µl ในหลุมทุกหลุมแล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 25°C หลังจากนั้นบันทึกผลการเกิด cytopathic effect แล้วคำนวณหาค่า TCID₅₀/ml ตามวิธีของ Karber (1931) ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ 3 ครั้ง

8.2.2 การทนต่อตัวทำละลายไขมัน (Sensitivity to lipid solvent)

ทดสอบการทนต่อตัวทำละลายไขมันในที่นี้สารที่ใช้ทดสอบคือ คลอโรฟอร์ม ตามวิธีของ Rovozzo and Burke (1973) เพื่อทดสอบว่าไวรัสมีเปลือกหุ้มหรือไม่ ดังนี้ นำไวรัสจากปลาบู่ทราย ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดที่มี คลอโรฟอร์มปริมาตร 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลานาน 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำไวรัสมาทดสอบไวรัสไตเตรชัน เปรียบเทียบกับไวรัสในกลุ่มควบคุม บันทึกผลการเกิด cytopathic effect แล้วคำนวณหาค่า TCID₅₀/ml ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

8.2.3 การทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C (Sensitivity to heat)

เพื่อทดสอบเสถียรภาพของเชื้อไวรัสหรือองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อไวรัสในสภาพอุณหภูมิสูง ทดสอบตามวิธีของ Rovozzo and Burke (1973) ดังนี้ เจือจางไวรัสจากปลาบู่ทราย ด้วย HBSS (2% FCS) 10 เท่า แบ่งเป็น 3 หลอดๆละ 0.6 ml หลอดที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลานาน 30 นาที และหลอดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน 60 นาที และหลอดที่ 3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบกำหนดนำทั้ง 3 หลอดมาทำไวรัสไตเตรชันในภาดหลุมชนิด 96 หลุม บันทึกผลการเกิด cytopathic effect แล้วคำนวณหาค่า TCID₅₀/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดลอง 3 ครั้ง

8.2.4 ทดสอบการยอมรับการติดเชื้อของไวรัสต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ

(Cell line susceptibility)

นำไวรัสจากปลาบู่ทรายมาทดสอบการเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยง 8 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา ได้แก่ EPC, FHM, BF-2, DT, SSN-1 และ BB เซลล์เพาะเลี้ยงตะพาน้ำ STE และ เซลล์เพาะเลี้ยงจระเข้ SCE ดังนี้ เตรียมเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² จนได้เซลล์แผ่เต็มพื้นที่ผิวและเรียงเป็นชั้นเดียว จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้แล้วมาทำไวรัสไตเตรชัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ตรวจดูการเกิด cytopathic effect เป็นเวลา 7 วัน หลังจากทำไวรัสไตเตรชันจากนั้นคำนวณหาค่า TCID₅₀/ml ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

8.2.5 การทนต่อสภาพกรดที่ pH 3 (Stability at low pH)

ทดสอบเสถียรภาพของเชื้อไวรัสหรือองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อไวรัสที่ pH 3 ตามวิธีของ Kasornchanda *et al.* (1991) ดังนี้ กลุ่มควบคุมทำดังนี้ ผสมไวรัสจากปลาบู่ทรายปริมาตร 100 µl กับ HBSS pH 7.2 ปริมาตร 900 µl ในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ สำหรับกลุ่มทดลอง ผสมไวรัสจากข้อ 6.3 ปริมาตร 100 µl กับ Glycine-HCl buffer pH 3 (ภาคผนวก) ปริมาตร 900 µl ในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ นำทั้ง 2 กลุ่มบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำทั้ง 2 กลุ่มมาทำไวรัสไตเตรชัน เพื่อคำนวณหาค่า TCID₅₀/ml เปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่ม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

8.2.6 การทดสอบอุณหภูมิกับการเจริญของไวรัส (Optimum growth temperature)

ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C โดยเปรียบเทียบค่า TCID₅₀/ml ของแต่ละอุณหภูมิ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² จำนวน 8 ขวด ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C จนเซลล์เพาะเลี้ยงเจริญได้ 90% ของพื้นที่ผิว เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เจือจางไวรัสจากปลาบู่ทรายด้วย HBSS ให้ได้ปริมาณไวรัส 10² TCID₅₀/ml จากนั้นใส่ไวรัสลงในขวดของเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 4 ขวด ขวดละ 1 ml และใส่ HBSS (0%FCS) ลงในขวดเซลล์เพาะเลี้ยง EPC อีก 4 ขวด ขวดละ 1 ml (กลุ่มควบคุม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติสารละลายขึ้นบนเซลล์ออกให้มากที่สุด ล้างเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ทั้ง 8 ขวดด้วย HBSS (2%FCS) ปริมาตร 8 ml จำนวน 2 ครั้ง เติอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ทุกขวดขวดละ 8 ml แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 µl จากทุกขวดสำหรับทำไวรัสไตเตรชันที่ 0 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละคู่ของขวดที่ใส่เชื้อไวรัสและขวดควบคุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C เก็บตัวอย่างไวรัสจากอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกขวดขวดละ

200 μ l ที่ 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน หลังจากติดเชื้อไวรัส นำไวรัสที่เก็บได้มาทำไวรัสไตเตรชัน เพื่อเปรียบเทียบค่า TCID₅₀/ml ที่ป้อนไว้ในแต่ละอุณหภูมิ จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

8.2.7 หาระยะเวลาในการติดเชื้อจนถึงการปลดปล่อยเชื้อไวรัสจากเซลล์เจ้าบ้าน

(One-Step Growth Cycle)

หาระยะเวลาในการติดเชื้อจนถึงการปลดปล่อยเชื้อไวรัสจากเซลล์เจ้าบ้านใน 1 รอบ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² 4 ขวดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ที่อุณหภูมิ 25 °C จนเซลล์เจริญได้ 90% ของพื้นที่ผิว เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เจือจางไวรัสจากปลาบู่ทรายให้ได้ปริมาณไวรัส 10⁴ TCID₅₀/ml ด้วย HBSS (2% FCS) จากนั้นใส่เชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ที่เลี้ยงไว้ขวดละ 1 ml จำนวน 3 ขวด ในขณะที่ขวดที่ 4 ใส่ HBSS 1 ml นำขวดเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 ขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เติสารละลายชั้นบนเซลล์ออกให้มากที่สุด ล้างเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ทั้ง 4 ขวดด้วย HBSS (0% FCS) ปริมาตร 8 ml จำนวน 2 ครั้ง เติอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ปริมาตร 8 ml ในแต่ละขวดแล้วดูอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 μ l จากทุกขวดสำหรับทำไวรัสไตเตรชัน ที่ 0 ชั่วโมง จากนั้นนำทั้ง 4 ขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เก็บตัวอย่างไวรัสปริมาตร 200 μ l จากทุกขวดที่เวลา 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 40 และ 50 ชั่วโมงหลังจากติดเชื้อไวรัส ตามลำดับ นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้นี้มาทำไวรัสไตเตรชันเพื่อคำนวณหาปริมาณไวรัสที่ปลดปล่อยออกจากเซลล์เจ้าบ้าน

9. การศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิดของไวรัสจากปลาบู่ทราย (Identification)

9.1 การบ่งชี้และเปรียบเทียบสมบัติของโปรตีนและสมบัติทางซีรั่มวิทยากับไวรัสอื่น ๆ

3.1.1 การทำไวรัสให้บริสุทธิ์ มีขั้นตอนดังนี้

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 175 cm² จำนวน 10 ขวด ใส่เชื้อไวรัสชนิดต่างๆที่เตรียมไว้แล้วเช่นเดียวกับข้อ 6.3 ได้แก่ ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ปริมาตรขวดละ 200 μ l ชนิดละ 2 ขวด และเลี้ยงเซลล์ SCE ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 175 cm² ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จำนวน 4 ขวด ใส่เชื้อไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ที่เตรียมไว้แล้วเช่นเดียวกับไวรัสจากปลาบู่ทราย ปริมาตรขวดละ 200 μ l ชนิดละ 2 ขวด นำขวดเลี้ยงเซลล์ EPC และ SCE ที่ใส่ไวรัสแล้วทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C จนเกิด cytopathic effect สมบูรณ์ซึ่งไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆ ใช้เวลาประมาณ 3 วัน ส่วนไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ใช้เวลาประมาณ 15 วัน จากนั้นนำไวรัสทั้งหมดไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อตกตะกอน

เศษเซลล์ แยกสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ นำไปปั่นที่ความเร็ว 28,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เสร็จแล้วแยกสารละลายส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนไวรัสด้วย TE buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 1 ml เตรียม sucrose gradient 15-45%(w/w) (ภาคผนวก) ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นหยดตะกอนไวรัสไว้บนผิวหน้าของ sucrose gradient ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 28,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเห็นแถบของไวรัสเป็นสีขาวจางๆ อยู่ในหลอด (จะเห็นชัดเจนเมื่อเอากระดาษสีดำบัง) ใช้เข็มดูดแถบของไวรัสให้ได้ปริมาตรประมาณ 1 ml นำไปวัดค่าดัชนีการหักเหของสารละลายน้ำตาลเพื่อเทียบหาค่าความหนาแน่นของไวรัสตามวิธีของ Griffith, 1986 แล้วละลายแถบของไวรัสที่เก็บได้ด้วย TE buffer นำไปปั่นที่ความเร็ว 22,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อแยกไวรัสออกจากน้ำตาลซูโครส เก็บตะกอนไวรัสที่ปั่นได้ที่อุณหภูมิ -20 °C ไวรัสที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วนำไปทำการศึกษาดังนี้

9.1.1.1. วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

9.1.1.2. เปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของไวรัสชนิดต่างๆ

- นำดีเอ็นเอของไวรัสที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Xba I* และ *EcoRI*

- นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนส่วน major capsid protein และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Msp I*, *Alu I*, *Mbo II* และ *Sau3A I*

9.1.1.3 สำหรับไวรัสจากปลาบู่ทรายเมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีสำหรับทดสอบการล้มล้างฤทธิ์

9.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทราย กับไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus ด้วยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate) ตามวิธีการของ Leammli (1970) โดยใช้อุปกรณ์ Mini-Protein II dual slab cell จากนั้นนำไวรัสแต่ละชนิดที่เลี้ยงไว้แล้ว ผสมกับ sample buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที ทิ้งให้เย็น นำไปปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างไปใส่ในหลอดของ 4% stacking gel ที่มี 10% separating gel (ภาคผนวก) พร้อมทั้งโปรตีนมาตรฐาน (SDS-PAGE Broad range standard) ซึ่งประกอบด้วย Myosin (200 kDa), β -galactosidase (116.25 kDa), Phosphorylase (97.4 kDa), Serum albumin (66.2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (31 kDa), Trypsin inhibitor (21.5 kDa), Lysozyme (14.4 kDa) และ Aprotinin (6.5 kDa) เติม tank buffer (ภาคผนวก) ใน lower chamber และกำจัดฟองอากาศใต้ขอบล่างของแผ่นเจลให้หมด เติม tank buffer ใน upper chamber ปิดฝาและเสียบปลั๊กต่อกับ power supply ที่ 100

โวลต์ โปรตีนจะเคลื่อนมาจากหลุมจะสังเกตเห็นแถบสีน้ำเงินเคลื่อนมาถึง separating gel จึงเปลี่ยนความต่างศักย์มาที่ 120 โวลต์ เมื่อสีเคลื่อนถึงขอบล่างของแผ่นเจลแล้ว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ปิด สวิตช์สีน้ำเงินเจลมาด้วยสี coomassie blue (ภาคผนวก) โดยเติม coomassie blue ให้ท่วมเจลวางบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที เทสีย้อมคืนและเติม destain solution I (ภาคผนวก) ให้ท่วมเจลนาน 20 นาที วางบนเครื่องเขย่าเท destain solution I ทิ้ง แล้วเติม destain solution II (ภาคผนวก) นานประมาณ 12-18 ชั่วโมง เมื่อพื้นเปลี่ยนเป็นสีใสให้นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer จากนั้นคำนวณหามวลโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

9.1.3 การลบล้างฤทธิ์ (Neutralization)

ศึกษาการลบล้างฤทธิ์ของแอนติบอดีต่อไวรัสจากปลาบู่ทรายที่เตรียมได้จากกระต่ายกับไวรัสจากปลาบู่ทราย

9.1.3.1 การสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสจากปลาบู่ในกระต่าย

ฉีดไวรัสครั้งที่ 1 นำไวรัสจากปลาบู่ทรายที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 9.1.1 มาผสมกับ Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าที่บริเวณโคนขาหลังของกระต่ายพันธุ์ New zealand white เมื่อครบ 1 เดือน เก็บเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูเพื่อนำซีรัมมาทดสอบแอนติบอดีไตเตอร์

ฉีดไวรัสครั้งที่ 2 ฉีดไวรัสปริมาตร 0.5 ml เข้าที่เส้นเลือดดำที่ใบหูของกระต่าย หลังจากฉีดกระต่ายครบ 1 สัปดาห์ ให้เก็บเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูเพื่อนำซีรัมมาทดสอบแอนติบอดีไตเตอร์

ฉีดไวรัสครั้งที่ 3 ฉีดไวรัสปริมาตร 1 ml เข้าที่เส้นเลือดดำที่ใบหูของกระต่าย หลังจากฉีดกระต่ายครบ 1 สัปดาห์ ฉีดยาสลบเข้าที่เส้นเลือดดำที่ใบหู เมื่อกระต่ายสลบแล้วจึงเก็บเลือดโดยใช้เข็ม ฉีดยาดูดเลือดจากหัวใจของกระต่ายให้ได้มากที่สุด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชั่วโมง แล้วเก็บเข้าตู้เย็น 4 °C ในวันถัดไปจึงดูดซีรัมเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อทดสอบแอนติบอดีไตเตอร์ต่อไป

9.1.3.2 การทดสอบหาแอนติบอดีไตเตอร์

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ปริมาตร 50 μ l ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม แถวที่ A-D ยกเว้นคอลัมน์ที่ 1 โดยดูดซีรัมที่เก็บได้จากข้อ 9.1.3.1 ใส่ในคอลัมน์ที่ 1 แถวที่ A-D หลุมละ 100 μ l เจือจางซีรัมโดยใช้ multichannel pipette ดูดซีรัมจากคอลัมน์ที่ 1 นี้ ปริมาตร 50 μ l ใส่ในคอลัมน์ที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายจากคอลัมน์ที่ 2 ปริมาตร 50 μ l ใส่ในคอลัมน์ที่ 3 ผสมให้เข้ากัน ทำเช่นนี้จนถึงคอลัมน์ที่ 10 แล้วใส่ไวรัสจากปลาบู่ทรายที่เตรียมไว้ในข้อที่ 6.3 ปริมาตร 50 μ l ทุกหลุมของแถว A-D นำถาดหลุมไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่เซลล์เพาะเลี้ยง EPC ในทุกแถวของแถว A-D หลุมละ 100 μ l

สำหรับแถว E-H ใส่เซลล์เพาะเลี้ยง EPC และไวรัสจากปลาบู่ทรายเพื่อทำไวรัสไตเตรชันตามวิธีที่กล่าวแล้ว ในกลุ่มนี้จะเป็นกลุ่มควบคุม นำถาดหลุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เปรียบเทียบการเกิด cytopathic effect ของเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ภายใน 7 วัน ของกลุ่มทดลองในแถว A-D และกลุ่มควบคุมในแถว E-H

9.1.4 การใช้เทคนิค Western blot ตรวจสอบความจำเพาะต่อกันระหว่างซีรัมกระต่ายและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัส

ในการศึกษานี้ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีของกระต่ายที่กระตุ้นด้วยไวรัสจากปลาบู่ทรายต่อองค์ประกอบโปรตีนของอนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ Grouper iridovirus

นำไวรัสชนิดต่างๆที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 9.1.1 มาทำ SDS-PAGE เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 9.1.2 แต่ใช้ Kaleidoscope prestained standard เป็นโปรตีนมาตรฐานประกอบด้วยโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลดังนี้ myosin (202 kDa), β -galactosidase (121 kDa), Bovine serum (79 kDa), Carbonic anhydrase (41 kDa), Soybean trypsin inhibitor (31.6 kDa), Lysozyme (17.8 kDa) และ Aprotinin (8.2 kDa) หลังจากทำ electrophoresis แล้วทำการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส

การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทำได้โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลส กระดาษกรองและแผ่นเจลแช่ใน transblot buffer ประมาณ 15 นาที แล้วนำมาประกอบบนชุด trans-blot semidry transfer cell โดยวางแผ่นเจลบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแล้วประกบด้วยกระดาษกรองทั้ง 2 ด้าน ผ่านด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โปรตีนจากแผ่นเจลจะเคลื่อนมาอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสสังเกตได้จากสีของ Kaleidoscope prestained standard ซึ่งเคลื่อนลงมาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส แช่ใน tris buffered saline (TBS) (ภาคผนวก) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ใน 3% BSA ใน TTBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย tween- tris buffered saline (TTBS) (ภาคผนวก) 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วแช่ในแอนติซีรัมของกระต่ายที่เตรียมได้ในข้อ 9.1.3.1 ที่ความเจือจาง 1:1 ด้วย 1% BSA ใน TTBS ข้ามคืนที่ 4 °C ล้างด้วย TTBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน conjugate (HRP anti-rabbit IgG ที่เจือจาง 1: 3,000 ด้วย 1% BSA ใน TTBS) ประมาณ 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ใน 3',3' dianimobenzidine tetrahydrochloride นาน 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น จะปรากฏเห็นแถบของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและโปรตีนที่จำเพาะเกิดขึ้น คำนวณหามวลโมเลกุลของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาต่อแอนติบอดี

9.2 การบ่งชี้และเปรียบเทียบไวรัสจากปลาบู่ทรายและไวรัสต่างๆทางอณูชีววิทยา

9.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากไวรัส

9.2.1.1 สกัดดีเอ็นเอของไวรัสด้วย QIAamp DNA Mini kit ของบริษัท Qiagen

นำไวรัสชนิดต่างๆที่เตรียมไว้แล้วปริมาตร 200 μ l เติม proteinase K (20 μ g/ml) ปริมาตร 20 μ l Rnase A (20 μ g/ml) ปริมาตร 20 μ l และ buffer AL ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 70 % alcohol ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm ในคอลัมน์ในเครื่องไมโครเซนติฟิวจ์เป็นเวลา 1 นาที ใส่ AW1 ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำที่กรองผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม AW2 ปริมาตร 500 μ l ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ล้างตะกอนด้วย TE buffer นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

9.2.1.2 สกัดดีเอ็นเอด้วย phenol – chloroform ดัดแปลงวิธีของ (Hall and Smith, 1991)

นำตัวอย่างไวรัสที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 9.1.1 ไวรัสละ 200 μ l เติม proteinase K (20 μ g/ml) ปริมาตร 20 μ l และ Rnase A (20 μ g/ml) ปริมาตร 20 μ l ผสมให้เข้ากันบ่มอุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ใช้ tip ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol/chloroform (24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตร นำไปปั่นด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ใช้ tip ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M Sodium acetate ในปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตร เติม Absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตร เก็บไว้ที่ -30 °C ซ้ำมคืน นำไปปั่นด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออกอย่างรวดเร็ว ล้างดีเอ็นเอที่อยู่ก้นหลอดด้วย 75%alcohol ปริมาตร 500 μ l กลับหลอดไปมา นำไปปั่นด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออกอย่างรวดเร็ว ล้างดีเอ็นเอที่อยู่ก้นหลอดด้วย 75% alcohol อีกครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งประมาณ 1-2 ชั่วโมง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

9.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)

ในการทดลองนี้ได้หาวิธีที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยีน major capsid protein ของไวรัสจากปลาน้ำจืด ด้วยวิธีพีซีอาร์ ทำการเปรียบเทียบโดยใช้ปริมาณ DNA template ที่แตกต่างกันและปริมาณ Primer ที่แตกต่างกันและเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยีน Major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆดังนี้

9.2.2.1 เปรียบเทียบโดยใช้ปริมาณ DNA template ที่แตกต่างกัน

9.2.2.1.1 ใช้ดีเอ็นเอของไวรัสจากปลาน้ำจืดที่สกัดด้วย QIAamp DNA Mini kit เป็น DNA template ที่ 0, 0.435, 0.87, 1.74, 2.61 และ 3.48 μg

9.2.2.1.2 Primer คือ Forverse primer (mc-1) 5'-GTTTCATCGACTTGGCCACT-3'

Reverse primer (mc-3) 5'-ATGTTGTGCATGGGGTTCTT-3'

ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 bp

9.2.2.1.3 เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อปริมาณดีเอ็นเอต่างกัน

	ปริมาณดีเอ็นเอ (μg)					
	0	0.435	0.87	1.74	2.61	3.48
น้ำกลั่นไร้เชื้อ (μl)	14.8	13.8	12.8	10.8	8.8	6.8
10x PCR buffer (μl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
d NTP(10mM) (μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
5x Q-Solution (μl)	5	5	5	5	5	5
Primer mc-1 (μl)	1	1	1	1	1	1
Primer mc-3 (μl)	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polymerase (5unit/ μl) (μl)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DNA template (μl)	0	1	2	4	6	8
รวม (μl)	25	25	25	25	25	25

9.2.2.2. เปรียบเทียบโดยใช้ปริมาณ Primer ที่แตกต่างกัน

9.2.2.2.1 ใช้ดีเอ็นเอของไวรัสจากปลาบู่ทรายเป็น DNA template ที่สกัดด้วย QIAamp DNA Mini kit

9.2.2.2.2 Primer คือ Forverse primer (mc-1) 5'-GTTTCATCGACTTGGCCACT-3'
Reverse primer (mc-3) 5'-ATGTTGTGCATGGGGTTCTT-3'

ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 bp ที่ปริมาณ primer 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 μM

9.2.2.2.3. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อปริมาณ primer ต่างกัน

	ปริมาณ primer (μM) [*]					ปริมาณ primer (μM) ^{**}			
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	0.1	0.3	0.5	0.7
น้ำกลั่นไร้เชื้อ (μl)	15.8	14.8	13.8	12.8	11.8	14.8	12.8	10.8	8.8
10x PCR buffer (μl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
d NTP(10mM) (μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
5x Q-Solution (μl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Primer mc-1 (μl)	0	0.5	1	1.5	2	0.5	1.5	2.5	3.5
Primer mc-3 (μl)	0	0.5	1	1.5	2	0.5	1.5	2.5	3.5
Tag DNA polymerase (5unit/ μl) (μl)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DNA template (μl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
รวม (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25

*= Stock primer 10 μM

**= Stock primer 5 μM

9.2.2.3 เปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยีน Major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆ

9.2.2.3.1 เปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยีน major capsid protein ขนาด 300 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ที่สกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp DNA Mini kit

Primer คือ Forverse primer (mc-1) 5'-GTTTCATCGACTTGGCCACT-3'

Reverse primer (mc-3) 5'-ATGTTGTGCATGGGGTTCTT-3'

9.2.2.3.2 เปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยีน major capsid protein ขนาด 1,400 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ที่สกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp DNA Mini kit

Primer คือ Forverse primer (mc-1) 5'-GTTTCATCGACTTGGCCACT-3'

Reverse primer (mc-2) 5'-AGGACCCATGACGGAAAAG-3'

9.2.2.3.3 เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้

น้ำกลั่นไร้เชื้อ	13.5 μ l
10x PCR buffer	2.5 μ l
d NTP(10mM)	0.5 μ l
5x Q-Solution	5 μ l
Primer mc-1 (0.4 μ M)	1 μ l
Primer mc-2 (0.4 μ M)	1 μ l
Taq DNA polymerase (5unit/ ul)	0.25 μ l
DNA template	1 μ l
รวม	25 μ l

9.2.2.4 นำหลอดพีซีอาร์ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที
2. ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denature 95 °C	1 นาที
Annealing 55 °C	1 นาที
Extensoin 72 °C	1 นาที สำหรับ ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 bp ส่วน ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1,400 bp Extensoin 72 °C = 3 นาที ทำซ้ำ 30 รอบ
3. เมื่อครบรอบสุดท้าย ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

9.2.2.5 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เตรียม 1.5% agarose gel โดยซึ่ง agarose หนัก 0.75 g ผสมใน 1x TBE buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปต้มจนสารละลายใส ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 55-60 °C เติมสารละลาย ethidium bromide (10 mg/ml) ประมาณ 2.5 µl ผสมให้เข้ากันโดยหมุนเบาๆ เทสารละลายนี้ลงใน agarose gel chamber ที่เตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นอย่างน้อยประมาณ 30 นาที จน agarose แข็งตัวดี จากนั้นค่อยๆ ดึง comb ออก แล้วนำถาด agarose gel นี้ ไปวางใน electrophoresis chamber แล้วใส่ 1x TBE buffer ให้ได้ปริมาตรตามต้องการซึ่งท่วมสูงกว่าผิวหน้าของ agarose gel ประมาณ 5 ml ไล่ฟองอากาศที่อยู่ในหลุมออกให้หมด ผสมผลผลิตพีซีอาร์หรือ ดีเอ็นเอไวรัสที่สกัดโดยวิธี phenol-chloroform จำนวน 5 µl กับ 5x loading buffer จำนวน 1 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปใส่ในหลุมของเจล ทำเหมือนกันทุกๆ ตัวอย่างจนครบ เสียบขั้วไฟฟ้าของ electrophoresis chamber ต่อกับ power supply แล้วปรับให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 45 นาที เมื่อครบตามเวลาให้นำ agarose gel มาวางบน UV-transilluminator เพื่อตรวจดูแถบของดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) บันทึกผลที่ได้ด้วยกล้องโพลาไรซ์

9.2.2.6 การตรวจหาลำดับเบสของ major capsid protein ขนาด 300 bp

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน major capsid protein ขนาด 300 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไปตรวจหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

9.2.3 การใช้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งเฉพาะ (restriction endonuclease digestion of viral DNA)

9.2.3.1 นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน major capsid protein ขนาด 1,400 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด จากข้อ 9.2.2.3.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Msp I*, *Alu I*, *Sau3A I* และ *Mbo II*

9.2.3.2 นำจีโนมของไวรัสที่สกัดด้วยวิธี phenol – chloroform มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Xba I* และ *EcoR I* ดังนี้

โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้

น้ำกลั่น	3.75 μ l
10xbuffer	1 μ l
เอนไซม์ตัดจำเพาะ (10 unit/ μ l)	0.25 μ l
ดีเอ็นเอ	5 μ l
รวม	10 μ l

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน นำผลผลิตที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ตามข้อ 9.2.2.5

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การแยกสกัดเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทราย

การแยกสกัดเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายโดยกลุ่มวิจัยไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ เมื่อนำปลาบู่ทรายที่มีอาการ สีตัวซีด มีแผลหลุมตื้นข้างลำตัว และบริเวณริมฝีปากมีแผลถลอก (ภาพที่ 4-5) จำนวน 3 ตัว มาแยกเพาะสกัดหาเชื้อไวรัสจาก ไต ม้าม เหงือก กล้ามเนื้อ และบริเวณที่เป็นแผลของปลาบู่ทราย ทดสอบการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ได้ผลคือ หลังจากการทดลอง 7 วัน เซลล์ในหลุมที่ไม่ติดเชื้อไวรัส (กลุ่มควบคุม) เซลล์มีลักษณะยาวและแผ่เต็มพื้นที่ผิวเรียงเป็นชั้นเดียว (ภาพที่ 6 ก) ส่วนในหลุมที่ใส่เชื้อไวรัสเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือเกิด cytopathic effect โดยมีลักษณะดังนี้ คือ มีรูปร่างกลม พอง วาวแสง แยกเป็นเซลล์เดี่ยว เนื่องจากการหดตัวของไซโตพลาสซึมกระจายทั่วไปทั้งพื้นที่ผิว เมื่อทำการถ่ายเทไวรัสจากหลุมที่เกิด cytopathic effect นี้ไปใส่ในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ที่เตรียมใหม่ พบว่าหลังจากใส่ไวรัส 1 วัน เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 6 ข, ตรงลูกศรชี้) หลังจากผ่านไป 2 วัน เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเริ่มมากขึ้นเกิดเป็นกลุ่มกระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 6 ค) บางส่วนของเซลล์เริ่มหลุดจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ขยายเป็นวงออกไป หลังจากผ่านไป 3 วัน กลุ่มของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหลุดจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์มากขึ้น เซลล์เกิด cytopathic effect ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6 ง) หลังจากผ่านไป 4-7 วัน เซลล์เกิด cytopathic effect สมบูรณ์

2. ลักษณะสมบัติของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไวรัส

เมื่อนำไวรัสที่เจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อดูลักษณะของอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน พบว่า มีอนุภาคไวรัสอยู่รอบผนังเซลล์ (ภาพที่ 7) และภายในไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 8) อนุภาคไวรัสที่พบเป็นนิวคลีโอแคปซิดรูปหกเหลี่ยม และจากการวัดขนาดของอนุภาคไวรัสจำนวน 18 อนุภาค พบว่า นิวคลีโอแคปซิดมี ขนาด 132.49 ± 7.79 nm แกนกลางมีสี่ที่ขนาด 76.66 ± 6.49 nm ดังตารางที่ 5 นอกจากนี้ยังพบว่าที่บริเวณของผนังเซลล์จะเห็นว่ามี การปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกมาจากเซลล์ EPC

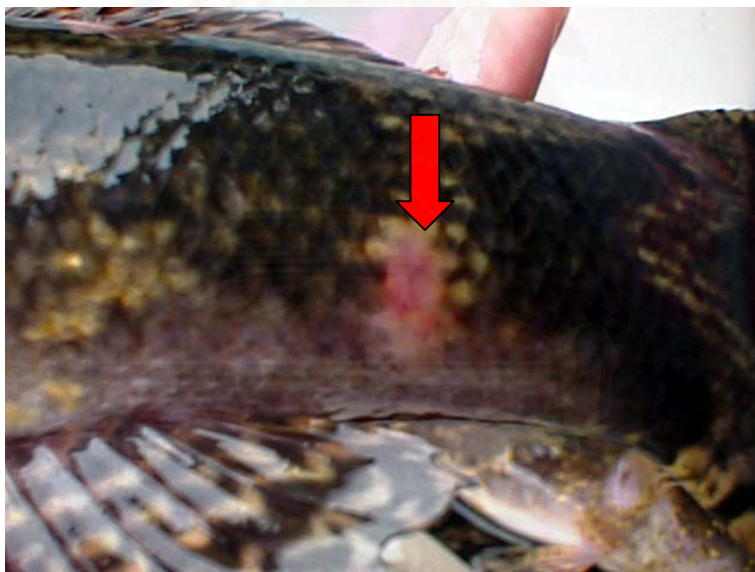
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของขนาดนิวคลีโอแคปซิดและแกนกลางของไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทราย

ขนาด	ค่าเฉลี่ย (mean±SD) nm
นิวคลีโอแคปซิด	132.49 ± 7.79
แกนกลาง	76.66 ± 6.49

ก



ข



ภาพที่ 4 ลักษณะของปลาบู่ทรายที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดนครปฐม; ภาพ

ก. ลูกศรชี้คือ แผลหลุม, ภาพ ข. ลูกศรชี้คือ แผลถลอกตกเลือด

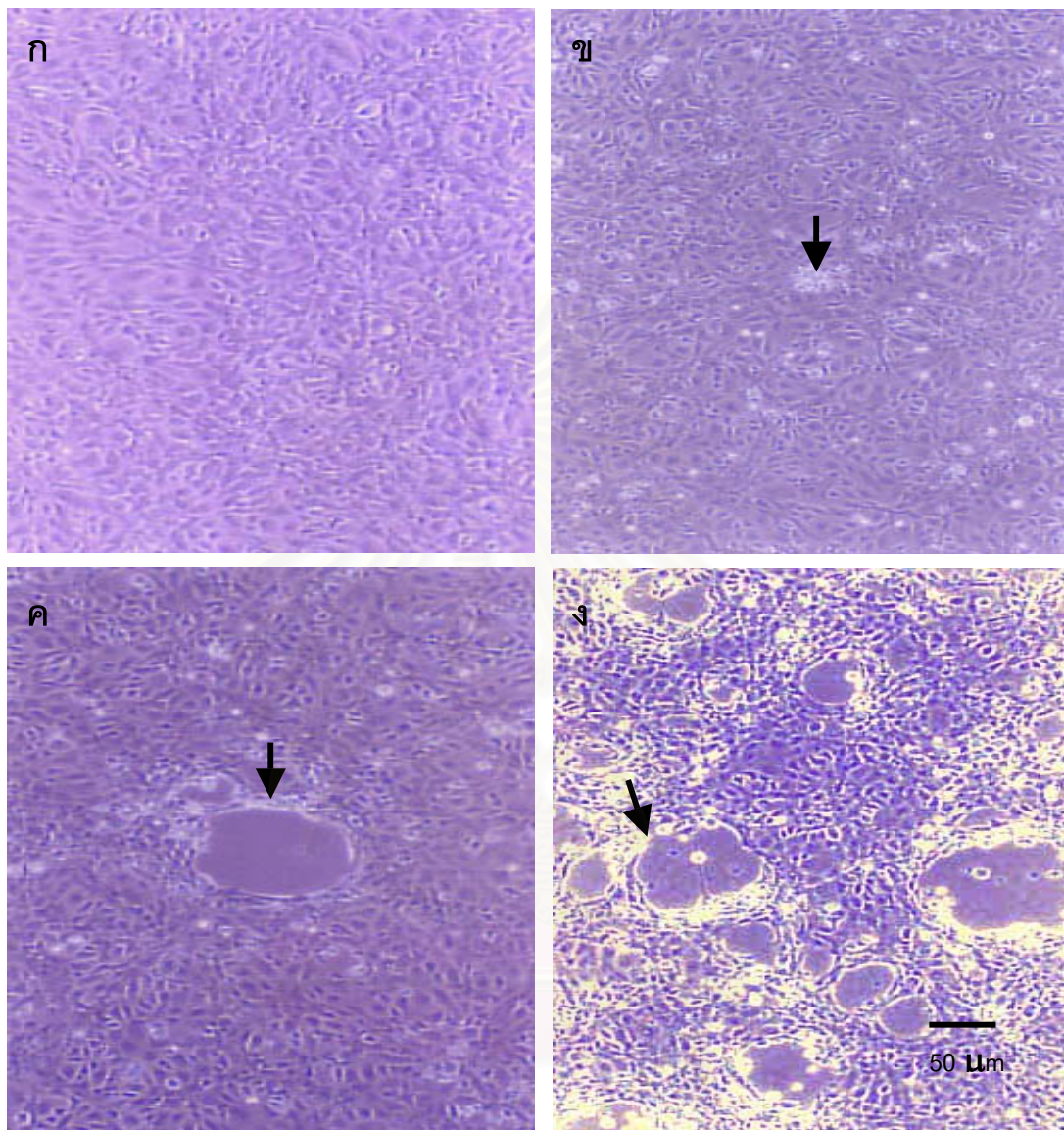
ก



ข

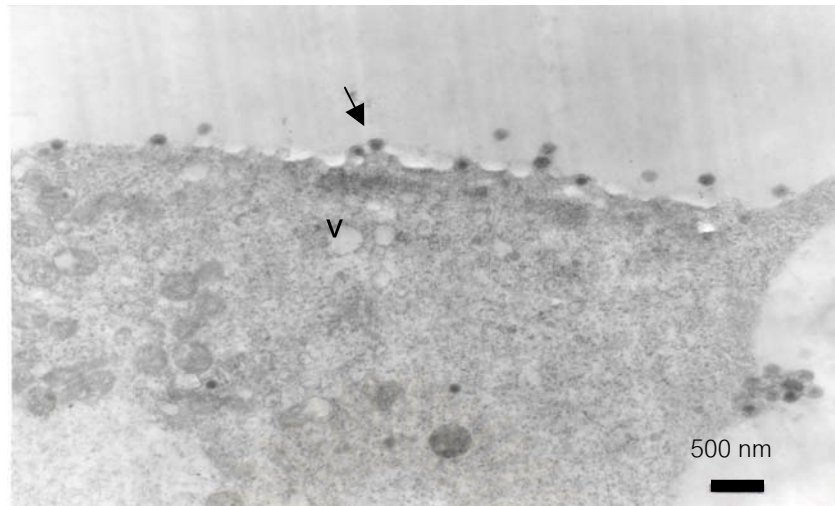


ภาพที่ 5 ลักษณะของปลาบู่ทรายที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดนครปฐม; ภาพ ก. ลูกครีซี้ คือ ปลาบู่ทรายมีสีตัวซีด, ภาพ ข. ลูกครีซี้คือ รีมฟีปากมีแผลผิวหนังเปิดออก

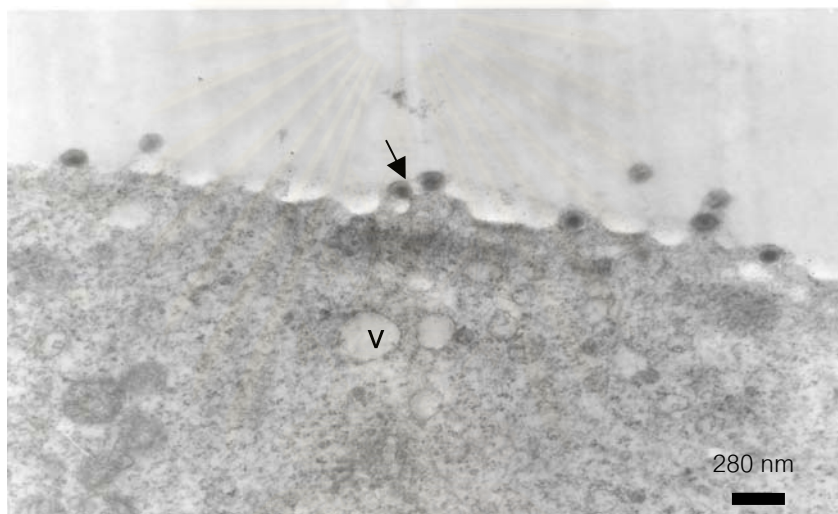


ภาพที่ 6 การเกิด cytopathic effect ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลานู๋ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC; ก. เซลล์เพาะเลี้ยง EPC ปกติ, ข. เซลล์เพาะเลี้ยง EPC เมื่อติดเชื้อไวรัส 1 วัน, ค. เซลล์เพาะเลี้ยง EPC เมื่อติดเชื้อไวรัส 2 วัน, ง. เซลล์เพาะเลี้ยง EPC เมื่อติดเชื้อไวรัส 3 วัน เซลล์เกิด cytopathic effect ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ (ลูกศรชี้ คือ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และการเกิด plaque)

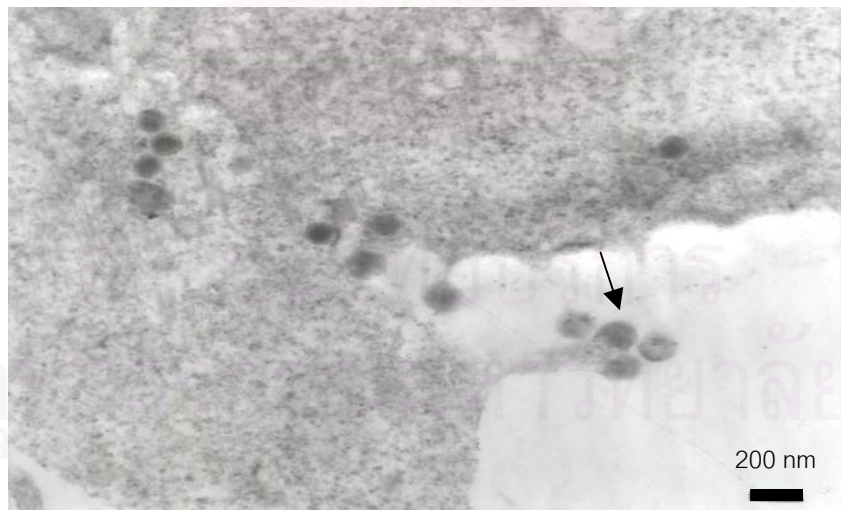
ก



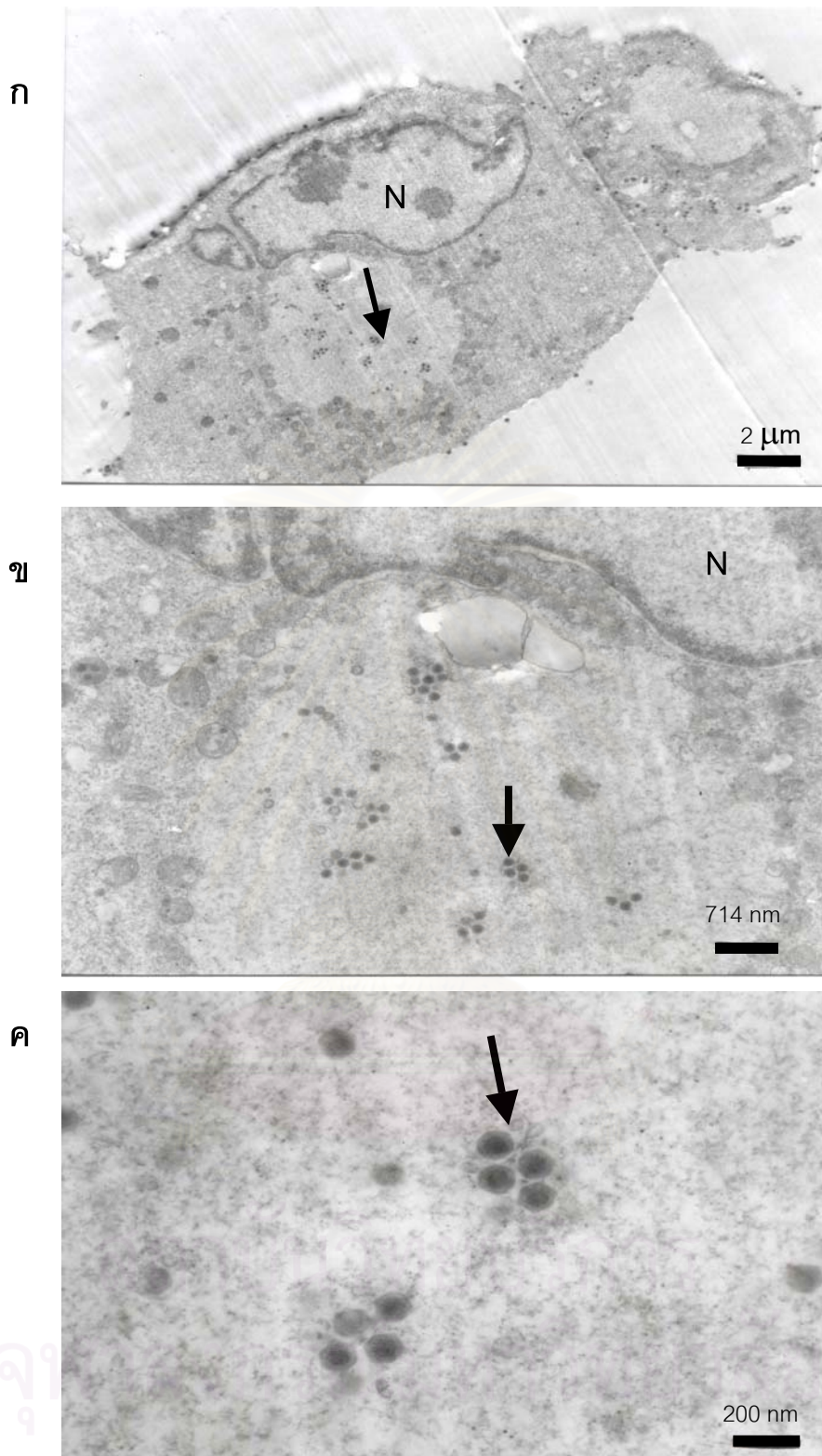
ข



ค



ภาพที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านแสดงไวรัสกำลังปลดปล่อยจากเซลล์เพาะเลี้ยง EPC (ลูกศรชี้ คือ อนุภาคไวรัส, V=vacuole), ก; กำลังขยาย x4000, ข; กำลังขยาย x12k, ค; กำลังขยาย x40k



ภาพที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านแสดงไวรัสภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เพาะเลี้ยง EPC (ลูกศรชี้ คือ อนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นนิวคลีโอแคปซิด, N=nucleus), ก; กำลังขยาย x12k, ข; กำลังขยาย x20k, ค; กำลังขยาย x30k

2.2 ลักษณะสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของไวรัสจากปลาบู่ทราย

2.2.1 ชนิดของกรดนิวคลีอิกของไวรัส (Type of nucleic acid)

ตรวจสอบการเกิด cytopathic effect ของเซลล์เพาะเลี้ยง EPC โดยคำนวณเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของกลุ่มที่ใส่และไม่ใส่ IUdR พบว่า ในกลุ่มที่ใส่ IUdR มีค่าไตเตอร์ $2.49 \pm 0.50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ส่วนกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่ใส่ IUdR มีค่าไตเตอร์ $9.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ แสดงว่าสาร IUdR สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสชนิดนี้ได้ ซึ่งสรุปได้ว่าไวรัสนี้มีสารพันธุกรรมเป็นชนิดดีเอ็นเอ

2.2.2 การทนต่อตัวทำละลายไขมัน (Sensitivity to lipid solvent)

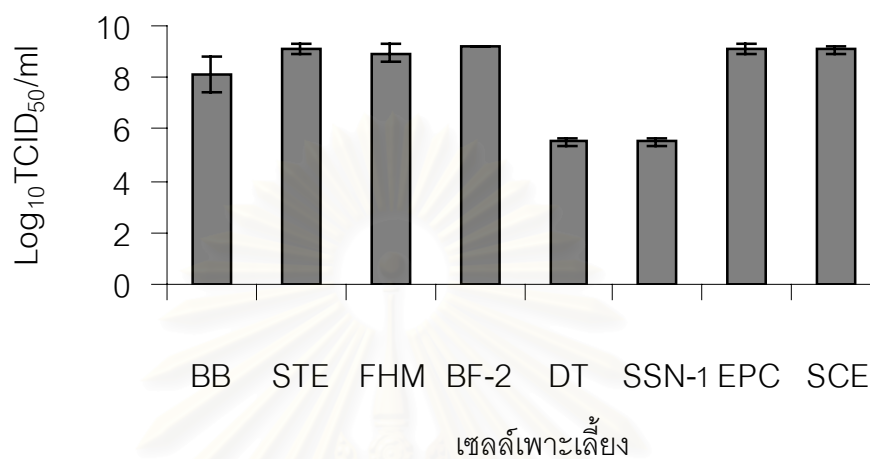
เมื่อทดสอบการทนต่อสารละลายคลอโรฟอร์มของเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC พบว่า สารละลายคลอโรฟอร์มมีผลทำให้การเจริญของไวรัสลดลงโดยมีค่าไตเตอร์ $1.06 \pm 1.84 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ในขณะที่กลุ่มควบคุมไวรัสสามารถเจริญได้มากกว่าคือมีค่าไตเตอร์ $8.86 \pm 0.57 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ โดยดูจากการเกิด cytopathic effect ของเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงว่าไวรัสนี้เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม

2.2.3 การทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C (Sensitivity to heat)

การทดสอบเสถียรภาพของเชื้อไวรัสหรือองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อไวรัสในสภาพอุณหภูมิ 56°C พบว่า เมื่อต้มไวรัสจากปลาบู่ทรายที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ความร้อนที่อุณหภูมินี้มีผลทำให้การเจริญของไวรัสลดลงโดยมีค่าไตเตอร์ $3.85 \pm 0.54 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ และ $3.3 \pm 0.79 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ตามลำดับ ในขณะที่ไวรัสกลุ่มควบคุมมีค่าไตเตอร์ $9.03 \pm 0.28 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$

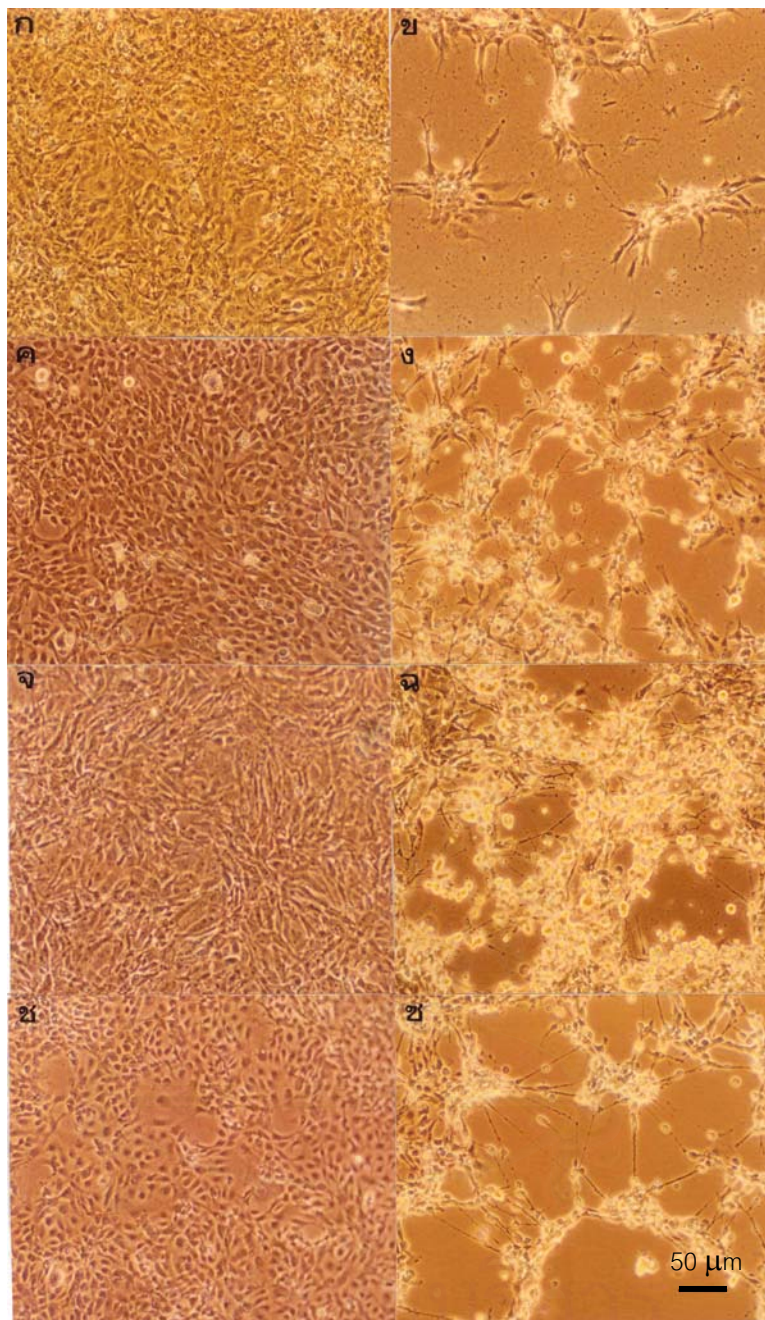
2.2.4 ทดสอบการยอมรับการติดเชื้อของไวรัสจากปลาบู่ทรายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ (Cell line susceptibility)

เมื่อนำไวรัสจากปลาบู่ทรายมาทดสอบการเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยง 8 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา ได้แก่ EPC, FHM, BF-2, DT, SSN-1 และ BB เซลล์เพาะเลี้ยงของตะพานน้ำ STE และ เซลล์เพาะเลี้ยงของจระเข้ SCE พบว่า ไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 8 ชนิด ไวรัสนี้เจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง BF-2, SCE, EPC และ STE โดยมีค่าไตเตอร์ $9.2, 9.06 \pm 0.11, 9.09 \pm 0.19$ และ $9.09 \pm 0.190 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ รองลงมาคือเซลล์เพาะเลี้ยง FHM, BB, SSN-1 และ DT มีค่าไตเตอร์ $8.93 \pm 0.33, 8.1 \pm 0.69, 5.53 \pm 0.15$ และ $5.53 \pm 0.15 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ตามลำดับ ดังภาพที่ 9 ลักษณะการเกิด cytopathic effect จากเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 8 ชนิดมีลักษณะคล้ายกันคือ เซลล์ที่ติดเชื้อจากไวรัสจะมีลักษณะบวม กลม วาวแสง หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ บริเวณที่เซลล์ถูกทำลายจะค่อยๆ ขยายออกไป ดังภาพที่ 10 -11



ภาพที่ 9 กราฟแท่งเปรียบเทียบการยอมรับการติดเชื้อของไวรัสจากปลาบู่ทรายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ได้แก่ BB, FHM, BF-2, DT, SSN-1, EPC, STE และ SCE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



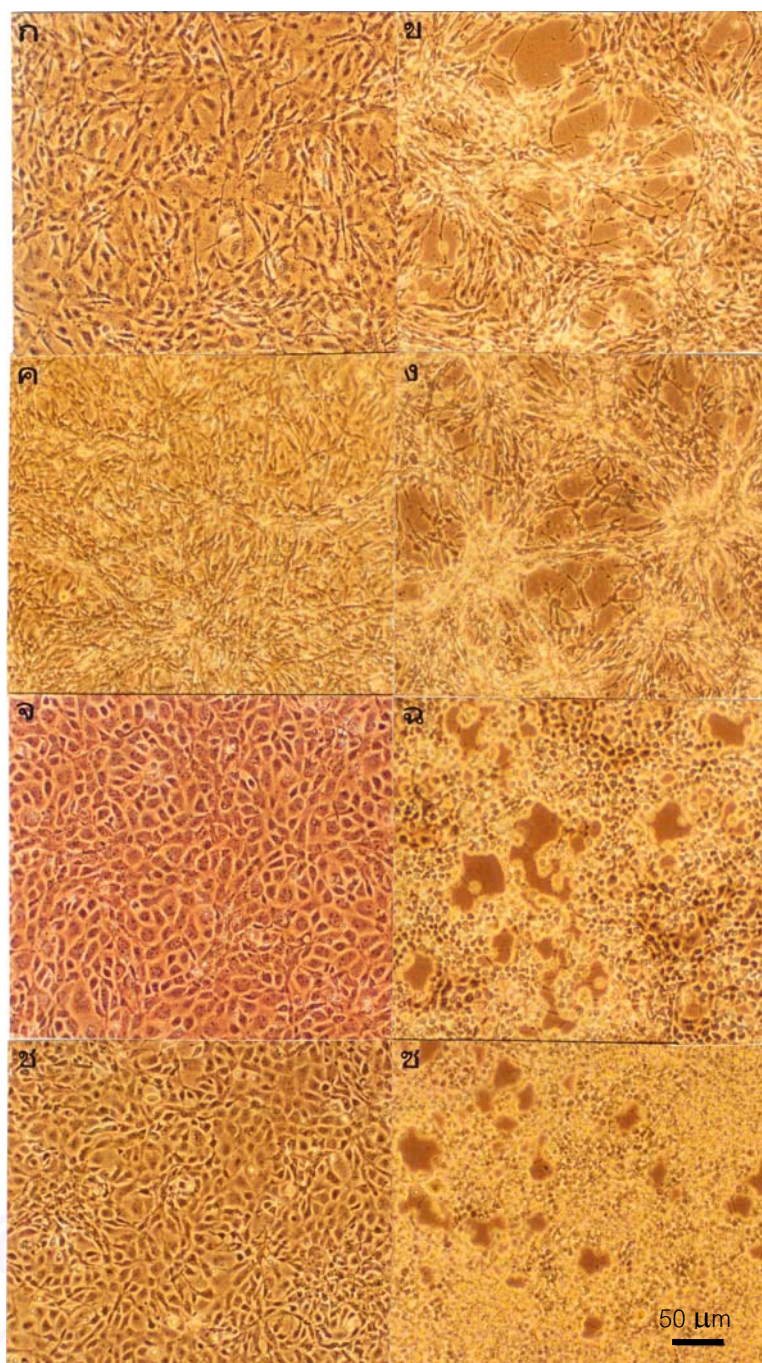
ภาพที่ 10 การเกิด cytopathic effect จากเชื้อไวรัสจากปลาน้ำจืดในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ;

ก; เซลล์เพาะเลี้ยง FHM ปกติ passage ที่ 165 ข; เซลล์เพาะเลี้ยง FHM เกิด cytopathic effect

ค; เซลล์เพาะเลี้ยง BB ปกติ passage ที่ 145 ง; เซลล์เพาะเลี้ยง BB เกิด cytopathic effect

จ; เซลล์เพาะเลี้ยง DT ปกติ passage ที่ 133 ฉ; เซลล์เพาะเลี้ยง DT เกิด cytopathic effect

ช; เซลล์เพาะเลี้ยง SSN-1 ปกติ passage ที่ 137 ฅ; เซลล์เพาะเลี้ยง SSN-1 เกิด cytopathic effect



ภาพที่ 11 การเกิด cytopathic effect จากเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ;

- ก; เซลล์เพาะเลี้ยง SCE ปกติ passage ที่ 140 ข; เซลล์เพาะเลี้ยง SCE เกิด cytopathic effect
 ค; เซลล์เพาะเลี้ยง BF-2 ปกติ passage ที่ 145 ง; เซลล์เพาะเลี้ยง BF-2 เกิด cytopathic effect
 จ; เซลล์เพาะเลี้ยง EPC ปกติ passage ที่ 140 ฉ; เซลล์เพาะเลี้ยง EPC เกิด cytopathic effect
 ช; เซลล์เพาะเลี้ยง STE ปกติ passage ที่ 147 ซ; เซลล์เพาะเลี้ยง STE เกิด cytopathic effect

2.2.5 การทนต่อสภาพกรดที่ pH 3 (Stability at low pH)

ทดสอบเสถียรภาพของเชื้อไวรัสหรือองค์ประกอบโปรตีนของเชื้อไวรัสที่ pH 3 พบว่า เมื่อบ่มไวรัสที่อุณหภูมิ 25°C ที่ pH 3 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไวรัสไปทำการไตเตรดเพื่อคำนวณหาค่า TCID₅₀/ ml พบว่า ในสภาพเป็นกรดที่ pH3 ไวรัสถูกยับยั้งการเจริญ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไวรัสที่บ่มด้วย HBSS ซึ่งมีสภาพที่เป็นกลาง (pH 7.2) สามารถเจริญได้มีค่าไตเตอร์ 9.09±0.19 Log₁₀ TCID₅₀/ ml

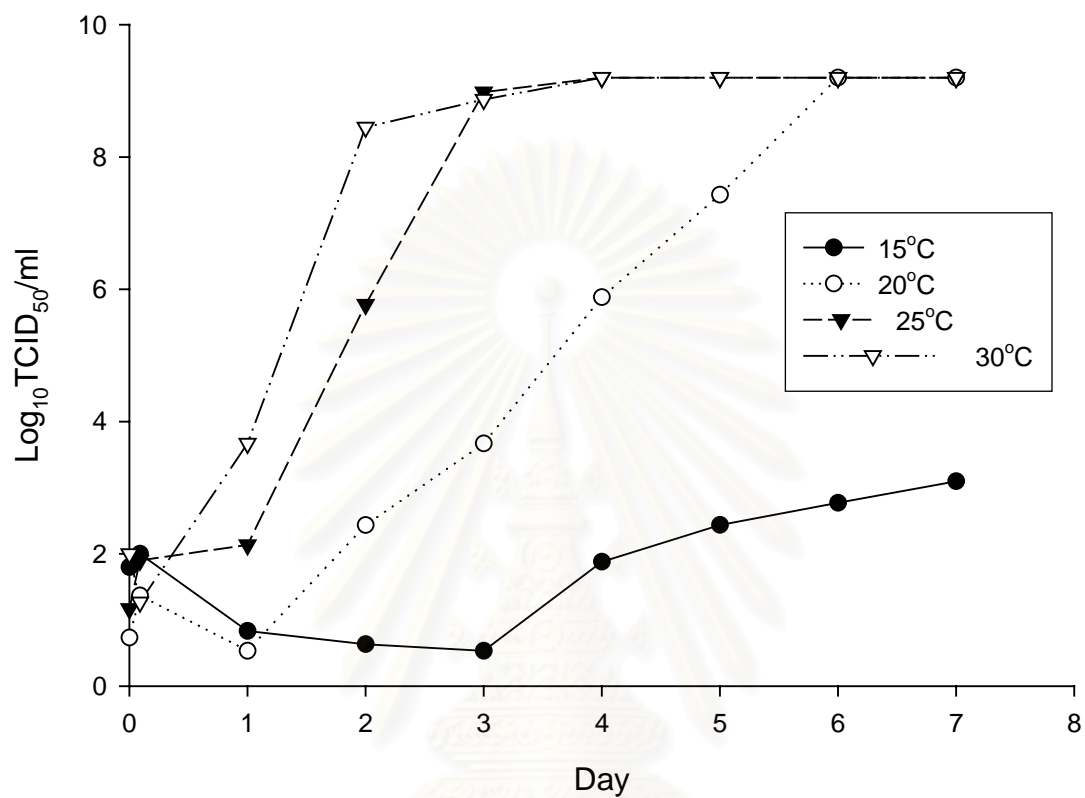
2.2.6 การทดสอบอุณหภูมิกับการเจริญของไวรัส (Optimum growth temperature)

เมื่อทดสอบอุณหภูมิกับการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทราย พบว่า หลังจากบ่มไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC จำนวน 4 ขวด ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะและเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นล้างไวรัสที่ไม่ได้เกาะผิวเซลล์ด้วย HBSS ออกให้มากที่สุด แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ลงในขวดเพาะเลี้ยงและดูอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ออกเพื่อตรวจหาปริมาณไวรัสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ ไวรัสที่ไม่เข้าสู่เซลล์ โดยวิธีไตเตรชัน (0 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อไวรัส) พบว่า มีค่าไตเตอร์ 1.8, 0.73, 1.6 และ 2 Log₁₀ TCID₅₀/ ml และหลังจากนำขวดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30°C ศึกษาการเกิด cytopathic effect ของเซลล์ภายใน 7 วัน หลังจากการติดเชื้อไวรัสพบว่า เซลล์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 15°C เซลล์ไม่เกิด cytopathic effect ภายใน 7 วัน (เซลล์เริ่มเกิด cytopathic effect ในวันที่ 8) ส่วนไวรัสที่บ่มที่อุณหภูมิ 20°C เซลล์เริ่มเกิด cytopathic effect ในวันที่ 2 และเกิด cytopathic effect สมบูรณ์ ในวันที่ 6 ในขณะที่ไวรัสที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C เซลล์เริ่มเกิด cytopathic effect ในวันที่ 2 และ เซลล์เกิด cytopathic effect สมบูรณ์ ในวันที่ 3 และ 2 ตามลำดับ ดังภาพที่ 12 และตารางที่ 7 สรุปได้ว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30°C รองลงมา คือ ที่อุณหภูมิ 20 และ 15°C ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติ (ANOVA) พบว่า ค่าเฉลี่ย Log₁₀TCID₅₀/ml ของแต่ละอุณหภูมิมีนัยสำคัญ (p< 0.05) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ย Log₁₀TCID₅₀/ml ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30°C (mean±SD)

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ย Log ₁₀ TCID ₅₀ / ml
15	1.89 ± 0.92 ^a
20	4.98 ± 3.12 ^b
25	6.82 ± 3.48 ^c
30	7.17 ± 3.43 ^c

ตัวอักษรเหนือตัวเลขในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



ภาพที่ 12 ปริมาณไวรัสจากปลาบู่ทรายที่ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ที่ อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ปริมาณไวรัสจากปลาบู่ทราย ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml} \pm \text{SD}$) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก เซลล์
เพาะเลี้ยง EPC ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 °C

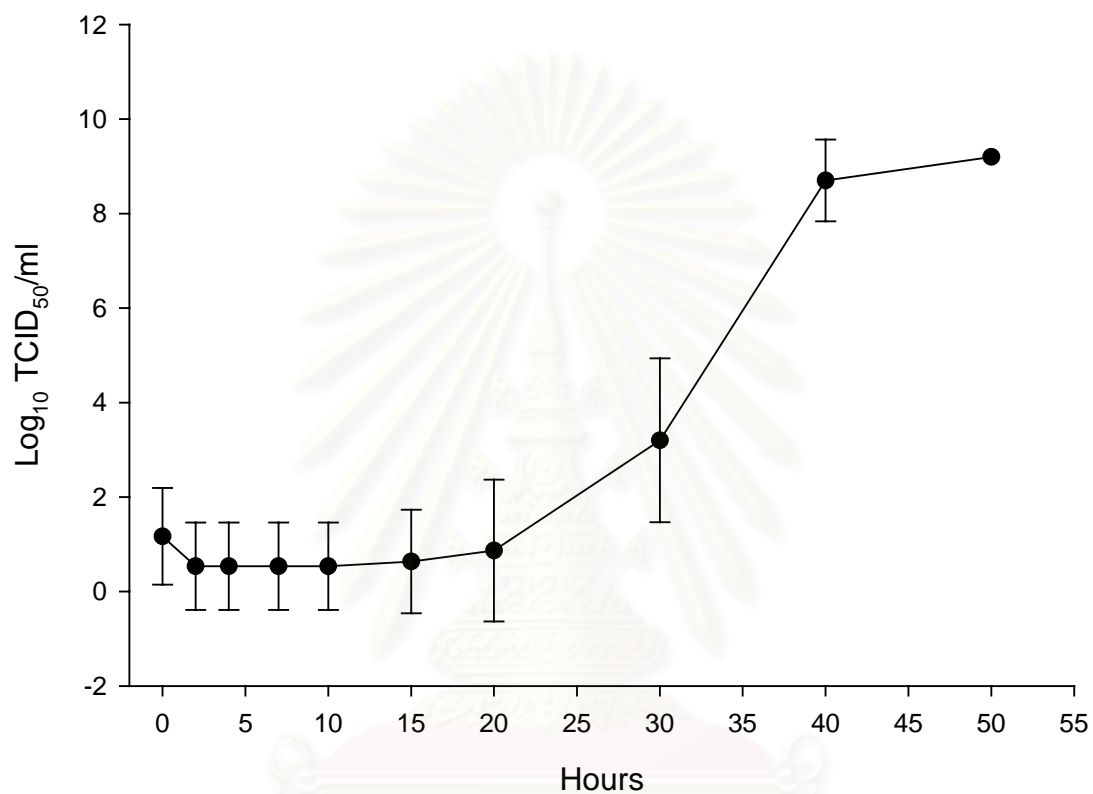
เวลา (วัน)	อุณหภูมิ (°C)			
	15	20	25	30
0	1.8±0.17 -	0.73±0.27 -	1.16±1.02 -	2.0±0.34 -
0.09	2.0±0.45 -	1.36±0.12 -	1.90 -	1.26±0.13 -
1	0.83±1.44 -	0.53±0.92 -	2.13±2.98 ++	3.66±1.32 +++
2	0.63±1.09 -	2.43±0.40 +	5.76±0.92 +++	8.44±0.80 ++++
3	0.53±0.92 -	3.66±0.40 ++	8.98±0.66 ++++	8.86±0.57 ++++
4	1.88±0.33 -	5.88±0.98 +++	9.2±0.38 ++++	9.20 ++++
5	2.43±0.52 -	7.42±0.19 ++++	9.2 ++++	9.20 ++++
6	2.77±0.19 -	9.20 ++++	9.20 ++++	9.20 ++++
7	3.09±0.36 -	9.20 ++++	9.20 ++++	9.20 ++++

- + = เซลล์เกิด cytopathic effect 20 เปอร์เซ็นต์
 ++ = เซลล์เกิด cytopathic effect 50 เปอร์เซ็นต์
 +++ = เซลล์เกิด cytopathic effect 70 เปอร์เซ็นต์
 ++++ = เซลล์เกิด cytopathic effect 100 เปอร์เซ็นต์

2.2.7 หาระยะเวลาในการติดเชื้อจนถึงการปลดปล่อยเชื้อไวรัสจากเซลล์เจ้าบ้าน

(One-Step Growth Cycle)

ผลการหาระยะเวลาในการติดเชื้อจนถึงการปลดปล่อยเชื้อไวรัสจากเซลล์เจ้าบ้าน แสดงในภาพที่ 13 ดังนี้ เมื่อทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง EPC ติดเชื้อด้วยไวรัสจากปลาบู่ทราย หลังจากบ่มไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะและเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นล้างไวรัสที่เหลือออกให้มากที่สุด และเมื่อนำส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์มาไ้เตรดและคำนวณหาปริมาณไวรัสพบว่ามีค่าไตเตอร์ $1.16 \pm 1.02 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C ต่อไปอีกและเก็บส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์มาไ้เตรดเพื่อคำนวณหาปริมาณไวรัสที่ชั่วโมงที่ 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 40 และ 50 พบว่า ชั่วโมงที่ 2, 4, 7 และ 10 ปริมาณไวรัสมีค่าไตเตอร์ $0.53 \pm 0.92 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ แสดงว่าไม่มีการปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูกออกภายนอกเซลล์ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 15 เซลล์ EPC บางเซลล์มีรูปร่างกลม บวม หดตัวเป็นเซลล์เดี่ยวกระจายอยู่ทั่วไปทั้งพื้นที่ผิวและมีค่าไตเตอร์ $0.63 \pm 1.09 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ แสดงว่า เริ่มมีการปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูก (new progeny) ออกภายนอกเซลล์ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 20 ไวรัสมีค่าไตเตอร์ $0.83 \pm 1.50 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ และพบเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมีมากขึ้น เมื่อถึงชั่วโมงที่ 30 ไวรัสมีค่าไตเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น $3.2 \pm 1.73 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ ลักษณะของเซลล์เริ่มตายเป็นกลุ่มๆ จากกลุ่มเล็กๆ แล้วขยายออกเป็นวงกว้างเห็นเป็นช่องว่างหรือ plaque เซลล์เกิด cytopathic effect ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมง 40 ไวรัสมีค่าไตเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น $7.7 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ เซลล์เกิด cytopathic effect ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 50 เซลล์เกิด cytopathic effect สมบูรณ์ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายใช้เวลาหลังจากเกาะและเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน มีการเจริญ สร้างและปลดปล่อย ไวรัสรุ่นใหม่ใช้เวลาประมาณ 15 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 การเพิ่มปริมาณไวรัสจากปลาบู่ทรายตั้งแต่เริ่มติดเชื้อจนถึงการปลดปล่อย
ไวรัสจากเซลล์เจ้าบ้าน (One-Step Growth Cycle) ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 การศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิดของไวรัสจากปลาบู่ทราย

3.1 การบ่งชี้ชนิดและการเปรียบเทียบสมบัติของโปรตีนและสมบัติทางซีรัมวิทยาของไวรัสต่าง ๆ

3.1.1 การทำไวรัสให้บริสุทธิ์

จากการเตรียมไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus ให้บริสุทธิ์ แล้วนำแถบของไวรัสไปวัดหาค่าดัชนีการหักเหของสารละลายน้ำตาลเพื่อเทียบหาค่าความหนาแน่นของอนุภาคไวรัสชนิดต่างๆ พบว่า ค่าความหนาแน่นของอนุภาคไวรัสแต่ละชนิดได้ผลดังตารางที่ 8 ซึ่งมีค่าความหนาแน่นในช่วง 1.1658-1.2087 g/cm³ โดยที่ไวรัส Seabass iridovirus มีค่าความหนาแน่นสูงสุด คือ 1.2087 g/cm³ รองลงมาคือ ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด มีความหนาแน่น 1.2070 g/cm³ ในขณะที่ไวรัสจากปลาบู่ทราย มีความหนาแน่นน้อยที่สุด คือ 1.1658 g/cm³

ตารางที่ 8 ค่าความหนาแน่น (g/cm³) ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus

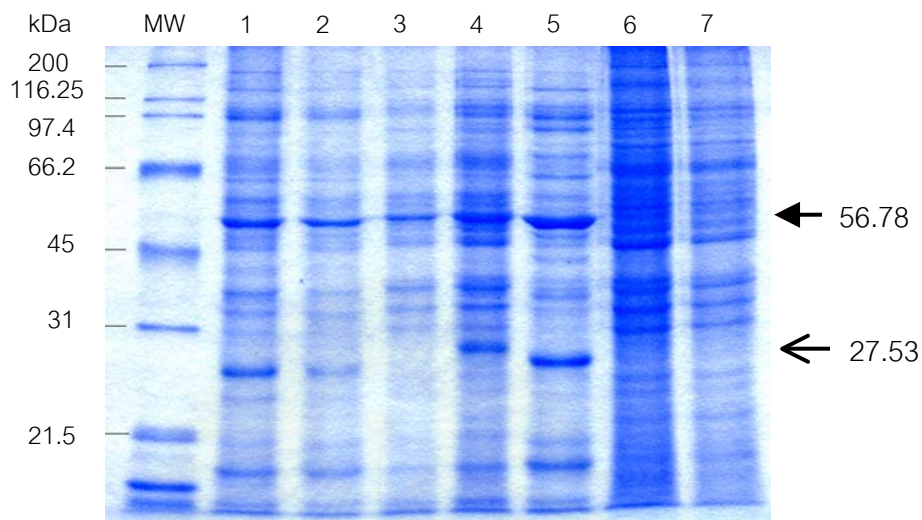
ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus

ชนิดของไวรัส	ⁿ D(refractive index)	Density (g/cm ³)
ไวรัสจากปลาบู่ทราย	1.3951	1.1658
Tiger frog iridovirus	1.4010	1.1811
ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา	1.3954	1.1660
ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร	1.4069	1.1966
ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด	1.4107	1.2070
Seabass iridovirus	1.4126	1.2087
Grouper iridovirus	1.4046	1.1877

3.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ไวรัสทั้ง 7 ชนิด มีแถบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบมากกว่า 20 แถบ คือ มีแถบโปรตีนจำนวน 23, 23, 21, 31, 24, 31 และ 24 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14 โดยองค์ประกอบของโปรตีนเหล่านี้มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 6.5 ถึง 200 kDa และสามารถแบ่งรูปแบบของโปรตีน (electrophoretic pattern) ของไวรัสออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร และ ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus

ไวรัสจากปลาบู่ทราย มีรูปแบบของโปรตีนคล้ายคลึงกับไวรัสที่แยกได้จากกบจังหวัดต่างๆมากที่สุด แถบโปรตีนที่พบได้ทั้งในไวรัสจากปลาบู่ทราย และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆคือ โปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 56.78 kDa (ลูกศรทึบชี้) ในขณะเดียวกันก็มีบางแถบโปรตีนที่พบในไวรัสจากปลาบู่ทราย แต่ไม่พบแถบโปรตีนนี้ในไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา และไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร คือแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 27.53 kDa (ลูกศรโปร่งชี้) นอกจากนี้ไวรัสจากปลาบู่ทรายมีรูปแบบของโปรตีนคล้ายคลึงกับไวรัส Tiger frog iridovirus มากที่สุด



ภาพที่ 14 รูปแบบโปรตีนของไวรัสชนิดต่างๆ เมื่อย้อมด้วยสี coomassie blue (ลูกศรทึบ คือ 56.78 kDa, ลูกศรโปร่ง คือ 27.53 kDa)

MW = Standard protein

แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

แถวที่ 6 = ไวรัส Seabass iridovirus

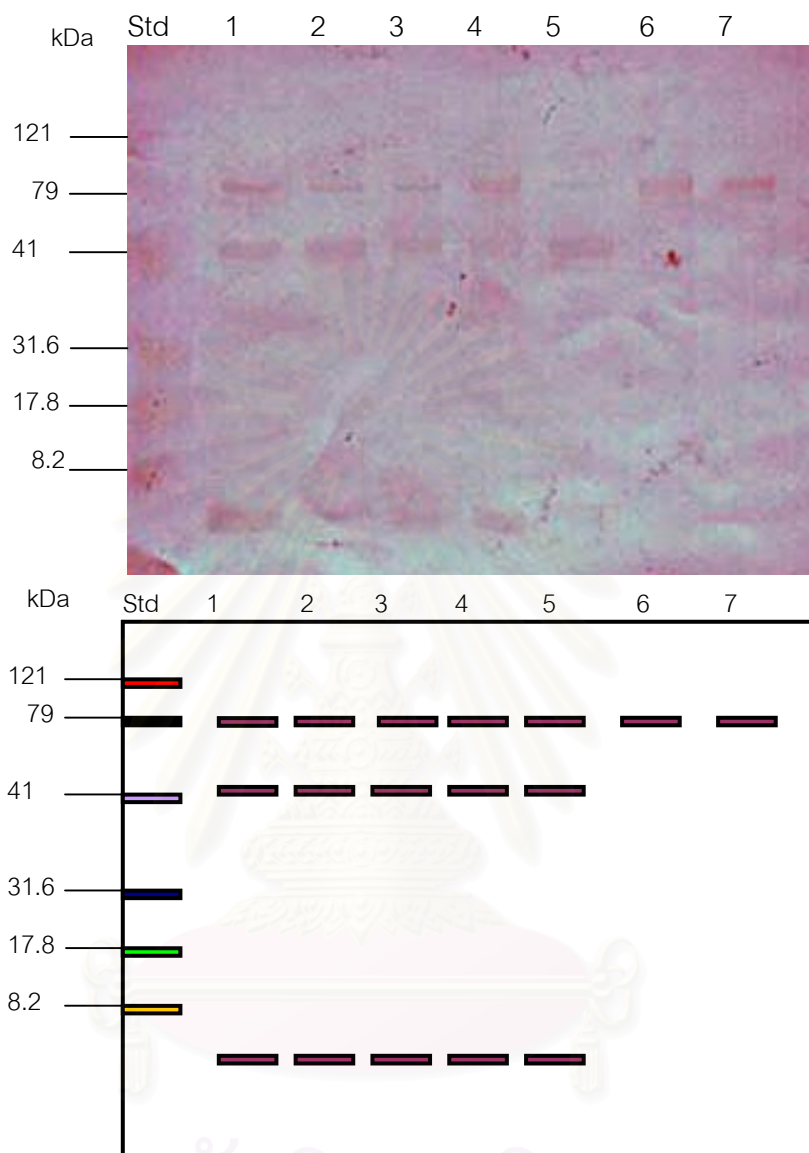
แถวที่ 7 = ไวรัส Grouper iridovirus

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 การลบล้างฤทธิ์ (Neutralization)

จากผลการศึกษาการลบล้างฤทธิ์ของซีรัมจากกระต่ายที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีด้วยไวรัสจากปลาบู่ทราย พบว่า กลุ่มทดลองมีค่าไตเตอร์ $9.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าไตเตอร์ $9.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ดังนั้นสรุปได้ว่า แอนติบอดีของกระต่ายต่อไวรัสจากปลาบู่ทรายที่เตรียมได้ครั้งนี้ไม่สามารถลบล้างฤทธิ์ไวรัสจากปลาบู่ทรายได้

เมื่อใช้เทคนิค Western blot ในการตรวจสอบความจำเพาะของซีรัมกระต่ายที่ถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีด้วยไวรัสจากปลาบู่ทรายต่อองค์ประกอบโปรตีนของไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus ที่แยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วถ่ายแถบโปรตีนมาอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสและทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของกระต่ายบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ผลดังแสดงในภาพที่ 15 จากภาพจะเห็นได้ว่า มีแถบสีเข้ม 3 แถบเกิดขึ้นที่แถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 74.13, 48.97 และ น้อยกว่า 8.2 kDa ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ส่วนไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus ไม่พบแถบโปรตีนที่ 48.97 kDa และน้อยกว่า 8.2 kDa ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถจำแนกกลุ่มไวรัสได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร และ ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus



ภาพที่ 15 ผลปฏิบัติการจำเพาะโดยวิธี Western blot ของแอนติซีรัมต่อไวรัสจากปลาบู่ทรายกับ องค์ประกอบโปรตีนของไวรัสชนิดต่างๆที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE

Std = standard protein

แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

แถวที่ 6 = ไวรัส Seabass iridovirus

แถวที่ 7 = ไวรัส Grouper iridovirus

3.2 การบ่งชี้และเปรียบเทียบไวรัสจากปลาบู่ทรายและไวรัสต่างๆทางอณูชีววิทยา

3.2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp DNA Mini kit

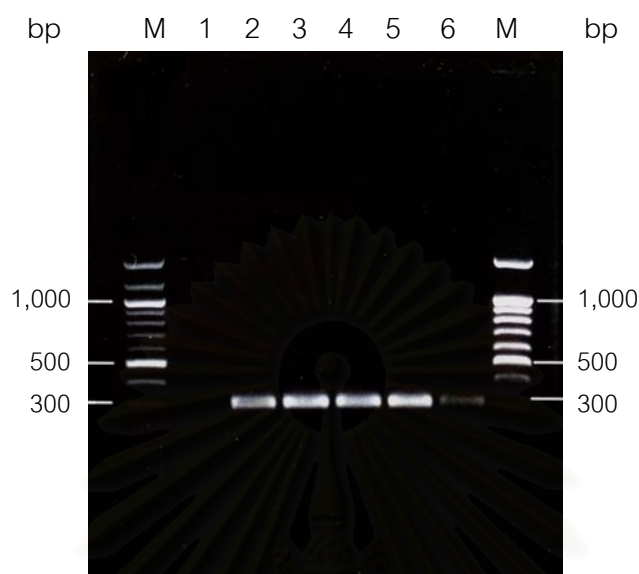
เมื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากบึงจังหวัดสงขลา ไวรัสจากบึงจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากบึงจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ที่สกัดได้จากชุด QIAamp DNA Mini kit ด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุด QIAamp DNA Mini kit

ไวรัส	ปริมาณดีเอ็นเอ (µg / µl)
ไวรัสจากปลาบู่ทราย	0.435
Tiger frog iridovirus	0.575
ไวรัสจากบึงจังหวัดสงขลา	0.490
ไวรัสจากบึงจังหวัดพิจิตร	0.475
ไวรัสจากบึงจังหวัดร้อยเอ็ด	0.630
Seabass iridovirus	0.525
Grouper iridovirus	0.485

3.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน Major capsid protein ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์

3.2.2.1 ในการทดลองหาปริมาณ DNA template และ primer ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาของพีซีอาร์ โดยใช้ DNA template จากไวรัสของปลาบู่ทรายแสดงผลการศึกษาครั้งนี้ เมื่อสกัดดีเอ็นเอของไวรัสจากปลาบู่ทราย โดย QIAamp DNA Mini kit แล้วนำไปวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีปริมาณ 0.435 µg / µl ใช้ไวรัสนี้เป็น DNA template โดยใส่ลงในปฏิกิริยาของพีซีอาร์ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0.435 0.87 1.74 และ 2.61 µg เมื่อทำพีซีอาร์และ gel electrophoresis แล้ว ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่า ปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ เพิ่มมากขึ้นหรือแถบดีเอ็นเอเด่นชัดขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ DNA template จาก 0.435 ถึง 2.61 µg แต่ในกรณีที่ปริมาณ DNA template สูงเกิน 2.61 µg แล้วพบว่าผลผลิตพีซีอาร์จะน้อยลง



ภาพที่ 16 ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 bp ของยีน major capsid protein ของเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทราย ที่ ปริมาณ DNA template ต่างกัน โดยมีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5 mM และ primer 0.4 μM บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide

M = 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 = 0 μg

แถวที่ 2 = 0.435 μg

แถวที่ 3 = 0.87 μg

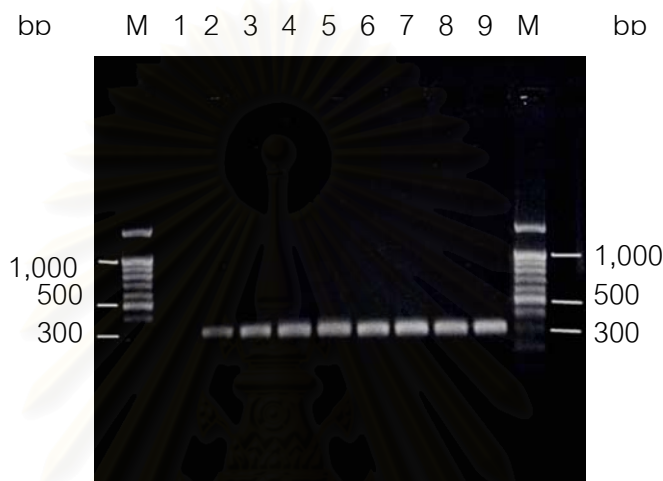
แถวที่ 4 = 1.74 μg

แถวที่ 5 = 2.61 μg

แถวที่ 6 = 3.48 μg

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน major capsid protein ของไวรัสจากปลาบู่ทรายที่ primer มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-0.8 μM ดังแสดงในภาพที่ 17 พบว่า ผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาด 300 bp พบเริ่มแรกที่ 0.1 μM และเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ primer เพิ่มขึ้นเป็น 0.2, 0.3 และ 0.4 μM ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้นของ primer สูงกว่า 0.4 μM ผลผลิตของพีซีอาร์ไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ primer ที่ 0.4 μM เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณยีน major capsid protein ของไวรัสจากปลาบู่ทราย



ภาพที่ 17 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 300 bp ของยีน major capsid protein ของเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทราย เมื่อปริมาณ primer ต่างกัน โดยมีความเข้มข้นของ MgCl_2 1.5 mM และ DNA template 0.435 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide

M = 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 = primer 0 μM

แถวที่ 2 = primer 0.1 μM

แถวที่ 3 = primer 0.2 μM

แถวที่ 4 = primer 0.3 μM

แถวที่ 5 = primer 0.4 μM

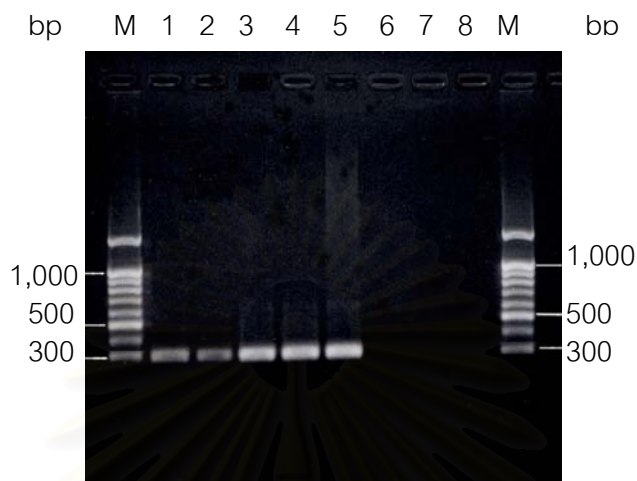
แถวที่ 6 = primer 0.5 μM

แถวที่ 7 = primer 0.6 μM

แถวที่ 8 = primer 0.7 μM

แถวที่ 9 = primer 0.8 μM

3.2.2.2 จากการทดลองข้อ 3.2.2.1 สามารถสรุปได้ว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในบางส่วนของยีน major capsid protein ปริมาณ DNA template ที่เหมาะสม คือ 0.435 μg และปริมาณ primer ที่เหมาะสม คือ 0.4 μM ดังนั้นในการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 300 bp ของไวรัสต่างๆ จึงใช้ปริมาณ DNA template และปริมาณ primer ดังกล่าว การเปรียบเทียบผล ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอ ขนาด 300 bp ของไวรัสต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 18 พบว่าได้ผลผลิต พีซีอาร์ ขนาด 300 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัด สงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร และ ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ดได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็น เอของไวรัส Sea bass iridovirus และ Grouper iridovirus นอกจากนี้ยังได้ส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไป ยังศูนย์หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อตรวจหาลำดับเบส ของไวรัสชนิดต่างๆ เมื่อนำลำดับเบสของไวรัสแต่ละชนิดมา align เปรียบเทียบกับ Rana tigrina ranavirus จาก Gene bank รหัส AY 033630 ด้วยโปรแกรม sequencing navigator ได้ผลดังภาพที่ 19 พบว่าลำดับเบสของไวรัสเหล่านี้เหมือนกันยกเว้นลำดับเบสที่ตำแหน่ง 117 ของไวรัสจากกบจังหวัด ร้อยเอ็ดที่ต่างจากไวรัสอื่น



ภาพที่ 18 ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 300 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิด
 ต่างๆ มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5 mM และ primer 0.4 μM บน 1%
 agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide

M = 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาหมอทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

แถวที่ 6 = ไวรัส Seabass iridovirus

แถวที่ 7 = ไวรัส Grouper iridovirus

แถวที่ 8 = Negative control

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Oxyeleotris mamoratus ranavirus	TATGACAATC	TTGAGAGAGC	AATGTACGGG	GGTTCGGACG	CCACCACGTA	CTTTGTCAAG	GAGCACTACC	CCGTGGGGTG	GTTCACCAAG
Tiger Frog iridovirus	TATGACAATC	TTGAGAGAGC	AATGTACGGG	GGTTCGGACG	CCACCACGTA	CTTTGTCAAG	GAGCACTACC	CCGTGGGGTG	GTTCACCAAG
Rana tigrina ranavirus-Songkhla	TATGACAATC	TTGAGAGAGC	AATGTACGGG	GGTTCGGACG	CCACCACGTA	CTTTGTCAAG	GAGCACTACC	CCGTGGGGTG	GTTCACCAAG
Rana tigrina ranavirus-Pijit	TATGACAATC	TTGAGAGAGC	AATGTACGGG	GGTTCGGACG	CCACCACGTA	CTTTGTCAAG	GAGCACTACC	CCGTGGGGTG	GTTCACCAAG
Rana tigrina ranavirus-Roiate	TATGACAATC	TTGAGAGAGC	AATGTACGGG	GGTTCGGACG	CCACCACGTA	CTTTGTCAAG	GAGCACTACC	CCGTGGGGTG	GTTCACCAAG
AY033630 Rana tigrina ranavirus	TATGACAATC	TTGAGAGAGC	AATGTACGGG	GGTTCGGACG	CCACCACGTA	CTTTGTCAAG	GAGCACTACC	CCGTGGGGTG	GTTCACCAAG
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Oxyeleotris mamoratus ranavirus	CTGCCGTCTC	TGGCTGCCAA	GATGTCTGGT	AACCCGGCTT	TCGGGCAGCA	GTTTTCGGTC	GGCGTTCCCA	GGTCGGGGGA	TTACATCCTC
Tiger Frog iridovirus	CTGCCGTCTC	TGGCTGCCAA	GATGTCTGGT	AACCCGGCTT	TCGGGCAGCA	GTTTTCGGTC	GGCGTTCCCA	GGTCGGGGGA	TTACATCCTC
Rana tigrina ranavirus-Songkhla	CTGCCGTCTC	TGGCTGCCAA	GATGTCTGGT	AACCCGGCTT	TCGGGCAGCA	GTTTTCGGTC	GGCGTTCCCA	GGTCGGGGGA	TTACATCCTC
Rana tigrina ranavirus-Pijit	CTGCCGTCTC	TGGCTGCCAA	GATGTCTGGT	AACCCGGCTT	TCGGGCAGCA	GTTTTCGGTC	GGCGTTCCCA	GGTCGGGGGA	TTACATCCTC
Rana tigrina ranavirus-Roiate	CTGCCGTCTC	TGGCTGCCAA	GATGTCTGGT	AACCCGGCTT	TCGGGCAGCA	GTTTTCGGTC	GGCGTTCCCA	GGTCGGGGGA	TTACATCCTC
AY033630 Rana tigrina ranavirus	CTGCCGTCTC	TGGCTGCCAA	GATGTCTGGT	AACCCGGCTT	TCGGGCAGCA	GTTTTCGGTC	GGCGTTCCCA	GGTCGGGGGA	TTACATCCTC
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
Oxyeleotris mamoratus ranavirus	AACGCCTGGT	TGGTACTCAA	GACCCCTGAG	GTCGAGCTCC	TGGCCGCAAA	CCAGCTGGGA	GAAAATGGCA	CCATCAGGtG	GACA
Tiger Frog iridovirus	AACGCCTGGT	TGGTACTCAA	GACCCCTGAG	GTCGAGCTCC	TGGCCGCAAA	CCAGCTGGGA	GAAAATGGCA	CCATCAGGtG	GACA
Rana tigrina ranavirus-Songkhla	AACGCCTGGT	TGGTACTCAA	GACCCCTGAG	GTCGAGCTCC	TGGCCGCAAA	CCAGCTGGGA	GAAAATGGCA	CCATCAGGtG	GACA
Rana tigrina ranavirus-Pijit	AACGCCTGGT	TGGTACTCAA	GACCCCTGAG	GTCGAGCTCC	TGGCCGCAAA	CCAGCTGGGA	GAAAATGGCA	CCATCAGGtG	GACA
Rana tigrina ranavirus-Roiate	AACGCCTGGT	TGGTACTCAA	GACCCCTGAG	GTCGAGCTCC	TGGCCGCAAA	CCAGCTGGGA	GAAAATGGCA	CCATCAGGtG	GACA
AY033630 Rana tigrina ranavirus	AACGCCTGGT	TGGTACTCAA	GACCCCTGAG	GTCGAGCTCC	TGGCCGCAAA	CCAGCTGGGA	GAAAATGGCA	CCATCAGGtG	GACA

ภาพที่ 19 ลำดับเบสของยีน major capsid protein ขนาด 300 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย, ไวรัส Tiger frog iridovirus, ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา, ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร, ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด และ Rana tigrina ranavirus Miao et al., 2001(unpublished).

(Character: Match: -, Mismatch: *)

3.2.2.3 ผลการเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยีน major capsid protein ทั้งสาย ขนาด 1,400 bp ของไวรัสต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 20 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน major capsid protein ขนาด 1,400 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตรและไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ดได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัส Seabass iridovirus และ Grouper iridovirus



ภาพที่ 20 ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆ มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5 mM และ primer 0.4 μM บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide

M = 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

แถวที่ 6 = ไวรัส Seabass iridovirus

แถวที่ 7 = ไวรัส Grouper iridovirus

แถวที่ 8 = Negative control

3.2.3 การตัดยีน major capsid protein ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อนำผลผลิตของยีน major capsid protein ขนาด 1,400 bp ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร และ ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Msp I*, *Alu I*, *Sau3A I* และ *Mbo II* และนำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผลการทดลองดังต่อไปนี้

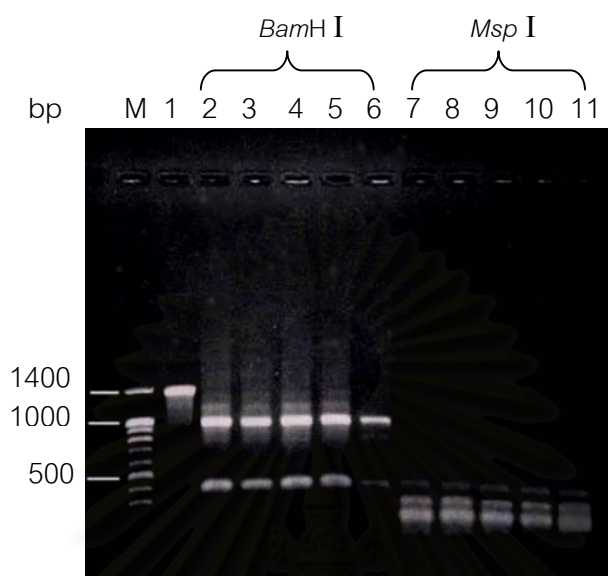
- เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* ดังแสดงในภาพที่ 21 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆเหมือนกัน คือ ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ 400 และ 1,000 bp

- เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp I* ดังแสดงในภาพที่ 21 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆเหมือนกัน คือ ได้แถบดีเอ็นเอที่ 400 300 และ 200 bp

- เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo II* ดังแสดงในภาพที่ 22 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆเหมือนกัน คือ ได้แถบดีเอ็นเอที่ 800, 350 และ 150 bp

- เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu I* ดังแสดงในภาพที่ 23 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆเหมือนกัน คือ ได้แถบดีเอ็นเอที่ 950 และ 450 bp

- เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A I* ดังแสดงในภาพที่ 24 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆเหมือนกัน คือ ได้แถบดีเอ็นเอที่ 500, 400 250 และ 150 bp



ภาพที่ 21 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Msp I*

M = 100 bp DNA ladder

แฉกที่ 1 = ผลผลิตยีนขนาด 1,400 bp

แฉกที่ 2 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แฉกที่ 3 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แฉกที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แฉกที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แฉกที่ 6 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

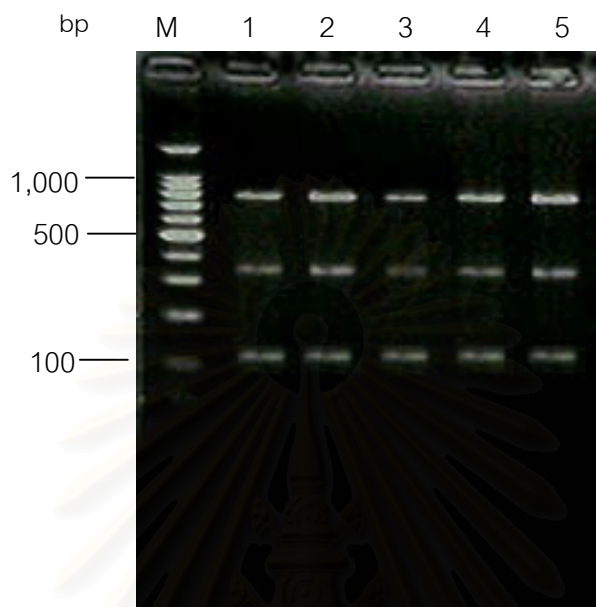
แฉกที่ 7 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แฉกที่ 8 = ไวรัสจาก Tiger frog iridovirus

แฉกที่ 9 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แฉกที่ 10 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แฉกที่ 11 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด



ภาพที่ 22 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo* II

M = 100 bp DNA ladder

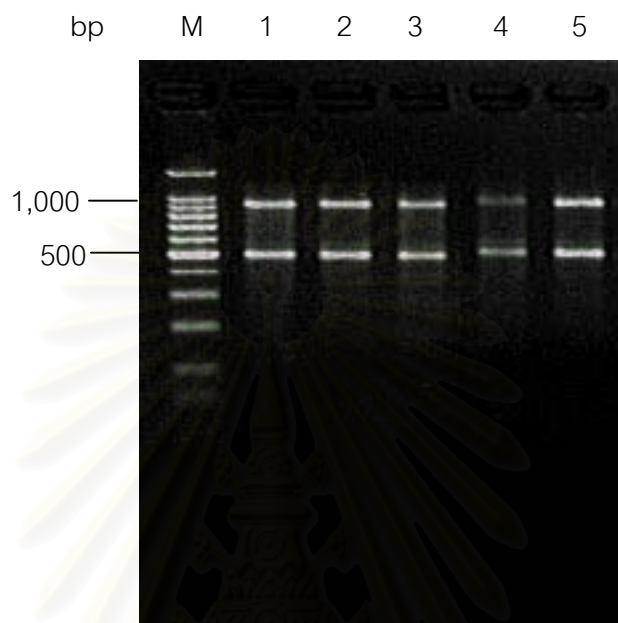
แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด



ภาพที่ 23 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*

M = 100 bp DNA ladder

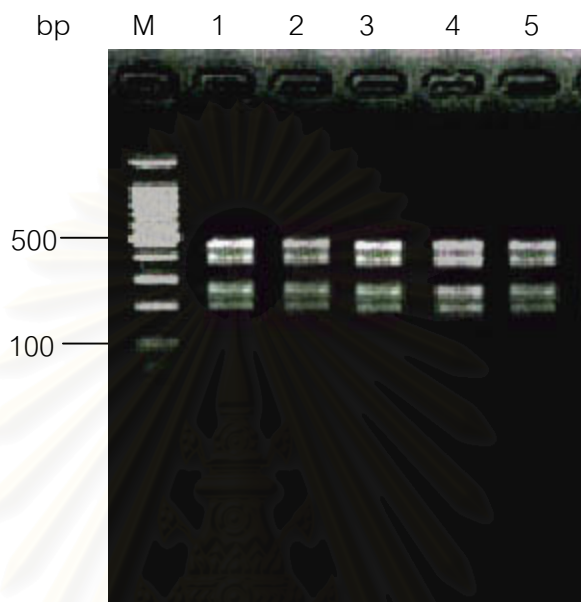
แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาน้ำจืด

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด



ภาพที่ 24 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 1,400 bp ของยีน major capsid protein ของไวรัสชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A I*

M = 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

3.2.4 การตัดจีโนมของไวรัสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อนำจีโนมของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus ซึ่งสกัดด้วยวิธี phenol-chloroform มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* *Xba I* และ *EcoR I* และทำ electrophoresis ผลการทดลองดังต่อไปนี้

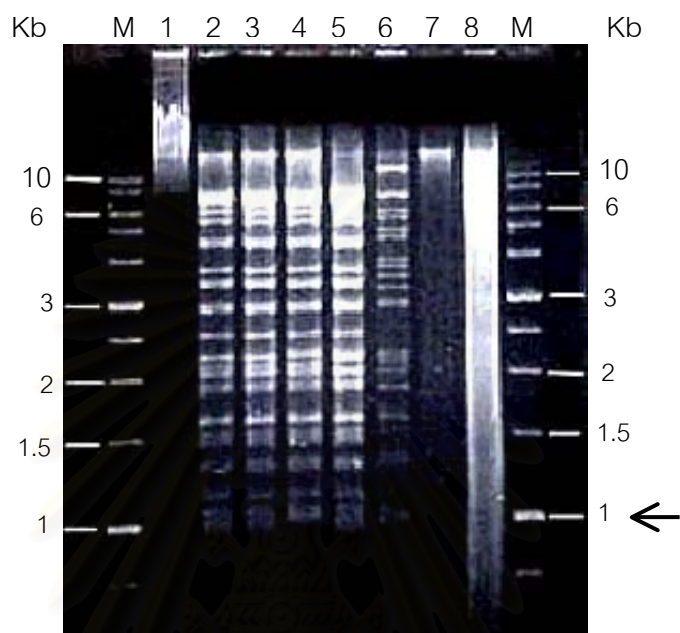
3.2.4.1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 25 จะเห็นว่ามีรูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอมากกว่า 20 แถบ และมีรูปแบบที่แตกต่างกันคือ

รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทรายคล้ายกับไวรัส Tiger frog iridovirus มากที่สุด คือมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเท่ากัน และขนาดเดียวกัน

รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาบู่ทราย ต่างจากของไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา คือ ไวรัสจากปลาบู่ทราย มีแถบดีเอ็นเอที่ 1 Kb (ตำแหน่งตรงลูกศรชี้) แต่ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไม่มีแถบนี้

รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ถึงแม้จะมีแถบดีเอ็นเอมากกว่า 20 แถบ เช่นเดียวกัน แต่มีรูปแบบที่แตกต่างจากไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว

รูปแบบ RFLP ของไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus พบเป็นแถบสเมียร์ของดีเอ็นเอ



ภาพที่ 25 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดจีโนมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*; ลูกศรชี้ คือ 1 Kb

M = 1 Kb DNA ladder

แถวที่ 1 = จีโนมของไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตรที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถวที่ 2 = ไวรัสจากปลาบู่ทราย

แถวที่ 3 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

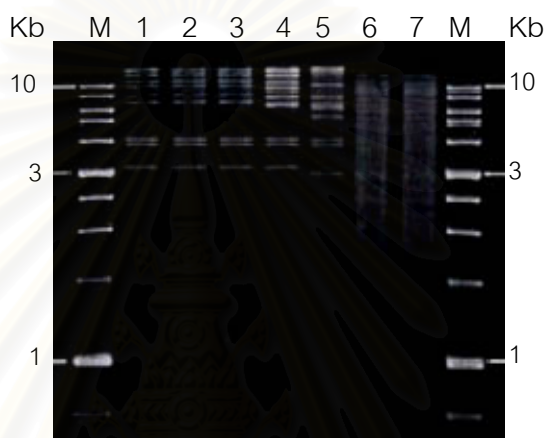
แถวที่ 6 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

แถวที่ 7 = ไวรัส Seabass iridovirus

แถวที่ 8 = ไวรัส Grouper iridovirus

3.2.4.2 เมื่อตัดจีโนมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 26 พบว่า

- รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลาน้ำจืดหลาย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา และไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร เหมือนกัน
- รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด มีรูปแบบที่แตกต่างจากไวรัสจากปลาน้ำจืดหลาย ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลาและไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร
- รูปแบบ RFLP ของไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus พบแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบต่างจากไวรัสอื่นที่กล่าวมา



ภาพที่ 26 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดจีโนมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I

M = 1 Kb DNA ladder

แถบที่ 1 = ไวรัสจากปลาน้ำจืดหลาย

แถบที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถบที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถบที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถบที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

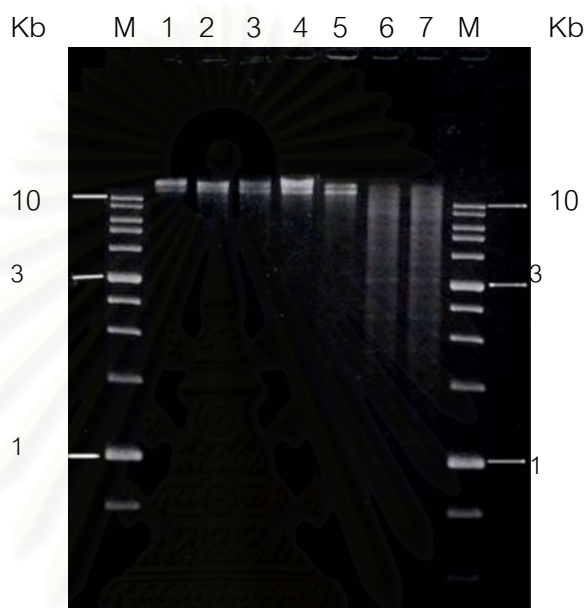
แถบที่ 6 = ไวรัส Seabass iridovirus

แถบที่ 7 = ไวรัส Grouper iridovirus

3.2.4.3 เมื่อตัดจีโนมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 27 พบว่า

รูปแบบ RFLP ของไวรัสจากปลานู๋ทราย ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร และไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด เหมือนกัน

รูปแบบ RFLP ของไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus พบแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบต่างจากไวรัสอื่นที่กล่าวมา



ภาพที่ 27 รูปแบบ RFLP เมื่อตัดจีโนมของไวรัสชนิดต่างๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I

M = 1 Kb DNA ladder

แถวที่ 1 = ไวรัสจากปลานู๋ทราย

แถวที่ 2 = ไวรัส Tiger frog iridovirus

แถวที่ 3 = ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา

แถวที่ 4 = ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร

แถวที่ 5 = ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด

แถวที่ 6 = ไวรัส Seabass iridovirus

แถวที่ 7 = ไวรัส Grouper iridovirus

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เมื่อนำปลาบู่ทรายที่มีอาการ สีตัวซีด มีแผลหลุมตื้น แผลถลอกตกเลือดข้างลำตัวและบริเวณริมฝีปากมีแผลถลอกจากจังหวัดนครปฐมมาเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจากอวัยวะภายใน เช่น ไต ม้าม ตับ พบว่าไม่พบแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในปลาบู่ทราย แสดงว่าการตายของปลาบู่อาจมีสาเหตุจากปัจจัยอื่นและเมื่อนำอวัยวะต่างๆจากปลาบู่ทรายที่ป่วยเป็นโรคเช่น ไต ม้าม กล้ามเนื้อ และบริเวณที่เป็นแผลจากปลาบู่ทรายจำนวน 3 ตัว มาทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยกลุ่มวิจัยไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสจากปลาบู่ทรายด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง EPC

ในการทดสอบลักษณะสมบัติต่างๆของไวรัสจากปลาบู่ทรายเลือกเซลล์เพาะเลี้ยง EPC ในการทดสอบ เนื่องจากไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ดีซึ่งมีค่าไตเตอร์ $9.09 \pm 0.19 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ ลักษณะการเกิด cytopathic effect เห็นอย่างชัดเจน คือ เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมีรูปร่างกลม วาวแสง หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเริ่มมากขึ้นเห็นเป็นกลุ่มกระจายอยู่ทั่วไป บางส่วนของเซลล์เริ่มหลุดจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ขยายเป็นวงกว้างออกไป

ในการทดสอบลักษณะสมบัติต่างๆของไวรัสจากปลาบู่ทรายเลือกบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C เนื่องจากไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ดีและใช้เวลาในการเกิด cytopathic effect จนสมบูรณ์ประมาณ 4 วัน

จากผลการศึกษารูปร่างของไวรัสที่แยกสกัดได้จากปลาบู่ทรายจากภาพกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน พบว่า อนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทรายมีรูปร่างเป็นนิวคลีโอแคปซิดรูป 6 เหลี่ยม (icosahedral symmetry) และพบอนุภาคไวรัสภายในไซโตพลาสซึมและบริเวณรอบนอกเซลล์เพาะเลี้ยง อนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทรายมีนิวคลีโอแคปซิดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $132.49 \pm 7.77 \text{ nm}$ แกนกลางมีขนาด $76.66 \pm 6.49 \text{ nm}$

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของนิวคลีโอแคปซิดและแกนกลางกับไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* พบว่า นิวคลีโอแคปซิดของไวรัสจากปลาบู่ทราย พบว่า มีขนาด $132.49 \pm 7.77 \text{ nm}$ เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* ของสัตว์อื่นๆพบว่า มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคของไวรัสที่แยกสกัดได้จากซาลาแมนเดอร์ที่ Jancovich *et al.* (1997) รายงานไว้คือ 160 – 180 nm แต่มีขนาดใกล้เคียงกับไวรัส EHNV ที่สกัดได้จากปลา *Perca Fluviatilis*, ไวรัส SFIR ที่สกัดได้จากปลา *Silurus glani*, ไวรัส CFIR I, II, III ที่สกัดได้จากปลา *Ictalurus melas*, ไวรัส FV-3 ที่สกัดได้จากกบ *Rana pipiens* และ ไวรัส REIR ที่สกัด

ได้จากกบ *Rana esenlenta* ซึ่ง Ahne et al. (1998) ได้รายงานขนาดของอนุภาคไวรัสเหล่านี้เฉลี่ยประมาณ 130 nm

แกนกลางของอนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทรายพบว่า มีขนาด 76.66 ± 6.49 nm ซึ่งเล็กกว่าอนุภาคไวรัสจากปลา redfin perch ซึ่ง Langdon et al. (1986) รายงานไว้คือ 88 -110 nm การที่ขนาดของนิวคลีโอแคปซิดและแกนกลางของอนุภาคไวรัสชนิดๆ มีขนาดแตกต่างกันดังกล่าวไว้ข้างต้นเนื่องมาจากชนิดของไวรัสที่ต่างกัน

เมื่อทดสอบการเจริญของไวรัสโดยแซ่ในสาร IUdR พบว่า สาร IUdR สามารถลดการเจริญของไวรัสเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยค่าไตเตอร์ลดลงไปมากกว่า $6 \log_{10}$ TCID₅₀/ ml โดยสาร IUdR จะเข้าไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดดีเอ็นเอภายในเซลล์ เพราะสาร IUdR เป็น base analog ของ thymidine เมื่อ IUdR ถูกนำเข้าไปแทนที่เบส thymidine ในสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ทำให้ไวรัสไม่สามารถถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ประกอบเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ (defective particle) และสาร IUdR ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ (Rovvozo and Bruke, 1973) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakajima and Sorimachi (1994) และ Spear and Smith (1992) ที่รายงานว่า สาร IUdR สามารถลดการเจริญของ red sea bream iridovirus และ ในไวรัสที่แยกได้จาก Ornate burrowing frog ซึ่งไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีสารพันธุกรรมเป็นชนิดดีเอ็นเอ ดังนั้นไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถสรุปได้ว่ามีสารพันธุกรรมเป็นชนิดดีเอ็นเอ

จากการทดสอบการมีเปลือกหุ้มของไวรัสจากปลาบู่ทรายโดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทดสอบพบว่า คลอโรฟอร์มมีผลลดการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทรายโดยทำให้ค่าไตเตอร์ลดลงไปมากกว่า $7 \log_{10}$ TCID₅₀/ ml แสดงว่าไวรัสจากปลาบู่มีเปลือกหุ้ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakajima and Sorimachi (1994) รายงานว่าคลอโรฟอร์มสามารถลดการเจริญของไวรัส red sea braem iridovirus ได้เนื่องจากคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายไขมันได้ดีและเปลือกหุ้มของไวรัสประกอบด้วยชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) เมื่อเปลือกหุ้มของไวรัสถูกทำลายด้วยคลอโรฟอร์มทำให้ไวรัสสูญเสียสภาพในการเกาะและเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านของอนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยง EPC พบว่า ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เพาะเลี้ยง EPC มีอนุภาคของไวรัสระยะที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (nucleocapsid) อยู่เป็นจำนวนมาก แสดงว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายมีการประกอบเป็นอนุภาคภายในไซโตพลาสซึม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Murphy and Kingsburg, 1990 ที่ว่าไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* มีการประกอบเป็นอนุภาคภายในไซโตพลาสซึม ส่วนไวรัสที่อยู่

ขอบนอกของเซลล์เมื่อดูจากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านเห็นมีเปลือกหุ้ม แสดงว่าอนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทรายนี้เป็นชนิดมีเปลือกหุ้ม

จากข้อมูลข้างต้นที่กล่าวมาแล้วข้างต้นได้ว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae*

ผลการศึกษาความทนทานของไวรัสจากปลาบู่ทรายที่อุณหภูมิ 56°C พบว่า เมื่อบ่มไวรัสที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที การเจริญของไวรัสถูกยับยั้งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมไวรัสที่บ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที, 60 นาทีและกลุ่มควบคุม มีค่าไตเตอร์ 3.85 ± 0.54 , $3.3 \pm 0.79 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ และ $9.03 \pm 0.28 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kanchanakhan *et al.* 1999 ที่รายงานในเชื้อไวรัส Tiger frog Iridovirus ที่แยกได้จากกบนา แต่แตกต่างจากผลการศึกษาของ เรวัตร์ คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์ (2538) ซึ่งรายงานไวรัส Seabass iridovirus ถูกยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลานาน 30 นาที แสดงว่าไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทรายมีความทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C ได้ดีกว่าไวรัส Seabass iridovirus

เมื่อทดสอบความทนทานของไวรัสจากปลาบู่ทรายในสภาพที่เป็นกรด (pH 3) พบว่าไวรัสนี้ไม่สามารถเจริญหรือสามารถก่อให้เกิด cytopathic effect ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสมบัติของไวรัส Tiger frog Iridovirus ที่แยกสกัดได้จากกบนาโดย Kanchanakhan *et al.* 1999

จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทรายในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆคือ เซลล์เพาะเลี้ยงของปลาได้แก่ BF-2, EPC, DT, SSN-1, FHM และ BB และ เซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลื้อยคลาน SCE และ STE พบว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลาและเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลื้อยคลาน โดยสามารถเจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา คือ BF-2 และ EPC และเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลื้อยคลาน คือ SCE และ STE มีค่าไตเตอร์ 9.2 , 9.09 ± 0.19 , 9.06 ± 0.11 , และ $9.09 \pm 0.19 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของไวรัสชนิดอื่นๆ ได้แก่ Tiger frog Iridovirus ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลาและสัตว์เลื้อยคลาน (Kanchanakhan *et al.*, 1999) เช่นเดียวกัน

ไวรัส Grouper iridovirus สามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลาหลายชนิดคือ GF, EPC และ BF-2 (จิราพร เกษรจันทร์และเรวัตร์ คงประดิษฐ์, 2539) ส่วนไวรัส Seabass iridovirus พบว่ามีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านมากกว่าคือ สามารถเจริญเฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลากระพงเท่านั้น (เรวัตร์ คงประดิษฐ์และจิราพร เกษรจันทร์, 2538)

การที่ไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลาหลายชนิดและสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด อาจเนื่องมาจากไวรัสจากปลาบู่ทรายมีสัตว์ที่เป็นพาหะหลายชนิดเช่นเดียวกับการรายงาน Essni and Granoff (1989) ซึ่งได้รายงานไว้ว่า ไวรัส EHNV มีสัตว์ที่เป็นพาหะในปลากระดูกแข็ง 7 ชนิด ทั้งจากธรรมชาติและจากการทดลองการก่อโรคในห้องปฏิบัติการ (Langdon, 1989) ดังนั้นเพื่อเป็นการควบคุมโรคของไวรัสจากปลาบู่ทรายจึงควรทราบรายละเอียดต่างๆเกี่ยวกับชนิดของสัตว์ที่เป็นพาหะต่อไวรัสนี้เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไปสู่สิ่งมีชีวิตอื่นและการป้องกันและกำจัดโรคอย่างถูกวิธีต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทรายที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30°C พบว่าการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทรายที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C แตกต่างจากอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C รองลงมา คือ 20 และ 15 °C ตามลำดับ การที่ไวรัสนี้เจริญได้ดีที่ 25 และ 30 °C นั้นสอดคล้องกับอุณหภูมิของน้ำที่ปลาบู่ทรายอาศัยอยู่และโดยปกติโรคที่ปรากฏในฟาร์มเลี้ยงปลาจะมีอุณหภูมิของน้ำที่ 25-30 °C (Nakajima and Sorimachi, 1994)

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทรายใน 1 รอบ พบว่าการเจริญเป็นแบบ Sigmoid curve โดยมีระยะพักตัวเท่ากับ 10 ชั่วโมง และใช้เวลาในการพักตัวจนกระทั่งปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูกออกภายนอกเซลล์ของเจ้าบ้านประมาณ 15 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากไวรัส Tiger frog iridovirus ซึ่งมีระยะพักตัวในเซลล์ของเจ้าบ้านเท่ากับ 4 ชั่วโมง และระยะเวลาที่ใช้ในการพักตัวจนกระทั่งปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูกออกภายนอกเซลล์ของเจ้าบ้าน 7 ชั่วโมง (Kanchanakhan *et al.*, 1999) และแตกต่างจากไวรัส FV-3 ซึ่งรายงานโดย Kelly (1975) ว่าระยะพักตัวของไวรัส FV-3 ในเซลล์ fibroblast ของ embryo ไก่ เท่ากับ 18 ชั่วโมง ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการพักตัวจนกระทั่งปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูกออกภายนอกเซลล์ของเจ้าบ้าน คือ 24 ชั่วโมง แสดงว่าไวรัสแต่ละชนิดใช้เวลาในการพักตัวจนกระทั่งปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูกออกภายนอกเซลล์ของเจ้าบ้านใช้เวลาแตกต่างกันและเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละไวรัส

จากผลการศึกษาจำนวนและรูปแบบของโปรตีนโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE ของไวรัสจากปลาบู่ทรายและไวรัสจากสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus พบว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายและไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆ มีจำนวนและรูปแบบของโปรตีนโครงสร้างคล้ายกัน โดยไวรัสจากปลาบู่ทราย เหมือนกับไวรัส Tiger frog iridovirus มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไวรัสจากปลาบู่ทรายและไวรัสจากกบเป็นไวรัสที่พบในสัตว์น้ำจืดเหมือนกัน

ไวรัสจากปลาบู่ทราย และไวรัสจากกบนี้มีจำนวนแถบโปรตีนและรูปแบบของโปรตีนโครงสร้าง แตกต่างจากไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ทั้งนี้อาจเนื่องจากปลาทั้ง 2 ชนิด เป็นสัตว์น้ำเค็ม และไวรัสจากปลาทั้ง 2 ชนิดเป็น iridovirus คนละชนิดกับไวรัสจากปลาบู่ทราย และไวรัสจากกบ

การศึกษาโปรตีนโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE ของไวรัสนี้มีผู้ศึกษาดังนี้คือ Ahne *et al.* (1998) คือ ไวรัส Iridovirus ในวงศ์ *Iridoviridae* จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและปลา รายงานว่า ไวรัสดังกล่าวมีแถบโปรตีนโครงสร้างมากกว่า 20 ชนิดและมีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 20-140 kDa และ Hedrick *et al.* (1992) ศึกษาไวรัสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและปลาเช่นเดียวกัน รายงานว่ามีแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลในช่วง 20-154 kDa นอกจากนี้ Murphy and Kingsburg (1990) ได้ศึกษาพบว่าการที่ Iridovirus มีแถบโปรตีนมากเนื่องจากมีจีโนมขนาดใหญ่ ประมาณ 200-350 Kb และการศึกษาค้นคว้าก็พบเช่นเดียวกันว่าไวรัสจากปลาบู่ทราย และไวรัสจากกบ มีจำนวนโปรตีนโครงสร้างมากกว่า 20 ชนิดและมีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 6.5 –200 kDa

ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus และไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆมีแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัดที่มีมวลโมเลกุล 56 kDa คาดว่าน่าจะเป็น major capsid protein ซึ่ง Williams (1996) ได้ทำการสำรวจเอกสารเกี่ยวกับ major capsid protein ของไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* ที่ได้มีผู้ศึกษาไว้แล้ว พบว่าอยู่ในช่วง 48-55 kDa เช่น ไวรัสจากคางคก (*Bufo marinus*) มี major capsid protein ที่มีมวลโมเลกุล 49 kDa (Zupnovic *et al.*, 1998) FV-3 มีมวลโมเลกุลของ major capsid protein ที่ 48-50 kDa (Mao *et al.*, 1999) การที่ major capsid protein ของไวรัสที่แยกได้จากเจ้าบ้านชนิดต่างๆมีมวลโมเลกุลต่างกัน อาจเนื่องมาจากความแตกต่างภายในยีนของแต่ละไวรัสเอง

การศึกษาการล้มล้างฤทธิ์ไวรัสจากปลาบู่ทราย พบว่า แอนติซีรัมจากกระต่ายไม่มีคุณสมบัติในการล้มล้างฤทธิ์ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Hedrick *et al.* (1992) ที่รายงานว่า แอนติซีรัมต่อสกุล *Ranavirus* ของไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* ที่สร้างจากกระต่ายมีค่าไตเตอร์ต่ำเช่นเดียวกัน การที่แอนติซีรัมจากกระต่ายมีค่าไตเตอร์ต่ำอาจเนื่องมาจาก ไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* เป็นไวรัสที่มีจีโนมขนาดใหญ่และมีโปรตีนโครงสร้างมากกว่า 20 ชนิด (Murphy and Kingsburg, 1990) จึงเป็นการยากที่กระต่ายจะสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่มีมากกว่า 20 ชนิดในปริมาณมากพอที่จะตรวจสอบได้อย่างไรก็ตาม Nakajima and Sorimachi, 1994 รายงานว่าสามารถตรวจสอบแอนติบอดีของกระต่ายต่อ red sea bream iridovirus ได้ โดยวิธี Immunofluorescence assay ซึ่งเป็นเพราะว่าวิธี Immunoassay มีความไวมากกว่าการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธีการล้มล้างฤทธิ์

เมื่อใช้เทคนิค Western blot ตรวจสอบความจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมกระทำยต่อองค์ประกอบโปรตีนของอนุภาคไวรัสชนิดต่างๆ พบว่า สามารถจำแนกไวรัสออกเป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

จากการศึกษาของ Ahne *et al.*, 1998 รายงานว่า เมื่อนำจีโนมของไวรัสจากปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด ได้แก่ *BamH I*, *Xba I*, *Hind III*, *EcoR I*, *Bgl I*, *Pst I* และ *Kpn I* สามารถแยกความแตกต่างของไวรัสได้ จากการศึกษารูปแบบของ RFLP ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงได้ศึกษารูปแบบ RFLP ของไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ ไวรัสจากปลานู๋ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus เมื่อตัดจีโนมของไวรัสเหล่านี้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Xba I* และ *EcoR I* พบว่า สามารถแบ่งไวรัสเหล่านี้ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไวรัสจากปลานู๋ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลาและไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตรโดยในกลุ่มนี้ผลของ RFLP เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ซึ่งมีรูปแบบ RFLP เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I* และ *Xba I* ต่างจากไวรัสในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ไวรัส Seabass iridovirus และไวรัส Grouper iridovirus ซึ่งรูปแบบ RFLP เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกับกลุ่ม 1 และ 2

ผลการตัดผลผลิตพีซีอาร์ในส่วนของยีน major capsid protein ขนาด 1,400 bp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Msp I*, *Alu I*, *Mbo II* และ *Sau3A I* ของไวรัสชนิดต่างๆ ได้แก่ ไวรัสจากปลานู๋ทราย และไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา และไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด พบว่า ขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ของไวรัสเหล่านี้ไม่แตกต่างกัน และจากการศึกษาลำดับเบสของยีน major capsid protein ขนาด 300 bp ของไวรัสจากปลานู๋ทราย และไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา และไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด โดยส่งไปหาลำดับเบสที่หน่วยบริการทางชีวภาพ พบว่าลำดับเบสของไวรัสเหล่านี้เหมือนกัน ยกเว้นลำดับเบสของไวรัสของกบจังหวัดร้อยเอ็ด ต่างจากไวรัสจากกบจังหวัดอื่นๆและไวรัสจากปลานู๋ทรายเพียงตำแหน่งเดียวแสดงว่ายีน major capsid protein ของไวรัสจากปลานู๋ทรายและกบ เป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสน้อย (highly conserved regions) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Mao *et al.* (1999)

เมื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์มาตรวจสอบชนิดของไวรัสจากปลาบู่ทราย ก็พบว่าสามารถใช้ primer ที่ออกแบบจำเพาะสำหรับยีน major capsid protein จากไวรัสสกุล *Ranavirus* ทั้ง 2 คู่นี้สามารถก่อให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 bp และ 1,400 bp นอกจากนี้ผลจากการหาลำดับเบสในผลผลิตพีซีอาร์ ก็พบว่ามีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไวรัสจากปลาบู่ทราย มีความคล้ายกับสกุล *Ranavirus* มากหรืออาจจะกล่าวได้ว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายเป็นไวรัสสายพันธุ์หนึ่งของสกุล *Ranavirus* เทคนิคทางพีซีอาร์นอกจากจะใช้ในการตรวจสอบชนิดของไวรัสจากปลาบู่ทรายแล้ว ยังสามารถจำแนก ไวรัสชนิดต่างๆที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า พบว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายและกบสามารถจัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากได้ผลผลิตพีซีอาร์ซึ่งแตกต่างจากไวรัสจากปลาทะเล

การที่สามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบไวรัสได้สอดคล้องกับการศึกษา Kurita *et al.* (1998) ที่ได้รายงานไว้ว่า เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของ Iridovirus ในม้ามและเลือดของปลา red sea bream ที่ทดลองการก่อโรค และในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเลี้ยงไวรัสด้วยเซลล์ GF ซึ่งปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหลายชนิดได้แก่ Epizootic haematopoietic necrosis virus และ Bohle iridovirus (Gould *et al.* 1995) และ Striped Jack Necrosis Virus (SJNNV) (Nishizawa *et al.*, 1994) เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงมาก

จากข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะสมบัติทางโปรตีน ซีรัมวิทยา และอณูชีววิทยา สามารถบ่งชี้ว่าไวรัสจากปลาบู่ทราย ควรจัดเป็นไวรัสสายพันธุ์หนึ่งของสกุล *Ranavirus* และได้ตั้งชื่อว่า *Oxyeleotris marmoratus ranavirus* หรือ OMRV

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุป

เชื้อไวรัสได้จากปลาบู่ทรายจากจังหวัดนครปฐม สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เพาะเลี้ยงจากปลา คือ EPC โดยเริ่มจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมีรูปร่างกลม บวม หดตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นการตายของเซลล์จะเริ่มเป็นกลุ่มเล็กๆ แล้วแพร่ขยายออกไปเป็นวงกว้าง เห็นเป็นช่องว่างที่พื้นที่ผิวขดเลี้ยงเซลล์ ใช้เวลาในการทำลายเซลล์ทั้งหมดเป็นเวลา 4 วัน ไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทรายมีนิวคลีโอแคปซิดเป็นรูปหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 132.49 ± 7.77 nm แกนกลางมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 76.66 ± 6.49 nm มีสารพันธุกรรมเป็นชนิดดีเอ็นเอ เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม ประกอบเป็นอนุภาคไวรัสภายในไซโตพลาสซึม จากลักษณะสมบัติดังกล่าวสรุปได้ว่าไวรัสจากปลาบู่ทรายเป็นไวรัสในวงศ์ *Iridoviridae* ความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C สามารถลดการเจริญของไวรัสโดยมีค่าไตเตอร์ $3.85 \pm 0.54 \log_{10}$ และ $3.3 \pm 0.79 \log_{10}$ TCID₅₀/ml ภายในเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ และสูญเสียสภาพในการเจริญเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดที่ pH 3 ไวรัสจากปลาบู่ทรายสามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา ได้แก่ EPC, BF-2, DT, SSN-1 และ BB เซลล์เพาะเลี้ยง ตะพาน้ำ STE และเซลล์เพาะเลี้ยงของจระเข้ SCE โดยเจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง BF-2, EPC, SCE และ STE (มีค่าไตเตอร์ 9.2, 9.06 ± 0.11 , 9.09 ± 0.19 , 9.09 ± 0.19 Log₁₀ TCID₅₀/ml ตามลำดับ) รองลงมาคือเซลล์เพาะเลี้ยง FHM, BB, SSN-1 และ DT (มีค่าไตเตอร์ 8.93 ± 0.33 , 8.1 ± 0.69 , 5.53 ± 0.15 และ 5.53 ± 0.15 Log₁₀ TCID₅₀/ml ตามลำดับ) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของไวรัสนี้คือ $25-30^{\circ}\text{C}$ โดยรูปแบบการเจริญของไวรัสจากปลาบู่ทรายใน 1 รอบจะเป็นแบบ Sigmoid curve ใช้เวลาในการติดเชื้อจนถึงเริ่มการปลดปล่อยไวรัสรุ่นลูกจากเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 15 ชั่วโมง ไวรัสจากปลาบู่ทรายมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 1.1658 g/cm^3 ใน 15-45% (w/w) sucrose gradient

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนโครงสร้างของ ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus อนุภาคไวรัสจากปลาบู่ทรายมีโปรตีนโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบมากกว่า 20 ชนิด มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 6.5-200 kDa และมีรูปแบบโปรตีนคล้ายกับไวรัสจากกบจังหวัดต่างๆ ได้แก่ ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด จากการศึกษาโปรตีนโครงสร้างนี้พบว่า มีแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 56.78 kDa ซึ่งคาดว่าเป็น major capsid protein จากรูปแบบ RFLP เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*, *Xba I* และ *EcoR I* และความจำเพาะของซีรัมกระต่ายที่กระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีจากไวรัสจากปลาบู่ทรายกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสต่างๆ พบว่า สามารถแยกกลุ่มไวรัสที่ศึกษานี้ ออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไวรัสจากปลาบู่ทราย ไวรัส Tiger frog iridovirus ไวรัสจากกบจังหวัดสงขลา ไวรัสจากกบจังหวัดพิจิตร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ไวรัสจากกบจังหวัดร้อยเอ็ด และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ไวรัส Seabass iridovirus และ ไวรัส Grouper iridovirus เมื่อ

กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของกระต่ายด้วยไวรัสจากปลาบู่ทรายและศึกษาการล้มล้างฤทธิ์ พบว่าแอนติซีรั่มที่ได้ไม่มีคุณสมบัติของการล้มล้างฤทธิ์ ในส่วนของ ไวรัสจากปลาบู่ทรายและจากกบทุกจังหวัดหรือสายพันธุ์ที่ทำการศึกษามีลำดับเบสในยีน major capsid protein ค่อนข้างที่จะมีความผันแปรน้อยหรือ highly conserved regions จากการศึกษาโดยเทคนิคพีซีอาร์และการหาลำดับเบสในผลผลิตพีซีอาร์และพบว่า ไวรัสที่แยกได้จากปลากระพงขาวและปลากระวังเป็นไวรัสสกุลที่แตกต่างจากไวรัสจากปลาบู่ทรายและกบ ในส่วนของไวรัสที่แยกได้จากปลาบู่ทรายนั้นนับว่าเป็นการพบครั้งแรกในปลาบู่ทรายและพบว่ามีลักษณะสมบัติคล้ายกันมากกับ Tiger frog iridovirus ที่แยกได้จากกบ ซึ่ง ไวรัสจากปลาบู่ทรายและ Tiger frog iridovirus มีส่วนของยีน major capsid protein ที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกับ ไวรัสสกุล *Ranavirus* ดังนั้น ไวรัสจากปลาบู่ทรายควรจัดเป็นไวรัสสายพันธุ์หนึ่งในสกุล *Ranavirus* และควรมีชื่อไวรัสว่า *Oxyeleotris marmoratus ranavirus* หรือ OMRV

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการศึกษาการล้มล้างฤทธิ์ของแอนติบอดีกระต่ายต่อไวรัสจากปลาบู่ไม่สามารถตรวจแอนติบอดีได้ดังนั้นควรมีการศึกษาการตรวจวัดระดับของแอนติบอดีที่กระต่ายสร้างขึ้นด้วยเทคนิคอื่นต่อไปเช่น ELISA Immunofluorescence assay หรือ dot blot immuno assay
2. ศึกษาการก่อโรคจากไวรัสในปลาบู่ทรายและสัตว์น้ำอื่นๆไปสู่อโฮสต์อื่นในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการระบาดของเชื้อไวรัสในสิ่งแวดล้อมจะได้เป็นแนวทางทางป้องกันและการจัดการหากเชื้อไวรัสสามารถก่อโรคในสัตว์อื่น
3. ศึกษาการทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัส
4. ควรที่จะมีการหาลำดับเบสทั้งยีน major capsid protein ของ *Oxyeleotris marmoratus ranavirus* เพื่อจะได้เปรียบเทียบกับไวรัสอื่นๆในสกุลเดียวกัน
5. นำเทคนิคพีซีอาร์ที่ได้ปรับปรุงแล้วไปใช้ไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ iridovirus ในปลาและในกบ แทนการเพาะแยกเชื้อในขวดเลี้ยงเซลล์
6. ศึกษากลไกการเกิดโรคในสัตว์ทดลองโดยใช้ DNA probe ติดตามการเข้าติดเชื้อและการแพร่ของเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง ตลอดจนอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ *Oxyeleotris marmoratus ranavirus* ในสัตว์ทดลองนั้นๆ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กำธร โพธิ์ทองคำ. 2514. ชีววิทยาของปลาบู่ทราย. รายงานประจำปี 2514. แผนกทดลองการเพาะเลี้ยง กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง . หน้า 74-98.
- จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัต คงประดิษฐ์. 2539. การแยกเชื้อไวรัสและคุณสมบัติบางประการของ Iridovirus-like agent สาเหตุของโรคครีบดำในปลากะรัง. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 5/2539 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง . 8 หน้า.
- ชลอ ลิ่มสุวรรณ และ สุปราณี ชินบุตร. 2527. มะเร็งต่อมน้ำเหลืองในปลาบู่ทราย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 33 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง. 9 หน้า.
- ไพไลพันธ์ พุททวัฒน์, บรรณธิการ. 2540. ไวรัสวิทยา. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แม็ค.
- ไพศาล ต้นโพธิ์, วิรุณ บุญหมั่น และ วิเชียรเปล่งฉวี. 2519. การสำรวจปริมาณปลาที่จับขึ้นจาก บึงบอระเพ็ด. รายงานประจำปี 2519 สถานีประมงจังหวัดนครสวรรค์. 38 หน้า.
- ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, วารินทร์ ธนาสมหวัง, ทวี วิพุทธานุมาศ, ชัชวาล สวัสดิ์ภักดี และ พิเศก ยืนยก. 2525. การเลี้ยงปลาบู่ในกระชัง. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 1/2525 งานพัฒนาการเลี้ยงปลาในกระชัง โครงการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย กรมประมง. หน้า 11-13.
- ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์. 2543. ปลาบู่...สู้ไม่ถอย. วารสารการประมง, ปีที่ 53 ฉบับที่ 5: 505-513.
- เรวัต คงประดิษฐ์ และ จิราพร เกษรจันทร์. 2538. Iridovirus สาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวในโรงเพาะฟัก. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 5/2538 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 6 หน้า.
- สมโภชน์ อัคระทิววัฒน์. 2540. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: องค์การค้ำคูณสภา.
- สันติ ห่อมระฤก, พิทยา เพ็ญนภาภรณ์ และ สุพร สุทธานุรักษ์. 2522. การสำรวจสภาวะการประมงในอ่างเก็บน้ำเขื่อนลำตะคองและอ่างเก็บน้ำเขื่อนลำพระเพลิง. รายงานประจำปี 2522 สถานีประมงจังหวัดนครราชสีมา. 28 หน้า.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2512. การศึกษาประชากรปลาและประสิทธิภาพของเครื่องมือจับสัตว์น้ำบางชนิดในอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์. รายงานประจำปี 2512 สถานีประมงจังหวัดขอนแก่น. 50 หน้า.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. การเตรียม TBE

Tris-base	27 g
Boric acid	13.75 g
0.5 M EDTA (pH8.0)	10 ml
เติมน้ำให้ครบ	1000 ml

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15

2.1. การเตรียม 1x L-15 10% FCS, Penicillin 100 unit และ

Streptomycin 100 µg/µl

Leibovitz	14.30 g
-----------	---------

เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนให้ครบ 1000 ml (pH 7.4-7.6) แล้วกรองให้ปลอด

เชื้อด้วยแผ่นกรอง 0.2 µ

2.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ 2% FCS, P/S

1x L-15	980 ml
Fetal calf serum	20 ml
Penicillin/Streptomycin (10,000 unit/10,000 µg/ml)	10 ml
Glutamine (200mM)	10 ml
(optional)	

2.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FCS, P/S

1x L-15	900 ml
Fetal calf serum	100 ml
Penicillin/Streptomycin (10,000 unit/10,000 µg/ml)	10 ml
Glutamine (200mM)	10 ml
(optional)	

3. HBSS (Hank's balanced salt solution)

3.1 1x HBSS

1x HBSS (powder)	1 ขวด
Distill water	1000 ml
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที	

3.2 2% FCS, HBSS

Fetal bovine serum	20 ml
--------------------	-------

1x HBSS 980 ml
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

4. 0.25% trypsin

trypsin 0.25 g
 PBS 100 ml
 กรองให้ปลอดเชื้อด้วยแผ่นกรอง 0.2 μ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

5. TE bufer (50mM Tris-base, 2.5mM EDTA pH 7.5)

EDTA 0.930 g
 Tris 6.050 g
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml ปรับ pH 7.5

6. 6x Loading dye

Bromophenol blue 0.25 g
 Sucrose 4 g
 เติมน้ำกลั่น 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Coomassie-blue (0.025% Coomassie-blue R-250, 40% methanol, 7% acetic acid)

Coomassie-blue 0.2 g
 Methanol 40 ml
 คนให้ละลาย
 Acetic acid 7 ml
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

8. Destain solution I

Methanol 500 ml
 Acetic acid 100 ml
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

9. Destain solution II

Methanol 140 ml
 Acetic acid 100 ml
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2000 ml

10. 15-45%(w/w) Sucrose gradient

Stock sucrose 66% w/w (342 g/ 200 ml TE buffer)

	Stock	TE buffer
15% sucrose	8.5	41.5
25% sucrose	16.0	34.0
35% sucrose	23.5	26.5
45% sucrose	31.5	18.5

11. Tank buffer

Tris	3 g
Glycine	14.4 g
SDS	1 g

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

12. Running gel overlay (0.375 M Tris-Cl pH 8.8, 0.1% SDS)

Tris	2.5 ml
SDS	1 ml

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

13. Monomer solution: 30%T, 2.7% C_{bis}

Acrylamine	58.4 g
Bis	1.6 g

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml ด้วย volumetric flask เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน

ขวดสีชา

14. Monomer solution in 75% glycerol: 30%T, 2.7% C_{bis}

Acrylamine	5.8 g
Bis	1.6 g

เติม 75% glycerol ให้ครบ 200 ml ด้วย volumetric flask เก็บไว้ที่ 4 องศา

เซลเซียสในขวดสีชา

15. 4x Running gel buffer: 1.5 M Tris-Cl pH8.8

Tris	18.15 g
------	---------

ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

16. 4x Stacking gel buffer: 0.5 M Tris-Cl pH6.8

Tris	3 g
------	-----

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl

- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 ml
17. 10% SDS
 SDS 10 g
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml
18. 10% Ammoniumpersulfate
 Ammoniumpersulfate 0.5 g
 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 ml
19. Water-saturated n-butanol
 n -butanol 50 ml
 น้ำกลั่น 5 ml
20. **Sample buffer**
 0.5 M Tris-Hcl pH 6.8 1 ml
Glyceol 0.8 ml
 10% SDS 1.6 ml
 0.05% Bromophenol blue 0.2 ml
 β -mercaptoethanol 0.4 ml
21. Phosphate buffer saline (PBS)
 Sodium dihydrogen phosphate 3.12 g
 Di-sodium hydrogen phosphate 3.56 g
 Sodium chloride 8.76 g
 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.2
22. Transblot buffer, pH 8.1-8.4
 Glycine 14.4 g
 Tris base 3.03 g
 Methanol 200 ml
 เติมน้ำกลั่นไว้เพื่อให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
23. Tris buffered saline (TBS)
 Tris base 2.42 g
 Sodium chloride 29.24 g
 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรปรับ pH เป็น 7.5
24. Tween- tris buffered saline (TTBS)
 Tween-20 0.5 ml
 TBS 100 ml
25. 10% separating gel

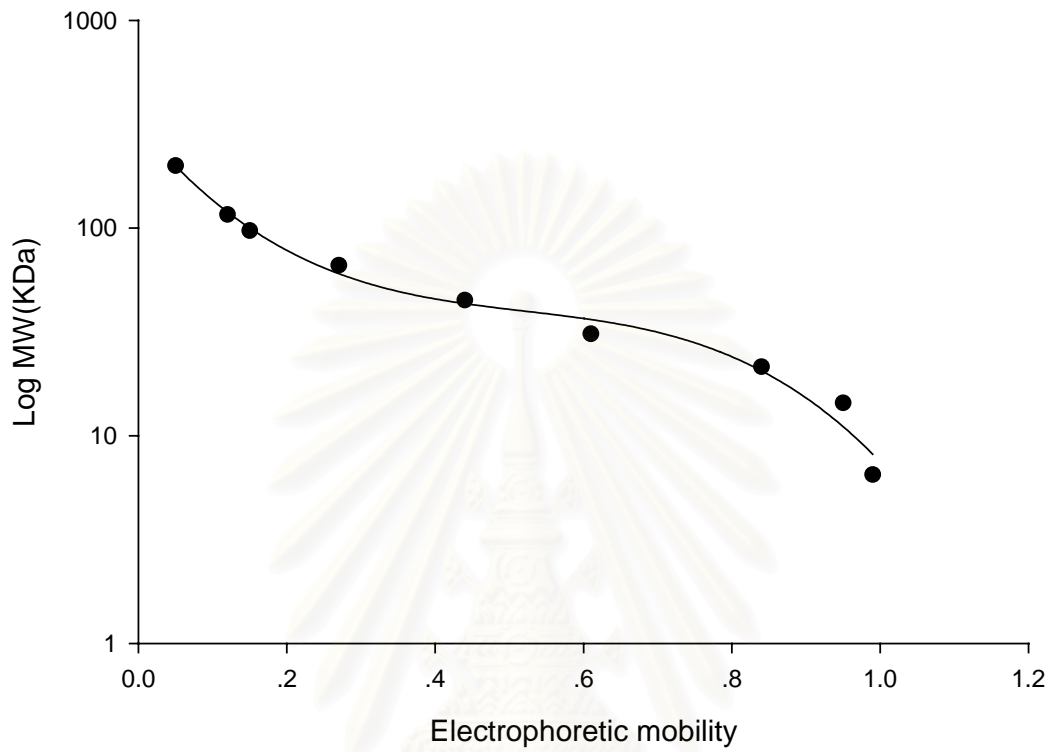
น้ำกลั่น	4.017 ml
10% SDS	100 μ l
1.5 M Tris-Hcl pH 8.8	2.5 μ l
Monomer solution	3.333 ml
10% Ammoniumpersulfate	5 μ l
TEMED	5 μ l
รวม	10 ml

26. 4% separating gel

น้ำกลั่น	6.1 ml
10% SDS	100 μ l
1.5 M Tris-Hcl pH 8.8	2.5 μ l
Monomer solution	1.34 ml
10% Ammoniumpersulfate	50 μ l
TEMED	5 μ l
รวม	10 ml

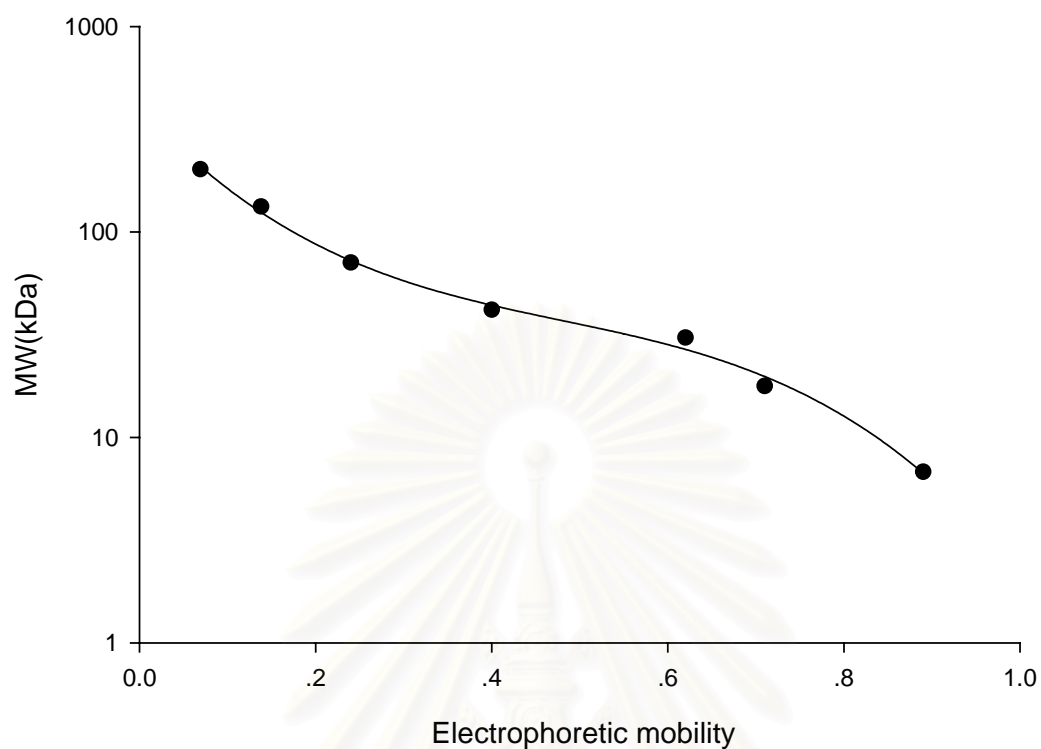
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข



ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง electrophoretic mobility และ มวลโมเลกุลมาตรฐาน
ชนิด Broad range

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง electrophoretic mobility และมวลโมเลกุล
มาตรฐานชนิด Broad range Kaleidoscope prestain standard

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวผ่องพรรณ ประสารก กเกิดเมื่อวันที่ 11 พฤศจิกายน พ.ศ. 2520 ที่ตำบลเขาสามสืบ อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว จบการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทในสาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย