

การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของจีโนมชิ้นที่ 8 ของไวรัสทิลลาเปียเลคที่คัดแยกจากปลานิล

Cloning and characterization of Tilapia lake virus genome segment 8

isolated from *Oreochromis niloticus*

นพดล พัวพันธุ์ (Noppadol Puapun)* ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที (Dr.Pattira Pongtipatee)**

ดร.ชุมพร สุวรรณยาน (Dr.Chumporn Soowannayan)***

ดร.ดวงแขชิตา กาญจนโสภากา (Dr.Duangkhaetita Kanjanasopa)****

บทคัดย่อ

โรคที่เกิดจากไวรัสทิลลาเปียเลค (Tilapia lake virus) หรือ ทีโอแอลวี (TiLV) สร้างความเสียหายอย่างหนักให้แก่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) การพัฒนาวัคซีนสามารถป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ได้ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีนจากชิ้นส่วนจีโนมไวรัสชิ้นที่ 8 ผลการศึกษาคุณสมบัติของ ลำดับนิวคลีโอไทด์พบตีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาด 525 คู่เบส ถอดรหัสได้โปรตีนขนาด 174 อะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุล 19.14 กิโลดาลตัน โปรตีนมีความเหมือนกับโปรตีน TiLV segment 8 ที่มีรายงานในประเทศไทย บังคลาเทศ อิสราเอล และเปรู วิเคราะห์หาตำแหน่ง epitope บนลำดับโปรตีนพบ epitope 3 ตำแหน่ง คือ IGEGLSEETKFKHLLVKHAGMTRKRIE ERLGRIS (34-อะมิโน) RKGQRFEFNRKQYLDIAKQA (20-อะมิโน) และ DTEGSQDDRMALKAD (15-อะมิโน) ซึ่งมีความเป็นแอนติเจนที่ดี และเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นไวรัสวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส TiLV ในประเทศไทย

ABSTRACT

Tilapia lake virus (TiLV) is an emerged disease caused the high economic loss in tilapia aquaculture (*Oreochromis niloticus*). Vaccination is the most effective tool to prevent viral diseases. Here, the study aimed to identify and characterize TiLV segment 8 gene from Nile tilapia. DNA target size was 525 base pairs that translated to protein 174 amino acids with a molecular weight of 19.14 kilodalton. Base on the phylogenetic tree, it closely related with TiLV segment 8 of TiLV virus isolated from Thailand, Bangladesh, Israel, and Peru. Three epitope domains in sequence showed high antigenicity at IGEGLSEETKFKHLLVKHAGMTRKRIE ERLGRIS (34-mer), RKGQRFEFNRKQYLDIAKQA (20-mer), and DTEGSQDDRMALKAD (15-mer). All results indicated this protein suitable to TiLV vaccine production in Thailand.

คำสำคัญ: ปลานิล ไวรัสทิลลาเปียเลค อีพีโทโรป

Keywords: *Oreochromis niloticus*, Tilapia lake virus, Epitope

*นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

**รองศาสตราจารย์ โครงการจัดตั้งคณะนวัตกรรมและการเกษตรและประมง สาขาทรัพยากรประมง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

***นักวิจัย หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ โครงการจัดตั้งคณะนวัตกรรมและการเกษตรและประมง สาขาวิชาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาที่มีการเติบโตทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Dinesh et al., 2017) อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลประสบปัญหาอย่างหนักจากการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัส Tilapia lake virus (TiLV) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ผลผลิตของปลานิลลดลง ไวรัส TiLV อยู่ในตระกูล Orthomyxovirus จัดเป็น novel segmented single-stranded RNA virus ที่ประกอบด้วยจีโนม 10 segments สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีน 10 ชนิด และจีโนมทั้งหมดมีความยาว 10,323 คู่เบส การระบาดของ TiLV ในปลานิลมีรายงานครั้งแรกจากประเทศอิสราเอลในปี 2014 ต่อมามีการตรวจพบไวรัสชนิดนี้ในภูมิภาคอื่นๆ ทั้งในทวีปอเมริกา เช่น เอกวาดอร์ โคลัมเบีย และในทวีปแอฟริกา เช่น อียิปต์ เป็นต้น ปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV มีอัตราการตายสูงและสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงในหลายประเทศ (Dong et al., 2017; Eyngor et al., 2014; Fathi et al., 2017; Ferguson et al., 2014; Surachetpong et al., 2017; Kembou-Tsofack et al., 2017) ในปี 2017 พบการระบาดของเชื้อ TiLV ในประเทศไทยบริเวณพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ ส่งผลให้ปลานิลที่ติดเชื้อ TiLV มีอัตราการตายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Surachetpong et al., 2017) ปลานิลที่ติดเชื้อจะแสดงอาการเฉื่อยชาและสภาพร่างกายผอมลง พฤติกรรมการว่ายน้ำผิดปกติ ร่วมกับภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง ตาบวมโปนทั้งสองด้าน ส่วนของเลนส์ตามีการขุ่น ผิวหนังเกิดแผลแบบลอกหลุด จุดเลือดออก เก็ดตั้งร่วมกับช่องท้องขยายใหญ่ เนื่องจากโรคที่เกิดจากติดเชื้อไวรัส TiLV เป็นโรคอุบัติใหม่ในปลานิลจึงยังไม่มีข้อมูลวิธีการป้องกันและการรักษาโรค ดังนั้น การติดตามสถานการณ์ของโรคอุบัติใหม่ TiLV จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการควบคุมป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัสในอนาคต

โรคที่มีเชื้อสาเหตุจากไวรัสไม่มียาปฏิชีวนะในการรักษาหรือใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ ทำให้ไวรัสสร้างความเสียหายอย่างหนักต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การปฏิบัติในโรงเพาะฟักหรือบ่อเลี้ยงทำได้โดยใช้สารเคมี เช่น ไอโอดีน โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ฟอร์มาลินหรือเวกอน (Virkon®) สำหรับฆ่าเชื้อเพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของไวรัส TiLV (Jaemwimol et al., 2019) อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีจำนวนมากเป็นการเพิ่มต้นทุนแก่เกษตรกร และอาจเกิดสารตกค้างในปลานิลส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค การใช้วัคซีนสามารถลดผลกระทบที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้ ดังจะเห็นได้จากความสำเร็จของการใช้วัคซีนในการป้องกันโรค และลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากไวรัสในปลา (Hwang et al., 2017; Matsuura et al., 2019) จากรายงานความสำเร็จในการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส TiLV ที่ได้จากส่วนของโปรตีน segment 8 (Hu et al., 2020) ทำให้ Zeng et al. (2021) ใช้ส่วนของ segment 8 (โปรตีน VP20) ในการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีน (pV-optiVP20) และโปรตีนวัคซีน (rVP20 subunit) ขึ้น และทดลองฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อปลา พบว่าปลาที่ฉีดด้วยดีเอ็นเอวัคซีนและกระตุ้นด้วยโปรตีนวัคซีน มีอัตราการรอดชีวิต 72.5 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยที่กล่าวข้างต้นจึงนำมาสู่หัวข้องานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกและเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในจีโนม segment 8 จากปลานิลที่มีการติดเชื้อไวรัส TiLV ของประเทศไทย โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ segment 8 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α และศึกษาคุณสมบัติของยีนต่อการเป็นโปรตีนแอนติเจน

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติชิ้นดีเอ็นเอของจีโนมชิ้นที่ 8 จากปลานิลที่ติดเชื้อไวรัส TiLV เพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส TiLV ในประเทศไทย

วิธีการวิจัย

การสกัดอาร์เอ็นเอจากปลานิลและการสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA)

เก็บตัวอย่างปลานิลจากตลาดจตุจักรที่แสดงอาการติดเชื้อไวรัส TiLV เลือกปลาที่มีขนาดตัว 3-5 กรัม นำปลา ล้างผ่านน้ำ และเช็ดทำความสะอาดผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดเอาอวัยวะ บริเวณช่องท้อง ได้แก่ ตับ ม้าม ไต ลำไส้ และเหงือก ประมาณ 0.1 กรัม ใส่รวมกันในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ บดเนื้อเยื่อ ด้วย plastic pestle ให้ละเอียดแล้วเติม TRIzol 500 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน นำหลอดบ่มในน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ลงผสมกับตัวอย่างด้วยการกลับหลอดไปมา บ่มหลอดในน้ำแข็งต่ออีก 15 นาที นำ หลอดปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ย้ายส่วนใสด้านบนลงหลอดใหม่ ตามด้วยการเติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันและบ่มหลอดในน้ำแข็งต่ออีก 15 นาที นำ สารละลายปั่นตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลาย ส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 300 ไมโครลิตร นำหลอดปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบเต็ม ล้างตะกอนจำนวน 2 ครั้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำ diethyl pyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 10-30 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop One (Thermo Scientific) และกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase I (Promega, USA) บ่มหลอด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 100 นาโนกรัม ใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ RNA dependent DNA polymerase ของชุดทดสอบ qScript XLT cDNA SuperMix โดยทำปฏิกิริยาตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต (Quantabio)

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส TiLV ด้วยวิธี semi-nested-PCR

ตรวจการติดเชื้อ TiLV ด้วยวิธี semi-nested-PCR (Taengphu et al., 2020) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรก (PCR) ด้วยไพรเมอร์ TiLV/nSeg1F; 5'- TCT GAT CTA TAG TGT CTG GGC C-3' และ TiLV/nSeg1R; 5'- AGT CAT GCT CGC TTA CAT GGT-3' ซึ่งให้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 620 คู่เบส และทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่ 2 (semi-nested-PCR) ด้วยไพรเมอร์ TiLV/nSeg1F; 5'- TCT GAT CTA TAG TGT CTG GGC C-3' และ TiLV/nSeg1RN; 5'- CCA CTT GTG ACT CTG AAA CAG-3' ซึ่งให้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 274 คู่เบส เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรก ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 20 นาโนกรัม ผสมรวมกับสารทดสอบ Go Taq G2 Flexi DNA Polymerase ที่มี ส่วนผสมของไพรเมอร์ความเข้มข้น 200 μ M MgCl₂ ความเข้มข้น 2 mM และ DNA Polymerase 1.25 ยูนิต ทำปฏิกิริยา ด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น Biometea T One 96G กำหนดปฏิกิริยา ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ของ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ semi-nested-PCR โดยเตรียมส่วนผสมและทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาในรอบแรก สำหรับการตรวจยีน Actin ใช้ไพรเมอร์ β -actin (Niu et al. 2021) โดยมี β -actin-F; 5'-CGA GAG GGA AAT CGT GCG TGA CA-3' และ β -actin-R; 5'-AGG AAG GAA GGC TGG AAG AGG GC-3' ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

การโคลนชิ้นส่วน segment 8 เข้าสู่ pGEM-T easy® vector

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ TiLV segment 8 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัส TiLV บริเวณ segment 8 ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (accession no. KU751821) ดังนี้ TiLV/Seg8-F; 5'-AGG TAC CAT GGC TCA AAT CCC AAC ACT AAG AGA-3' และ TiLV/Seg8-R; 5'-AGG ATC CTT ATT TAA GCA TTT CAC GGA AAT GAT T-3' โดยด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* (5'-GGTACC-3') และ *BamHI* (5'-GGATCC-3') เชื่อมต่ออยู่ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยชุดทดสอบ Go Taq G2 Flexi DNA Polymerase ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 525 คู่เบส เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยใช้ cDNA ในการทำปฏิกิริยา 20 นาโนกรัม กำหนดปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 525 คู่เบส ด้วยชุดสกัด NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHERY-NAGEL) จากนั้นโคลนชิ้นส่วนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T easy® vector (Promega, USA) และส่งถ่ายรีคอมบีแนนท์พลาสมิด (pSeg8) เข้าสู่คอมพลีเมนต์เซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิค heat shock คัดเลือกโคโลนีด้วย blue/white colony selection และย้ายเลี้ยงโคโลนีแบคทีเรียลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาแอมพิซิลิน บ่มเยาะที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด GenAll Exprep Plasmids SV mini (Gene All) ตามวิธีของบริษัท และตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BamHI* ส่งโคลนที่มีเป้าหมายหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนด้วยชีวสารสนเทศ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ TiLV segment 8 บนฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Protein BLAST และทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 สร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGAX ตามวิธี Maximum-likelihood และทำนายตำแหน่ง antibody epitope ด้วยโปรแกรม Bepipred Linear Epitope Prediction (IEDB analysis resource)

ผลการวิจัย

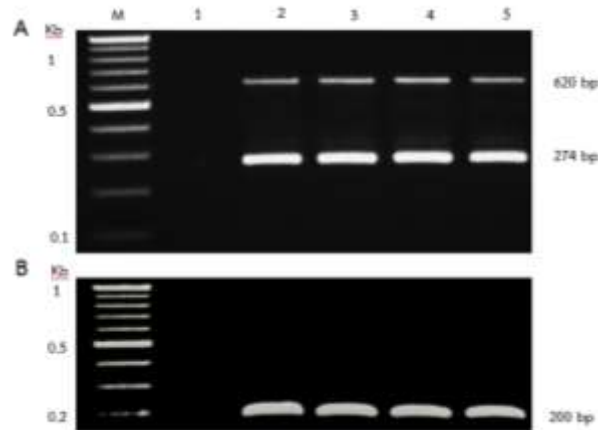
การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส TiLV ด้วย semi-nested PCR

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างปลานิลที่แสดงอาการติดเชื้อไวรัส TiLV และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส TiLV ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อจีโนมไวรัสบริเวณ segment 1 พบปลานิลทุกตัวอย่างให้แถบแบนดีเอ็นเอขนาด 274 และ 620 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดที่ใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัส TiLV ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ และปลานิลที่นำมาตรวจไวรัสให้แถบแบนที่จำเพาะกับยีน actin ของปลาซึ่งให้ขนาด 200 คู่เบส (ภาพที่ 1) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าปลานิลที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีการติดเชื้อไวรัส TiLV

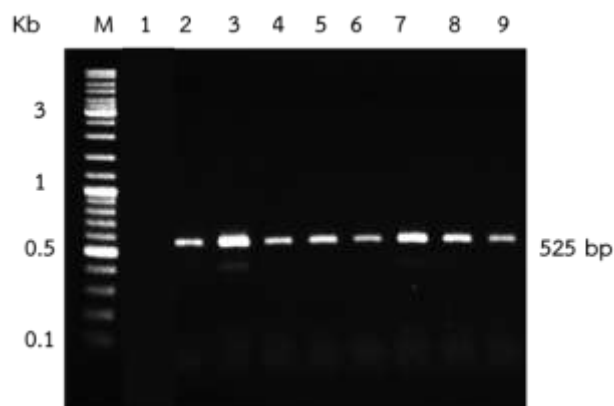
การโคลนชิ้น segment 8 เข้าเวกเตอร์ pGEM-T easy

นำ cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อปลานิลที่ติดเชื้อไวรัสทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของ segment 8 ด้วยไพรเมอร์ TiLV/Seg8 พบว่าไพรเมอร์ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 525 คู่เบส (ภาพที่ 2) ซึ่งมีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับที่มีการรายงานในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม จึงทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายและโคลนเข้าเวกเตอร์ pGEM-T easy ตรวจสอบโคลนลำดับที่ 1-4 ด้วยโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR) และวิเคราะห์รีคอมบีแนนท์พลาสมิดที่สกัดจากโคลนด้วย

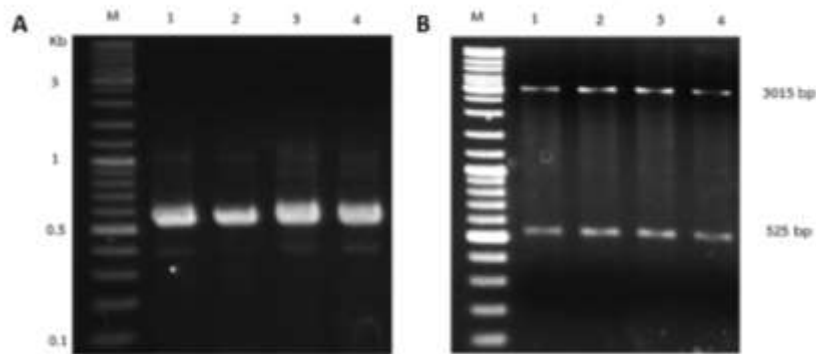
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *BamHI* จากผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ในทุกโคลนพบแถบดีเอ็นเอขนาด 525 คู่เบส (ภาพที่ 3A) และเมื่อตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าทุกโคลนให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 3,015 คู่เบส (*pGEM-T/KpnI-BamHI*) และ 525 คู่เบส (ภาพที่ 3B) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารีคอมบีแนนท์พลาสมิดมีดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่ภายในเวกเตอร์



ภาพที่ 1 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส TiLV ในปลานิลด้วย semi-nested PCR (A) ผลผลิตพีซีอาร์ของปลาที่ติดเชื้อไวรัส TiLV และ (B) ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากยีน actin ซึ่งใช้เป็น internal control M; 1 Kb DNA marker, เลนินที่ 1; negative control (H₂O), เลนินที่ 2-5; ปลานิลตัวที่ 1-4



ภาพที่ 2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน TiLV segment 8 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เลนินที่ M; 1 Kb DNA marker, เลนินที่ 1; negative control (H₂O), เลนินที่ 2-9; ผลผลิตพีซีอาร์จาก cDNA ของไวรัส TiLV ที่สกัดจากอวัยวะในช่องท้องปลานิล



ภาพที่ 3 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยโคลนนิ่ง (A) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI-BamHI* (B) M; 1 Kb DNA marker, เลนส์ที่ 1-4; โคลนนิ่งของโคลนที่ 1-4 (ภาพซ้าย) และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pSeg8) จากโคลนที่ 1-4 (ภาพขวา)

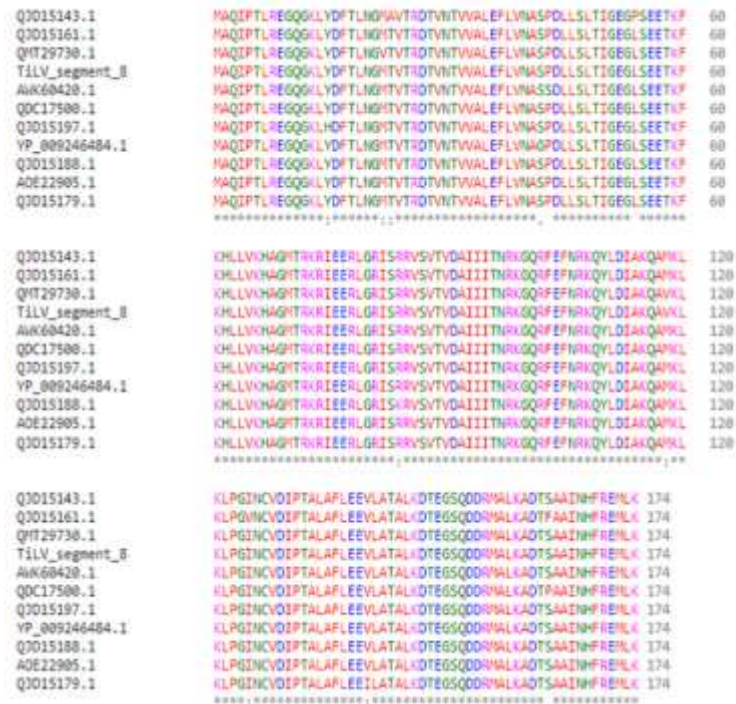
การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีน TiLV segment 8 ด้วยชีวสารสนเทศ

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมายเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่าดีเอ็นเอเป้าหมายมีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 525 คู่เบส มีความใกล้เคียงกับดีเอ็นเอของ Tilapia lake virus strain EC-2012 (accession no. MK392379) ที่แยกได้จากเอกวาดอร์ถึง 98.86 เปอร์เซ็นต์ นำนิวคลีโอไทด์ถอดรหัสเป็นโปรตีนได้โปรตีนขนาด 174 อะมิโน และมีมวลโมเลกุลประมาณ 19.14 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4) จากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับโปรตีนนี้เปรียบเทียบกับโปรตีนของไวรัส TiLV segment 8 ที่พบในประเทศไทย บังคลาเทศ อิสราเอล และเปรู ซึ่งมีรายงานในฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ Thailand 2016 (AOE22905.1) Thailand 2018 (QJD15179.1) Bangladesh 2017 (QMT29730.1) Thailand 2018 (QJD15188.1) Israel 2011 (YP_009246484.1) Thailand 2019 (QJD15197.1) Peru 2018 (QDC17500.1) Thailand 2018 (AWK60420.1) Thailand 2016 (QJD15161.1) และ Thailand 2015 (QJD15143.1) พบว่ามีความเหมือนกัน 99.4%, 98.8%, 99.4%, 98.8%, 98.8%, 98.8%, 98.8%, 98.8%, 98.2% และ 98.2% ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

```

atg gct caa atc cca aca cta aga gag ggc caa ggg aag ctc tac gat ttc acg ctc aac
M A Q I P T L R E G Q G K L Y D F T L N
ggc atg aca gtg act aga gac aca gtc aac act gta gtt gct ctg gag ttt ctt gtc aat
G M T V T R D T V N T V V A L E F L V N
gca agt ccg gat ttg ctt tcc cta aca att ggc gaa ggc ctc tca gaa gaa aca aag ttt
A S P D L L S L T I G E G L S E E T K F
aaa cac ctg ctt gtt aag cac gcc ggc atg acc cgg aag cgg ata gag gaa agg ctg gga
K H L L V K H A G G M T R K R I E E R L G
cga atc tcg agg cga gtc agt gtg aca gtc gac gca att ata ata aca aac cgc aag ggt
R I S R R V S V T V D A I I I T N R K G
caa aga ttt gaa ttc aat cga aaa cag tac ctg gat att gcc aaa caa gct gtg aag ctt
Q R F E F N R K Q Y L D I A K Q A V K L
aag ctc cct ggg att aac tgt gtc gac ata ccc act gcg ctc gct ttt ctc gag gaa gtc
K L P G I N C V D I P T A L A F L E E V
ctg gca act gct ttg aaa gac act gaa ggc tca caa gat gac agg atg gcc ctt aag gca
L A T A L K D T E G S Q D D R M A L K A
gac act tct gct gct atc aat cat ttc cgt gaa atg ctt aaa taa
D T S A A I N H F R E M L K
    
```

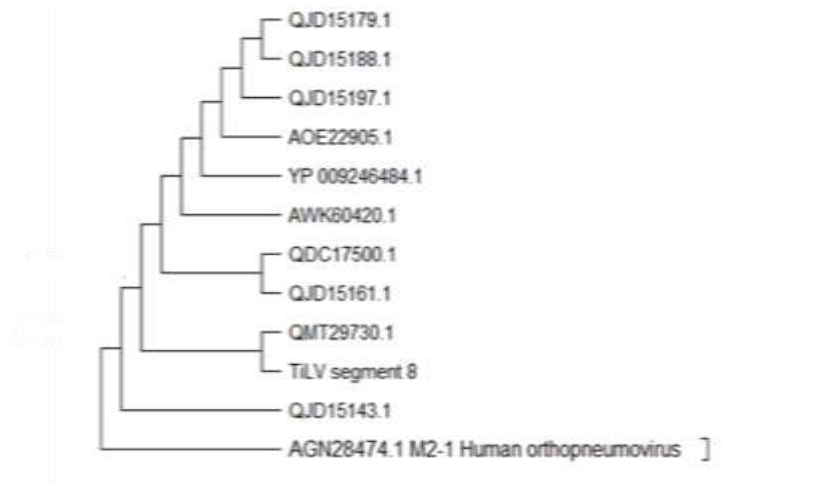
ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน TiLV segment 8



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโน TiLV_segment_8 ด้วยโปรแกรม ClustalW2 เปรียบเทียบกับ TiLV segment 8 ที่มีรายงานใน GenBank ดังนี้ Thailand 2015 (QJD15143.1) Thailand 2016 (QJD15161.1) Bangladesh 2017 (QMT29730.1) Thailand 2018 (AWK60420.1) Peru 2018 (QDC17500.1) Thailand 2019 (QJD15197.1) Israel 2011 (YP_009246484.1) Thailand 2018 (QJD15188.1) Thailand 2016 (AOE22905.1) และ Thailand 2018 (QJD15179.1) สัญลักษณ์แสดง *, identical residue, :, conserved substitution, .; semi-conserved substitution

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของโปรตีน TiLV segment 8 ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้เปรียบเทียบกับ TiLV segment 8 บนฐานข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่าโปรตีน TiLV segment 8 ทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและแตกต่างจากไวรัส Respiratory syncytial virus (RSV) ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ (ภาพที่ 6) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า ดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นส่วนของยีน TiLV segment 8

วิเคราะห์โปรตีน TiLV segment 8 ด้วยโปรแกรม Bepipred Linear Epitope Prediction (IEDB web server) (กำหนดค่า threshold 0.500) เพื่อทำนายตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็น epitope พบว่าโปรตีนให้ค่า epitope ในช่วง 0.251 ถึง 0.622 และมีลำดับกรดอะมิโน 8 ตำแหน่ง บนโปรตีนที่แสดงค่า epitope สูงกว่าค่า threshold 0.5 ซึ่งเป็นตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน 5-14, 23-29, 43, 50-83, 98-117, 119-128, 147-161 และ 163 บริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่อยู่ผิวนอกของโครงสร้างโปรตีนซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดีได้ดี (ภาพที่ 7) จากการทำนายบริเวณ epitope พบว่าลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง “IGEGLSEETKFKHLLVKHAGMTRKRIERLGRIS” “RKGQRFEFNRKQYLDIAKQA” และ “DTEGSQDDRMALKAD” ซึ่งมีขนาดของลำดับกรดอะมิโน 34, 20 และ 15 โมเลกุล ตามลำดับ เป็นบริเวณ epitope ที่เหมาะสมต่อการเป็นไวรัสแอนติเจน จากผลการวิเคราะห์นี้จึงสามารถสรุปได้ว่า โปรตีน TiLV segment 8 ที่ได้จากการศึกษามีความเป็นแอนติเจนสูง (antigenicity) จึงเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัส TiLV ของปลานิลในประเทศไทย



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีน TiLV segment 8 ด้วย โปรแกรม MEGAX โดยวิธี Maximum likelihood method TiLV segment 8 ประกอบด้วย Thailand 2018 (QJD15179.1) Thailand 2018 (QJD15188. 1) Thailand 2019 (QJD15197. 1) Thailand 2016 (AOE22905. 1) Israel 2011 (YP_009246484. 1) Thailand 2018 (AWK60420. 1) Peru 2018 (QDC17500. 1) Thailand 2016 (QJD15161.1)Bangladesh 2017 QMT29730.1)Thailand 2015 (QJD15143.1) และ Respiratory syncytial virus (RSV) (AGN28474.1) ซึ่งเป็นกลุ่มนอก (outgroup)



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ตำแหน่ง epitope ของโปรตีน TiLV segment 8 เปรียบเทียบกับโปรตีน TiLV segment 8 ที่แยกได้จากประเทศไทย Thailand 2016 (AOE22905.1) Thailand 2018 (QJD15188.1) และ Thailand 2019 (QJD15197.1)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยสามารถแยกยีน segment 8 จากจีโนมไวรัส TiLV และโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ยีนที่คัดแยกมีขนาด 525 คู่เบส มีลำดับกรดอะมิโน 174 อะมิโน และมีมวลโมเลกุล 19.14 กิโลดาลตัน โปรตีนมีความเหมือนและมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับโปรตีนของไวรัส TiLV segment 8 จากประเทศไทย บังคลาเทศ อิสราเอล และเปรู เมื่อนำโปรตีนมาทำนายบริเวณ epitope พบว่ามีหลายตำแหน่งที่ให้ค่า epitope สูง ซึ่งโปรตีนมีความเหมาะสมต่อการเป็นแอนติเจนสำหรับการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัส TiLV จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานความสำเร็จของการพัฒนาวัคซีนป้องกัน TiLV จากส่วนของยีน segment 8 (โปรตีน VP20) โดยพัฒนาเป็นวัคซีนชนิด DNA vaccine (pV-optiVP20) และโปรตีนวัคซีน (rVP20 subunit) และทดสอบฉีดเข้าปลาชนิดด้วยดีเอ็นเอวัคซีนและฉีดกระตุ้นซ้ำ (boost) ด้วยโปรตีนวัคซีน (Pv-optiVP20 prime-rVP02 หรือ Pri-Bo) พบว่าปลาที่มีอัตราการรอดชีวิต 72.5 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับวัคซีนมีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น และมีจำนวนไวรัสต่ำกว่าชุดควบคุม (Zeng et al., 2021) ต่อมา มีการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนจาก segment 10 (pcDNA3.1-ORF10) และทดลองฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อของปลาที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน แล้วกระตุ้นซ้ำด้วยดีเอ็นเอวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นเดิม พบว่าดีเอ็นเอวัคซีนที่ระดับความเข้มข้นสูง (450 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำให้ปลารอดชีวิตสูงสุด วัคซีนสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสในอวัยวะม้าม ตับ และไต ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีนสามารถกระตุ้นและเพิ่มความต้านทานของปลา โดยการส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น *IgM*, *TLR2*, *MyD88*, *IL8*, *TNF α* , *IFN γ* , และ *NF- κ B* (Yu et al., 2021) จากความสำเร็จของการพัฒนาวัคซีนและผลการวิจัยในครั้งนี้ จึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะพัฒนาวัคซีนจากยีน TiLV segment 8 ซึ่งมีความจำเพาะกับไวรัสที่คัดแยกได้จากประเทศไทย เพื่อใช้ป้องกันโรคและลดการแพร่ระบาดของ TiLV ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลาของไทย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนการผลิตบัณฑิตจาก สาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ TAMDOE60040 และ หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกู้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ สารเคมี และครุภัณฑ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Dinesh R, George MR, John KR, Abraham S. TiLV-a worldwide menace to tilapia aquaculture. *J Entomol Zool Stud* 2017; 5 (2): 605-607.
- Dong HT, Ataguba GA, Khunrae P, Rattanaojpong T, Senapin S. Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease. *Aquaculture* 2017; 479: 579-583.
- Eyngor M, Zamostiano R, Kembou Tsofack JE, Berkowitz A, Bercovier H, Tinman S, et al. Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (12): 4137-4146.
- Fathi M, Dickson C, Dickson M, Leschen W, Baily J, Muir F, et al. Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome. *Aquaculture* 2017; 473: 430-432.
- Ferguson HW, Kabuusu R, Beltran S, Reyes E, Lince JA, del Pozo J. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report. *J Fish Dis* 2014; 37(6): 583-589.

- Hu H, Zeng W, Wang Y, Wang Q, Bergmann SM, Yin J, et al. Development and application of a recombinant protein-based indirect ELISA for detection of anti-tilapia lake virus IgM in sera from tilapia. *Aquaculture* 2020; 520: 734756.
- Hwang JY, Kwon MG, Kim YJ, Jung SH, Park MA, Son MH. Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol* 2017; 60: 420-425.
- Jaemwimol P, Sirikanchana K, Tattiyapong P, Mongkolsuk S, Surachetpong W. Virucidal effects of common disinfectants against tilapia lake virus. *J Fish Dis* 2019; 42 (10): 1383-1389.
- Kembou-Tsofack JE, Zamostiano R, Watted S, Berkowitz A, Rosenbluth E, Mishra N, et al. Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2017; 55 (3): 759-767.
- Matsuura Y, Terashima S, Takano T, Matsuyama T. Current status of fish vaccines in Japan. *Fish Shellfish Immunol* 2019; 95, 236-247.
- Niu J, Wu F, Huang Y, Tang J, Wang B, Lu Y, et al. Identification and characterization of high-mobility group box 1 (HMGB1) from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac Rep*, 2021; 19: 100573.
- Surachetpong W, Janetanakit T, Nonthabenjawan N, Tattiyapong P, Sirikanchana K, Amonsin A. Outbreaks of tilapia lake virus infection, Thailand, 2015–2016. *Emerg Infect Dis* 2017; 23 (6): 1031-1033.
- Taengphu S, Sangsuriya P, Phiwsaiya K, Debnath PP, Delamare-Deboutteville J, Mohan CV, et al. Genetic diversity of tilapia lake virus genome segment 1 from 2011 to 2019 and a newly validated semi-nested RT-PCR method. *Aquaculture* 2020; 526: 735423.
- Yu NT, Zeng WW, Wang JH, Zhang YL, Zhang XC, Liu ZX. A high efficacy DNA vaccine against Tilapia lake virus in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Preprints* 2021; 1-13.
- Zeng W, Wang Y, Chen X, Wang Q, Bergmann SM, Yang Y, et al. Potency and efficacy of VP20-based vaccine against tilapia lake virus using different prime-boost vaccination regimens in tilapia. *Aquaculture* 2021; 539: 736654.