



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุวิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาโครงสร้างทางอณูวิทยาและการวิเคราะห์ความหลากหลายของบริเวณที่ใช้จับแอนติเจนของ Complementary DNA ของยีน Immunoglobulin M สายหลักของปลานิล *Oreochromis niloticus*

Molecular Characterization and Diversity Analysis of Variable Regions of Complementary DNA of Immunoglobulin M Heavy Chain Gene in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

นามผู้วิจัย นางสาวจิราภรณ์ ภูอินดี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศีระษะภูมิ, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์ศศิมนัส อุณัจกร, ปร.ด. )

ประธานสาขาวิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

สิงสีทงี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาโครงสร้างทางอณูวิทยาและการวิเคราะห์ความหลากหลายของบริเวณที่ใช้จับแอนติเจนของ  
Complementary DNA ของยีน Immunoglobulin M สายหลัก  
ของปลานิล *Oreochromis niloticus*

Molecular Characterization and Diversity Analysis of Variable Regions of  
Complementary DNA of Immunoglobulin M Heavy Chain Gene in Nile Tilapia  
(*Oreochromis niloticus*)

โดย

นางสาวจิราภรณ์ ภูยีนดี

เสนอ

บัณฑิตมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)  
พ.ศ. 2556

จิราภรณ์ ภูยีนดี 2556: การศึกษาโครงสร้างทางอณูวิทยาและการวิเคราะห์ความหลากหลายของบริเวณที่ใช้จับแอนติเจนของ Complementary DNA ของยีน Immunoglobulin M สายหลักของปลาไนล *Oreochromis niloticus* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศีระษะภูมิ, Ph.D. 139 หน้า

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Immunoglobulin (Ig) M heavy chain ของปลาไนลโดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid amplification cDNA ends (RACEs) พบว่ามีความยาวทั้งหมด 1,921 bp ซึ่งประกอบด้วย Open reading frame ความยาว 1,740 bp โดยสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 580 Residues เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า มีรูปแบบเป็นคุณลักษณะของ IgM heavy chain secreted form เนื่องจากมีโครงสร้างประกอบด้วย L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>μ</sub>1-C<sub>μ</sub>2-C<sub>μ</sub>3-C<sub>μ</sub>4 จึงให้ชื่อว่า "On-sIgM" ซึ่งพบว่า On-sIgM มีกรดอะมิโนอนุรักษ์ (Conserved residues) และ Signature motifs ที่สำคัญต่อโครงสร้างและหน้าที่ของ IgM ประกอบด้วยกรดอะมิโน Tryptophan (W) และ Cysteine (C) ที่เป็นกรดอะมิโนอนุรักษ์ ทั้งหมด 8 และ 10 ตำแหน่ง ตามลำดับ และพบตำแหน่ง Potential N-linked glycosylation sites ได้แก่ NSS ใน C<sub>μ</sub>2 1 ตำแหน่ง, NKT ใน C<sub>μ</sub>3 1 ตำแหน่ง และ NTT ใน C<sub>μ</sub>4 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบ Signature Motifs ที่สำคัญต่อโครงสร้างของโปรตีน IgM ซึ่งได้แก่ <sup>62</sup>GKGLEW<sup>67</sup> ในบริเวณ Frame work region (FR) 2 Motif <sup>113</sup>YYCVR<sup>117</sup> บริเวณ FR3 Motif <sup>122</sup>FDYWGGKTTVTVT<sup>135</sup> บริเวณ FR4 Motif <sup>216</sup>LQCAVTH<sup>222</sup> บริเวณ C<sub>μ</sub>1 และ Motif <sup>433</sup>HEDLIEP<sup>439</sup> บริเวณ C<sub>μ</sub>3 และจากการศึกษาความสัมพันธ์และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ On-sIgM ของปลาไนล โดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่า On-sIgM จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Immunoglobulin M heavy chain ของปลากระดุกเข็ง โดยมีค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนสูงที่สุดกับปลา Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ที่ 62.6% และ 55.4% ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของ Variable domain (V<sub>H</sub>) ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในปลาไนล พบว่า IgM ของปลาไนลมีการใช้ V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> และ J<sub>H</sub> อย่างน้อย 9, 6 และ 4 Families ตามลำดับ เพื่อนำมาใช้ในการสร้างความหลากหลายของ Variable domain ในการจับกับแอนติเจนและจากการศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ Variable domain ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธีของ Kabat and Wu (1971) และวิธีของ Shannon (1948) พบว่าบริเวณ Complementarity determining regions (CDRs) มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากกว่าบริเวณ Frame work regions (FRs) โดยที่ CDR3 มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุด รองลงมาคือ CDR2 และ CDR1 ตามลำดับ และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่า On-sIgM มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบในระดับที่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับการศึกษาระดับการแสดงออก โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR พบว่า IgM heavy chain มีการแสดงออกได้ทั้ง 13 อวัยวะเช่นเดียวกัน โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ที่ไตส่วนหน้า รองลงมาคือ ม้าม, ลำไส้และเม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต ตามลำดับ นอกจากนี้การประเมินจำนวนยีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region ที่อยู่บนสารพันธุกรรมทั้งหมด (Genome) ของปลาไนล ด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่ายีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region มีเพียง 1 copy number เท่านั้น

Chiraporn Phuyindee 2013: Molecular Characterization and Diversity Analysis of Variable Regions of Complementary DNA of Immunoglobulin M Heavy Chain Gene in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoom, Ph.D. 139 pages.

A full-length of cDNA encoding Immunoglobulin (Ig) M heavy chain complementary DNA (cDNA) of Nile tilapia was successfully cloned using 5' and 3' Rapid amplification cDNA ends (RACEs) techniques. The complete cDNA of Nile tilapia IgM heavy chain gene was 1,921 bp in length composed of 1,740 bp for open reading frame of 580 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of Nile tilapia IgM heavy chain possesses a typical secretory IgM heavy chain designated "On-sIgM", organized with a variable region and connected to four constant regions to form L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>μ</sub>1-C<sub>μ</sub>2-C<sub>μ</sub>3-C<sub>μ</sub>4 pattern. Conserved amino acid residues and signature motifs important for molecular function were evidently observed. Tryptophan (W) and cysteine (C) necessary for structural support were found 8 and 10 positions, respectively. N-linked glycosylation sites NSS, NKT and NTT were identified as 1 position in C<sub>μ</sub>2, 1 position in C<sub>μ</sub>3 and 2 positions in C<sub>μ</sub>4, respectively. Signature motifs <sup>62</sup>GKGLEW<sup>67</sup>, <sup>113</sup>YYCVR<sup>117</sup>, <sup>122</sup>FDYWGKGTTVTVTT<sup>135</sup>, <sup>216</sup>LQCAVTH<sup>222</sup> and <sup>433</sup>HEDLIEP<sup>439</sup> were characterized in framework region (FR) 2, FR3, FR4, C<sub>μ</sub>1 and C<sub>μ</sub>3, respectively. The comparisons of nucleotide and amino acid sequences of On-sIgM with IgM heavy chain of those other organism IgM heavy chains showed highest similarity scores of 62.6% and 55.4%, respectively, to orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Structural analysis of 126 cDNAs encoding variable domains of IgM heavy chain revealed that 9 V<sub>H</sub>, 6 D<sub>H</sub> and 4 J<sub>H</sub> families were utilized to generate the repertoire of antigen binding domains. The similarity value of V<sub>H</sub> segments between the families was 54.0-66.7%. Diversity analysis of variable domain indicated that the amino acid sequences of framework regions (FRs) are less variable than complementary determining regions (CDRs), which were the most variable in CDR3. Tissue expression profile analysis by RT-PCR was performed in a healthy Nile tilapia. The result showed that Nile tilapia IgM heavy chain was ubiquitously expressed in all 13-tested tissues with similar expression levels. However, quantitative real-time RT-PCR indicated that Nile tilapia IgM heavy chain gene was also ubiquitously expressed, but the highest expression level was observed in head kidney followed by spleen, intestine and peripheral blood leukocytes (PBLs), respectively. Furthermore, Southern blot analysis of constant region of IgM heavy chain gene in three different fishes demonstrated that there is only one copy number located on Nile tilapia genomes.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก ผู้ที่คอยให้ความช่วยเหลือและชี้แนะในการวางแผนงานวิจัย พร้อมทั้งช่วยเหลือใน  
เรื่องของทุนการศึกษา ตลอดจนสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์  
ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศศิมนัส อุณจักร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำในการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น  
ตลอดจนให้ความช่วยเหลืออนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัยบางส่วน

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.วิน สุระเชษฐพงษ์ ประธานการสอบ  
ปากเปล่าชั้นสุดท้าย อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.ประพจน์ดี ปิยะวิริยะกุล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกใน  
การสอบปากเปล่าชั้นสุดท้าย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เรืองวิชัย ยืนพันธ์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิต  
วิทยาลัยในการสอบประมวลความรอบรู้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีรักษ์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความ  
อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยและสนับสนุนงานวิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร เป็นอย่างสูงที่เอื้อเฟื้อห้อง  
ปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ตลอดจนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยบางส่วน

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยการผลิตปศุสัตว์ สัตว์น้ำ  
และสุขภาพสัตว์ ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัย  
แห่งชาติ สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553  
[Center of Advanced Studies for Agriculture and Food, KU Institute for Advanced  
Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand (CASAF, NRU-KU, Thailand)] ที่  
สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้เป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดและคอยอยู่  
เคียงข้างข้าพเจ้าตลอดมา อีกทั้งยังคอยให้โอกาสทางการศึกษาและสนับสนุนผลักดันให้ได้รับ  
การศึกษาที่ดีตามสติปัญญาและกำลังความสามารถของข้าพเจ้ามาจนถึงทุกวันนี้

จิราภรณ์ ภูอินดี  
พฤษภาคม 2556

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	28
อุปกรณ์	28
วิธีการทดลอง	33
ผลและวิจารณ์	53
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	109
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	112
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	139

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลผลิตการเพาะเลี้ยงและมูลค่าปลานิลทั่วโลกระหว่างปี 2549-2553	7
2	คุณสมบัติบางประการของอิมมูโนโกลบูลิน Class ต่าง ๆ	19
3	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	31
4	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank	57
5	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน <i>On-sIgM</i> กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank	62

## สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน	20
2	การจัดเรียงตัวของ Variable domain และ Constant domain ในอิมมูโนโกลบูลินสาย Heavy chain และ Light chain	22
3	แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector	37
4	ขนาดของชิ้น Insert ของ cDNA ของ EST โคลน HK 0156 ภายหลังจากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Xho</i> I บน Agarose gel	54
5	แผนภาพการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE	55
6	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blast X	56
7	การตรวจสอบตำแหน่ง Leader peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ( <i>On-slgM</i> ) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0	59
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนทั้งหมดของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในปลานิล	60
9	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน <i>On-slgM</i> กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยการใช้วิธี Multiple alignment	66
10	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน IgM heavy chain ในปลานิล ( <i>On-slgM</i> ) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank	67
11	ขนาดของ 5' RACE PCR product ของ Variable ( $V_H$ ) domain ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล บน Agarose gel	71
12	การจัดกลุ่มของ Variable ( $V_H$ ) domain family ของปลานิล	75
13	ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ $D_H$ segment	80
14	ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ $J_H$ segment	82
15	การกระจายตัวของความยาวของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ทั้งหมด 126 โคลน	84
16	ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region โดยไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Leader peptide ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธีของ Kabat and Wu (1971)	93

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region โดยไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Leader peptide ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธีของ Shannon (1948)	93
18	การแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลปกติ เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน $\beta$ -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR	98
19	Amplification plot เพื่อการสร้างกราฟมาตรฐาน ในการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	100
20	Amplification plot เพื่อการสร้างกราฟมาตรฐาน ในการศึกษาการแสดงออกของยีน $\beta$ -actin ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	101
21	กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ในการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	101
22	กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ในการศึกษาการแสดงออกของยีน $\beta$ -actin ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	102
23	Dissociation curve ในการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	102
24	Dissociation curve ในการศึกษาการแสดงออกของยีน $\beta$ -actin ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	103
25	ระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในปลานิลปกติ โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR	104
26	การวิเคราะห์รูปแบบของยีน IgM heavy chain ในส่วนของ Constant region โดยเทคนิค Southern blot analysis ใน Genome ของปลานิล	107

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

RNA	=	Ribonucleic acid
sp.	=	Species
PCR	=	Polymerase chain reaction
°C	=	Degree Celsius
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
pH	=	Positive potential of the hydrogen ions
EDTA	=	Ethylenediaminetetra acetic acid
Da	=	Dalton
bp	=	Base pair
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
μM	=	Micromolar
μg	=	Microgram
ng	=	Nanogram
ml	=	Millilitre
μl	=	Microlitre
U	=	Enzyme unit
Ala (A)	=	Alanine
Arg (R)	=	Arginine
Asn (N)	=	Asparagine
Asp (D)	=	Aspartic acid
Cys (C)	=	Cysteine
Glu (E)	=	Glutamic acid
Gln (Q)	=	Glutamine
Gly (G)	=	Glycine
His (H)	=	Histidine
Ile (I)	=	Isoleucine

การศึกษาโครงสร้างทางอณูวิทยาและการวิเคราะห์ความหลากหลายของบริเวณที่ใช้  
จับแอนติเจนของ Complementary DNA ของยีน Immunoglobulin M สายหลัก  
ของปลานิล *Oreochromis niloticus*

Molecular Characterization and Diversity Analysis of Variable  
Regions of Complementary DNA of Immunoglobulin M Heavy Chain  
Gene in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

คำนำ

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นปลากระดูกแข็ง (Teleost) น้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทยและยังพบว่าการเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางทั่วโลก โดยในประเทศไทย การเลี้ยงปลานิลของเกษตรกรส่วนใหญ่ เป็นระบบการเลี้ยงทั้งในบ่อดินและการเลี้ยงในกระชังที่ให้ผลผลิตสูงต่อหน่วยพื้นที่ อย่างไรก็ตาม ผลจากการที่เกษตรกรปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นสูงทำให้ประสบกับปัญหาการเกิดโรคระบาดของเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ที่พบว่าเป็นสาเหตุของการตายที่รุนแรงและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจกับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาอย่างกว้างขวาง (Leal *et al.*, 2010; Mohamed and Refat, 2011; Pridgeon *et al.*, 2011; Rodkhum *et al.*, 2011) เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว เกษตรกรส่วนใหญ่ได้หันมาใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีกันอย่างแพร่หลายโดยขาดความรู้ความเข้าใจ ซึ่งนอกจากจะไม่สามารถรักษาปลาอย่างได้ผลแล้ว ยังก่อให้เกิดผลกระทบทางด้านลบตามมานานาประการ เช่น การตกค้างของยาและสารเคมีในตัวปลาและผลิตภัณฑ์ไปจนถึงการตกค้างในสภาพแวดล้อม ซึ่งนอกจากจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคทางตรงแล้วยังส่งผลกระทบต่อจุลชีพที่มีประโยชน์ที่พบตามธรรมชาติอีกด้วยและยังส่งผลต่อเนื่องให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาประสบกับภาวะการขาดทุนอย่างหนักในปัจจุบัน

เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาการเกิดโรคระบาดที่เกิดขึ้นดังกล่าว นักวิจัยบางส่วนได้เริ่มหันมาศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของปลาเศรษฐกิจชนิดนี้กันอย่างจริงจังโดยมีความคาดหวังว่าจะสามารถมีความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้องเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาเพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นพื้นฐานเพื่อแสวงหาแนวทางในการสร้างมาตรการการป้องกันและรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพและนำไป

ประยุกต์ใช้ให้เป็นรูปธรรมในอนาคต ซึ่งจากข้อมูลในปัจจุบันทำให้ทราบว่าสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของปลา นั้นมีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไปที่ประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองแบบจำเพาะเจาะจง (Specific or acquired immunity) ที่ใช้ในการป้องกันตัวให้รอดพ้นจากเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลเปรียบเทียบกับปลาเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ กลับพบว่าข้อมูลเหล่านี้ในปลานิลยังมีอยู่น้อยมาก

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางอณูวิทยาของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Immunoglobulin M สายหลัก ที่พบในปลานิล ทั้งนี้ เนื่องมาจากยีนชนิดนี้ถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป โดยพบว่าจะทำหน้าที่สำคัญหลายประการในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงเช่น การเป็นโมเลกุลที่คอยดักจับสิ่งแปลกปลอมอยู่บนผิวเซลล์ของ B cells (B lymphocytes) ที่ยังไม่เคยพบกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Antigen) และถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อทำปฏิกิริยา Neutralization เพื่อลดความเป็นพิษหรือความรุนแรงของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม การส่งเสริมกระบวนการกลืนกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) รวมไปถึงการกระตุ้นระบบการตอบสนองโดยการสร้างโปรตีนหลายชนิดในกระบวนการ Complement fixation อีกด้วย นอกจากนี้การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของบริเวณที่ใช้ในการจับ แอนติเจน (Variable region) บน cDNA ของยีนชนิดนี้อีกด้วย ผลของการศึกษานี้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจในระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นในปลานิลที่มีประสิทธิภาพและเป็นรูปธรรมอันจะส่งผลให้ธุรกิจการเลี้ยงปลานิลของไทยสามารถดำเนินต่อไปอย่างมั่นคงและยั่งยืนในอนาคต

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA (cDNA) ของ ยีน Immunoglobulin M heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends Polymerase Chain Reaction (RACE PCR)
2. เพื่อศึกษาโครงสร้าง คุณสมบัติและลักษณะทางอณูวิทยาของ cDNA ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ของปลานิล
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Immunoglobulin M heavy chain ของ ปลานิลเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ
4. เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนบริเวณ Variable domain ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในปลานิล
5. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในเนื้อเยื่อจาก อวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลปกติ โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และวิธี Quantitative Real-time RT-PCR
6. เพื่อประเมินจำนวนและรูปแบบ Constant region ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ที่อยู่บนสารพันธุกรรมทั้งหมด (Genome) ของปลานิล โดยเทคนิค Southern blot analysis

## การตรวจเอกสาร

### ปลานิล

#### 1. ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง ในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (ชื่อเดิมคือ *Tilapia nilotica*) ปัจจุบันมีการจัดลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Perciformes
Family	Cichlidae
Genus	<i>Oreochromis</i>
Species	<i>niloticus</i>

ปลานิลจัดเป็นปลากระดูกแข็ง (Teleost fish) มีรูปร่างลักษณะคล้ายกับปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ลำตัวสั้น แบนข้าง แต่ปลานิลมีลักษณะพิเศษคือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 47 แถว ตามลำตัวมีลายขวางจำนวน 9-10 แถบ นอกจากนี้ ลักษณะทั่วไปยังพบว่า ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบกันประกอบด้วยครีบแข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำตัดขวางแลดูคล้ายลายข้าวตอก ซึ่งสีของลำตัวจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยโดยสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย ขนาดลำตัวยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร เมื่ออายุได้ประมาณ 3 เดือนเศษจะเริ่มมีลักษณะแตกต่างทางเพศ สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดทั้งปี ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) เป็นปลาที่มีความอดทนและปรับตัวให้อยู่ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น ทนต่อสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ ทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ดี ทนต่อค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำและทนความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ดีกว่าปลาน้ำจืดหลายชนิด รวมทั้งสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40°C

แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10°C พบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ตึ๊ง ทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลานิลนี้อยู่ในเขตร้อน นอกจากนี้ปลานิลยังสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถขยายพันธุ์ตัวเองในบ่อเลี้ยง กินอาหารได้หลายชนิด เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลง และสัตว์น้ำเล็ก ๆ เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย สามารถเลี้ยงร่วมกับปลาอื่นได้ เจริญเติบโตเร็ว (สมเจตน์, 2550; Popma and Masser, 1999)

ปลานิลมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึงและทะเลสาบในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยิกา ปลานิลถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะ เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทรงนำเข้ามาทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว ครั้งนั้นพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวได้ทรงโปรดเกล้า ให้ทดลองเลี้ยงปลานิลในบ่อสวนจิตรลดา พบว่าปลานิลที่ทรงโปรดเกล้าให้ทดลองเลี้ยง ได้เจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี ต่อมาจึงได้พระราชทานชื่อว่า "ปลานิล" โดยมีที่มาจากชื่อแม่น้ำไนล์ (Nile) ที่เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยดั้งเดิมและพระราชทานพันธุ์ปลาดังกล่าวให้กับกรมประมงจำนวนหนึ่ง เมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2509 เพื่อนำไปขยายพันธุ์และแจกจ่ายแก่พสกนิกรและปล่อยตามแหล่งน้ำ (มานพและคณะ, 2536)

## 2. ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลานิล

ปลานิลจัดว่าเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและของโลก กำลังได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่มีการพัฒนาสายพันธุ์จนมีลำตัวหนา มีส่วนของกล้ามเนื้อใหญ่ สามารถแลเป็นชิ้น (Fillet) ส่งขายตลาดต่างประเทศ สามารถปรุงแต่งเป็นอาหารได้หลากหลายชนิด นอกจากนี้หน่วยงานทั้งภาครัฐบาลและเอกชนมีการส่งเสริมและพัฒนาการเลี้ยงปลานิลอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีผลผลิตมากขึ้น เพื่อเป็นการสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการโดยเฉพาะเกษตรกรรายย่อยของประเทศ

ปัจจุบันปลานิลเป็นปลาที่ได้รับความนิยมในการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในระดับภูมิภาคเอเชียนั้นปลานิลมีแนวโน้มที่จะทำให้การเลี้ยงเป็นไปแบบอุตสาหกรรมโดยในระยะเวลากว่า 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนากระบวนการเลี้ยงและสายพันธุ์ปลานิลอย่างต่อเนื่อง โดยผลผลิตมากกว่าครึ่งเป็นผลผลิตจากภูมิภาคเอเชีย ในปี พ.ศ. 2553 ปริมาณการผลิตปลานิลทั่วโลกอยู่ที่ 2,538,052 ตัน คิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 4,018,626,000 เหรียญสหรัฐฯ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีปริมาณการจับจากธรรมชาติอยู่ที่ 287,120 ตัน (FAO, 2012) สำหรับการ

เพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยนั้น มีอัตราการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น โดยส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเพื่อการบริโภคภายในประเทศ แต่ได้มีความพยายามปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีลักษณะและคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันปลานิลสามารถส่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศในลักษณะของปลาแช่แข็ง ตลาดที่สำคัญ ๆ อาทิ ญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี เป็นต้น ผลผลิตปลานิลที่ประเทศไทยส่งออก จำเป็นต้องมีใบกำกับกับการจำหน่ายสัตว์น้ำ Fisheries Movement Document (FMD) ซึ่งออกโดยกรมประมง หากดูผลผลิตปลานิลจากระบบการออกใบกำกับกับการจำหน่ายสัตว์น้ำ (FMD) ในปี พ.ศ. 2554 มีจำนวน 2,167.0 ตัน ซึ่งลดลง 54.0% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2553 และสำหรับในปี พ.ศ. 2555 คาดว่าจะมีผลผลิตปลานิลจำนวน 179,849 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 29.1% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2554 (กรมประมง, 2555) โดยผลผลิตปลานิลส่วนใหญ่จะบริโภคภายในประเทศเป็นรูปสด 89% ในการแปรรูปทำเค็ม ตากแห้ง 5% ย่าง 3% และที่เหลือในรูปอื่น ๆ สำหรับปลานิลทั้งตัวและในรูปแช่แข็งก็มีจำหน่ายในประเทศ ซึ่งผู้ผลิตคือโรงงานและจำหน่ายให้ภัตตาคารหรือร้านอาหาร เนื่องจากราคาปลานิลในประเทศไทยมีราคาสูงกว่าราคาจำหน่ายในตลาดโลก โดยราคาเฉลี่ยที่เกษตรกรขายได้ในภาคกลางในปี พ.ศ. 2554 ปลานิลขนาดเล็กอยู่ที่ระดับ 22.71 บาท/กก. ปลานิลขนาดกลาง 36.01 บาท/กก. และปลานิลขนาดใหญ่ 45.66 บาท/กก. ปลานิลทุกขนาดมีการปรับราคาเพิ่มขึ้น 2-15% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2553 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555)

ปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ของไทยในปี พ.ศ. 2554 มีจำนวน 11,910.6 ตัน คิดเป็นมูลค่า 747.7 ล้านบาท ซึ่งมีปริมาณส่งออกลดลง 8.1% แต่มูลค่าของสินค้าเพิ่มขึ้น 11.8% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2553 ตลาดส่งออกหลักของไทย คือ ซาอุดีอาระเบีย 17% สหรัฐอเมริกา 17% สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์ 14% คูเวต 12% อังกฤษ 7% ฝรั่งเศส 6% เนเธอร์แลนด์ 4% และอื่น ๆ 23% รูปแบบผลิตภัณฑ์ปลานิลที่ไทยส่งออกมากที่สุด คือ ปลานิลทั้งตัวแช่แข็ง จำนวน 9,751.1 ตัน มูลค่า 431.6 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 81.9% และ 57.7% ของปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลทั้งหมด รองลงมา คือ เนื้อปลานิลแช่เย็น ปริมาณ 1,201.1 ตัน มูลค่า 174.6 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 10.1% และ 23.4% เนื้อปลานิลฟิลเล่แช่แข็ง จำนวน 860.4 ตัน มูลค่า 130.7 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 7.2% และ 17.5% และรูปแบบอื่น ๆ คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 0.8% และ 1.4% ตามลำดับ (กองประมงต่างประเทศ, 2555)

ตารางที่ 1 ผลผลิตการเพาะเลี้ยงและมูลค่าปลานิลทั่วโลกระหว่างปี 2549-2553

ปีพุทธศักราช	ผลผลิต	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (1,000 เหรียญสหรัฐฯ)
2549	1,890,696	2,106,466
2550	1,862,878	2,567,132
2551	2,061,816	2,840,701
2552	2,240,589	3,433,018
2553	2,538,052	4,018,626

ที่มา: องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO, 2012)

### 3. โรคปลานิล

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการเลี้ยงปลานิลกันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามสิ่งที่ถือเป็นปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญคือการเกิดโรคระบาดที่รุนแรง โดยโรคที่เกิดขึ้นในปลานิลมาจากหลายสาเหตุ มีทั้งที่เกิดจากปรสิต แบคทีเรียและเชื้อรา (กมลพร, 2539) โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคในปลานิล ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ที่พบว่าเป็นสาเหตุของการตายที่รุนแรงและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจกับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาอย่างกว้างขวาง (Leal *et al.*, 2010; Mohamed and Refat, 2011; Pridgeon *et al.*, 2011; Rodkhum *et al.*, 2011)

โรคปลานิลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก ๆ คือ โรคติดเชื้อ (Infectious diseases) อาจมีสาเหตุเกิดมาจากแบคทีเรีย ปรสิตหรือเชื้อรา และโรคไม่ติดเชื้อ (Non-infectious diseases) สามารถแบ่งได้เป็นโรคที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม โรคที่เกิดจากอาหารและโรคที่เกิดจากความบกพร่องทางพันธุกรรม โรคไม่ติดเชื้อเป็นโรคไม่ติดต่อ ไม่สามารถรักษาได้ ในขณะที่โรคติดเชื่อนั้น มีสาเหตุมาจากเชื้อโรคซึ่งส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมหรือติดมากับปลาที่เป็นพาหะ

ของโรค โรคเหล่านี้สามารถติดต่อกันได้ (Contagious diseases) และต้องการการรักษาจัดการ เพื่อที่จะควบคุมการระบาดของโรค (กมลพร, 2539) โรคติดเชื่อในปลานิลที่พบส่วนใหญ่ได้แก่

### 3.1 โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตภายนอก

ปรสิตภายนอกที่ทำอันตรายต่อปลานิลมีหลายชนิด โดยปรสิตจะเข้าเกาะบริเวณเหงือก ผิวหนังและครีบ ทำให้ปลาเกิดความระคายเคืองและมีบาดแผลตามมา ส่วนพวกที่เกาะบริเวณเหงือก จะทำให้มีผลต่อระบบการแลกเปลี่ยนแก๊ส ทำให้ปลาเกิดปัญหาขาดออกซิเจนได้ ปลาจะมีเมือกมาก ผิดปกติ เพื่อพยายามที่จะกำจัดปรสิตให้หลุดออกไป อาจสังเกตเห็นแผลตามลำตัว ปรสิตบางชนิด ก่อให้เกิดมีจุดขาว ๆ บนลำตัว สีของลำตัวปลาที่มีปรสิตเกาะอาจจะซีดหรือเข้มผิดปกติ ว่ายน้ำทุรน-ทุราย ทำให้ปลาระคายเคือง น้ำหนักลด ชนิดของปรสิตภายนอกที่สำคัญ ได้แก่

3.1.1 โปรโตซัว พยาธิในกลุ่มนี้จะทำลายลูกปลามากกว่าปลาขนาดใหญ่ ชนิดของ โปรโตซัวที่พบบ่อยได้แก่ *Trichodina* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius multifiliis*, *Epistylis* sp., *Scyphidia* sp., *Apiosoma* sp. และ *Ichthyobodo* sp. ซึ่งปรสิตเหล่านี้ส่วนใหญ่จะ เข้าเกาะบริเวณเหงือกและผิวหนัง โดยเฉพาะ *Trichodina* sp. หรือเห็บระฆัง เป็นปรสิตที่พบบ่อยใน ปลานิล ปรสิตนี้พบในเหงือกและผิวหนังปลานิล ปลาที่มีปรสิตเหล่านี้เกาะมาก ๆ จะไม่ค่อยกินอาหาร ว่ายน้ำกระวนกระวาย พลิกตัวไปมา มีการใช้ลำตัวสีและถูกับผนังบ่อเพื่อให้ปรสิตหลุดออก และอาจ ทำให้ลูกปลาตายในปริมาณมากได้ พบระบาดในบ่อที่มีการเลี้ยงปลาหนาแน่นสูงและมีสารอินทรีย์สูง

3.1.2 ปลิงใส ได้แก่ *Gyrodactylus* sp. และ *Dactylogyrus* sp. ปรสิตในกลุ่มนี้จะ เข้าเกาะบริเวณเหงือกทำให้เหงือกมีผิวหนังขึ้นหรือเกิดอาการบวมทำให้ปลาหายใจไม่สะดวก ซึ่งปลิงใสที่มักพบในปลานิล คือ *Cichlidogyrus* sp. ปลาที่มีปรสิตพวกนี้เกาะอาจจะมีสีตัวเข้มกว่า ปกติ กินอาหารน้อยลง หากมีเกาะบริเวณเหงือกในปริมาณมาก ทำให้เหงือกบวม อักเสบและการ แลกเปลี่ยนอากาศของปลาลดลง มีผลให้ปลาตายได้ (ชนกันต์, 2548)

3.1.3 ครัสเตเชียน ได้แก่ *Ergasilus* sp., *Lernaea* sp. และ *Lamproglana* sp. ปรสิตในกลุ่มนี้มีส่วนของอวัยวะที่มีปลายแหลมฝังเข้าไปในเนื้อปลาเพื่อช่วยในการยึดเกาะและ/หรือ กินเซลล์ หรือ เลือดของปลาเป็นอาหาร ซึ่งทำอันตรายต่อปลาอย่างรุนแรง ทำให้ปลาเกิดแผลขนาดใหญ่ และสูญเสียเลือด ถ้าพบมีปริมาณมากจะทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็ว ปรสิตกลุ่มนี้มักพบในปลา นิลที่เลี้ยงในกระชังเป็นส่วนใหญ่

### 3.2 โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตภายใน

ปรสิตกลุ่มนี้มักพบอยู่ในทางเดินอาหารและไม่ทำอันตรายต่อปลามากนัก ชนิดที่พบได้แก่

3.2.1 โปรโตซัว ได้แก่ *Trypanosoma* sp. ปรสิตชนิดนี้แม้จะตรวจพบในระบบเลือดของปลานิลแต่ยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่าทำให้ปลานิลป่วยหรือตาย (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2545)

3.2.2 เมตาซัว ได้แก่ *Digenetic trematode* หรือโรคพยาธิใบไม้, Cestodes หรือพยาธิตัวแบน, Nematodes หรือพยาธิตัวกลม และ Acanthocephalan หรือพยาธิหัวหนาม ปลาจะมีอาการผอม ไม่ยอมกินอาหารตามปกติ และเป็นโอกาสให้เชื้อโรคชนิดอื่นเข้ามาแทรกซ้อนได้ (กมลพร, 2539)

### 3.3 โรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย

ลักษณะการติดเชื้อทางแบคทีเรียจะคล้าย ๆ กัน จะมีการตกเลือด มีแผลตามลำตัว ครีบกร่อน มีน้ำในช่องท้อง ไม่กินอาหาร โรคของปลานิลที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียพบว่ามีรายงานเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคประมาณ 19 ชนิด (Al-Harbi and Uddin, 2004) แต่ที่พบว่ามี ความรุนแรงและเป็นสาเหตุหลักในการตายของปลานิลมี 3 ชนิดได้แก่

3.3.1 โรค Columnaris เกิดจากเชื้อ *Flavobacterium columnare* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนยาว โรคนี้มักพบในช่วงที่อากาศมีการเปลี่ยนแปลงกระทันหัน ในช่วงอากาศเย็นหรือร้อนกว่าปกติ ช่วงฝนตกหนัก และมักพบในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง รวมถึงการเกิดภาวะเครียดจากการขนส่ง การเคลื่อนย้าย ปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารที่ไม่ดี การมีปรสิตเกาะเยอะ ๆ ล้วนแต่เป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ ปลาที่ติดเชื้อจะว่ายน้ำอย่างเชื่องช้า ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน เกิดเนื้องอกบริเวณเหงือก และผิวหนังเป็นแผลเปื่อยบริเวณระหว่างหัวกับครีบหลังซึ่งในปัจจุบันพบว่าโรค Columnaris ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมาก (Schneck and Caslake 2006; Leal *et al.*, 2010)

3.3.2 โรค Motile Aeromonad Septicaemia (MAS) เกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ปลาชนิดที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะมีอาการว่ายน้ำเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน มีการตกเลือด เกิดบาดแผลเป็นหลุมลึก ท้องบวม ตับเหลือง มีการตกเลือด บริเวณลำไส้ (Abd-El-Rhman, 2009; Tellez-Banuelos *et al.*, 2010)

3.3.3 โรค Streptococcosis เกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการระบาดรุนแรงในน้ำร้อน สามารถทำให้ปลาตายจำนวนมากในเวลาอันสั้น ปลาชนิดที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้อาการภายนอกโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตเห็นได้คือ สีของลำตัวที่เข้มขึ้น ว่ายน้ำช้า ๆ ลอยนิ่ง ๆ ตามขอบบ่อ กินอาหารลดลง เกิดการตกเลือดตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเช่น แผ่นปิดเหงือก ฐานครีบว่ายน้ำ รอบปาก รอบรูทวาร ขอดหางบวม ท้องบวม มีเมือกปนเลือดไหลออกจากรูทวาร เกิดฝีบริเวณขากรรไกร ว่ายน้ำลอยหัวหรือควงส่วน มีอาการครีบกร่อนและฉีกขาด เกิดการอักเสบรอบ ๆ และภายในลูกตาทำให้เกิดอาการตาโปนและขุ่นขาว การเกิดโรคในปลานิล จะพบการแสดงอาการภายนอกของโรคดังกล่าวมาได้อย่างชัดเจน ดังเช่นในรายงานการศึกษาของ Al-Harbi (1994) และ Rodkhum *et al.* (2011)

#### 4. ระบบภูมิคุ้มกันของปลา (The fish immune system)

ระบบภูมิคุ้มกันมีหน้าที่คอยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เป็นอันตรายเข้ามาสู่ร่างกาย แม้กระนั้นเมื่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้สามารถบุกรุกเข้ามาในร่างกายได้ ระบบภูมิคุ้มกันจะพยายามทำลายและกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมโดยเร็วได้อย่างมีประสิทธิภาพ หน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ การป้องกัน (Defense) การรักษาสมดุลของร่างกาย (Homeostasis) และการเฝ้าระวัง (Surveillance) ในส่วนของระบบภูมิคุ้มกันของปลาถือว่ามีการศึกษาไม่มากนัก เมื่อเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงชนิดอื่น เนื่องจากปลามีความหลากหลายทางวิวัฒนาการสูงมากโดยพบว่าสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ได้แก่ ปลาที่ไม่มีขากรรไกร (Jawless fish) และกลุ่มที่มีขากรรไกร (Jaw fish) โดยในกลุ่มหลังนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ ปลากระดูกแข็ง (Teleost) และปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous fish) โดยเฉพาะปลากระดูกแข็งนั้นถือเป็นกลุ่มของปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกมากกว่าปลากลุ่มอื่น

ปลากระดูกแข็งจัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดแรกตามสายวิวัฒนาการที่มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่ามีลักษณะของระบบภูมิคุ้มกันคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Anderson, 1990) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมด ปลามีการตอบสนองทางด้าน

ภูมิคุ้มกันทั้งแบบ Cellular และ Humoral เนื่องจากปลาเมื่อวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า "Lymphoid organ" โดยมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (Non-specific หรือ Innate immune system) และแบบจำเพาะ (Specific หรือ Adaptive immune system) (Magor and Magor, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า ปลากระดูกแข็งและสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมยังมีความคล้ายคลึงกันของเซลล์และสารต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Tort *et al.*, 2003) เช่น Macrophages, B และ T lymphocytes, Major Histocompatibility Complex (MHC), Cluster of Differentiation (CD), Cytokines, Interferon pathway เป็นต้น (Levraud and Boudinot, 2009) โดยระบบภูมิคุ้มกันในปลากระดูกแข็งสามารถอธิบายโดยละเอียดได้ดังนี้

#### 4.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immune system)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นภูมิคุ้มกันของปลาที่โดยทั่วไปถือว่าเป็นด่านแรกในการป้องกันการติดเชื้อและถือว่าเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดใดชนิดหนึ่ง (Non-specific response) (Medzhitov and Janeway 2002) มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้เกิดโรค (Virulence bacteria) ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้เป็นภูมิคุ้มกันที่ถูกกำหนดมาตั้งแต่ Germ line ทำให้ร่างกายของปลาสร้างตัวรับ (Receptor) ที่สามารถจดจำกลุ่มโครงสร้างที่เรียกว่า "Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)" เช่น Polysaccharides, Peptidoglycan และ Lipopolysaccharide (LPS) เป็นต้น (Medzhitov and Janeway, 1997) ซึ่งจะเกิดการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างรวดเร็ว เนื่องจากภูมิคุ้มกันชนิดนี้สามารถทำงานได้ทันทีและยังพบว่ามีทั้งเซลล์และโมเลกุลของสารหลายชนิดเข้ามาทำงานร่วมกัน โดยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อยคือ

##### 4.1.1 กลไกการป้องกันโดยใช้โครงสร้างทางกายภาพ (Physical defenses)

กลไกนี้ถือเป็นด่านแรกที่ตัวปลาสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งได้แก่ เกล็ด (Scales) ผิวหนัง (Skin) และเมือก (Mucus) ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้ามาภายในร่างกาย (Aoki *et al.*, 2008) ที่ผิวหนังและเมือกยังมีโมเลกุลอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอยู่ด้วย เช่น Lectins, Lysozyme, Complement, Antibacterial peptide และ Immunoglobulin (Magnadottir, 2006) เพื่อจับและทำลายสิ่งแปลกปลอมในเบื้องต้น ซึ่งสามารถใช้ป้องกันได้ทั้ง

แบคทีเรีย ไวรัสและโปรโตซัว การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีนี้เป็นวิธีการง่าย ๆ ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้พบกับสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นครั้งแรก หรือเมื่อได้รับอีกในครั้งต่อไปก็อาจจะใช้วิธีการนี้ซ้ำอีกโดยไม่มีการจดจำ

#### 4.1.2 กลไกการป้องกันโดยอาศัยเซลล์ (Cellular defenses)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคสามารถผ่านการป้องกันด่านแรกหรือโครงสร้างทางกายภาพเข้ามาสู่ภายในตัวของปลาแล้ว ภายในร่างกายของปลาจะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อโรคเป็นด่านที่สอง ซึ่งสามารถฆ่าและทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้จำนวนหนึ่ง โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบนี้ได้แก่ Macrophages และ Polymorphonuclei (PMN) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ Neutrophil ในสัตว์ชั้นสูง (Ellis, 2001) เซลล์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่ม Phagocytes ทำหน้าที่โอบล้อมจับกิน (Engulfment) เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมอย่างไม่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยขบวนการ Phagocytosis เป็นผลให้เกิดการย่อยสลายเชื้อโรคเป็นหน่วยย่อยเล็ก ๆ และกำจัดทิ้งไป รวมทั้งทำหน้าที่เป็นเซลล์เตรียมแอนติเจน (Antigen presenting cell: APC) นำเสนอแอนติเจนที่ตกแต่งโครงสร้างแล้วให้กับเซลล์ในกลุ่ม Lymphocytes เพื่อให้เกิดการตอบสนองแบบจำเพาะอีกด้วย

ในปลาพบว่า มี Non-specific cells components คล้ายคลึงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือมี Phagocytic cells, Granulocyte (Neutrophils), Monocytes (Macrophages), และ Nonspecific cytotoxic cells (NCCs) หรือ NK cell equivalents (Plouffe *et al.*, 2005)

#### 4.1.3 กลไกการป้องกันโดยอาศัยสารน้ำหรือโปรตีนในเลือด (Humoral defenses)

ปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปจะมีการหลั่งสารโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่สำคัญออกมาภายในระบบหมุนเวียนเลือด สารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการทำลาย โดยการทำให้เซลล์หรืออนุภาคของเชื้อโรคแตกสลาย (Lysis) หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอย่างไม่จำเพาะเจาะจง ประกอบไปด้วยสารที่สำคัญหลายชนิด เช่น Anti-bacterial peptides, Proteases, Complements, Transferrins และ Antiviral myxovirus resistance-1 protein (Mx1) (ประพฤติดี, 2550; Aoki *et al.*, 2008) โดยสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

4.1.3.1 Agglutinin และ Precipitin ได้แก่ Lectin like, C-type lectin และ Pentraxines เป็นสารในกลุ่มของโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่สามารถเกิดการเชื่อมต่อกับโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมจึงเป็นผลให้เกิดปฏิกิริยารวมกลุ่ม (Agglutination activity) ของสิ่งแปลกปลอม และสามารถกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกจากร่างกายได้ โดยพบว่า Lectin ชนิด C-reactive protein (CRP) สามารถจดจำโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตแบบจำเพาะของเชื้อก่อโรคได้ ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบ Opsonization, phagocytosis และ Complement system และมีการตอบสนองต่อ Neutrophil-chemotactic อีกด้วย (Arason, 1996; Wilson *et al.*, 1999)

4.1.3.2 Lytic enzymes ได้แก่ Lysozymes, Chitinases, Cathepsins และ Complements ทำหน้าที่ย่อยทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย โดย Complement นั้น จัดได้ว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การกระตุ้นให้เกิดระบบ Complement มีผลต่อการกระตุ้นโปรตีนต่าง ๆ เช่นเอนไซม์ Lysozyme โดยจะทำปฏิกิริยากับ Peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์แตก (Cell lysis) ระบบ Complement สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Opsonization โดยอาศัยเซลล์ในกลุ่ม Phagocytes โดยระบบ Complement ในปลากระดูกแข็งมีความคล้ายคลึงกับในสัตว์ชั้นสูง ซึ่งมีทั้ง Classical และ Alternative pathway (Holland and Lambris, 2002)

4.1.3.3 Growth inhibitors ได้แก่ Mx protein และ Antiviral myxovirus resistance-1 protein (Mx1) ทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือไวรัส และ Transferrin ซึ่งจัดเป็น Iron binding protein โดย Iron เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่ง Transferrin มีความสามารถในการแย่งจับกับ Iron ได้มากกว่าจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และยังมีบทบาทไปกระตุ้นการตอบสนองของ Macrophage ในการหลั่ง Antimicrobial peptide (Oxygen independent) และ Oxidative burst (Oxygen dependent) ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงเป็นอย่างมาก (Mietzner and Morse, 1994; Stafford and Belosevic, 2003) นอกจากนี้ยังมีสารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากคือ Cytokines และ Chemokines เป็นสารที่หลั่งออกมาเพื่อควบคุมระบบภูมิคุ้มกันและเป็นสัญญาณโมเลกุล (Signaling molecule) เพื่อทำหน้าที่ในการเรียกเซลล์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันไปยังบริเวณเป้าหมาย การเกิดการอักเสบและการสร้างเม็ดเลือด รวมไปถึงการเชื่อมโยงเครือข่ายของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะกับแบบจำเพาะในการทำงานร่วมกันอีกด้วย (Secombes *et al.*, 1999)

## 4.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive or Acquired immune system)

ปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous fish) เช่น ฉลาม (Sharks) และปลากระเบน (Skates และ Rays) จัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรก ๆ ที่มีการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและมีการสร้างแอนติบอดี (Antibody) ที่มีประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค (Kumar and Hedges, 1998) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้สามารถพบได้ตั้งแต่ปลากระดูกอ่อนไปจนถึงสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม เช่น มนุษย์ แต่ยังไม่ปรากฏพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) เช่น แมลง ปู และ กุ้ง (Du Pasquier, 2001) ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะทำงานต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immunity) มีความสามารถในการจำแนกสิ่งแปลกปลอมและองค์ประกอบของตัวเอง (Differentiation of self from non-self) โดยระบบภูมิคุ้มกันนี้จะมีการตอบสนองเฉพาะต่อสิ่งแปลกปลอม (Non-self) เท่านั้น นอกจากนี้ระบบนี้ยังมีลักษณะที่สำคัญคือ มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ที่เคยเข้ามาในร่างกายหรือเชื้อที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันและมีการจดจำสิ่งที่มากระตุ้น (Memory) ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนชนิดเดียวกันเป็นครั้งที่สองหรือต่อ ๆ มา จะมีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว รุนแรง และมีปริมาณมากกว่าการตอบสนองที่เกิดขึ้นในครั้งแรก (Warr, 1997) การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ ดังนี้

### 4.2.1 การตอบสนองโดยผ่านสารน้ำหรือโปรตีนในเลือด (Humoral immune response; HIR)

การตอบสนองประเภทนี้เป็นการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันที่อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม Lymphocytes สองกลุ่มหลักคือ B และ T lymphocytes (B and T cells) และเซลล์ในกลุ่ม Antigen presenting cells (APCs) ทั้งหลาย ซึ่งได้แก่ B-lymphocytes เอง Dendritic cells และ Macrophages ในสัตว์ชั้นสูงเซลล์ที่ทำหน้าที่เหล่านี้โดยทั่วไปได้แก่ Monocytes (Macrophages), Interdigitating cells และ Dendritic cells มีบทบาทในการดักจับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมโดยขบวนการ Phagocytosis (Roitt *et al.*, 2001) แล้วทำการย่อยสลายและตกแต่งโครงสร้างของแอนติเจน โดยจะเลือกเอาเฉพาะส่วนที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า "Epitope หรือ Antigenic determinant" ไปแสดงไว้ที่ผิวเซลล์ จากกระบวนการทำงานของเซลล์เหล่านี้เป็นผลให้เกิดการสร้างแอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน เพื่อทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่ลึกลับเข้ามาในร่างกายอย่างจำเพาะเจาะจง บางครั้งการทำลายจุลินทรีย์อาจจะต้องอาศัย Complement เข้าร่วมด้วยกัน ซึ่งทั้งหมดนี้อยู่ในส่วนของน้ำเลือด

(พลาสมาหรือซีรัม) หรือของเหลวในร่างกาย ภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดจากการกระตุ้นโดยธรรมชาติ (Natural) หรือเกิดจากการกระตุ้นโดยจิตใจ (Artificial) จากการรายงานที่ผ่านมาพบว่าปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous fish) จัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรกที่ถูกค้นพบพัฒนาการของ Humoral adaptive immune system และ Memory response จากการพบ Memory response ของ IgM และ IgNAR (New antigen receptor) ต่อ Hen egg-white lysozyme (HEL) (Dooley and Flajnik, 2005)

เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อระบบภูมิคุ้มกันประเภทนี้คือ B cell ซึ่ง B cell หนึ่งชนิดสามารถสร้างแอนติบอดีในการจดจำต่อแอนติเจนหรือ Epitope เพียงชนิดเดียวเท่านั้น โดยในช่วงแรกนั้น B cell จะอยู่ในรูปของ Immature (Naïve) B cell โดยมี B cell receptor (BCR) ที่อยู่ในรูปของ Immunoglobulin M membrane-bound form ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ เมื่อ Naïve B cell ถูกกระตุ้นโดยการจดจำกับ Epitope ของเชื้อโรคหรือสารพิษอย่างจำเพาะเจาะจงแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็น Activated B cell ซึ่ง Naïve B cell จะมีการนำแอนติเจนเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ Receptor-mediated endocytosis และส่งแอนติเจนนั้นเข้าสู่กระบวนการตัดย่อย (Exogenous pathway) ให้เป็น Epitope ที่มีความเหมาะสมพร้อมกับสร้างโปรตีน Major histocompatibility complex class II (MHC II) นำเสนอ Epitope ดังกล่าวไว้ที่ผิวเซลล์ เพื่อเป็นสื่อกลางให้ Immature (Naïve) helper T cells มาจดจำ Epitope โดยอาศัย T cell receptor (TCR) หลังจากนั้น Naïve helper T cell จะเกิดการเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็น Activated helper T cell ซึ่งจะมีการหลั่งสารสำคัญกลุ่ม Cytokines หลายชนิดออกมาเช่น Interleukin-2 เพื่อทำให้ Activated B cells มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Proliferation) และมีการจำแนกตัวเอง (Differentiation) เพื่อกำหนดหน้าที่ในการสร้างชนิดของอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะ โดยจะมีการปรับ Isotype ของแอนติบอดี (Class switching) ตามแต่สัญญาณคำสั่งของสารกลุ่ม Cytokines รวมทั้งพัฒนาตัวเองไปเป็น Plasma B cell ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่อยู่ในรูป Secreted form ออกไปสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อตอบสนองและจดจำต่อแอนติเจนชนิดนั้น ๆ ในกระแสเลือดหรืออวัยวะอื่นที่มีแอนติเจนชนิดนั้นอยู่ (Pelletier and Williams, 2009) นอกจากนี้ยังมีลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งคือ Immunological memory โดย B cell บางส่วนพัฒนาไปเป็น Memory B cell เพื่อจดจำต่อแอนติเจนชนิดนั้น ๆ โดยเซลล์ในกลุ่มนี้จะไม่หลั่งแอนติบอดีในรอบแรกของการถูกกระตุ้น เราเรียกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนในครั้งแรกนี้ว่า "Primary immune response" ผลของการตอบสนองผ่านทางแอนติบอดีในระยะนี้จะมีไม่มากนักและการตอบสนองค่อนข้างช้าใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ เมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนชนิดเดิมในครั้งถัดไป Memory B cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นจะเข้ามาทำ

หน้าที่ เป็นผลให้เกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วและรุนแรงมากกว่าครั้งแรก เราเรียกรับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนในครั้งที่สองนี้ว่า "Secondary immune response" ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงแอนติบอดีที่ถูกผลิตขึ้นในการตอบสนองครั้งแรกส่วนมากจะเป็น Immunoglobulin M (IgM) และการตอบสนองในครั้งถัดมาจะมีการผลิต Immunoglobulin G (IgG) เป็นหลัก (Roitt *et al.*, 2001) ส่วนในปลากระดูกแข็งนั้นการตอบสนองทั้งสองครั้งนี้ แอนติบอดีที่มีการผลิตออกมาเป็นส่วนมากในการดักจับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม คือ IgM (Morrison and Nowak, 2002)

#### 4.2.2 การตอบสนองโดยผ่านเซลล์ (Cell-mediated immune response; CMIR)

การตอบสนองประเภทนี้เป็นการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก T lymphocytes ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยตรงหรือร่วมกับระบบ Humoral immune response (HIR) การตอบสนองประเภทนี้เป็นภูมิคุ้มกันที่สำคัญเป็นอย่างมากของร่างกายในการทำลายจุลชีพที่ก่อโรครภายในเซลล์ (Intracellular microorganisms) เช่น *Chlamydia suis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Rickettsia*, *Shigella* และ *Listeria* เป็นต้น (Biswasa *et al.*, 2008) รวมทั้งการติดเชื้อไวรัสและการเกิดเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง ซึ่งร่างกายไม่สามารถทำลายเซลล์เหล่านี้ผ่านทางการทำงานของแอนติบอดีได้ โดยในกรณีที่เซลล์มีการติดเชื้อโรคหรือเซลล์เหล่านี้ภายในไซโทพลาซึม (Cytoplasm) ของเซลล์ จะมีการตัดและตกแต่งอนุภาคของเชื้อโรคหรือเซลล์เหล่านี้ให้อยู่ในรูป Epitope ที่เหมาะสมแล้วจะมีการส่ง Epitope นั้นผ่านไปให้โปรตีนที่เรียกว่า "Major histocompatibility complex class I (MHC I)" ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่อยู่บนผิวของเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกชนิด โดยจะมี T-cell receptors (TCRs) ที่จำเพาะของ Cytotoxic T killer cells มาตรวจสอบ Epitope ของสิ่งแปลกปลอมที่แสดงอยู่บนผิวเซลล์นั้น เป็นผลให้ Cytotoxic T killer cells เกิดการจดจำอย่างจำเพาะและหลั่งสารพิษไปยังเซลล์เหล่านั้น เป็นผลทำให้เซลล์เหล่านั้นถูกทำลายแบบ Self-killing (Apoptosis) เป็นผลต่อเนื้อให้เซลล์ที่ผิดปกติรวมถึงเซลล์ที่มีการติดเชื้อไม่สามารถเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายไปยังเซลล์ที่อยู่ในบริเวณข้างเคียงได้อีก

จากข้อมูลในปัจจุบันถึงแม้ว่าจะยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ชัดเจนว่าปลากระดูกแข็งจะมีประชากร (Population) ของเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น Cytotoxic T killer cells เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง แต่จากการศึกษาในระดับอนุวิทยาพบว่าสามารถพบการแสดงออกของโมเลกุลและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับโมเลกุลที่สร้างจากเซลล์ที่ทำหน้าที่ในส่วน of CMIR เช่น T-cell

receptors, CD<sub>4</sub> และ CD<sub>8</sub> เป็นต้น นอกจากนี้ จากการทำให้ Graft-versus-host reaction (GVHR) ในปลากระดูกอ่อน เช่น ฉลาม (Ototake *et al.*, 2000) และปลากระดูกแข็ง เช่น Gunbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*) (Nakanishi and Ototake, 1999) หรือปลาในกลุ่ม Salmonid และ Cyprinid fish และ Delayed (type IV) hypersensitivity reactions (DTH) ซึ่งรู้กันดีว่าเป็นการตอบสนองอย่างหนึ่งของ CMIR ก็สามารถพบในปลาหลายชนิดรวมทั้งปลากระดูกอ่อน ปลาไม่มีกระดูกขากรรไกร (Lamprey), และปลากระดูกแข็ง (Manning and Nakanishi, 1996) เหล่านี้ล้วนเป็นเครื่องยืนยันและแสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันในปลาจะมีองค์ประกอบของการตอบสนองแบบ CMIR เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง

## 5. อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin or Antibody)

อิมมูโนโกลบูลินหรือแอนติบอดีเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในกระแสเลือด (Humoral immune system) ของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีขากรรไกรทั้งหมด ตั้งแต่ปลาฉลามจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Flajnik, 2002; Flajnik and Du Pasquier, 2004) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันทางด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงที่พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Cheng *et al.*, 2006) แต่ไม่พบในปลาที่ไม่มีขากรรไกร (Agnathan fish) (Du Pasquier, 1993; Tian *et al.*, 2009) ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด (Heterogenous) ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อแอนติเจนโดยแอนติบอดีจะมีปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เข้ามากระตุ้นเท่านั้น โดยทั่วไปในสภาพปกติร่างกายจะไม่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ของร่างกาย (Self-antigen) แอนติบอดีมีลักษณะพิเศษที่สำคัญ 2 ประการคือ มีความสามารถในการจดจำแล้วรวมกับแอนติเจนที่จำเพาะต่อมันได้ (Recognition function) และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนแอนติบอดี (Antigen-antibody complex) สามารถทำให้เกิดผลต่าง ๆ ตามมา เช่น ทำให้เกิดการกระตุ้นการรวมกันโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า "Complement" แล้วทำให้เซลล์เชื้อโรคแตกสลาย (Lysis) หรือกระตุ้นโมเลกุล Mast cell ให้เกิดการหลั่งของ Histamine ออกมาเป็นการส่งเสริมกระบวนการอักเสบ (Enhanced inflammation) เป็นต้น แอนติบอดีถูกสร้างขึ้นโดย Plasma cell เป็นส่วนใหญ่ แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลินเหล่านี้จะเป็นสารพวกไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่ประกอบด้วย Polypeptides 2 แบบ คือ Heavy chain และ Light chain และมีคาร์โบไฮเดรตเกาะอยู่บนโพลีเปปไทด์ ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับแอนติเจนเพราะคาร์โบไฮเดรตไม่ได้อยู่ตรงส่วนที่แอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่เรียกว่า "Antigenic binding site หรือ Fab" ซึ่งมีความหลากหลายของกรดอะมิโนมาก ส่วนอีกบริเวณหนึ่งจะเป็นส่วนที่มีความคงตัวซึ่งจะเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของ

แอนติบอดีแต่ละชนิด (Effector function) และเป็นส่วนที่เรียกว่า "Crystallizable fragment หรือ Fc" (Roitt *et al.*, 2001)

อิมมูโนโกลบูลินหรือแอนติบอดีมีหน้าที่หลัก ๆ อยู่ด้วยกัน 3 ประการ คือ ประการแรก การลดความเป็นพิษ ของเชื้อโรคและสารพิษลง (Neutralization) ซึ่งเกิดจากการจับกันของ แอนติบอดีและแอนติเจนเป็นผลให้เกิดการลดความเป็นพิษของสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย ประการที่สอง คือ การเกิดขบวนการ Opsonization ของ Phagocytosis ในการจับกินเชื้อโรคและ สิ่งแปลกปลอม ซึ่งเกิดจากการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกัน (Antigen-Antibody complex) โดยใน ส่วน Fc ของแอนติบอดีนั้นสามารถถูกจดจำโดย Fc receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม Phagocytes เป็นผลให้เกิดการกระตุ้นการส่งเสริมให้ Phagocytes จับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น ประการสุดท้าย คือ การเกิด Complement activation แบบ Classical pathway โดยการเกิด Antigen-Antibody complex หรือ Immune complex ซึ่งไปกระตุ้นโปรตีน Complement ตั้งแต่ C1-C9 เป็นผลให้เกิดการแตกสลายของเซลล์จุลชีพ ในกระบวนการนี้จะมี C3b และ C4b ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Opsonin ทำให้เกิดกระบวนการ Opsonization ของ Phagocytes โดยเซลล์ Phagocytes จะมีตัวรับต่อ C3b และ C4b ซึ่งจับอยู่กับ immune complex ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการ Phagocytosis ได้ดียิ่งขึ้น รวมถึงการ กระตุ้นกระบวนการอักเสบ (Inflammation) โดยมี C3a, C4a และ C5a ที่มีคุณสมบัติเป็น Anaphylatoxin กระตุ้น Mast cell และ Basophil ให้หลั่งสาร Vasoactive amines ออกมาและ ชักนำให้มีการปล่อย Lysosomal enzyme จาก Neutrophil อีกด้วย (Walport, 2001; Holland and Lambris, 2002)

### 5.1 โครงสร้าง ชนิดและคุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลิน

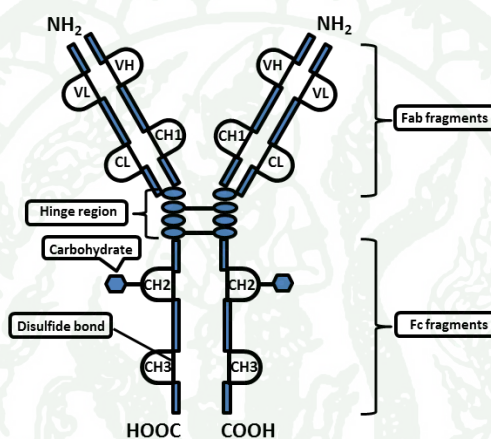
อิมมูโนโกลบูลินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่นในมนุษย์และหนู สามารถแบ่งออกเป็น 5 classes (Isotypes) จำแนกตามชนิดของ Constant domain ของ Heavy chain ได้แก่ IgM, IgD, IgG, IgE และ IgA โมเลกุล IgM มียีน Constant domain เป็นชนิด  $\mu$  โมเลกุล IgD มียีน Constant domain เป็นชนิด  $\delta$  โมเลกุล IgG มียีน Constant domain เป็นชนิด  $\gamma$  ซึ่งมี 4 subclasses คือ  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  และ  $\gamma_4$  โมเลกุล IgE มียีน Constant domain เป็นชนิด  $\epsilon$  และ โมเลกุล IgA มียีน Constant domain เป็นชนิด  $\alpha$  ซึ่งมี 2 subclasses คือ  $\alpha_1$  และ  $\alpha_2$  (Abbas *et al.*, 2007) ซึ่งอิมมูโนโกลบูลินแต่ละคลาสมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติบางประการของอิมมูโนโกลบูลิน Class ต่าง ๆ

Properties	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
Percent of total	5-10	1	75-85	0.01	10-15
Serum concentration (mg/100 ml)	125±45	3	1,275±280	0.03	225±55
Molecular weight value	900,000	183,000	150,000	200,000	155,000- 350,000
Sedimentation coefficient (S)	7, 10, 13, 15, 17	6.5	7	-	19
Carbohydrate (%)	10	2.8	2.5	10.7	10
Half-life (day)	10	2.8	25	2.3	7
Number of subclass	2	1	4	1	2
Immunologic valency	10	1	2	2	2
Bind complement	+	-	+	-	-
Appearance after immunization	Earliest	-	Latest	-	Immediate
Present in secretion	-	-	+	+	+
Precipitation	+	-	+	-	±
Agglutination	+	-	+	-	-
Opsonization	+	-	+	-	-
Virus neutralization	+	-	+	-	-
Hemolysis	+	-	+	-	-
Skin fixation	-	-	-	+	-
Site of biosynthesis	Much in spleen, lymphoid tissues	Spleen lymph node	All lymphoid tissues	Predomi- nantly in submucosa	Spleen Lymphoid tissues, submucosa

ที่มา: ดัดแปลงจาก Davis *et al.* (1973)

อิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วย Polypeptide 4 สาย คือ Heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกันแต่ละสายมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 - 77,000 ดาลตัน เชื่อมต่อกัน ซึ่งในแต่ละ Class หรือ Subclass จะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และประกอบด้วย Light (L) chain 2 สายที่เหมือนกันแต่ละสายมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน ซึ่ง Polypeptide ของ H และ L แต่ละสายจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ Disulfide bond โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลิน บางชนิดจะมี Hinge region อยู่ตรงกลาง H chain เพื่อการเคลื่อนไหวของส่วนที่จับกับแอนติเจน มี Variable region เพื่อใช้จับกับแอนติเจนและมี Constant region เพื่อคงรูปร่างและเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละชนิด (Fahey, 1965; Roitt *et al.*, 2001) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

Light (L) chain ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกเป็นสองชนิด เรียกว่า "Kappa ( $\kappa$ ) และ Lambda ( $\lambda$ )" โดยปกติสัดส่วนของ  $\kappa:\lambda$  จะมีปริมาณ 3:2 ยกเว้นของ IgD ซึ่งมีปริมาณ  $\lambda$  chain มากกว่า  $\kappa$  chain และในโมเลกุลเดียวกันจะต้องประกอบด้วย 2 โมเลกุลของ  $\kappa$  หรือ  $\lambda$  ใดอย่างหนึ่ง ไม่มีชนิดใดที่มี 2 อย่างรวมกัน โดยทั่วไปโมเลกุล L chain ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 214 Residues ทั้งสอง Isotypes นี้จะปรากฏอยู่ในอิมมูโนโกลบูลินแต่ละโมเลกุลซึ่งมี L chain และ

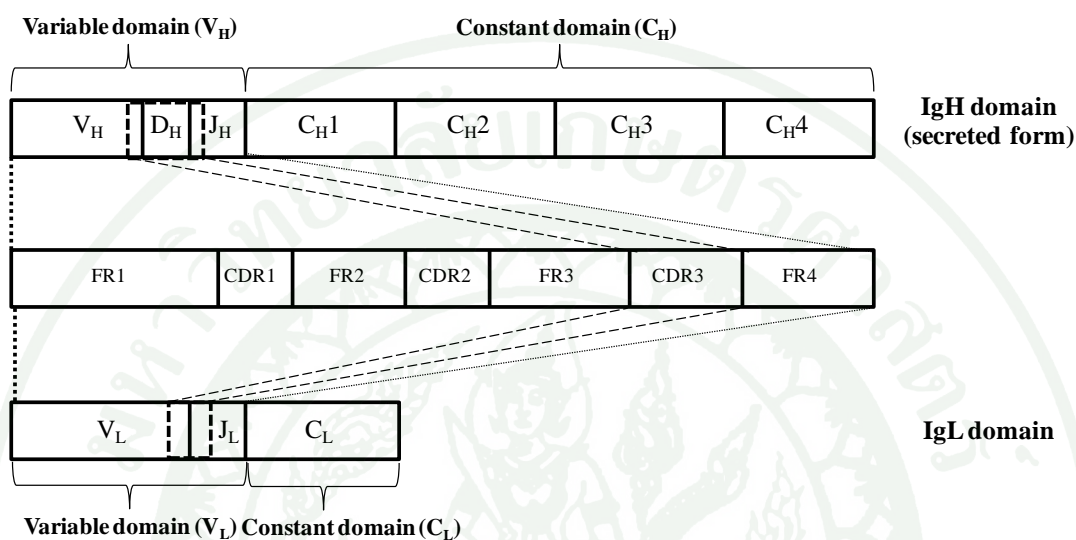
H chain เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่ง Hilschmann and Craig (1965) พบว่า L chain มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน ประกอบด้วยส่วนประกอบ 2 ส่วนที่แตกต่างกัน คือ ครึ่งหนึ่งของ L chain ปลายหนึ่งเป็นด้าน COOH (C-terminal) มีกรดอะมิโนประมาณ 107-111 Residues เรียกว่า " $C_L$  (Constant: Light chain)" ในขณะที่ปลายอีกด้านหนึ่งเป็นด้าน  $NH_2$  (N-terminal) มีลำดับกรดอะมิโนที่หลากหลายเป็นที่รู้จักกันในชื่อ " $V_L$  (Variable: Light chain)" ซึ่งทุก ๆ L chain มีส่วนของ Variable และ Constant เพียงหนึ่งส่วนเท่านั้น

อิมมูโนโกลบูลินแต่ละสายจะมี H chain สองเส้นที่แสดงลักษณะจำเพาะของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละชนิด H chain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 450 Residues เรียงตัวกันเป็น Polypeptide chain มีด้านปลาย  $\text{NH}_2$  ที่มีความหลากหลายมากเรียก "Variable region ( $V_H$ )" ประกอบด้วยกรดอะมิโน 107-115 Residues ส่วนที่เหลือ 310-330 Residues อยู่ทางปลายด้าน Carboxyl terminal เป็นกรดอะมิโนที่ค่อนข้างคงที่เรียกว่า "H chain constant region ( $C_H$ )" ซึ่งแบ่งออกเป็น  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  และ  $C_{H4}$  domain ในบริเวณ N-terminal ของทั้ง L chain และ H chain มีกรดอะมิโนที่ไม่แน่นอนแปรเปลี่ยนไปอยู่เสมอจะเป็นส่วนของอิมมูโนโกลบูลินหรือแอนติบอดีที่มีหน้าที่จับกับแอนติเจน (Antigen binding site) จะเห็นว่าแต่ละโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินที่มีโครงสร้างพื้นฐานดังกล่าวนี้จะมีตำแหน่ง Antigen binding site อยู่ด้วยกัน 2 ตำแหน่ง (ภาพที่ 1)

Antigen binding site คือส่วนของแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจน ประกอบด้วยส่วน Variable region ของ H และ L chain ( $V_H$  และ  $V_L$ ) ซึ่งเข้ามาใกล้กันพอเหมาะ การเรียงตัวของกรดอะมิโนบน  $V_H$  และ  $V_L$  นี้ขึ้นกับ Immunological specificity ของแอนติบอดีนั้น ๆ ตำแหน่งบน Variable region ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนได้มากที่สุด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ Antigen binding site เรียก "Hypervariable region" โดยมีความหลากหลายของกรดอะมิโนบน Variable region จำนวนมากกว่า  $2.58 \times 10^{19}$  รูปแบบ (Berger, 2004) และทางด้าน Carboxyl end ของ H chain 2 สาย เป็นส่วนที่ไม่มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนเรียกว่า "Fc fragment (Fc)" ซึ่งจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณ 2.5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลายทางด้าน N terminal ของ L chain และ H chain มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้จึงเรียกว่า "Fab fragment (Fab)" ในส่วน Domain ของอิมมูโนโกลบูลินนั้นไม่ได้อยู่เป็นเส้นตรงแต่จะงอพับบิดเป็นห่วงรูปสามมิติ ซึ่งเกิดจาก Disulfide bond และแรงอื่น ๆ ซึ่งแต่ละส่วนบน Peptide chain ที่งอพับเหล่านี้เรียกว่า "Domain" การตั้งชื่อ Domain บน H chain นั้นจะตั้งตามความคงที่หรือเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจากปลาย  $\text{NH}_2$  เป็น  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  และ  $C_{H4}$  domain (Abel *et al.*, 1968; Padlan, 1994)

Variable domain เป็นโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินหรือแอนติบอดีที่ใช้ในการจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะเจาะจง ภายในโครงสร้างของ Variable domain ประกอบด้วย Complementarity determining regions (CDR 1-3) และ Framework (FR 1-4) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่มาก ซึ่งความหลากหลายของ Variable domain เกิดการสร้างขึ้นในระหว่างขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของ B cell (B cell differentiation) ไปเป็น Plasma B-cell (Pilstrom and Bengten, 1996) อิมมูโนโกลบูลินสาย Heavy chain จะมี CDR1 และ CDR2

อยู่ในส่วนของ  $V_H$  segment และ CDR3 เป็นองค์ประกอบที่สร้างขึ้นโดยการรวมตัวกันของ  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  segments ขณะที่อิมมูโนโกลบูลินสาย Light chain จะมี CDR1-3 อยู่ในส่วนของ  $V_L$  segment (ภาพที่ 2)



**ภาพที่ 2** การจัดเรียงตัวของ Variable domain และ Constant domain ในอิมมูโนโกลบูลินสาย Heavy chain และ Light chain

การจัดกลุ่มของ  $V_H$  อาศัยหลักความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องมีค่ามากกว่า 80% จึงจะจัดว่า  $V_H$  นั้น ๆ เป็นกลุ่ม (Family) เดียวกัน  $V_H$  ต่างกลุ่มกันจะมีค่าความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 70% (Brodeur and Riblet, 1984) มีผู้ทำการศึกษา  $V_H$  gene segments ของมนุษย์และหนูมากกว่า 100 segments ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของ  $V_H$  ได้ 7 และ 14 กลุ่มตามลำดับ (Willems van Dijk *et al.*, 1993; Matsuda *et al.*, 1993; Tutter *et al.*, 1991) ในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Matsunaga *et al.*, 1990; Andersson and Matsunaga, 1995) และปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Warr *et al.*, 1991; Ghaffari and Lobb, 1991) พบว่ามี  $V_H$  gene segments มากกว่า 100 segments เช่นกัน ซึ่งปลากระดุกแข็งเหล่านี้สามารถจัดกลุ่มของ  $V_H$  family ได้ 11 และ 13 กลุ่มตามลำดับ (Roman *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2003)  $V_H$  family ในปลา Salmon (*Salmo salar*) พบ 9 กลุ่ม (Solem *et al.*, 2001) ปลา Zebrafish (*Danio rerio*) พบ 7 กลุ่ม (Danilova *et al.*, 2005) ปลากระดุกแข็งโบราณ (Chondrosteian) เช่น ปลาสเตอร์เจียน-ไซบีเรีย (*Acipenser baerii*) พบ 3 กลุ่ม (Lundqvist *et al.*, 1998) นอกจากนี้ ปลา Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) (Bengtén *et al.*, 1994) ปลา Goldfish (*Carassius auratus*) (Wilson *et al.*, 1991)

ปลา Ladyfish (*Elops saurus*) (Amemiya and Litman, 1990) และปลา Pufferfish (*Takifugu rubripes*) (Saha *et al.*, 2005) พบ  $V_H$  family ได้ 3, 3, 2 และ 2 กลุ่ม ตามลำดับ

## 5.2 กลไกการสร้างความหลากหลายของอิมมูโนโกลบูลินในปลา

เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสำคัญในการผลิตแอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลินเพื่อทำหน้าที่ในการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง คือ B Lymphocytes (B cells) ซึ่งถูกสร้างจาก Hemopoietic tissues ในเนื้อเยื่อไตส่วนหน้า (Head kidney) ไตส่วนหลัง (Trunk kidney) ม้าม (Spleen) และตับ (Liver) กลไกการสร้างความหลากหลายของอิมมูโนโกลบูลินในปลาเกิดขึ้นที่ไตส่วนหน้า (Bone marrow equivalent) เริ่มต้นจากการพัฒนาตัวของ B cell precursor, Pro-B cell, Pre-B cell, Immature B cell และ Mature B cell หลังจากนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวนและจำแนกตัวเอง (Proliferation and Differentiation) ต่อไปให้กลายเป็น Plasma B cell และ Memory B cell เพื่อทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีและจดจำ Epitope ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมนั้น โดยในระยะพัฒนาตัวของ B cell นี้จะประกอบไปด้วยกลไกการสร้างความหลากหลายของแอนติบอดีดังต่อไปนี้

5.2.1 ระยะ B cell precursor ซึ่งภายในมี Germline DNA ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้าง  $V_H$ ,  $D$ ,  $J_H$  และ  $C_H$  ของอิมมูโนโกลบูลินทั้งสาย H และ L โดยทั่วไปแล้วการจัดเรียงตัวของยีนอิมมูโนโกลบูลินมี 2 แบบ ได้แก่ การจัดเรียงตัวแบบ Multiple cluster type และการจัดเรียงตัวแบบ Translocon type ซึ่งการจัดเรียงตัวแบบ Multiple cluster type จะมีการจัดเรียงตัวของยีน  $(V-D-J-C)_n$  เรียงต่อกันไปกันไปเป็นกลุ่ม การจัดเรียงตัวของยีนแบบนี้พบได้ในยีน Immunoglobulin ทั้ง Heavy chain และ Light chain ของปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous fish) เช่น ฉลาม (Sharks) และกระเบน (Skates, Rays) สาย Heavy chain เป็นแบบ  $(V_H-D-J_H-C_H)_n$  และสาย Light chain เป็นแบบ  $(V_L-J_L-C_L)_n$  เรียงต่อกันไปกันไปเป็นกลุ่ม โดยจะเกิด Duplication ของยีนเหล่านี้เกิดขึ้นหลายครั้งใน Genome (Hinds and Litman, 1986; Hohman *et al.*, 1992; Hohman *et al.*, 1993; Kokubu *et al.*, 1988a; Kokubu *et al.*, 1988b; Rast *et al.*, 1994; Shambloott and Litman, 1989a; Shambloott and Litman, 1989b) ซึ่งสาย Heavy chain ยีน  $C_H$  เพียงยีนเดียวสามารถรวมกับแต่ละกลุ่มของ V, D และ J โดยประกอบด้วยกลุ่มของ Variable domain ( $V_H$ ) - Diversity domain ( $D_1$ ) - ( $D_2$ ) - Joining domain ( $J_H$ ) - Constant domain ( $C_H$ ) ซึ่ง D domains ประกอบด้วย D elements ตั้งแต่ 1 ถึง 3 elements และมี  $C_H$  region เพียงยีนเดียวเท่านั้น (Bengtén *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับ อิมมูโนโกลบูลินสาย Light chain ใน

ปลาคระดูกแข็งมีการจัดเรียงตัวแบบ Multiple cluster ( $V_L$ - $J_L$ - $C_L$ ) ด้วยเช่นกัน (Bengtén, 1994; Daggfeldt *et al.*, 1993; Ghaffari and Lobb, 1991) ส่วนการจัดเรียงตัวของยีนแบบ Translocon type เป็นการจัดเรียงตัวของยีนในรูปแบบที่คงที่ ( $V_{H(n)}$ - $D_{(n)}$ - $J_{H(n)}$ - $C_H$ ) พบได้ในโครงสร้างของยีน อิมมูโนโกลบูลินสาย Heavy chain ของปลาคระดูกแข็งไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่นเดียวกับ โครงสร้างของยีนอิมมูโนโกลบูลินสาย Light chain ( $V_{L(n)}$ - $J_{L(n)}$ - $C_L$ ) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Stavnezer and Amemiya, 2004)

5.2.2 ระยะเวลา Pro-B cell ในระยะนี้จะมีโปรตีน Ig $\alpha$  และ Ig $\beta$  ซึ่งเป็น Signaling protein ที่จะมาเกาะติดอยู่กับ Membrane IgM (mIgM) ที่สร้างจากระยะ Immature B cell ซึ่ง โปรตีนทั้งสามชนิดนี้จะทำหน้าที่เป็น B cell antigen receptor (BCR) (Dylke *et al.*, 2007) ใน ระยะนี้จะเกิดกระบวนการสร้างความหลากหลายของ Variable segments โดยจะมีเอนไซม์สำคัญ คือ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) และ Recombination-Activating Gene (RAG) ที่มีการแสดงออกมาจากยีน RAG ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ (Rearrangement) ของยีน  $V_H$ , D และ  $J_H$  ซึ่งกลไกเหล่านี้ได้แก่ Combinatorial diversity, Junctional diversity และ Gene conversion โดย Combinatorial diversity คือการเรียงต่อกันของยีน  $V_H$ , D และ  $J_H$  แบบ สุ่ม Junctional diversity คือ การเติมหรือลบนิวคลีโอไทด์ที่ปลายของยีน  $V_H$ , D และ  $J_H$  ด้วย Palindromic (P) และ Non-template encoded (N) nucleotides โดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ TdT (Lieber, 1992) และ Gene conversion เกิดขึ้นในกระต่าย วัว หมู ม้าและไก่ ซึ่ง พบว่ามี Pseudo V gene จำนวนมากอยู่ทางด้านหน้าของ Functional V gene ทั้งสาย H และ L โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นหลังจาก VDJ rearrangement (Arakawa and Buerstedde, 2004)

5.2.3 ระยะเวลา Pre-B cell ในระยะนี้จะมีเอนไซม์ RAG-1 และ RAG-2 เข้ามาทำหน้าที่ เป็น Transcription factor ของ Membrane Ig Heavy Chain ( $\mu$ ) แต่ยังไม่มีการแสดงออกมาเป็น โปรตีนและระยะนี้จะมีการเกิด  $V_L$ - $J_L$  Rearrangement และการจับคู่กันของ H และ L Chain (Ehlich *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Jankovic *et al.*, 2004) ในปลา Zebrafish, Cod, Trout, Haddock, Clearnose skate และ Bullshark พบว่า RAG-1 และ RAG-2 เข้ามามีบทบาทในระยะ การพัฒนาตัวของ B cell ใน Lymphoid organ เช่นเดียวกับในสัตว์ชั้นสูง เช่น คนและไก่ (Willett *et al.*, 1997; Miracle *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2004; Miyar *et al.*, 2007)

5.2.4 ระยะเวลา Immature B cell ในระยะนี้ไม่พบการแสดงออกของแอนไทม์ RAG-1 และ RAG-2 (Nagaoka *et al.*, 2000) อิมมูโนโกลบูลิน Membrane IgM (mIgM) มีการแสดงออกมาเป็นโปรตีนและไปอยู่บนผิวของ B cell และมีโปรตีน  $Ig\alpha$  และ  $Ig\beta$  ทำงานร่วมกันเป็น B cell antigen receptor (BCR) (Dylke *et al.*, 2007) หลังจากระยะนี้ Immature B cell จะถูกส่งออกไปตามกระแสเลือดไหลเวียนทั่วร่างกายเพื่อรอการกระตุ้นจากเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมแล้วเปลี่ยนตัวเองไปเป็น Mature B cell ต่อไป

5.2.5 ระยะเวลา Mature B cell ในระยะนี้เมื่อ Naïve B cell ที่มี mIgM และ mIgD อยู่บนผิวเซลล์ ล่องลอยอยู่ในกระแสเลือด เมื่อเจอกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเป็นครั้งแรกจะเกิดกระบวนการ Somatic hypermutation เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ Variable region ให้มีความจำเพาะ (Affinity) กับ Antigen (Ag) ชนิดนั้น ๆ ให้มากขึ้นและจับกันได้ดีขึ้น (Hombach *et al.*, 1990; Reth *et al.*, 1991; Dylke *et al.*, 2007) จากนั้นจะมีการ Proliferation และ Differentiation ตัวเองให้เป็น Plasma B cell และ Memory B cell โดยอาศัยการทำงานของ IL-2 เพื่อทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Ag นั้นและจดจำ Ag นั้นเมื่อ B cell เหล่านี้เจอ Ag ชนิดนี้อีกครั้งก็จะเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วและรุนแรงมากขึ้นนั่นเอง (Ozaki *et al.*, 2004)

### 5.3 ความหลากหลายของอิมมูโนโกลบูลินในปลา

ปลาจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลัง สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ปลาที่ไม่มีขากรรไกร (Agnathans) เช่น Lampreys และ hagfish ปลากระดูกอ่อน (Chondrichthyes) เช่น ฉลามและกระเบน กลุ่มสุดท้ายคือ ปลากระดูกแข็ง (Osteichthyes) ปลาจัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรกที่มีวิวัฒนาการในการสร้างอิมมูโนโกลบูลินออกมาตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยอวัยวะที่เรียกว่า "Lymphoid organs" ในการผลิตเซลล์เม็ดเลือด เช่นเดียวกับไขกระดูก (Bone marrow) ในสัตว์ชั้นสูง โดยอวัยวะในระบบน้ำเหลืองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบไปด้วย Bone marrow, Lymph nodes และ Peyer's patches ส่วนอวัยวะในระบบน้ำเหลืองของปลาประกอบไปด้วย Thymus, Kidney, Spleen, Gut-associated lymphoid tissue และ Mucosa-associated lymphoid tissue ซึ่งอวัยวะที่มีความสำคัญต่อการผลิตเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลาเป็นอย่างมาก คือ ไตส่วนหน้า (Head kidney) และม้าม (Spleen) เซลล์ที่ผลิตได้จากอวัยวะน้ำเหลืองเหล่านี้เพื่อทำหน้าที่ในการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immune response) และแบบจำเพาะเจาะจง

(Specific immune response) ได้แก่ Lymphocytes, monocytes, macrophages, granulocytes และ thrombocytes (Manning and Nakanishi, 1996; Morrison and Nowak, 2002)

จากข้อมูลในปัจจุบันพบว่า อิมมูโนโกลบูลินในปลาที่ไม่มีขากระดูก (Agnatha) พบได้เป็นจำนวนน้อยและยังจำแนกลักษณะได้อย่างไม่ชัดเจน เช่น ในปลา Hagfish พบว่ามีอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgM (Raison *et al.*, 1978) ส่วนในสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มปลาที่มีขากระดูก (Jawed fish) เช่น ปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous) และปลากระดูกแข็ง (Teleost) พบว่ามีการผลิตอิมมูโนโกลบูลินเช่นกัน (Flajnik, 2002) ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าปลากระดูกแข็ง (Teleost) สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้เพียง IgM (Bengtzen *et al.*, 1992; Harding *et al.*, 1990; Hordvik *et al.*, 1992; Nakao *et al.*, 1997) และ IgD (Hirono and Aoki, 2003; Hordvik *et al.*, 1999; Stenvik and Jorgensen, 2000; Wilson *et al.*, 1997) ออกมาตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ต่อมาได้มีการศึกษาและรายงานว่ามี Ig ที่ถูกค้นพบใหม่โดยเฉพาะ Ig heavy chain isotypes ชนิดใหม่ เช่นจาก Zebrafish (IgZ) (Danilova *et al.*, 2005), Sharks (IgNAR; new antigen receptor) (Nuttall *et al.*, 2001; Dooley *et al.*, 2003), Rainbow trout (IgT) (Hansen *et al.*, 2005), Fugu (Savan *et al.*, 2005a) และ Common carp (IgM-IgZ) (Savan *et al.*, 2005b) ซึ่งเท่ากับว่าในปัจจุบันได้มีการรายงานการค้นพบอิมมูโนโกลบูลิน 6 ชนิดในปลาแล้ว ซึ่งในปลากระดูกแข็งได้แก่ IgM, IgD, IgZ, IgT, IgM-IgD chimera และ IgM-IgZ chimera (Wilson *et al.*, 1997; Hordvik *et al.*, 1999; Hirono and Aoki, 2003; Danilova *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005; Savan *et al.*, 2005a, 2005b) โดย Ig ชนิดใหม่ที่พบเหล่านี้มีโครงสร้างไม่เหมือนกับ Ig ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ และหน้าที่ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อิมมูโนโกลบูลินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 5 classes โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างกันของส่วน Heavy chain constant region ของโมเลกุลแอนติบอดินั้นในการจำแนก ได้แก่ IgM, IgG, IgD, IgA และ IgE (Tian *et al.*, 2009) ส่วนสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกสัตว์ปีก (Avians) พบอิมมูโนโกลบูลิน 3 คลาสได้แก่ IgM, IgY และ IgA (Lundqvist *et al.*, 2006; Schaerlinger *et al.*, 2008) สัตว์เลื้อยคลาน (Reptiles) พบ 3 คลาสได้แก่ IgM, IgD และ IgA สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Amphibians) พบ 5 คลาสได้แก่ IgM, IgY, IgX, IgD และ IgF ซึ่งพบว่า IgY และ IgX มีหน้าที่คล้ายคลึงกับ IgG และ IgA ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Warr *et al.*, 1995; Mussmann *et al.*, 1996) ตามลำดับ

อิมมูโนโกลบูลินหลักที่ปลาใช้ในการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันคือ IgM โดยปกติแล้ว IgM สามารถอยู่ในรูปของ Membrane-bound receptor บนผิวของ B cell เพื่อทำการดักจับแอนติเจนหรือจะอยู่ในรูป Secreted form ที่ล่องลอยอยู่ภายในของเหลวในร่างกาย (Tian *et al.*, 2009) โครงสร้างของ IgM heavy chain ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในรูป Membrane bound form ประกอบด้วย Leader sequence ( $L_H$ ) - Variable domain ( $V_H$ ) - Diversity domain ( $D_H$ ) - Joining domain ( $J_H$ ) - Constant regions ( $C_{\mu}1-4$ ) และมี Transmembrane domain (TM1 และ TM2) ส่วนในปลากระดูกแข็ง TM1 จะมาเชื่อมต่อกับ  $C_{\mu}3$  โดยตัด  $C_{\mu}4$  ออกไป ส่วน IgM ในรูป Secreted form จะมีการจัดเรียงโครงสร้างคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งประกอบด้วย  $L_H-V_H-D-J_H-C_{\mu}1-C_{\mu}2-C_{\mu}3-C_{\mu}4$  (Litman *et al.*, 1999; Honjo *et al.*, 1989; Schwager *et al.*, 1988) โดย IgM ในปลากระดูกแข็งจะพบมากในรูป Tetrameric โดยมีโมเลกุลของ IgM มาเชื่อมต่อกัน 4 โมเลกุล โดยใช้ Joint (J) chain (Acton *et al.*, 1971) และในปลากระดูกอ่อนจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น มนุษย์จะพบ IgM ในรูป Pentameric โดยมีการเชื่อมต่อกันของ IgM ถึง 5 โมเลกุล (Kobayashi *et al.*, 1984) ในปลามีขากรรไกร (Jawed fish) พบว่า IgM มี H chain คล้ายกับ  $\mu$ -chain ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนปลากระดูกอ่อน (Chondrichthyes) และปลาปอด (Dipnoi) มี IgM เป็น Pentameric form คล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่า IgM จำนวนหนึ่งในปลาปอดมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าปกติจึงเรียกว่า "IgN" ซึ่งจะคล้ายกับ IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและ IgM ยังสามารถพบได้ในรูป Monomeric form กับ Dimeric form อีกด้วย พบได้ในปลากระดูกแข็ง เช่น Channel catfish ที่อิมมูโนโกลบูลินมีโมเลกุลต่างกัน โดยจะแตกต่างกันที่ Covalent structure ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ Light chain (Ota *et al.*, 2003) ในปัจจุบันพบว่ายีน IgM heavy chain ได้มีการศึกษาในปลาหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น Catfish (Ghaffari and Lobb, 1989a; Wilson *et al.*, 1990) Ladyfish (Amemiya and Litman, 1990) Atlantic cod (Bengtzen *et al.*, 1994) Atlantic salmon (Hordvik *et al.*, 1992, 1997) Rainbow trout (Lee *et al.*, 1993; Andersson and Matsunaga 1993; Hansen *et al.*, 1994) Holostean fish ได้แก่ Bowfin, *Amia calva* และ Gar (Wilson *et al.*, 1995), Zebrafish (Danilova *et al.*, 2000) Antarctic teleost (Coscia *et al.*, 2000) Mandarin fish (Zhang *et al.*, 2003) Japanese flounder (Lee *et al.*, 2001; Srisapomee *et al.*, 2004) Pufferfish (Saha *et al.*, 2005) Orange-spotted grouper (Cheng *et al.*, 2006) European eel (Jianjun *et al.*, 2009) Indian major carps (Bag *et al.*, 2008) Shark (Lee *et al.*, 2008) และ Large yellow croaker (Tian *et al.*, 2009) เป็นต้น

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง METTLER PJ 400
2. เครื่องชั่ง Mettler Toledo PL83-S
3. -20 °C Freezer (Mirage)
4. -80 °C ULT Freezer (Thermo Forma)
5. Microwave oven (Whirlpool)
6. Microcentrifuge Universal 320R (Hettich)
7. Microcentrifuge MIKRO 200R (Hettich)
8. Minicentrifuge, Profuge 6K Korea
9. Water bath shaker, GFL 1083
10. Incubator (Memmert)
11. Incubator Shaker Seriker II model VS-8480 SFN
12. Shaker TPM-2 (Sarstedt)
13. Vortex-2 Genic, Scientific Industries, USA
14. Autoclave HICLAVE™ (HIRAYAMA)
15. Hot air oven (Memmert)
16. Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
17. Cylinder ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร
18. Automatic micropipette ขนาด P10, P20, P200 และ P1000 (Bio-Rad)
19. Pipette tips ขนาด 10, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Ultratip)
20. Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
21. Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 และ 0.6 มิลลิลิตร
22. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Costar)
23. Power supply power PAC 200 (Bio-Rad)
24. Electrophoresis electric, Myrun (Bioactive)
25. Thermal Cycler Machine (Takara)
26. Mx Pro™ 3005P QPCR Thermal Cycler (Stratagene, USA)
27. FastPrep® homogenizer (Biomedicals)

28. NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)
29. UV light transilluminator (Hoefer, USA)
30. Hybond™ -N<sup>+</sup> Positively charged nylon membrane (Amersham, USA)
31. Whatman 3MM (USA)
  
32. สารเคมีสำหรับงานทางอณูโมเลกุล
  - Absolute ethanol; C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (Merck)
  - Boric acid; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck)
  - Chloroform; CHCl<sub>3</sub> (Merck)
  - Sodium chloride; NaCl (Merck)
  - Sodium hydroxide; NaOH (Eka Nobel)
  - N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine; TEMED (Bio-Rad)
  - Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
  - Tris-base; Tris (hydroxymethyl) aminomethane
  - Sterile distilled water; dH<sub>2</sub>O
  - Magnesium chloride; MgCl<sub>2</sub>
  - GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas)
  - GeneRuler™ Lambda (λ) Hind III DNA Ladder (Fermentas)
  - Isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)
  - 100 mM dNTP (Fermentas)
  - 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside; X-gal (Sigma)
  - Agarose (Conda)
  - Ethidium bromide; EtBr (Invitrogen)
  - Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA)
  
33. ชุด Kit สำเร็จรูป
  - HiYield™, Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Real Biotech)
  - Plasmid DNA Extraction kit (BioExcellence)
  - RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)
  - BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)
  - DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)

34. เอนไซม์และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) และ Vector
- DreamTaq™ DNA polymerase (Fermentas)
  - TaKaRa LA Taq™ (TaKaRa)
  - Xho I (Fermentas)
  - Eco RI (Fermentas)
  - Bam HI (Fermentas)
  - Pst I (Fermentas)
  - pGEM-T Easy vector (Promega)
  - T4 DNA ligase (Promega)
35. สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย
- *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109
36. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
- Technical agar (Difco, USA)
  - Sodium chloride; NaCl (Merck)
  - Bacto tryptone (BD, France)
  - Yeast extracts (Scharlau)
  - Super Optimal Culture medium (SOC medium)
  - Luria Bertani broth (LB broth) และ Luria Bertani agar (LB agar)
37. ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)
- BLASTN and BLASTX program  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BlastN>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BlastX>
  - CAP3: Contig assembly program  
<http://bioweb.pasteur.fr/seqana/interface/cap3.html>
  - VecScreen  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/Vecscreen.html>
  - SignalP version 3.0  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

- MatGat program version 2.02  
<http://bitincka.com/ledion/matgat>
- ClustalW  
<http://www.clustal.org>
- MEGA version 4.0.2  
<http://www.megasoftware.net>
- POPGENE version 1.31  
<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>
- ImMunoGeneTics Database  
<http://www.ebi.ac.uk/imgt/>

### 38. ไพรเมอร์ (Primers)

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Gene name	Primer name	Sequence 5' → 3'	Amplicon sizes	Experiment
IgM heavy chain	- IgMuF1	GGATGATACCTATACT GCCTCCTG	-	RT-PCR, Real-time PCR, RACE-PCR
IgM heavy chain	- IgMuR1	TTGTGCATTCCAGTCC TGTCTCCT	-	RACE-PCR
IgM heavy chain	- IgMuR2	GTGACTGGGTTACTTG CTATGTCC	425	RT-PCR
IgM heavy chain	- IgMuR22	AATCTAGTCTGATCAT TCAGGTCA	174	Real-time PCR
β-actin	- β-actinF1	GGTCATCACCATGGC AATG	529	RT-PCR
β-actin	- β-actinR1	ACTGAAGCCATGCCAA TGAG	529	RT-PCR
M13 forward	- M13 F	AAAACGACGGCCAG	-	-
M13 reverse	- M13 R	AACAGCTATGACCATG	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Gene name	Primer name	Sequence 5' → 3'	Amplicon sizes	Experiment
β-actin	- β-actinF2	ACAGGATGCAGAAGGA GATCACAG	155	Real-time PCR
β-actin	- β-actinR2	GTACTCCTGCTTGCTG ATCCACAT	155	Real-time PCR
-	- UPM-long	CTAATACGACTCACTA TAGGGCAAGCATGGTA TCAACGCAGAGT	-	RACE-PCR
-	- UPM-short	AAGCAGTGGTATCAAC GCAGAGT	-	RACE-PCR
IgM heavy chain	- SB F	GGATGATACCTATACT GCCTCCTG	533	Southern blot
IgM heavy chain	- SB R	GGTGAACAACACAGAA GCGTGT	533	Southern blot

## วิธีการทดลอง

### 1. การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Immunoglobulin M heavy chain (IgM) ในปลานิล

1.1 การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน IgM ของปลานิลจากห้องสมุด cDNAs ที่สร้างจากไตส่วนหน้า (Head kidney) และม้าม (Spleen) ของปลานิลและการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการสืบค้น Expressed sequence tag (ESTs) clones ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล จากห้องสมุด cDNAs ที่สร้างจากไตส่วนหน้าของปลานิล (Srisapome *et al.*, 2008. Accession number FF279526, FF279636, FF279652, FF279682, FF279704, FF279723, FF280026, FF280099, FF280129, FF280309, FF280392, FF280433, FF280472 และ FF280584) และม้ามของปลานิล (Srisapome *et al.*, 2008. Accession number FF280698, FF280756, FF 280926, FF280982, FF281089, FF281496, FF281499 และ FF281503) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม CAP 3 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqana /interface/cap3.html>) พบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลในโคลน HK 0156 (Accession number FF279636) มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' มากที่สุดจึงได้นำโคลนนี้นี้มาทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ด้วย M13F primer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองมาทำการ Alignment กัน พบว่ายังไม่แสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ จึงนำ EST โคลนดังกล่าวมาทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNAs ของยีน IgM heavy chain ของ ปลานิล ด้วยเทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification of cDNA Ends เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ของ cDNAs ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลต่อไป

1.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ IgM heavy chain cDNA โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification of cDNA Ends

นำปลานิลขนาดทดลองประมาณ 500 กรัม ซึ่งเป็นปลาที่แข็งแรง ไม่มีอาการของโรคต่าง ๆ มาทำการสกัด Total RNA จากไตส่วนหน้า (Head kidney) และม้าม (Spleen) โดยใส่ตัวอย่างเนื้อเยื่อประมาณ 100 มิลลิกรัม ใน TRI Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center)

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการบดเนื้อเยื่อที่ได้ด้วยเครื่อง FastPrep® homogenizer (Biomedicals) เป็นเวลา 40 วินาที หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกส่วนใสที่ประกอบด้วย Total RNA ไปยัง Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปกลับไปกลับมานานประมาณ 15 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสด้านบนที่เป็นชั้นของ RNA ไปใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Isopropyl alcohol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปกลับไปกลับมา แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการสกัด mRNAs โดยใช้ Quick Prep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) จากนั้นนำ mRNAs ที่สกัดได้มาสังเคราะห์ 5' และ 3' First strand cDNA ด้วย BD Smart™ RACE cDNA Amplification kit (BD Biosciences Clontech) ตามวิธีการของบริษัท

ในการสังเคราะห์ First strand cDNA นั้น จะใช้ mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม โดยเตรียม Microcentrifuge tube จำนวน 2 หลอด หลอดแรกทำ 5'-RACE-Ready cDNA ซึ่งประกอบด้วย mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม, BD Smart II A oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและ 5'-CDS primers (5'-(T)<sub>25</sub>V N-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' อีกหนึ่งหลอดจะทำ 3'-RACE-Ready cDNA ซึ่งประกอบด้วย mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม และ 3'-CDS primer (5'-AAGCAG TGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>V N-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละหลอดให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปบ่มที่ 70°C นาน 2 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเพื่อเก็บตัวอย่างที่อยู่บริเวณก้นหลอด ในแต่ละหลอดจะเติม 5x First-strand buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 20 mM Dithiothreitol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ BD PowerScript Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว เพื่อเก็บตัวอย่างที่อยู่บริเวณก้นหลอด นำหลอดไปบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่งใน Hot-lid thermal cycler โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกมานำเจือจางด้วย Tricine-EDTA buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที ตัวอย่างที่ได้จะนำไป

เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้ หลังจากนั้นนำ First strand ที่ได้ไปทำ PCR โดยใช้ Specific primers ของยีน IgM heavy chain (IgMuR1 primer และ IgMuF1) (ตารางที่ 3) ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลโคลน HK 0156 ร่วมกับการใช้ Universal primers (UPM) (ตารางที่ 3) ในการทำปฏิกิริยา

โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

5'or 3' RACE First strand cDNA	1.25	ไมโครลิตร
10x Universal primer (UPM)	2.5	ไมโครลิตร
10 $\mu\text{M}$ Gene-specific primer	1	ไมโครลิตร
10x LA PCR <sup>TM</sup> Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$ free)	2.5	ไมโครลิตร
10 mM dNTP mix	0.5	ไมโครลิตร
25 mM $\text{MgCl}_2$	2.5	ไมโครลิตร
5 U/ $\mu\text{l}$ LA Taq <sup>TM</sup> DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร
Sterilized distilled water	14.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้ในช่วงแรก ของปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 30 วินาที  $55^{\circ}\text{C}$  นาน 30 วินาที และ  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 25 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาทีแล้วเก็บรักษา 5' และ 3' RACE PCR Product ที่ได้ ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผล 5' และ 3' RACE PCR Product ที่ได้ ด้วยการใส่ 1.5% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่าง ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตในเครื่อง UV light transilluminator (Hoefer, USA)

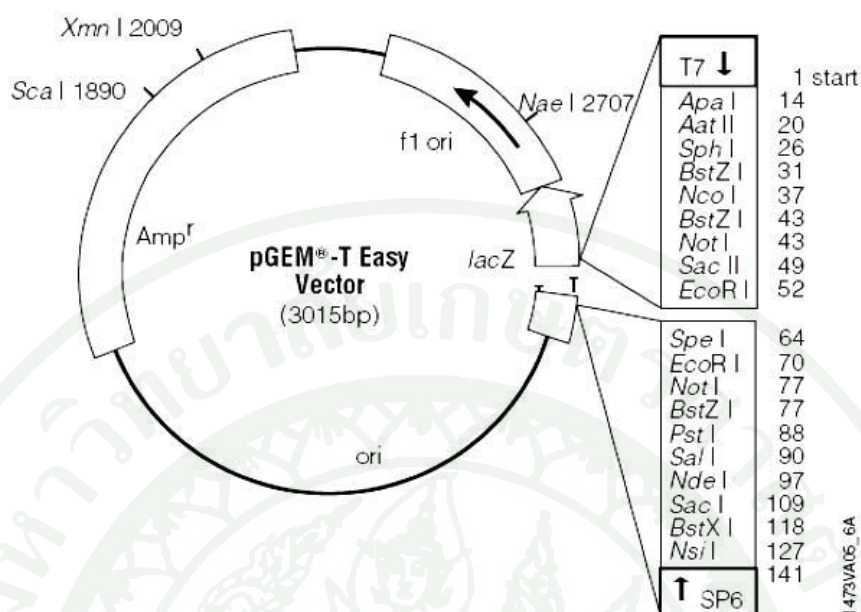
### 1.3 การแยก DNA จาก Agarose gel และการทำให้ชิ้น DNA บริสุทธิ์

การแยก DNA จาก Agarose gel และทำให้ชิ้น DNA บริสุทธิ์ โดยใช้ *HiYield™* Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ทำตามวิธีการของบริษัท Real Biotech โดยทำการตัด Agarose gel ซึ่งมีแถบ DNA ที่ต้องการ ใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม บัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของ Agarose gel 300 มิลลิกรัม นำไปเขย่าด้วย เครื่อง Vortex mixer หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10-15 นาที พลิกหลอดกลับไปมาทุก ๆ 2-3 นาที หลังจากนั้นนำ DF column มาใส่ใน Collection tube แล้วใส่สารละลายตัวอย่างข้างต้น 800 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่างแล้ววาง DF column กลับเข้าที่เดิม เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่างแล้ววาง DF column กลับเข้าที่เดิม แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที อีกครั้งเพื่อให้ Column matrix แห้ง หลังจากนั้นทำการย้าย DF column ที่แห้งแล้วไปใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเก็บรักษา DNA ที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ -20°C

ตรวจสอบผลของ Purified product ที่ได้ บน 1% Agarose gel electrophoresis ใน บัฟเฟอร์ 1X TBE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสง อัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV light transilluminator (Hoefer, USA)

### 1.4 การเชื่อมต่อ PCR Product กับ TA Cloning vector (pGEM<sup>®</sup>-T easy vector)

เชื่อมต่อ DNA เพื่อสร้าง Plasmid DNA สายผสม โดยนำสารละลาย DNA ที่ บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1.3 จำนวน 1.5 ไมโครลิตร ผสมกับ T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร 2x Rapid ligation buffer 2.5 ไมโครลิตร และ pGEM<sup>®</sup>-T easy vector (Promega, USA) (ภาพที่ 3) 0.5 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่ำ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector

ที่มา: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf> (2012)

### 1.5 การเตรียม Competent Cell

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 เลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ลงเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่งใส่ Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 6 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม 100 mM CaCl<sub>2</sub> 625 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที และเทของเหลวด้านบนทิ้ง เติม 100 mM CaCl<sub>2</sub> ที่เตรียมใน 15% Glycerol 375 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ถ้ายังไม่ใช้ให้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

## 1.6 การนำ DNA ลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 (Transformation)

ใช้วิธี Heat shock transformation โดยนำ Competent cell ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Ligation product 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดีดเบา ๆ แชน้ำแข็งเป็นเวลา 25 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที นำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม Super Optimal Culture medium (SOC medium) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ปิดปาก Microcentrifuge tubes ด้วย Parafilm นำไปบ่มใน Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 5 นาที ลดปริมาตรของสารละลายลงให้เหลือเพียง 100 ไมโครลิตร ผสมตะกอนกับสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ Micropipette แล้วนำสารละลาย 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงบนอาหาร LB Agar ที่มีสารละลาย Ampicillin ความเข้มข้น 0.01% ผสมอยู่ แล้วทำการเกลี่ย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) เข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LB Agar ที่มีสารละลาย Ampicillin ไว้ก่อนแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ Micropipette tip ที่ปลอดเชื้อมาทำการคัดเลือกเอาโคโลนีที่คาดว่าจะมีชิ้น Insert คือ เล็กๆ เฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว (Blue-white colony screening) มาเขียนลงบนอาหาร LB Agar ที่มีสารละลาย Ampicillin และทำการเกลี่ยด้วย IPTG และ X-Gal ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อทำเป็น Master plates

## 1.7 การตรวจสอบผลของการโคลน

การตรวจสอบผลของการโคลน จะใช้เทคนิค Colony PCR ซึ่งใช้ Universal primers 2 ชนิด คือ M13 Forward และ M13 Reverse (ตารางที่ 3) และใช้โคโลนีสีขาวของแบคทีเรียเป็น Template ซึ่งสารละลายส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งสิ้น 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10X DreamTaq™ Buffer	1.5	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	1.6	ไมโครลิตร
5 mM M13 forward primer	1.5	ไมโครลิตร
5 mM M13 reverse primer	1.5	ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.875	ไมโครลิตร
5 U/μl DreamTaq™ DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร
Distilled water	6.825	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15	ไมโครลิตร

ทำการเขี่ยโคลนีสขาวของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบจาก Master plate โดยใช้ Micropipette tip ที่ปลอดเชื้อ ใส่ลงสารละลายที่เตรียมไว้ แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้ในช่วงแรกของปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 55°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 25 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลที่ได้ ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV Light Transilluminator

### 1.8 การสกัด Plasmid เพื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้ชุดสกัด Plasmid DNA Extraction Manual Kit จากแบคทีเรีย ของบริษัท Bio Excellence (USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียโคลนีสขาวจาก Master plate ที่นำไปตรวจสอบด้วยวิธี Colony PCR แล้วได้ผลบวก โดยมีขนาดของชิ้น PCR Product ใกล้เคียงกับขนาดของชิ้น Insert ไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารละลาย Ampicilin ความเข้มข้น 0.01% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาเขย่าในเครื่อง Vortex mixer แบ่งใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 นาที เทอาหารด้านบนทิ้ง และทำซ้ำจนเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองที่เลี้ยงไว้หมดหลังจากนั้นเติม Cell suspension solution 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต จากนั้นเติม Cell lysis solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

โดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา แล้วเติม Neutralisation solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนติดมาด้วย หลังจากนั้นเติม Isopopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้างตะกอน โดยเติม 70% Ethanol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แต่ต้องระวังอย่าให้ตะกอน DNA หลุดออกมาด้วย ซับ 70% Ethanol ที่เหลือค้างอยู่โดยคว่ำปากหลอดลงบนกระดาษซับ ที่จุ่มไว้จุ่ม Ethanol ระบายออกไปหมด หลังจากนั้นเติม TE Buffer 20 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง โดยต้องเขย่าหลอดเป็นระยะ ๆ หลังจากนั้นเก็บ Plasmid ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

### 1.9 การทำ Restriction enzyme digestion

เนื่องจาก pGEM-T Easy เป็น Vector ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ชนิด *Eco* RI ซึ่งอยู่ขนาบข้างของชิ้น Insert บน Recombinant DNA (ภาพที่ 1) จึงใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการตัด Recombinant DNA ที่ได้จากการโคลน เพื่อยืนยันผล ซึ่งส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา มีดังนี้

Plasmid DNA	2	ไมโครลิตร
10X Buffer <i>Eco</i> RI	2	ไมโครลิตร
<i>Eco</i> RI	0.5	ไมโครลิตร
Distilled water	5.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดใน Microcentrifuge tubes ขนาด 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Ultraviolet Light Transilluminator และเปรียบเทียบขนาดของชิ้น DNA fragment ที่ได้ด้วยแถบ DNA มาตรฐาน (DNA ladder 100 bp plus)

### 1.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เลือก Plasmid ที่มีขึ้นของ Insert ขนาดความยาวใกล้เคียงกับ 5' และ 3' RACE PCR Product มาทำการตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' และ 3' ของ cDNA โดยใช้ M13 forward และ M13 reverse primers ด้วยวิธี Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham pharmacia biotech) โดยบริษัท Macrogen, Inc. (Korea)

## 2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน IgM heavy chain ของปลานิลกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

### 2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ IgM heavy chain cDNA ของปลานิล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งจากทางด้าน 5' และ 3' RACE มาทำการตัดส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vector และ Adaptor ออก โดยใช้โปรแกรม VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/Vecscreen.html>) หลังจากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการตัดเอา Vector และ Adaptor ออกแล้วนั้น ไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บันทึกไว้แล้วใน GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLASTN ที่กำหนดให้มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching ( $E$ -value) น้อยกว่า  $10^{-4}$  และใช้โปรแกรม BLASTX เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันของกรดอะมิโน โดยตรงบริเวณที่เหมือนกันนั้นต้องมีจำนวนของกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 10 Residues และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันไม่น้อยกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching ( $E$ -value) น้อยกว่า  $10^{-4}$  (Cao *et al.*, 2001) หลังจากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม BLASTN และ BLASTX ซึ่งให้ผลเป็นยีน IgM heavy chain ทั้งทางด้าน 5' และ 3' RACE ที่ได้มาทำ Alignment กัน พบว่ามีบริเวณซ้อนทับของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ของ IgM heavy chain cDNA ของปลานิล หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบส่วนของ Hydrophobic leader peptide sequence โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)

2.2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ IgM Heavy chain ของปลานิลกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล มาตัดส่วนของ 5' Untranslated region (UTR) และ 3' UTR ออก ให้ได้เฉพาะบริเวณ Open reading frame (ORF) มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank Database โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.clustal.org>) และ MatGat 2.02 (<http://bitincka.com/ledion/matgat>)

2.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน IgM heavy chain ของปลานิล

นำเอาลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ จากฐานข้อมูลของ GenBank database มาตัดส่วนของ 5' UTR, Leader sequence, Variable domain และ 3' UTR ออก ให้ได้เฉพาะ Constant region ( $C_{\mu}2-C_{\mu}4$ ) แล้ว มาทำ Multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW หลังจากนั้นทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0.2 (<http://www.megasoftware.net>) โดยใช้วิธี UPMGA ทั้งนี้ กำหนดให้ค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง

**3. การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Variable domain ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในปลานิล**

3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Variable ( $V_H$ ) domain ของยีน Immunoglobulin M heavy chain

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Variable domain ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ที่ได้ มาทำการแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ออกเป็น  $V_H$  segment,  $D_H$  segment และ  $J_H$  segment รวมทั้งทำการจำแนก Frame work region (FR) และ Complementary determining region (CDR) ตามการจำแนกของ ImMunoGeneTics (IMGT) Database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/>) แล้วทำการจัดกลุ่ม Family ของ  $V_H$  segment ด้วยการนำนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ Start codon จนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่ Encode ให้เป็นส่วนหนึ่งของ  $V_H$

segment มาจัดกลุ่มด้วยการใช้โปรแกรม CAP3 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqana/interface/cap3.html>) และทำ Multiple alignment หลังจากนั้นตรวจสอบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของ  $V_H$  segment ด้วยการโปรแกรม MatGat 2.02 เพื่อทำการจัดกลุ่ม Family ซึ่งการจัดกลุ่มของ  $V_H$  อาศัยหลักการความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ต้องมีค่ามากกว่า 80% จึงจะจัดว่า  $V_H$  นั้น ๆ เป็นกลุ่มเดียวกัน  $V_H$  ต่างกลุ่มกันจะมีค่าความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 70% (Brodeur and Riblet, 1984) จากนั้นทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของกรดอะมิโนในส่วน of Variable domain ซึ่งประกอบด้วย Frame Work Region (FR) และ Complementary Determining Region (CDR) ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ด้วยวิธี Shannon analysis (Shannon, 1948; Stewart *et al.*, 1997) โดยการใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>) และวิธีการของ Kabat and Wu (Kabat and Wu, 1971)

### 3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Diversity ( $D_H$ ) segment ของยีน Immunoglobulin M heavy chain

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  $D_H$  segment มาทำ Multiple alignment แล้วทำการจัดจำแนกกลุ่มของ  $D_H$  segment และนำกรดอะมิโนของ  $D_H$  segment มาหาค่าความถี่ในการใช้กรดอะมิโนเหล่านั้นในการจัดเรียงตัวของ  $D_H$  segment ใน Variable region ของ IgM heavy chain

### 3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Joining ( $J_H$ ) segment ของยีน Immunoglobulin M heavy chain

นำลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ  $J_H$  segment มาจัดกลุ่มด้วยการใช้โปรแกรม CAP3 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqana/interface/cap3.html>) และทำ Multiple alignment หลังจากนั้นตรวจสอบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ  $J_H$  segment ด้วยการโปรแกรม MatGat 2.02 เพื่อทำการจัดกลุ่ม Family ซึ่งการจัดกลุ่มของ  $J_H$  อาศัยหลักการความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ต้องมีค่ามากกว่า 80% จึงจะจัดว่า  $J_H$  นั้น ๆ เป็นกลุ่มเดียวกัน  $J_H$  ต่างกลุ่มกันจะมีค่าความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 70% (Brodeur and Riblet, 1984)

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Immunoglobulin M heavy chain โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และเทคนิค Quantitative Real-time PCR ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของปลานิล

##### 4.1 การสกัด Total RNA จากอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิล โดยใช้ TRI Reagent<sup>®</sup>

ทำการสกัด Total RNA จากเนื้อเยื่อของปลานิลปกติ ขนาดประมาณ 500 กรัม 13 อวัยวะ ซึ่งประกอบด้วย สมอง เหงือก อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ หัวใจ กล้ามเนื้อ ไตส่วนหน้า ไตส่วนหลัง ลำไส้ ตับ ม้าม กระเพาะอาหาร เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต (Peripheral blood leukocytes; PBLs) และผิวหนัง ด้วย TRI Reagent<sup>®</sup> (Gibco-BRL, USA) ตามวิธีการในข้อ 1.2 แล้วเก็บรักษาตะกอน RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะใช้

##### 4.2 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่เก็บอยู่ใน 75% Ethanol มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนของ 75% Ethanol ออก หลังจากนั้นเติม DEPC water เพื่อละลายตะกอน Total RNA แล้วนำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)

##### 4.3 การสังเคราะห์ First strand cDNA

นำ Total RNA ที่นำไปวัดปริมาณความเข้มข้นแล้วมาทำการสังเคราะห์ First strand cDNA โดยใช้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ของ Total RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลานิลโดยการใช้ RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) โดยนำ Total RNA 1 ไมโครกรัม มาทำการทำลาย Genomic DNA ออกก่อน ด้วยการใช้เอนไซม์ DNase I โดยมีส่วนผสมของสารละลายในการทำปฏิกิริยาดังนี้

Total RNA	1	ไมโครลิตร
DEPC water	7	ไมโครลิตร
10X buffer with MgCl <sub>2</sub>	1	ไมโครลิตร
DNase I	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

นำสารละลายผสมข้างต้นมาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด แล้วทำการบ่มที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Oligo(dT)<sub>18</sub> primer (0.5 µg/ml) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการหยั่งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 3-5 วินาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาเติม 5x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor (20 U/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 10mM dNTP mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษา First strand cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

#### 4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลปกติ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ First strand cDNA ที่เตรียมได้จากอวัยวะต่าง ๆ ในข้อ 3.3 มาเป็น Template โดยใช้ Specific primers ต่อ IgM (IgMuF1 primer และ IgMuR2 primer) (ตารางที่ 3) และทำการเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีนมาตรฐาน β-actin ซึ่งจะใช้เป็น Internal control โดยใช้ β-actinF1 primer และ β-actinR1 primer (ตารางที่ 3) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยามี ปริมาตรทั้งสิ้น 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10x DreamTaq <sup>TM</sup> Buffer	2.5	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2.5	ไมโครลิตร
10 mM forward primer	1	ไมโครลิตร
10 mM reverse primer	1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	ไมโครลิตร
5 U/μl DreamTaq <sup>TM</sup> DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	16.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดใน PCR tubes นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ Target DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 55°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาทีเป็นจำนวน 25 รอบ และช่วงที่สามใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที แล้วเก็บรักษา PCR Products ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C

ตรวจสอบผล PCR Product ที่ได้ของยีน IgM heavy chain และ β-actin บน 1% Agarose ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV Light Transilluminator และเปรียบเทียบขนาดของชิ้น DNA ที่ได้ด้วยแถบ DNA มาตรฐาน (DNA ladder 100 bp plus)

4.5 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Immunoglobulin M heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR

นำ First strand cDNA ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลที่ได้จากข้อ 3.3 มาเป็น Template โดยใช้ Specific primers ต่อ IgM (IgMuF1 primer และ IgMuR22 primer (ตารางที่ 3) และทำการเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนมาตรฐาน β-actin ซึ่งจะใช้เป็น Internal control โดยใช้ β-actinF2 primer และ β-actinR2 primer (ตารางที่ 3) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาต่อหนึ่งปฏิกิริยา (Reaction) มีปริมาตรทั้งสิ้น 12.5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย First strand cDNA

1 µg, 2x Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA), 10 µM Forward primer, 10 µM Reverse primer และ Distilled water โดยมีรายละเอียดดังนี้

First strand cDNA	0.5	ไมโครลิตร
2x Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix	6.25	ไมโครลิตร
10 µM Forward Primer	0.5	ไมโครลิตร
10 µM Reverse Primer	0.5	ไมโครลิตร
Distilled water	4.75	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	12.5	ไมโครลิตร

ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงใน 96 Well polypropylene plates โดยในแต่ละตัวอย่างจะทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งจะมีการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เราสนใจกับยีน  $\beta$ -actin ที่เป็น Internal control ในแต่ละตัวอย่างของ First strand cDNA จากนั้นนำ 96 Well polypropylene plates ที่ได้ไปใส่ในเครื่อง Mx3005P Real-time PCR system (Stratagene, USA) ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 55°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ และในช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 1 นาที 55°C นาน 30 วินาที และ 95°C นาน 30 วินาที เป็นจำนวน 1 รอบ แล้วบันทึกผลค่า Threshold cycle หรือ  $C_T$  ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน IgM Heavy chain ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลต่อไป

#### 4.6 การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก Quantitative Real-time PCR และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่า  $C_T$  ที่ได้ของทุก ๆ กลุ่มทดลองในแต่ละช่วงเวลา มาทำการคำนวณเพื่อหาค่า Relative expression ratio ตามวิธีการของ Livak และ Schmittgen (2001) ซึ่งค่า Relative expression ratio จะมีสูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Relative expression ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

เมื่อ  $\Delta C_T$  คือความแตกต่างของค่า  $C_T$  ของยีน IgM heavy chain กับค่า  $C_T$  ของยีน  $\beta$ -actin ในแต่ละช่วงเวลา โดยสามารถเขียนเป็นสมการในการคำนวณ ดังนี้

$$\Delta C_T = C_{T, \text{IgM heavy chain}} - C_{T, \beta\text{-actin}}$$

จากนั้นนำค่า  $\Delta C_T$  ที่ได้จากช่วงเวลา 0 วัน  $[(\Delta C_T)_{Time 0}]$  มาใช้เป็น Calibrator เพื่อปรับค่า  $\Delta C_T$  ของแต่ละช่วงเวลา  $[(\Delta C_T)_{Time X}]$  ให้ได้ค่าที่มีมาตรฐานเดียวกัน โดยค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าว เรียกว่า “ $\Delta\Delta C_T$ ”

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_{Time X} - (\Delta C_T)_{Time 0}$$

นำค่า  $\Delta\Delta C_T$  ที่ได้มาทำการคำนวณหาค่า Relative expression ratio ตามสูตรในการคำนวณข้างต้น

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละอวัยวะโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $P < 0.05$ )

## 5. การประเมินจำนวนยีนและรูปแบบของ Immunoglobulin M heavy chain ที่อยู่บนสารพันธุกรรมทั้งหมด (Genome) ของปลานิล ด้วยวิธี Southern blot hybridization

### 5.1 การสกัดสารพันธุกรรมทั้งหมด (Genome) ของปลานิลจากเลือด (Whole blood)

ทำการสกัดสารพันธุกรรมทั้งหมดของปลานิลจากเลือด (Whole blood) โดยใช้วิธี Phenol-Chloroform ตัดแปลงจากวิธีของ Taggart *et al.* (1992) ซึ่งจะใช้เลือดจากปลานิลทั้งหมด 3 ตัวเพื่อนำมาเป็นตัวแทนของปลานิลทั้งหมด นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำฟเฟออร์ TNES-Urea (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 4M Urea) ปริมาตร 350 ไมโครลิตรและเติม Proteinase K (20 mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน สกัดดีเอ็นเอขั้นแรกด้วยการเติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 10 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ ขั้นที่สอง เติมน้ำฟเฟออร์ : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 25:24:1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 10 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ และขั้นที่สาม เติมน้ำฟเฟออร์ : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 10 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย

เอทานอล 95% ที่เย็นจัด ปริมาตร 1.5-2 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที ละลายตัวอย่างดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปใช้

## 5.2 การทำ Restriction enzyme digestion

นำ Genomic DNA ที่สกัดได้จากเลือด (Whole blood) ในข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Pst* I โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

Genomic DNA	2	ไมโครลิตร
10x Buffer	2	ไมโครลิตร
Restriction enzyme	1	ไมโครลิตร
Distilled water	5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดใน Microcentrifuge tubes ขนาด 0.6 มิลลิลิตร โดยนำ Genomic DNA ของปลาในแต่ละตัว ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดแยกหลอดกัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วย Agarose gel electrophoresis บน 1% Agarose ในบัฟเฟอร์ 1xTBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Ultraviolet Light Transilluminator และเปรียบเทียบขนาดของชิ้น DNA fragment ที่ได้ ด้วยแถบ DNA มาตรฐาน ( $\lambda$  Hind III DNA Ladder)

### 5.3 การทำ Southern blot hybridization

นำ Agarose gel ที่ใช้แยก Genomic DNA ของปลาทั้ง 3 ตัว ที่ถูกตัดด้วย Restriction enzyme แต่ละชนิด มาทำสัญลักษณ์ด้วยการตัดมุมบนด้านขวา แล้วทำ Acid depurination โดยทำการแช่แผ่น Agarose gel นี้ด้วย 0.25 M HCl เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สี Band ของ DNA จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาล จากนั้นทำการ Denature DNA ด้วยการแช่เจลลงใน 0.4 M NaOH ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยัง Membrane โดยวิธี Capillary transfer ด้วยการนำ Agarose gel ไปวางบนแผ่นกระดาษที่มีกระดาษกรอง Whatman 3MM Chromatography paper (USA) เป็นสะพานโดยคว่ำหน้าเจลกับแผ่นกระดาษและปลายทั้งสองข้างของแผ่นกระดาษกรอง จุ่มอยู่ในสารละลาย ใน 0.4 M NaOH จากนั้นนำแผ่น Hybond™-N<sup>+</sup> Positively charged nylon membrane (Amersham, USA) ที่มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล วางทับแผ่นเจลด้านหลังและอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นวางกระดาษกรอง Whatman 3MM ทับบนแผ่น Nylon membrane ความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้ววางกระดาษซับให้มีความสูงประมาณ 4-6 เซนติเมตร วางแผ่นกระดาษทับบนกระดาษซับ จากนั้นวางอุปกรณ์ที่มีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม ทับบนกระดาษตั้งทิ้งไว้ 12-18 ชั่วโมง ดีเอ็นเอจะถูกถ่ายลงบนแผ่น Nylon membrane จากนั้นนำไปล้างใน 6x SSC (Saline-Sodium Citrate) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนเมมเบรนในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20°C หรือนำไปทำการ Hybridization ต่อไป

### 5.4 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA Probe) ของยีน Constant region ของยีน IgM heavy chain

การเตรียม Probe ทำโดยการนำ First strand cDNA ของปลานิลจากข้อ 3.3 มาเป็น Template ในปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการและสภาวะตามข้อ 3.4 หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยวิธีการ Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% Agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Ultraviolet Light Transilluminator และเปรียบเทียบขนาดของชิ้น DNA ที่ได้ด้วยแถบ DNA มาตรฐาน (DNA ladder 100 bp plus)

ทำการสกัด DNA จากแผ่น Agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการในข้อ 1.3 แล้ว นำ DNA ที่ได้ไปติดฉลากแบบสุ่ม (Random primed labeling) ด้วย Digoxigenin (DIG) dUTP โดยนำ DNA ตรวจจับยีนในส่วน Constant region ของยีน IgM heavy chain ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม dNTP labeling (DIG High Prime, Roche) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ บ่มข้ามคืน และทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

### 5.5 การทำ Hybridization

การทำ Prehybridization โดยการนำแผ่น Nylon membrane ที่ได้รับการถ่าย DNA จากตัวอย่างที่ทำการทดลอง นำมาใส่ลงในถุงพลาสติก แล้วเติม Preheat DIG Easy Hyb Granules ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาที

การทำ Hybridization โดยเติม Denature DIG-labeled DNA probe (นำ DIG-labeled DNA probe (ข้อ 5.4) ที่ติดฉลากด้วย DIG ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ไปต้ม นาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที) ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ของแผ่น Nylon membrane อย่าให้มีฟองอากาศ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

### 5.6 การตรวจสอบผลของการ Hybridization ด้วยการใช้นแอนติบอดีต่อ DIG

หลังจากทำ Hybridization ตามวิธีการในข้อ 5.5 แล้ว เทสารละลายทิ้ง แล้วนำแผ่น Nylon membrane ล้างใน Washing buffer เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ใน Blocking solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเตรียมสารละลายแอนติบอดีต่อ DIG ที่จับ กับ Alkaline phosphatase โดยเจือจางในอัตราส่วน 1:5,000 (150 mU/ ml) ในสารละลาย Blocking solution จากนั้นแช่แผ่น Nylon membrane ในสารละลายแอนติบอดี ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการล้างด้วย Washing buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการล้างซ้ำอีกครั้ง แล้วนำไปแช่ใน Detection buffer เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเท สารทิ้ง แล้วแช่แผ่น Nylon membrane ใน Colour substrate solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ปฏิกิริยาการเกิดสีจะเห็นภายใน 2-3 นาที และจะสิ้นสุดปฏิกิริยาภายใน 16 ชั่วโมง

จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นวางแผ่น Nylon membrane ที่อุณหภูมิต้องให้แห้ง แล้วทำการบันทึกผล

### สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

#### 1. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการการจัดการสุภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

#### 2. ระยะเวลาการทำวิจัย

เริ่มทำงานวิจัยเดือนมิถุนายน 2555 และสิ้นสุดงานวิจัยในเดือนมกราคม 2556

#### แหล่งทุนสนับสนุน

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยการผลิตปศุสัตว์ สัตว์น้ำและสุภาพสัตว์ ศูนย์วิทยการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 [Center of Advanced Studies for Agriculture and Food, KU Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand (CASAF, NRU-KU, Thailand)]

## ผลและวิจารณ์

### 1. การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Immunoglobulin M heavy chain (IgM) ในปลานิล

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล จากห้องสมุด cDNAs ที่สร้างจากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) (Srisapoomee *et al.*, 2008) ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีโคลน ESTs ที่มีรายงานว่าเป็นยีน IgM heavy chain ทั้งหมด 22 โคลน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ESTs โคลนเหล่านี้มาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN และ BLASTX พบว่า ESTs โคลนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนใกล้เคียงกับยีน IgM heavy chain ของปลากะตักแข็งมากที่สุด หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ESTs โคลนทั้งหมดมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม CAP 3 พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น

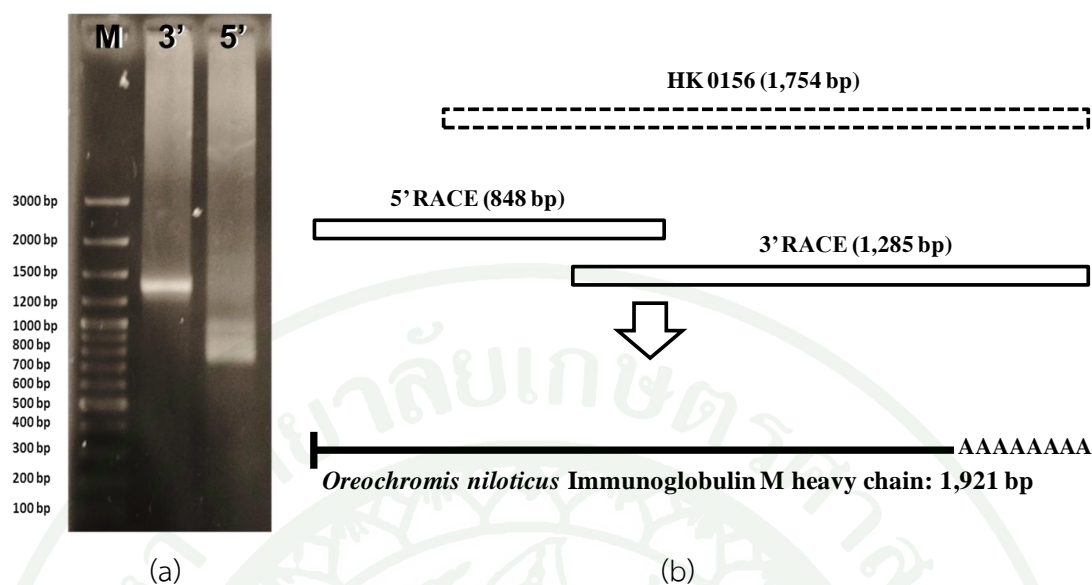
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ESTs โคลนทั้งหมดโดยการทำ Multiple sequence alignment พบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลในโคลน HK 0156 (Accession number FF279636) มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' มากที่สุด จึงได้นำ cDNA โคลนนี้มาทำการเพิ่มจำนวน (Cloning) ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 แล้วทำการสกัดพลาสมิด หลังจากนั้นนำพลาสมิดของโคลนดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้น Insert บน Agarose gel electrophoresis พบว่ามีขนาดประมาณ 1,900 bp (ภาพที่ 4) และเมื่อนำโคลน HK 0156 มาทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ทางด้าน 5' และ 3' ด้วย Universal primers ชนิด M13 reverse primer และ M13 forward primer ตามลำดับ ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 943 bp และ 904 bp ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' นั้นไปเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนใกล้เคียงกับยีน IgM heavy chain ของปลากะตักแข็งมากที่สุด แต่ทั้งนี้ยังไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 5' Untranslated

region (5' UTR) และ Start codon (ATG) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' นั้น พบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ C<sub>μ</sub>4 ตามมาด้วย 3' UTR และ Poly A tail ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนใกล้เคียงกับยีน IgM heavy chain secreted form ของปลากระดุกแข็งมากที่สุด เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองมาทำการ Alignment กัน พบว่ายังไม่แสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ จึงนำ EST โคลนนี้มาทำการออกแบบไพรเมอร์ทางด้าน 5' (ตารางที่ 3) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ขาดหายไปทางด้านปลาย 5' ของ cDNA และเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ที่ได้จาก EST โคลนนี้ รวมทั้งยังเป็นการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNAs ของยีน IgM heavy chain ที่แสดงรูปแบบเป็นคุณลักษณะของ Membrane-bound form ทางด้านปลาย 3' โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ตามลำดับ PCR product ทางด้าน 5' และ 3' RACE ที่วิเคราะห์ได้มีความยาวประมาณ 850 bp และ 1,300 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 5a) ซึ่งได้นำ PCR product มาเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM<sup>®</sup>-T easy vector แล้วทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' และ 3' โดยใช้ M13 forward และ M13 reverse primers พบว่า PCR product ทางด้าน 5' และ 3' RACE มีความยาวทั้งสิ้นเท่ากับ 848 bp และ 1,285 bp ตามลำดับและเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 มาเชื่อมต่อกันทำให้ได้ cDNAs ที่สมบูรณ์ของยีน IgM heavy chain ที่มีความยาวเท่ากับ 1,921 bp (ภาพที่ 5b)



ภาพที่ 4 ขนาดของชิ้น Insert ของ cDNA ของ EST โคลน HK 0156 ภายหลังจากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I บน Agarose gel โดยที่ M คือ 100 bp Plus DNA Ladder

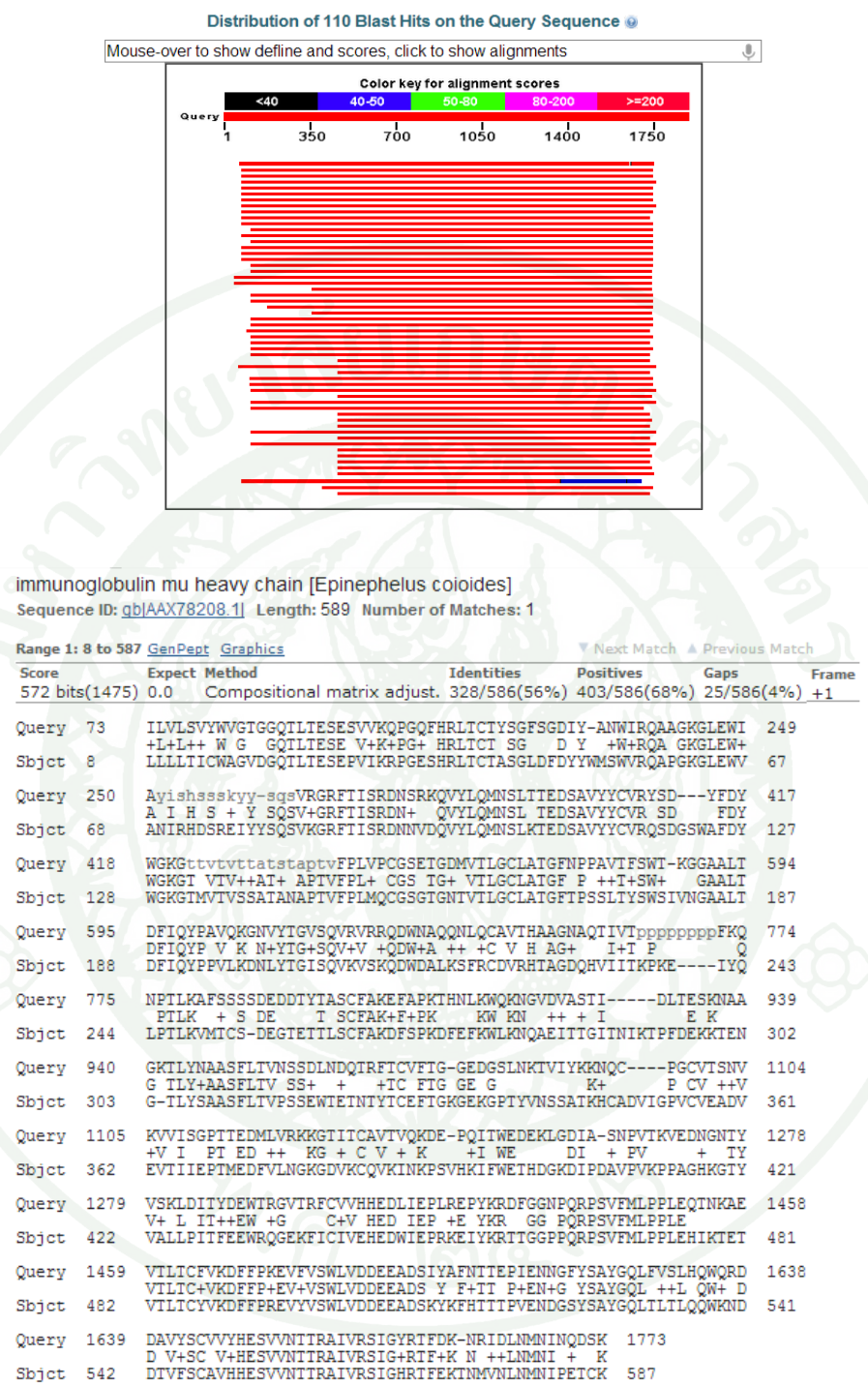


**ภาพที่ 5** การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค 3' และ 5' RACE (a) แถบ DNA แสดงขนาดของ PCR products ประมาณ 1,300 bp และ 850 bp โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE PCR ตามลำดับ (b) การเชื่อมต่อกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' และ 3' RACEs PCR products เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยที่ M คือ 100 bp Plus DNA Ladder

## 2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน IgM heavy chain ของปลานิลกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

### 2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ IgM heavy chain cDNA ของปลานิล

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลที่ได้จากข้อ 1 ไปทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนมากที่สุดกับ IgM heavy chain ของปลากระฉูดส้ม (*Epinephelus coioides*) (ภาพที่ 6) โดยมีค่า Score ของความคล้ายคลึงและ E-value เท่ากับ 572 และ 0.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล กับปลากะรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX

**ตารางที่ 4** การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank ที่มีค่า E-values สูงสุด 6 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม BLASTX

Putative genes	Closest species	E-values	Scores (bits)	Accession number
IgM heavy chain	<i>Epinephelus coioides</i>	0.0	571	AY885700
IgM heavy chain precursor	<i>Larimichthys crocea</i>	0.0	568	FJ589726
IgM heavy chain	<i>Lutjanus sanguineus</i>	0.0	567	HQ322494
IgM heavy chain	<i>Latris lineata</i>	0.0	565	FJ864715
IgM heavy chain	<i>Channa argus</i>	0.0	558	EU822510
IgM heavy chain secretory form	<i>Notothenia coriiceps</i>	0.0	555	AF437738

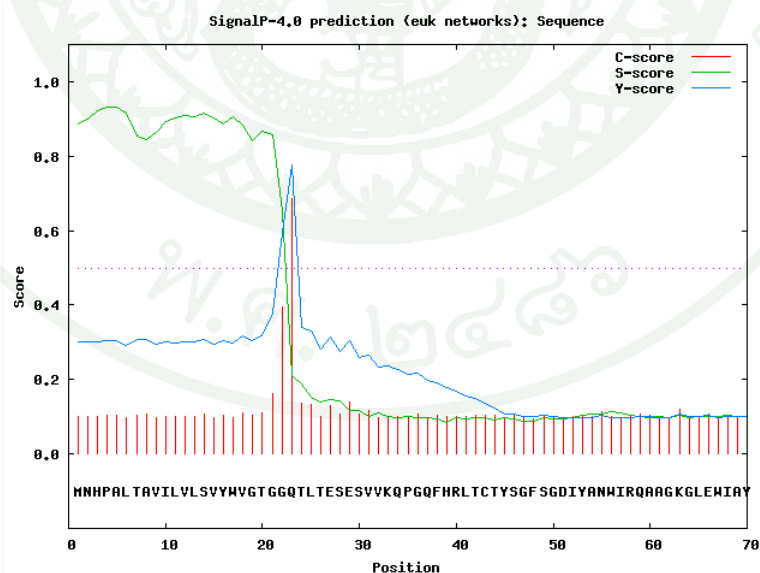
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลานิล พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 1,921 bp โดยมี Open reading frame (ORF) ความยาว 1,740 bp โดยมี ลำดับของ 5' และ 3' Untranslated region (UTR) มีความยาวเป็น 45 และ 140 bp ตามลำดับ โดยสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 580 residues เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาทำการ หาดำแหน่งของ Leader peptides ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 พบว่าสามารถแบ่งโครงสร้างของ โปรตีน IgM heavy chain ของปลานิล ออกเป็น 2 ส่วนที่ประกอบด้วย Leader peptides เท่ากับ 23 residues และอีก 557 residues เป็น Mature protein (ภาพที่ 7 และ 8) และจากลักษณะ โครงสร้างของ cDNA นี้พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของ Polyadenyl signal (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยอยู่ระหว่างลำดับของ Poly A tail จากปลายส่วน 3' ประมาณ 37 bp ซึ่งลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยมี Accession number เป็น KC677037 (ภาพที่ 8)

และเมื่อพิจารณาโครงสร้างที่ประกอบจากกรดอะมิโนในส่วนของ ORF ของ cDNA ของ ยีน IgM heavy chain ของปลานิล พบว่ามีรูปแบบตรงกับคุณลักษณะของ IgM heavy chain secreted form เนื่องจากมีโครงสร้างประกอบด้วย  $L_H-V_H-C_{\mu}1-C_{\mu}2-C_{\mu}3-C_{\mu}4$  ซึ่งไม่พบส่วนลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ Transmembrane domain (TM) เป็นองค์ประกอบ (Saha *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงกำหนดชื่อของ cDNA นี้ว่า "On-sIgM" ซึ่งโดยทั่วไปแล้วในปลากระดูกแข็งจะมี ลักษณะของ Ig membrane-bound form ที่มีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างเป็น

$L_H$ - $V_H$ - $C_{\mu}1$ - $C_{\mu}2$ - $C_{\mu}3$ - $T_M1$ - $T_M2$  ( $L_H$ ,  $V_H$ ,  $C_{\mu}$  และ  $T_M$  คือ Leader sequence, variable domain, constant domain และ transmembrane domain ตามลำดับ) ซึ่งจากผลของการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ด้วยวิธี 3' RACE PCR ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสามารถค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้นคือ Secreted form (Soluble form) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแสดงออกของยีน IgM membrane-bound form ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีน IgM secreted form จึงทำให้มีปริมาณ mRNA ของยีน IgM membrane-bound form น้อยจนไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากพอที่จะปรากฏออกมาให้เห็นเป็นแถบตีเอ็นเอเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis

นอกจากนี้ยังพบว่า On-sIgM มีกรดอะมิโนอนุรักษ์ (Conserved residues) และ Signature motif ที่สำคัญต่อโครงสร้างและหน้าที่ของ IgM (Wang and Liu, 2007) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน Cysteine (C) และ Tryptophan (W) ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ ทั้งหมด 10 และ 8 ตำแหน่งตามลำดับ ซึ่ง Cysteine (C) 8 ตำแหน่ง ที่อยู่ในบริเวณ Constant region มีความสำคัญต่อโครงสร้างของ Ig ในส่วนที่เป็น Inter และ Intra disulfide bridges รวมทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับรูปแบบโครงสร้างที่เป็น Tetrameric ของโมเลกุล IgM อีกด้วย (Amemiya and Litman, 1990; Saha *et al.*, 2005; Wang and Liu, 2007; Coscia *et al.*, 2012) และยังพบกรดอะมิโน Tryptophan (W) 6 ตำแหน่ง ที่อยู่ในบริเวณ Constant region ซึ่งมีความสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนในระดับตติยภูมิ (Tertiary structure) (Williams and Barclay, 1988) และยังพบตำแหน่ง Potential N-linked glycosylation sites บริเวณ  $C_{\mu}2$ ,  $C_{\mu}3$  และ  $C_{\mu}4$  เท่ากับ 1, 1 และ 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ โดยตำแหน่งนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน Asparagine (N)-X-Serine (S) และ Asparagine (N)-X-Threonine (T) [โดยที่ X คือกรดอะมิโนชนิดใด ๆ ที่ไม่ใช่ Proline (P)] (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2006) โดยสรุปแล้ว Potential N-linked glycosylation sites จะพบอยู่ในบริเวณ Constant region ( $C_{\mu}2$ ,  $C_{\mu}3$  และ  $C_{\mu}4$ ) ของ IgM heavy chain ของปลานิล ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ประกอบด้วย NSS, NKT, NTT และ NTT ตามลำดับ ซึ่ง N-linked glycosylation sites เหล่านี้จะมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโมเลกุล Ig (Wang *et al.*, 2003) จากการรายงานของ Shulman *et al.* (1986) เมื่อทำการตัดตำแหน่งของ N-linked glycosylation sites ในบริเวณ  $C_{\mu}3$  พบว่าจะมีผลต่อความสามารถในการกระตุ้นโมเลกุล Complement เช่นเดียวกับการรายงานของ Taylor *et al.* (1994) ที่พบว่า การตัดตำแหน่งของ N-linked glycosylation sites ในบริเวณ  $C_{\mu}3$  จะมีผลต่อความสามารถในการจับกับโมเลกุล C1q ขณะที่การศึกษาวิจัยของ Bazin *et al.* (1992) เมื่อทำการกลายพันธุ์ใน Hybridoma cell line แบบ

Point mutations เพื่อกำจัด Glycosylation site ที่ตำแหน่ง N<sup>563</sup> บริเวณ C-terminal ของโมเลกุล IgM heavy chain พบว่ามีความชอบในการจับ (Avidity) ของ Ab กับ Multivalent antigens เพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับตติยภูมิ (Quaternary structure) ของโมเลกุล Polymeric IgM นอกจากนี้ de Lalla *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ Human cell line มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทำให้โมเลกุล IgM ไม่มีการเกิด Glycosylation ที่ตำแหน่ง N<sup>563</sup> พบว่าเกิดการ Polymerization ของโมเลกุล IgM มากกว่าปกติ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุล IgM กับ J-chain เพื่อให้อยู่ในรูปแบบ Polymeric IgM ลดลง นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง Motif <sup>62</sup>GKGLEW<sup>67</sup> ในบริเวณ FR2 และ <sup>113</sup>YYCVR<sup>117</sup> บริเวณ FR3 ทั้งสองตำแหน่งนี้อยู่ในบริเวณ Antigen binding site ของโมเลกุล Ig โดยมีความสำคัญในการม้วนพับ (Folding) โครงสร้างโปรตีนให้มีความเหมาะสมต่อการจับกับแอนติเจน (Frazer and Capra, 1999; Saha *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2009) ตำแหน่ง <sup>122</sup>FDYWGKGTTVTVTT<sup>135</sup> บริเวณ FR4 เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบใน IgH ของปลาทุกชนิด ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Cheng *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009) ตำแหน่ง <sup>216</sup>LQCAVTH<sup>222</sup> เป็น Signature motif ที่อยู่บริเวณ C<sub>μ</sub>1 (Cheng *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009) และตำแหน่ง <sup>433</sup>HEDLIEP<sup>439</sup> บริเวณ C<sub>μ</sub>3 เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับโมเลกุล C1q ในการกระตุ้นระบบ Complement แบบ Classical pathway (Roitt *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 การตรวจสอบตำแหน่ง Leader peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล (*On-slgM*) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0



2.2 การเปรียบเทียบความเหมือนและคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน IgM Heavy chain ของปลานิล (*On-slgM*) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *On-slgM* (Accession number: KC677037) ในส่วน Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) มาทำการเปรียบเทียบความเหมือน (Identity) และคล้ายคลึง (Similarity) กันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) มีค่าอยู่ระหว่าง 38.0-47.3% เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ มนุษย์ ปลาโลมา วัว หนู และตุ่นปากเป็ด เป็นต้น และมีค่าระหว่าง 38.8-41.4% เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก ได้แก่ ซาลาแมนเดอร์ เป็ดและไก่ เป็นต้น ส่วนในกลุ่มของปลาทั้งปลากระดูกแข็งและปลาดุกอ่อนมีค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 38.0-67.0% และมีค่าความเหมือนกันของกรดอะมิโน (Amino acid identity) มีค่าอยู่ระหว่าง 25.8-28.8% เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีค่าระหว่าง 24.2-27.2% เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก ส่วนในกลุ่มของปลามีค่าความเหมือนของกรดอะมิโนระหว่าง 26.4- 55.4% (ตารางที่ 5) และเมื่อพิจารณาถึงค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (Similarity) พบว่า *On-slgM* ของปลานิล ในส่วน Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) มีค่าสูงที่สุดกับ IgM heavy chain ในส่วน Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) ของปลา Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) โดยมีค่าเท่ากับ 75.0%

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *On-slgM* กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank

Name	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
		Nucleotide	Amino acid	
<b>Higher vertebrates</b>				
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	CAA47708	40.2	28.8	47.0
Dolphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )	AAG40853	40.2	26.9	45.7
Cow ( <i>Bos taurus</i> )	AAN60017	47.3	26.4	46.2
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	CAC20701	41.2	25.8	46.2
Platypus ( <i>Ornithorhynchus anatinus</i> )	AA037747	38.0	28.2	46.9
Salamander ( <i>Pleurodeles waltl</i> )	CAE02685	41.4	27.2	47.6
Duck ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	AAA68605	39.3	24.2	51.5
Chicken ( <i>Gallus gallus</i> )	CAA25762	38.8	25.9	47.9
<b>Cartilaginous fish</b>				
Antarctic skate ( <i>Bathyraja eatonii</i> )	ACU11614	47.7	28.2	46.1
Nurse shark ( <i>Ginglymostoma cirratum</i> )	AAT76789	38.1	28.9	49.0
<b>Teleost fish</b>				
African lungfish ( <i>Protopterus aethiopicus</i> )	AAO52809	38.0	26.4	47.2
Long nose gar ( <i>Lepisosteus osseus</i> )	AAC59688	41.9	33.9	52.1
Bowfin ( <i>Amia calva</i> )	AAC59687	52.1	34.4	54.0
European eel ( <i>Anguilla anguilla</i> )	ABM87939	52.0	34.7	57.5
Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	AAT67447	43.5	34.2	55.1
Grass Carp ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )	ABD76396	43.6	34.1	54.2
Haddock ( <i>Melanogrammus aeglefinus</i> )	CAH04753	46.1	34.8	55.5
Rainbow trout ( <i>Onchorynchus mykiss</i> )	AAB27359	50.6	41.2	64.9
Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	AAB24064	50.8	40.3	64.0
Japanese pufferfish ( <i>Takifugu rubripes</i> )	BAD26619	52.2	45.1	63.6
Snakehead ( <i>Channa argus</i> )	ACF49353	60.3	48.5	67.2
Halibut ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> )	AAF69488	56.0	49.2	65.4
Japanese flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	BAB60868	56.6	49.2	66.1
Grouper fish ( <i>Epinephelus coioides</i> )	AAX78211	62.6	55.4	75.0
Mandarin fish ( <i>Siniperca chuatsi</i> )	AAQ14845	60.2	52.2	67.4
Tristan klipfish ( <i>Bovichtus diacanthus</i> )	ACH87158	67.0	51.6	69.6
Black rockcod ( <i>Notothenia coriiceps</i> )	AAL99934	58.2	49.1	65.9
Antarctic fish ( <i>Histriodraco velifer</i> )	ABW77756	56.5	48.6	68.2
Ploughfish ( <i>Gymnodraco acuticeps</i> )	ABY54906	57.9	48.8	66.1
Antarctic fish ( <i>Pagetopsis macropterus</i> )	ABW77754	56.8	48.6	65.5
Icefish ( <i>Chaenocephalus aceratus</i> )	AAL99930	64.4	49.9	67.2
Antarctic fish ( <i>Chionodraco hamatus</i> )	ABW81218	57.6	48.7	66.5

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *On-slgM* (Accession number: KC677037) บริเวณ Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) ของสาย Heavy chain กับลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีนนี้ในสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งได้แก่ *Epinephelus coioides* (Grouper fish; AAX78211), *Siniperca chuatsi* (Mandarin fish; AAQ14845), *Bathyraja eatonii* (Atlantic Skate; ACU11614), *Ginglymostoma cirratum* (Shark; AAT76789), *Mus musculus* (Mouse; CAC20701), *Bos taurus* (Cow; AAN60017) และ *Homo sapiens* (Human; CAA47708) โดยทำ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *On-slgM* บริเวณ Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) มีความยาวเท่ากับ 445 Residues ซึ่งมีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *slgM* บริเวณ Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) ในทุกสิ่งมีชีวิตที่นำมาพิจารณาซึ่งมีความยาวของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 436-455 Residues โดย *On-slgM* บริเวณ Constant region ( $C_{\mu}1-C_{\mu}4$ ) นี้มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกลุ่มของปลากระดูกแข็งมากที่สุดได้แก่ปลา Grouper fish เท่ากับ 448 Residues และเมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของ *On-slgM* บริเวณ Constant region ของสาย Heavy chain สามารถแบ่งเป็น Domain ต่าง ๆ ได้ 4 Domains ได้แก่  $C_{\mu}1$ ,  $C_{\mu}2$ ,  $C_{\mu}3$  และ  $C_{\mu}4$  (ภาพที่ 9) และพบว่ามีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (Conserved) ทั้งหมด 45 ตำแหน่ง ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนที่อยู่ภายในบริเวณ  $C_{\mu}1$  ประกอบด้วย Proline (P) 3 ตำแหน่ง, Leucine (L) 2 ตำแหน่ง, Cysteine (C) 3 ตำแหน่ง, Glycine (G) 1 ตำแหน่ง, Tryptophan (W) 2 ตำแหน่งและ Serine (S) 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโนที่อยู่ภายในบริเวณ  $C_{\mu}2$  ประกอบด้วย Cysteine (C) 2 ตำแหน่ง, Phenylalanine (F) 1 ตำแหน่ง, Tryptophan (W) 2 ตำแหน่ง, Serine (S) 1 ตำแหน่ง, Leucine (L) 1 ตำแหน่งและ Threonine (T) 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโนที่อยู่ภายในบริเวณ  $C_{\mu}3$  ประกอบด้วย Proline (P) 1 ตำแหน่ง, Cysteine (C) 2 ตำแหน่ง, Tryptophan (W) 2 ตำแหน่ง, Valine (V) 1 ตำแหน่งและ Histidine (H) 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโนที่อยู่ภายในบริเวณ  $C_{\mu}4$  ประกอบด้วย Proline (P) 3 ตำแหน่ง, Valine (V) 1 ตำแหน่ง, Leucine (L) 1 ตำแหน่ง, Glutamic acid (E) 1 ตำแหน่ง, Cysteine (C) 2 ตำแหน่ง, Tryptophan (W) 2 ตำแหน่ง, Phenylalanine (F) 1 ตำแหน่ง, Serine (S) 1 ตำแหน่ง, Histidine (H) 1 ตำแหน่ง, Glycine (G) 1 ตำแหน่งและ Threonine (T) 1 ตำแหน่ง ซึ่งในจำนวนเหล่านี้มีกรดอะมิโน Cysteine (C) และ Tryptophan (W) ที่พบเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างตติยภูมิของโมเลกุล IgM heavy chain โดยกรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>14</sup> ในบริเวณ  $C_{\mu}1$  คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะ Inter disulfide bridge กับ Ig light chain และในบริเวณ  $C_{\mu}1$  ยังพบกรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>26</sup> ที่คาดว่าจะใช้ในการสร้างพันธะ Intra disulfide bride กับ กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>83</sup>, ในบริเวณ  $C_{\mu}2$  กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>129</sup> จะสร้างพันธะ Intra disulfide bride กับ

กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>189</sup>, ในบริเวณ C<sub>μ</sub>3 กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>240</sup> จะสร้างพันธะ Intra disulfide bridge กับ กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>295</sup> และในบริเวณ C<sub>μ</sub>4 กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>341</sup> จะสร้างพันธะ Intra disulfide bridge กับ กรดอะมิโน Cysteine (C)<sup>402</sup> โดยในระหว่างคู่ของกรดอะมิโน Cysteine (C) เหล่านี้จะมีกรดอะมิโน Tryptophan (W) แทรกอยู่ในตำแหน่งที่ 40, 75, 143, 181, 253, 287, 355 และ 393 ตามลำดับ เพื่อทำหน้าที่ในการสร้างความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนในระดับตติยภูมิ (Tertiary structure) (Williams and Barclay, 1988) นอกจากนี้ยังพบ Cysteine (C)<sup>442</sup> ซึ่งน่าจะมีส่วนสำคัญในการสร้างรูปแบบโครงสร้าง Tetrameric ของโมเลกุล IgM heavy chain เช่นเดียวกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, สัตว์ปีก, สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ, ปลากระดูกอ่อน และปลากระดูกแข็ง (Pilstrom and Bengten, 1996) (ภาพที่ 9)

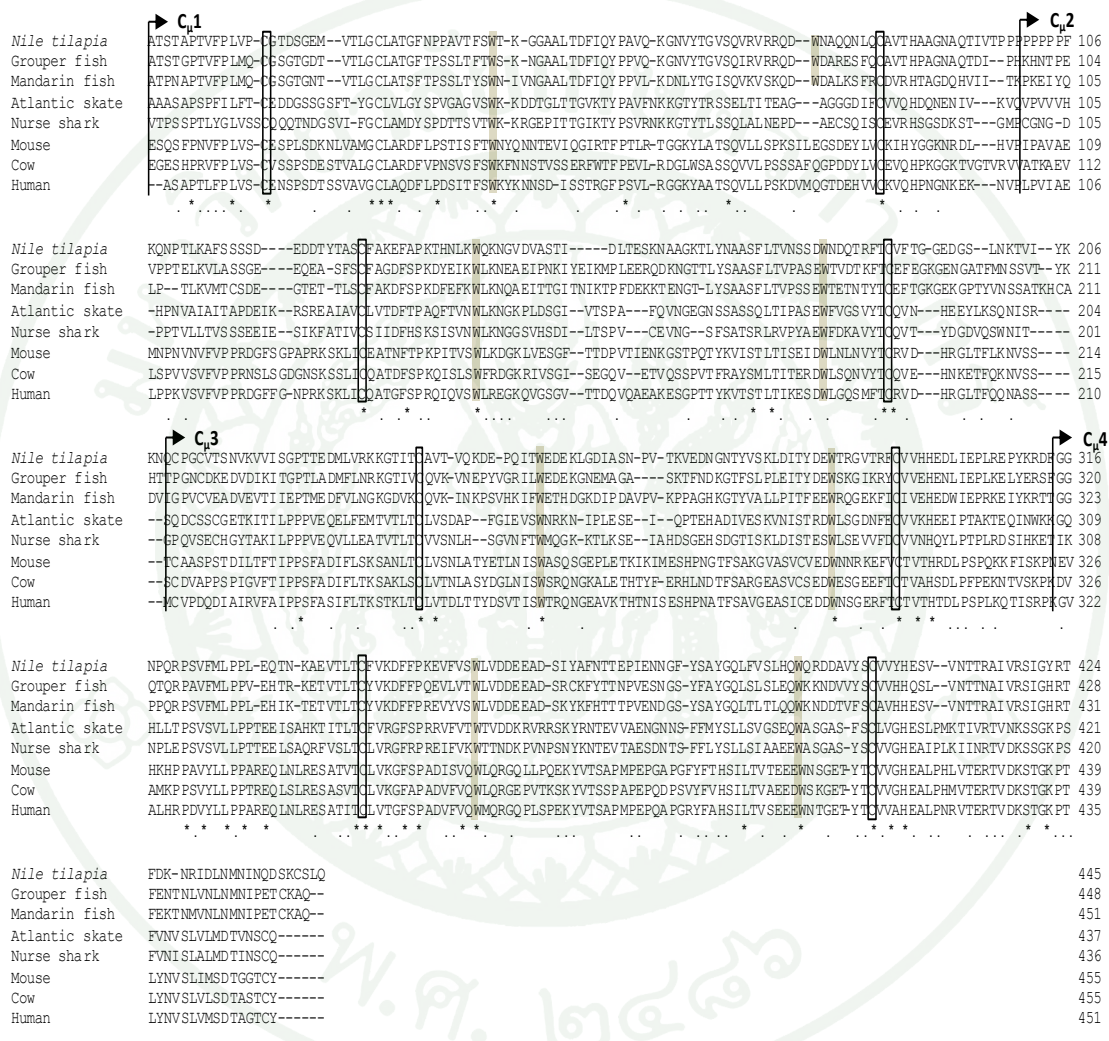
### 2.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน On-IgM กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ Constant regions (C<sub>μ</sub>2-C<sub>μ</sub>4) ของยีน IgM heavy chain ในปลาชนิด (Accession number: KC677037) จากการสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธีของ UPMGA โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1 ที่กำหนดให้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีการรายงานลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ 38 ชนิด ได้แก่ Human, Mouse, Rat, Cow, Dolphin, Platypus, Turtle, Slider, Duck, Chicken, Newt, Antarctic skate, Nurse shark, African lungfish, Bowfin, Longnose gar, European eel, Zebrafish, Grass Carp, Haddock, Rainbow trout, Atlantic salmon, Japanese pufferfish, Snakehead, Atlantic halibut, Japanese flounder, Orange-spotted grouper, Mandarin fish, Tristan klipfish, Striped trumpeter, Large yellow croaker, Humphead snapper, Icefish, Antarctic teleost fish, Cod icefish, Antarctic hemoglobin-free Fish, Blackfin icefish และ Antarctic fish (ตารางที่ 5) และนำลำดับกรดอะมิโนของยีน IgD heavy chain ในรูป Secreted form ของปลา Mandarin (Accession number: ACO88906) และ Grouper fish (Accession number: AEN71108) มาเป็น Out group พบว่า Phylogenetic tree ของยีน IgM heavy chain ในรูป Secreted form นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Superclass Tetrapoda) ประกอบด้วย สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก IgM ของปลา (Superclass Pisces) ที่ประกอบด้วยกลุ่มของปลากระดูกอ่อน (Class Chondrichthyes) ซึ่งในการวิเคราะห์นี้พบว่า

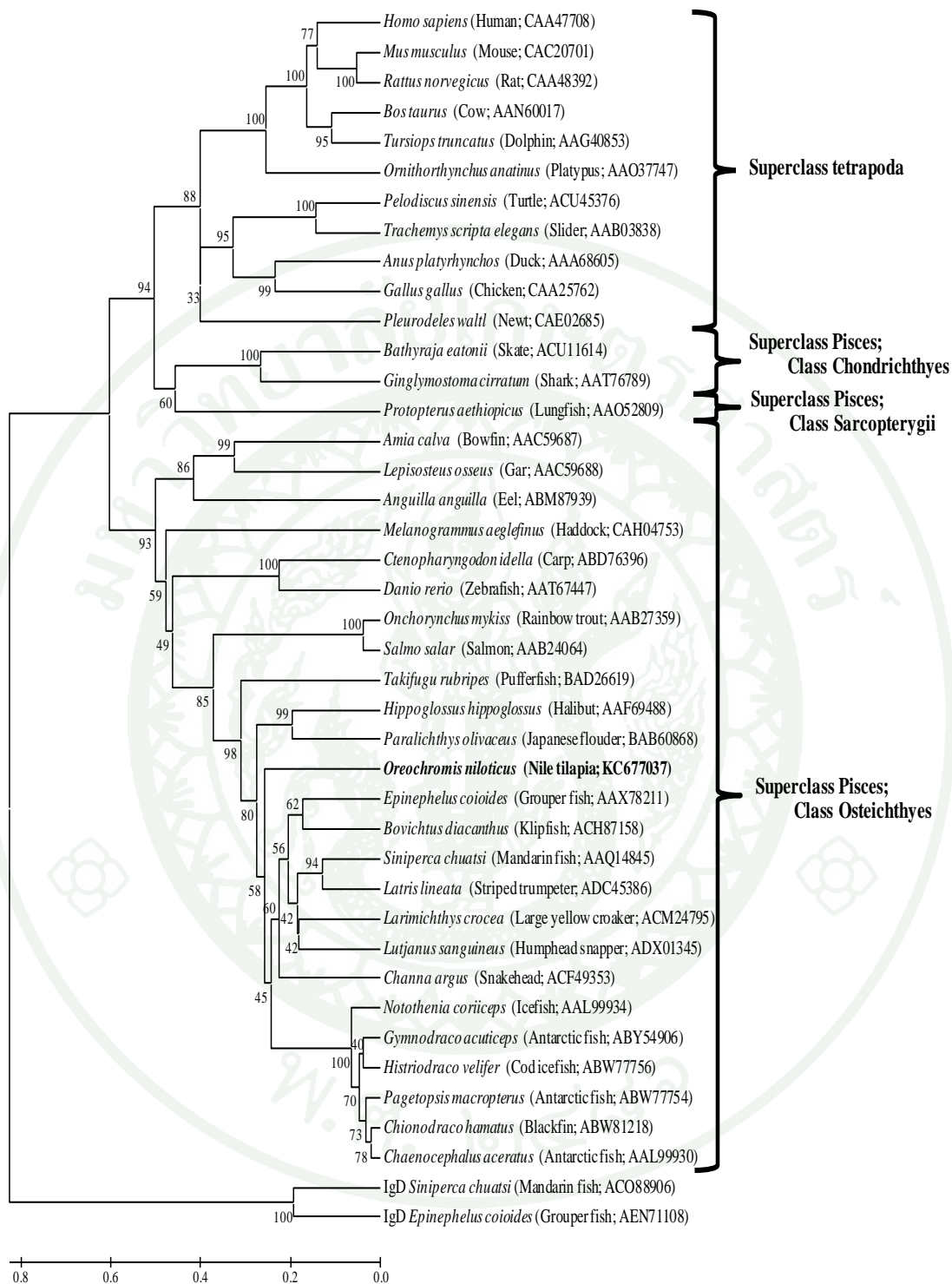
Lung fish (Class Sarcopterygii) ยังถูกจัดให้รวมอยู่ในกลุ่มนี้อีกด้วย อีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่มของปลา (Superclass Pisces) ในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง (Class Osteichthyes) เท่านั้น (ภาพที่ 10) ซึ่งจากการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน IgM heavy chain ในรูป Secreted form ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า IgM ของปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous fish) เช่น ฉลามและกระเบน มีวิวัฒนาการจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงซึ่งปลากระดูกอ่อนเหล่านี้จัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรก ๆ ที่มีการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในรูปสารน้ำ (Humoral immune response) (Kumar and Hedges, 1998; Morrison and Nowak, 2002) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้สามารถพบได้ตั้งแต่ปลากระดูกอ่อนไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่นมนุษย์แต่ยังไม่ปรากฏพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) ทั้งในส่วนของแมลง ปูและกุ้ง (Du Pasquier, 2001) ส่วนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ IgM ในปลาปอด (Dipnoi) ที่ถูกจัดรวมอยู่ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงเนื่องมาจากปลาปอดเป็นปลาที่มีอวัยวะในการหายใจคล้ายกับปอดของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดยไม่ใช่เหงือกเหมือนปลาชนิดอื่น ๆ (Romer, 1967) ซึ่ง Romer (1963) กล่าวว่าปลาปอดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มของ Crossopterygians (Coelacanth) ซึ่งเป็นบรรพบุรุษของสัตว์เลื้อยคลาน (Amphibians) และสัตว์ชั้นสูง (Higher vertebrates) และสอดคล้องกับการรายงานของ Ota *et al.* (2002) ที่กล่าวว่า IgM heavy chain ของปลาปอดมีความคล้ายคลึงกับ IgM heavy chain ของสัตว์ในกลุ่ม Tetrapods มากกว่ากลุ่มของปลา Neopterygian ได้แก่ Bowfins และ Sturgeons

ส่วน On-sIgM ของปลานิลนั้นจัดอยู่ในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง โดยมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากที่สุดกับปลาในกลุ่มของ Order Perciformes ได้แก่ Orange-spotted grouper, Mandarin fish, Tristan klipfish, Striped trumpeter, Large yellow croaker, Humphead snapper และ Snakehead และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการรองลงมากับปลากลุ่ม Antarctic notothenioid fishes (Order: Perciformes, Suborder: Notothenioidei) ได้แก่ Icefish, Antarctic teleost fish, Cod icefish, Antarctic hemoglobin-free Fish, Blackfin icefish และ Antarctic fish นอกจากนี้ On-sIgM ยังมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับปลาในกลุ่มของ Order Pleuronectiformes ได้แก่ Halibut และ Japanese flounder ซึ่งปลาในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับปลาในกลุ่มของ Order Tetraodontiformes ได้แก่ Pufferfish อีกด้วย ซึ่งจากผลที่ได้จากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน On-sIgM กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน On-sIgM กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 5) โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน IgM มีค่าความเหมือนและความคล้ายคลึงกับ IgM heavy chain

ของปลา Orange-spotted grouper fish มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่ายีน IgM heavy chain ของสิ่งมีชีวิตของทั้ง 2 กลุ่มแยกออกมาจากกลุ่ม Control out group ซึ่งได้แก่ IgD ของ *Siniperca chuatsi* (Mandarin fish; ACO88906) และ *Epinephelus coioides* (Grouper fish; AEN71108) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน On-IgM กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยใช้วิธี Multiple alignment กรอบสี่เหลี่ยมและตัวอักษรแรเงาแสดงถึงกรดอะมิโนอนุรักษ์ Cysteine (C) และ Tryptophan (W) ตามลำดับ สัญลักษณ์ \* แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน สัญลักษณ์ . แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูงและตำแหน่งที่มีลูกศรชี้แสดงถึงส่วนเริ่มต้นของ Domain ต่าง ๆ ของ IgM heavy chain บริเวณ Constant region



ภาพที่ 10 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน IgM heavy chain ในปลานิล (*On-sIgM*) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank พยัญชนะตัวเอียงแสดงถึงชื่อ Species ของสิ่งมีชีวิต ส่วนที่อยู่ในวงเล็บคือชื่อสามัญและ Accession number ในฐานข้อมูล GenBank ตามลำดับ

จากข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ cDNA ของยีน IgM heavy chain ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าได้มีการศึกษาทั้งในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงและกลุ่มของปลา โดยการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์ปีก เป็นต้น ส่วนในกลุ่มของปลาแบ่งออกได้เป็นกลุ่มของปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งหลายชนิด ได้แก่ ปลา Bowfin (*Amia calva*) และ Longnose gar (*Lepisosteus osseus*) (Wilson *et al.*, 1995), Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) (Lundqvist *et al.*, 2002) ปลา Pufferfish (*Takifugu rubripes*) (Saha *et al.*, 2005) ปลา Grouper fish (*Epinephelus coioides*) (Cheng *et al.*, 2006) ปลา Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), Sterlts sturgeon (*Acipenser ruthenus*), Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) และ Great sturgeon (*Huso huso*) (Wang and Liu, 2007) ปลา European eel (*Anguilla anguilla*) (Jianjun *et al.*, 2009) ปลา Large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) (Tian *et al.*, 2009) ปลา Antarctic skate species ประกอบด้วย *Bathyraja eatonii*, *Bathyraja albomaculata*, *Bathyraja brachyurops* และ *Amblyraja georgiana* (Coscia *et al.*, 2012) ปลา Red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) (Mao *et al.*, 2012) และปลา Spiny dogfish (*Squalus acanthias*) (Smith *et al.*, 2012) เป็นต้น

จากการศึกษาวิจัยของ Wilson *et al.* (1995) ในปลา Holostean เช่นปลา Bowfin (*Amia calva*) และ Longnose gar (*Lepisosteus osseus*) โดยทำการสกัด mRNA จากม้ามเพื่อนำมาทำเป็นแม่แบบ (DNA template) ในการโคลน cDNA ของยีน IgM heavy chain ด้วยวิธี RACE PCR ซึ่งได้ทำการศึกษาคูณลักษณะพบว่าเป็น cDNA ของยีน IgM heavy chain ในรูป Secretory form นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนอนุรักษ์ชนิด Cysteines ในบริเวณ C<sub>μ</sub>4 ซึ่งมีความสำคัญในการเป็น Intradomain disulfide bridges และเกี่ยวข้องกับ IgM polymerization และกรดอะมิโนอนุรักษ์ชนิด Cysteines ในบริเวณ C<sub>μ</sub>1 มีความเกี่ยวข้องกับ H-L chain disulfide bonding และคาดว่ากรดอะมิโน Cysteines ในบริเวณ C<sub>μ</sub>2 และ C<sub>μ</sub>3 จะมีความสำคัญในการเกิด Inter heavy chain disulfide bonding นอกจากนี้ยังพบบริเวณ Cryptic splice donor sites ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการ Alternative splicing ที่ใช้ในการสร้าง IgM membrane-bound form (Pilstrom and Bengten, 1996) ทางด้านปลาย 3' ใกล้กับบริเวณ C<sub>μ</sub>3 และ C<sub>μ</sub>4 อีกด้วย

Lundqvist *et al.* (2002) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain ใน Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) ที่ได้มาจากห้องสมุด cDNA ของ Peripheral blood leukocytes

พบว่า cDNA ของยีน IgM heavy chain มีส่วนที่เป็น Secretory tail ประกอบอยู่ นอกจากนี้ยังมี การค้นพบ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในรูป Membrane-bound form ซึ่งได้มาจากการทำ 3' RACE PCR รวมทั้งพบบริเวณ Cryptic splice site ภายใน Exon 4 อีกด้วย การศึกษาคุณลักษณะ ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในรูป Secretory form พบกรดอะมิโนอนุรักษ์ชนิด Cysteines ที่มีความสำคัญในการเกิดพันธะ Disulfide ของ Inter และ Intra H chain และการเกิด H-L chain disulfide bonding นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า ยีน IgM heavy chain ในปลา Bottlenose dolphin มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนมมากที่สุด

Saha *et al.* (2005) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลา Pufferfish (*Takifugu rubripes*) ซึ่งได้มาจากการทำ RACE PCR โดยใช้ DNA template จากห้องสมุด cDNA ของม้าม เมื่อทำการศึกษาคูณลักษณะพบว่าสามารถพบ cDNA ของยีน IgM heavy chain ได้ทั้งใน รูป Secreted form และ Membrane-bound form โดยในรูป Membrane-bound form นั้นจะ ไม่พบบริเวณ C<sub>μ</sub>4 domain และ Transmembrane domain ไปเชื่อมต่ออยู่กับปลาย 3' ของ C<sub>μ</sub>3 domain เช่นเดียวกับในปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนอนุรักษ์ Cysteine และ Tryptophan ซึ่งมีความสำคัญต่อโครงสร้างและการคงตัวของ Tertiary structure ของโปรตีน IgM รวมทั้งยังพบ Putative N-linked glycosylation sites (N-X-S/T) 5 ตำแหน่ง อีกด้วย

Cheng *et al.* (2006) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain จาก Whole serum ของปลา Grouper fish (*Epinephelus coioides*) พบว่าเป็น cDNA ของยีน IgM heavy chain ใน รูป Secreted form และมี Conserved cysteine (C) residues 3 ตำแหน่ง ซึ่งมีความสำคัญในการ เกิด Inter- และ intra-chain disulfide bridges รวมทั้งมี Tryptophan (W) residues 9 ตำแหน่ง ที่พบในบริเวณ Constant region นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของ Potential glycosylation sites ประกอบด้วย NGT, NSS และ NTT ที่ตำแหน่ง C<sub>μ</sub>2 and C<sub>μ</sub>4 domains และยังพบ Amino acid motifs ประกอบด้วย <sup>304</sup>Phe/ Tyr-X-Cys-X-Val-X-His<sup>310</sup> และ <sup>310</sup>His-X-Asp-X-X-X-Pro<sup>316</sup> พบในบริเวณ C<sub>μ</sub>3 domain อีกด้วย

Tian *et al.* (2009) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain จากปลา Large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) จากห้องสมุด cDNA ของม้าม ซึ่งพบว่าเป็น IgM secretory form เมื่อทำการศึกษาความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และ กรดอะมิโนของ cDNA ของยีน IgM heavy chain กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่ามีค่าความเหมือน

เท่ากับ 35.0-61.0% เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น ๆ และมีค่าความเหมือนเท่ากับ 27.78, 23.95 และ 31.50% เมื่อเปรียบเทียบกับคน (*Homo sapiens*), หนู (*Mus musculus*) และกบ (*Xenopus laevis*) ตามลำดับ และพบว่ามีค่าความเหมือนสูงสุดกับปลา *Epinephelus coioides* เท่ากับ 61.0% นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนอนุรักษ์ Cysteine residues 3 ตำแหน่ง กรดอะมิโนอนุรักษ์ Trypsin residues 8 ตำแหน่ง และ Potential N-glycosylated sites 3 ตำแหน่ง ในบริเวณ Constant region นอกจากนี้ยังพบ Motif ต่าง ๆ ได้แก่ <sup>61</sup>GKGLEW<sup>66</sup>, <sup>123</sup>FDYWGKGT-VTV-S<sup>136</sup>, <sup>217</sup>FQCAVTH<sup>223</sup> และ <sup>439</sup>HSEWLEP<sup>445</sup> อีกด้วย

Coscia *et al.* (2012) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลา Antarctic skates ที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยมี mRNA ที่สกัดได้จากม้ามเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งโครงสร้างของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ประกอบด้วย C<sub>μ</sub>1, C<sub>μ</sub>2, C<sub>μ</sub>3, C<sub>μ</sub>4 และ Secretory region และพบตำแหน่ง Putative N-glycosylation site 1 ตำแหน่งที่บริเวณ C<sub>μ</sub>1 domain บริเวณ C<sub>μ</sub>2 2 ตำแหน่ง บริเวณ C<sub>μ</sub>3 1 ตำแหน่งและบริเวณ C<sub>μ</sub>4 3 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบ Extracysteines 4 ตำแหน่งที่ไม่เกี่ยวข้องกับ Intradomain bonds พบในบริเวณ C<sub>μ</sub>1 domain 1 แห่ง ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมต่อ Heavy chain กับ Light chain และพบ 2 ตำแหน่งที่บริเวณ C<sub>μ</sub>3 และอีก 1 ตำแหน่งที่บริเวณ Secretory tailpiece

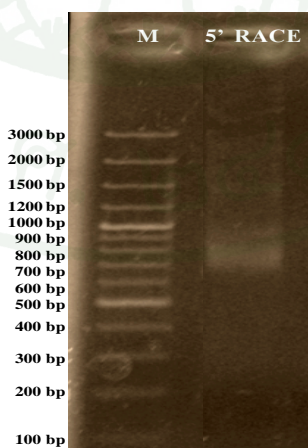
Mao *et al.* (2012) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM mu chain ในปลา Red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) โดยทำการสกัด mRNA จาก Thymus และ Head kidney แล้วมาทำ RACE PCR เพื่อให้ได้ cDNA ของยีน IgM mu chain ที่สมบูรณ์ที่ประกอบด้วย Leader peptide (L), Variable domain (V<sub>H</sub>), Constant domain C<sub>μ</sub>1, C<sub>μ</sub>2, Hinge, C<sub>μ</sub>3, C<sub>μ</sub>4, และ C-terminus ซึ่งเป็นคุณลักษณะของ IgM ในรูป Secretory form

Smith *et al.* (2012) ทำการศึกษา cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลา Spiny dogfish (*Squalus acanthias*) โดยทำการสกัด mRNA จากม้ามแล้วมาทำ 5' และ 3' RACE PCR ซึ่งจากการศึกษาคุณลักษณะพบว่าเป็น Secretory form และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ Elasmobranch ชนิดอื่น ๆ พบว่า Spiny dogfish IgM H chain มีความคล้ายคลึงกับ Horn shark (75%) และ Banded houndshark (70%) นอกจากนี้จากการศึกษาคุณลักษณะยังพบว่า cDNA ของยีน IgM heavy chain นี้ไม่พบกรดอะมิโนอนุรักษ์ Cysteine ในบริเวณ C1-C2 domain เลย

### 3. การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Variable domain ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในปลานิล

#### 3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Variable ( $V_H$ ) segments ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain

เพื่อศึกษาความหลากหลายของ Variable ( $V_H$ ) domain ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลานิล โดยการสร้าง cDNA library ของ Variable ( $V_H$ ) domain ของ cDNA ของยีน Ig heavy chain ด้วยเทคนิค 5' RACE PCR โดยใช้ 5' RACE cDNA template ที่สังเคราะห์จากม้ามและไตส่วนหน้าของปลานิล ทำให้ได้ PCR product ขนาดประมาณ 700-900 bp (ภาพที่ 11) และเมื่อโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy Vector และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ทางด้าน 5' และ 3' ด้วย Universal primers ชนิด M13 reverse primer และ M13 forward primer ตามลำดับ แล้วทำให้ได้ cDNA โคลนที่บรรจุข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Variable ( $V_H$ ) domain ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain จำนวนทั้งสิ้น 210 โคลนและเมื่อทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันออกทำให้ได้โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Variable ( $V_H$ ) domain ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ที่ไม่ซ้ำกันจำนวนทั้งสิ้น 126 โคลน ซึ่งคิดเป็นค่าความซ้ำซ้อนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Redundancy) ที่ได้จากการโคลนเท่ากับ 40% โดย cDNAs ทั้ง 126 โคลนนี้ได้ถูกบันทึกไว้ใน GenBank database โดยมี Accession number ตั้งแต่ KC708098-KC708223



ภาพที่ 11 ขนาดของ 5' RACE PCR products ของ Variable ( $V_H$ ) domain ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล บน Agarose gel โดยที่ M คือ 100 bp Plus DNA Ladder

ในการสร้างความหลากหลายของโมเลกุล Immunoglobulin ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเกิดขึ้นเฉพาะใน B cells เท่านั้น ซึ่งถือว่าเป็นปรากฏการณ์ที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่มีทั้งจำนวนและความหลากหลายสูง ซึ่งจากการรายงานของ Abbas *et al.* (2007) พบว่าใน 1 วงชีวิต (Life span) ของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ อาจต้องเผชิญกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมมากกว่า  $10^9$  ชนิด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของยีน ซึ่งใช้ในการสร้างโมเลกุลของ Immunoglobulin ที่เกิดจากการรวมตัวกันของ Segments ต่าง ๆ (Somatic rearrangement) ไม่ว่าจะเป็น  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$  และ  $C_H$  ของ Heavy chain genes ซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด จะพบว่าองค์ประกอบที่มีอยู่เหล่านี้จะไม่เพียงพอต่อการสร้าง Immunoglobulin ให้ตอบสนองต่อจำนวนของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่มีอยู่อย่างมหาศาลดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องทำให้ทราบว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงจะมีกลไกพิเศษหลาย ๆ กลไกมาช่วยในการสร้างความหลากหลายของโมเลกุลของ Immunoglobulin ให้มีจำนวนเพียงพอสำหรับรองรับกับปริมาณเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่จะบุกรุกเข้ามาในร่างกาย ที่สำคัญ ๆ มีอยู่ 7 กลไก (Warr, 1995) คือ 1) การมี Multiple germ-line segments ของยีนที่ใช้ในการสร้าง Immunoglobulin ทั้ง Heavy และ Light chains ซึ่งมีจำนวนยีนมากมายหลายชุด โดยจะพบว่ายีน Immunoglobulin heavy chain ประกอบไปด้วยยีน  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  เชื่อมต่อกันถึง  $C_H$  genes เรียงต่อกัน สำหรับ Light chain ประกอบไปด้วยยีน  $V_L$  และ  $J_L$  เชื่อมต่อกันถึง  $C_L$  genes เรียงต่อกันเป็นรูปแบบที่จำเพาะที่เรียกว่า "Translocational models หรือ Translocational arrangement"

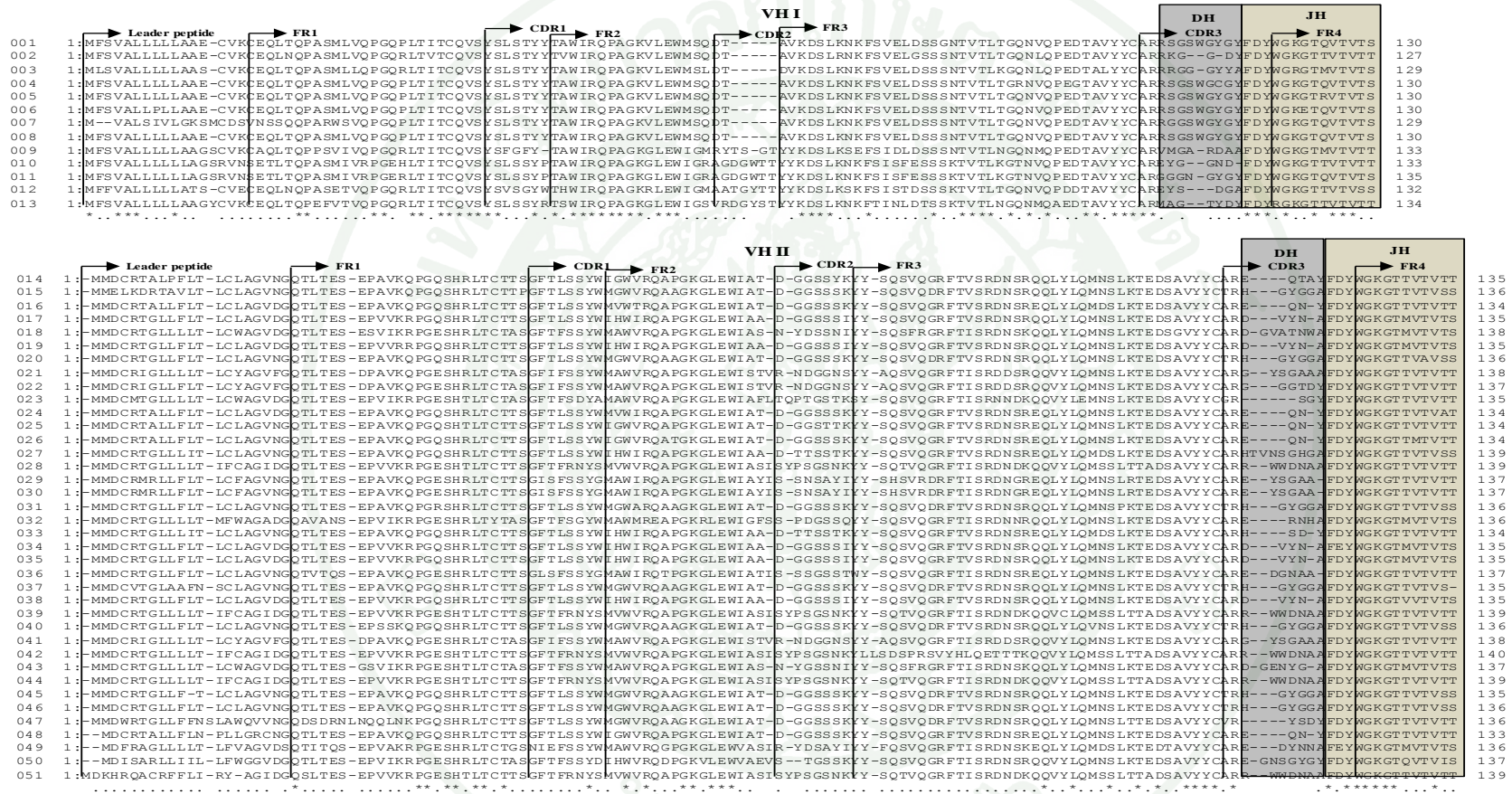
2) Combinatorial V(D)J joining กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในช่วงการพัฒนาคตัวของ B cells ในระยะ Pro-B cells โดยจะมีการเชื่อมต่อกันของยีน  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  แบบสุ่ม ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ซึ่งสร้างจาก Rearrangement activating gene (RAG) เพื่อให้ได้รูปแบบของ VDJ เพียง 1 แบบต่อ B cell 1 เซลล์ ดังนั้นจึงทำให้ได้ Variable region มากมาย 3) Junctional imprecision เป็นขั้นตอนซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาคตัวของ B cells จากระยะ Pro-B cells ไปเป็น Pre-B cells โดย  $D_H$  segments ที่อาจเกิด P หรือ N nucleotide แล้วจะมาเชื่อมต่อกันกับ  $V_H$  และ  $J_H$  อย่างอิสระไร้ทิศทาง ทำให้เกิด Nucleotides หรือ Peptides สายใหม่ของ Immunoglobulin ได้เช่นกัน

4) Combinatorial diversity of heavy and light chains (HL pairing) กระบวนการนี้เป็นการสร้างความหลากหลายของโมเลกุล Immunoglobulin โดยอาศัยการรวมตัวกันของ Heavy และ Light chains ซึ่งจะเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาคตัวของ B cells ในระยะ Pre-B cells ไปจนถึงระยะ Immature B cells ซึ่งในการสร้างโมเลกุล Immunoglobulin ที่สมบูรณ์นั้นจะเกิดการรวมตัวกันของ Heavy และ Light chains อย่างสุ่ม 5) Junctional diversity เป็นกระบวนการที่ใช้ในการสร้างความหลากหลายของ Variable region บนโครงสร้างของ Immunoglobulin ในบริเวณ

Complementarity determining region 3 (CDR3) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งใน Heavy และ Light chains โดยจะมีการนำ P และ N nucleotides ซึ่งเป็น Nucleotides ที่ไม่ได้อยู่ใน Germline มาเพิ่มหรือลดบนตำแหน่งที่เชื่อมต่อกันระหว่าง  $V_H-D_H$  และ  $D_H-J_H$  โดยเป็นผลมาจากการทำงานของ เอนไซม์ Terminaldeoxytransferase (TdT) ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของ กรดอะมิโนที่เป็นโปรตีนชนิดใหม่ที่สามารถจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้อย่างหลากหลายมากยิ่งขึ้น 6) Somatic hypermutation ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นบนตำแหน่งของ Variable region ของ Immunoglobulin ภายหลังจากที่ Naïve B cells ได้พบกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่มีความจำเพาะและเริ่มพัฒนาตัวเองให้กลายเป็น Mature B cells ในระหว่างการพัฒนาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนเพื่อให้ได้โครงสร้างของโปรตีน Immunoglobulin ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดนั้น ๆ ได้มากและแข็งแรงยิ่งขึ้น 7) Gene conversion เป็นกระบวนการที่ใช้ในการสร้างความหลากหลายของ Variable region ที่พบในกลุ่มสิ่งมีชีวิตบางชนิดเท่านั้น เช่น สัตว์ปีก กระต่าย วัว หมู และม้า ซึ่งพบว่าบนโครงสร้างของ Translocal model จะมี Pseudo V gene ( $\Psi V_H$ 's) จำนวนมากอยู่ทางด้านหน้าของ Functional V gene ที่มีเพียง 1 Segment ของทั้งสาย H และ L chains โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นหลังจากชิ้นส่วน Nucleotides สายสั้น ๆ ของ Pseudo V gene มาเชื่อมต่อกับ Functional  $V_H$  segment gene แบบสุ่มทำให้ได้  $V_H$  segments อันใหม่ที่มีความหลากหลาย หลังจากนั้นจึงรวมตัวกับ  $D_H$  และ  $J_H$  ก่อนที่จะรวมตัวกับ  $C_H$  ในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ที่ใช้ในการผลิต Immunoglobulin ต่อไป (Arakawa and Buerstedde, 2004)

โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNAs ทั้ง 126 โคลน ตั้งแต่ Leader sequence, FR1, CDR1, FR2, CDR2 และ FR3 มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (Nucleotide and amino acid identity) เพื่อใช้ในการจัดแบ่งกลุ่มของ  $V_H$  family โดยจะใช้เกณฑ์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) ที่มีค่ามากกว่า 80% ให้จัดอยู่ใน Family เดียวกัน จากการแบ่งกลุ่มดังกล่าวพบว่าสามารถจัดกลุ่มของ  $V_H$  family ได้เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่  $V_H$  I family มีสมาชิกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 13 โคลน (Accession number: KC708098- KC708110) คิดเป็น 10.32% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกัน ทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 80.1-99.7% และ 80.4-99.1% ตามลำดับ  $V_H$  II family มีสมาชิกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 38 โคลน (Accession number: KC708111-KC708148) คิดเป็น 30.16% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 80.2-99.7% และ 80.5-99.1% ตามลำดับ  $V_H$  III family มีสมาชิก

ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 23 โคลน (Accession number: KC708149-KC708171) คิดเป็น 18.25% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 80.2-99.2% และ 82.2-95.8% ตามลำดับ  $V_H$  IV family มีสมาชิกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 34 โคลน (Accession number: KC708172-KC708205) คิดเป็น 26.98% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 81.3-97.1% และ 80.2-96.6% ตามลำดับ  $V_H$  V family มีสมาชิกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 10 โคลน (Accession number: KC708206-KC708215) คิดเป็น 7.94% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 98.0-99.7% และ 88.2-99.1% ตามลำดับ  $V_H$  VI family มีสมาชิกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 4 โคลน (Accession number: KC708216-KC708219) คิดเป็น 3.17% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 89.8-90.1% และ 80.5-81.4% ตามลำดับ  $V_H$  VII family มีสมาชิกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 2 โคลน (Accession number: KC708220-KC708221) คิดเป็น 1.59% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่งความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในกลุ่มมีค่าเท่ากับ 94.1% และ 92.4% ตามลำดับ  $V_H$  VIII family (Accession number: KC708222) และ  $V_H$  IX family (Accession number: KC708223) มีสมาชิกกลุ่มละ 1 โคลน คิดเป็น 0.79% ของจำนวนโคลนที่ไม่ซ้ำกันทั้งหมด 126 โคลน ซึ่ง  $V_H$  แต่ละ Family มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 51.5-66.5% และ 25.8-58.6% ตามลำดับ (ภาพที่ 12) จากการจัดกลุ่ม  $V_H$  family ดังกล่าวยังพบว่า  $V_H$  II และ  $V_H$  IV family มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนภายในแต่ละกลุ่มสูงกว่า  $V_H$  families อื่น ๆ นอกจากนี้ในส่วนของ  $V_H$  II family จำนวน 34 โคลน จะมีรหัสเริ่มต้นที่แตกต่างจาก  $V_H$  families อื่น ๆ ซึ่งเริ่มด้วย "AUGAUG" ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ AUG codon เหล่านี้จะมีส่วนส่งเสริมทำให้กระบวนการแปลรหัสของ  $V_H$  families ทั้ง 2 นี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและง่ายยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับความถี่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ที่พบสูงถึง 30.16% (Kozak, 1998) ซึ่งลักษณะดังกล่าวก็สามารถพบได้ใน  $V_H$  families ในปลาหลายชนิดเช่น Emerald rockcod (*Trematomus bernacchii*), ปลา Channel catfish และปลา Zebrafish อีกด้วย (Coscia and Oreste, 2003)



ภาพที่ 12 การจับกลุ่มของ Variable ( $V_H$ ) domain family โดยที่สัญลักษณ์ \* แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน สัญลักษณ์ . แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูงและตำแหน่งที่มีลูกศรชี้แสดงถึงส่วนเริ่มต้นของ Domain ต่าง ๆ ของ IgM heavy chain ตัวอักษรในกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวและสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงถึงกรดอะมิโนในตำแหน่งของส่วน  $D_H$  และ  $J_H$  ตามลำดับ





### 3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Diversity ( $D_H$ ) segment ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล

จากการศึกษาความหลากหลายของบริเวณ  $D_H$  segments จาก cDNAs ทั้งหมด 126 โคลน โดยส่วนใหญ่จะเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่าง  $V_H$  segments โดยมี Conserved motif ที่สิ้นสุดเป็น YYCAR และ  $J_H$  segments ที่มี Conserved motif ที่เริ่มต้นเป็น FDYWG พบว่า จะมีกลไกที่มีการเติม (Addition) P และ N nucleotide บริเวณส่วนของ  $D_H$  segment อย่างชัดเจน ซึ่ง P nucleotide ที่พบประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้เหมือนกันทั้งจากหน้าไปหลังและหลังไปหน้า (Palindromic sequences) ได้แก่ GCGC, CGCG, GCGGCGCCGC, GCTAGC, CGTACG, CCGG, CAGCTG, AGCT, ACGT, TTTAAA, GGATCC และ AATT และพบ N nucleotide ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ GC กระจายตัวอยู่ทางด้าน 3' และ 5' ของ  $D_H$  segment เช่นเดียวกับการรายงานในปลา Emerald rockcod Coscia and Oreste (2003) และในกบ (Hsu *et al.*, 1989) รวมทั้งยังพบการสร้างความหลากหลายแบบ Inversion (D-D joining) เกิดขึ้นอยู่ภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  $D_H$  segment อีกด้วย (Hsu *et al.*, 1989) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์หลักของ  $D_H$  segment ได้แก่ TGGGG เกิดการ Inversion เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ GGGGT ในกลุ่มของ  $D_{HII}$  และมีการ Nucleotide addition ของลำดับนิวคลีโอไทด์ GGGGT และ GGGGCT เข้าไปอยู่ในกลุ่มของ  $D_{HII}$  และ  $D_{HV}$  ตามลำดับ รวมทั้งยังมีการเกิด Nucleotide deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มของ  $D_{HVI}$  อีกด้วย นอกจากนี้จากการจัดกลุ่ม  $D_H$  segment ตาม Motif ที่มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าสามารถจัดกลุ่ม  $D_H$  เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มของ  $D_{HI}$  ถึง  $D_{HVI}$  ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์หลักเป็น GCGGCG, TGGGA, GGCTAC, GGTGCT, GACGAA และ TACAA ตามลำดับ โดย  $D_{HI}$  มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 25 โคลน คิดเป็น 19.84% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 10 โคลนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน (Redundancy) จำนวน 15 โคลน คิดเป็น 11.90%  $D_{HII}$  มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 11 โคลน คิดเป็น 8.73% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 7 โคลนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันจำนวน 4 โคลน คิดเป็น 3.17%  $D_{HIII}$  มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 36 โคลน คิดเป็น 28.57% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 24 โคลนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันจำนวน 12 โคลน คิดเป็น 9.52%  $D_{HIV}$  มีจำนวนสมาชิกน้อยที่สุดเท่ากับ 7 โคลน คิดเป็น 3.17% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 7 โคลนและไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันเลย (0%)  $D_{HV}$  มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 9 โคลน คิดเป็น 7.14% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 7 โคลนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันจำนวน 2 โคลน คิดเป็น 3.17% และ  $D_{HVI}$  มีจำนวน

สมาชิกมากที่สุดเท่ากับ 38 โคลน คิดเป็น 30.16% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 7 โคลนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันจำนวน 31 โคลน คิดเป็น 24.60% (ภาพที่ 13)



	VH			JH		
	Tyr	Cys		Phe	Asp	Tyr
	Y	C		F	D	Y
<b>DH I</b>						
121	TAC	TGT	GCC AAA			TTT GAC TAC
069	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAT TAC
029	TAT	TGT	GCC CGA			TTT GAT TAC
021	TAT	TGT	GCT CGG			TTT GAT TAC
118	TAT	TGT	GTG CGT			TTT GAC TAC
041	TAT	TGT	GCT CGG			TTT GAT TAC
045	TAT	TGT	ACT CGA			TTT GAC TAT
013	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
068	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
010	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
<b>DH II</b>						
009	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
051	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAT TAC
036	TAT	TGT	GCC CGA			TTT GAT TAC
124	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
070	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
066	TAT	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
106	TAC	TGT	GTG AGA			TTT GAC TAC
<b>DH III</b>						
011	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
058	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
023	TAT	TGT	GGT CGA			TTT GAC TAC
065	TAT	TGT	GCC CAA			TTT GAC TAC
003	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
072	TAC	TGT	GCT CGG			TTT GAC TAC
018	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
123	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
119	TAC	TGC	GCC AAA			TTT GAC TAT
050	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
122	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
060	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
071	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
007	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
005	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
014	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
073	TAC	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
064	TAT	TGT	GCC CAA			TTT GAC TAC
022	TAT	TGT	GCT CGG			TTT GAC TAC
055	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
099	TAC	TGT	GCA CGT			TTT GAC TAC
002	TAC	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
052	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
033	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
<b>DH IV</b>						
102	TAC	TGT	GCA CGT			TTT GAC TAT
027	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAT
012	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAT
074	TAC	TGT	GCC AGT			TTT GAC TAT
057	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAT
081	TAC	TGT	GCA CGT			TTT GAC TAT
063	TAT	TGT	GCC AGA			TTT GAC TAC
<b>DH V</b>						
053	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
024	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
043	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
125	TAC	TGT	GCA CGG			TTT GAC TAC
082	TAC	TGT	GCA CGT			TTT GAC TAC
<b>DH VI</b>						
108	TAC	TGT	GCA CGT			TTT GAC TAC
126	TAC	TGC	GCT AGA			TTT GAC TAC
035	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
038	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
049	TAT	TGT	GCT CGA			TTT GAC TAC
062	TAT	TGT	GTT CGA			TTT GAC TAC
032	TAT	TGT	GCT CGG			TTT GAC TAC

ภาพที่ 13 ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D<sub>H</sub> segments โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านซ้ายมือคือ V<sub>H</sub> segments และลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านขวามือคือ J<sub>H</sub> segments ซึ่งตัวอักษรที่หนาแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์หลักของ D<sub>H</sub> segments ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึง Palindromic sequences กรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง Insertion ของ D<sub>H</sub> segments ที่มาจากกลุ่มอื่น ตัวอักษรหนาและเอียงแสดงถึง Inversion sequences และตัวอักษรที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมสีเข้มแสดงถึง Deletion sequences ในกลุ่มของ D<sub>H</sub>VI

### 3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายของ Joining ( $J_H$ ) segments ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล

จากการศึกษาความหลากหลายของ  $J_H$  segments จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region ทั้งหมด 126 โคลน โดยเริ่มตั้งแต่ Codon ที่ Encode motif FDYWG พบว่าสามารถจัดกลุ่มบริเวณ  $J_H$  segment ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มของ  $J_{HI}$  มีจำนวนสมาชิกน้อยที่สุดเท่ากับ 10 โคลน คิดเป็น 7.94% มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 95.2-97.6% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 4 โคลน กลุ่มของ  $J_{HII}$  มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 45 โคลน คิดเป็น 35.71% มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 81.0-97.6% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 14 โคลน กลุ่มของ  $J_{HIII}$  มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดเท่ากับ 55 โคลน คิดเป็น 43.65% มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 84.4-97.6% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 11 โคลน และกลุ่มของ  $J_{HIV}$  มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 16 โคลน คิดเป็น 12.70% มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 95.2-97.6% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันภายในกลุ่มเท่ากับ 4 โคลน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  $J_H$  segment ในแต่ละกลุ่มพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 1 Residue เท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นที่ยีน (Allelic variants) Stenvik *et al.* (2000) ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่ม  $J_{HI}$  พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 1 Residue ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่ม  $J_{HII}$  พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 1-5 Residues ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่ม  $J_{HIII}$  พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 1-2 Residues นอกจากนี้ในกลุ่ม  $J_{HIII}$  พบการเกิด Deletion และ Addition เกิดขึ้นในโคลนที่ 014 และ 062 อีกด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่ม  $J_{HIV}$  พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 1 และ 9 Residues (ภาพที่ 14)

## JH segments

```

JHI 001 TTTGACTACTGGGGGAAAGGAACACAAGTCACAGTAACTTCT
      005 -----G-----
      050 -----T-----
      006 -----A-----

      108 TTTGACTACTGGGGGAAAGGTACAATGGTTACAGTCACATCA
      076 -----G-----
      080 -----G-----
      018 --C-----
      034 ---G-----C-----C--G--T-----
      126 -----G-----A--
      017 -----C-----C--G--T-----
JHII 038 -----C--G--C--G--T-----
      053 -----A--C-----C--G--T-----
      003 -----G-----C-----
      058 -----TA-C-GT---
      121 -----T-----A--
      009 -----T--C--A--
      068 -----T--C-GT---

      014 TTTGACTACTGGGGAAAAGGGACAACACTGTGACTGTCACAACA
      062 -----G--ACA-CTGACTGTCACA---T--
      066 -----C-----
      067 -----G-----
      116 --C-----
JHIII 023 -----G-----
      024 -----G-----
      026 -----A-----
      065 -----A-----
      013 -----A-----
      052 -----T-C-----

      015 TTTGACTATTTGGGGAAAGGGACAACAGTCACTGTTTCATCA
      021 ---T--C-----A--A--C--G-----CA--A--
JHIV 020 -----G-----
      102 -----A-----

```

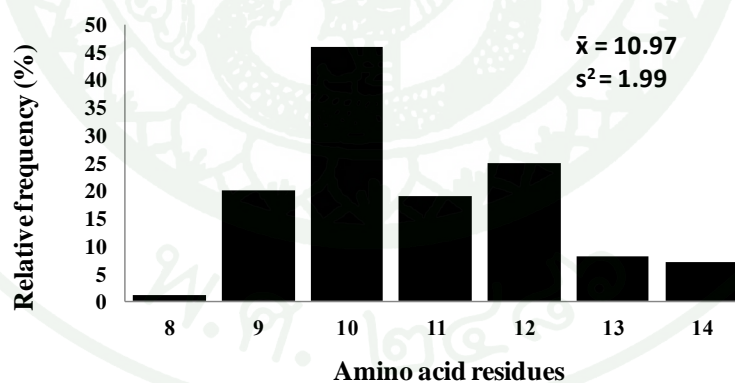
ภาพที่ 14 การจัดกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ J<sub>H</sub> segment ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region ทั้งหมด 126 โคลน

3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายและความแปรปรวนของกรดอะมิโนบนบริเวณ Complementarity determining region 3 (CDR3) ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล

เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า CDR3 บน Variable domain ของโมเลกุล Immunoglobulin จัดเป็นส่วนที่สำคัญอย่างยิ่งในการจับกับส่วนของ Epitopes ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจง โดยเป็นส่วนที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของ V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> และ J<sub>H</sub> segments และยังเป็นส่วนที่พบความแปรปรวนของกรดอะมิโนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณอื่นๆ ของ Variable domain ในการศึกษาครั้งนี้จากการตรวจสอบความหลากหลายของบริเวณ CDR3 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region ทั้งหมด 126 โคลนพบว่าบริเวณ CDR3 มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 24 ถึง 42 bp หรือคิดเป็นกรดอะมิโนได้ 8 ถึง 14 residues ซึ่งพบว่าที่ความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 10 Residues

เป็นความยาวของลำดับกรดอะมิโนที่พบมากที่สุด ในบริเวณ CDR3 โดยมีจำนวน 46 โคลน และมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 10.97 และพบว่ามี การกระจายตัวของความยาวของลำดับกรดอะมิโน (Length distribution) หรือความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโน (Length variability) เท่ากับ 1.99 (ภาพที่ 15) ซึ่งจากการศึกษา CDR3 region ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่นในมนุษย์ที่ได้ทำการศึกษาในระดับ Transcription พบว่า cDNA ของ  $V_H$  177 โคลน มีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ตั้งแต่ 2-26 Residues โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 13.1 และพบว่ามี ความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 19.5 ในหนู cDNA ของ  $V_H$  1,004 โคลน มีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ตั้งแต่ 2-17 Residues โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 9.4 และพบว่ามี ความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 8.1 กระจายพบ cDNA ของ  $V_H$  70 โคลน มีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ตั้งแต่ 4-19 Residues โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 12.4 และพบว่ามี ความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 10.8 (Wu *et al.*, 1993) นอกจากนี้ การศึกษาการกระจายตัวของความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ของ Wu *et al.* (2012) ได้รายงาน ว่าจาก CDR3 regions ของมนุษย์ 11,423 โคลน หนู 5,054 โคลน และลูกไก่ 1,269 โคลน พบว่าช่วงความยาวของ CDR3 regions ในมนุษย์มีการกระจายตัวแบบปกติอยู่ในช่วงกว้าง 5-37 Amino acid residues และมีค่าเฉลี่ยความยาวเท่ากับ  $16.1 \pm 4.1$  ในหนูมี CDR3 repertoire ที่สั้นกว่ามากอยู่ในช่วง 5-26 Amino acid residues และมีค่าเฉลี่ยความยาวเท่ากับ  $11.8 \pm 2.4$  และในลูกไก่มีการกระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ และมีความยาวของกรดอะมิโนยาวกว่าในมนุษย์เท่ากับ 8-32 Amino acid residues แต่กลับพบว่ามีค่าเฉลี่ยความยาวเท่ากับ  $16.2 \pm 3.2$  ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยความยาวของ CDR3 region ในมนุษย์ นอกจากนี้ การศึกษาการกระจายตัวของความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ในกบ (Adult frog) พบ cDNA ทั้งหมด 52 โคลน มีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ตั้งแต่ 3-16 Residues โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 8.9 และพบว่ามี ความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 7.7 (Roman *et al.*, 1995) และวัว (Adult cattle) พบ cDNA ทั้งหมด 23 โคลน มีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ตั้งแต่ 3-26 Residues โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 19.8 และพบว่ามี ความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 26.9 (Berens *et al.*, 1997) ในปลา Rainbow trout ตัวเต็มวัย จากการศึกษา cDNA ทั้งหมด 84 โคลน พบว่ามีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region ตั้งแต่ 4-11 Residues โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 8.4 และพบว่ามี ความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 2.7 CDR3 region ในปลา Atlantic cod พบ cDNA ทั้งหมด 112 โคลน มีความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ

CDR3 region ตั้งแต่ 6-17 Residues ซึ่งในช่วงความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 8-13 Residues พบว่ามีจำนวนโคลนมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 10.2 และพบว่ามีหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 3.6 (Stenvik *et al.*, 2000) ซึ่งโดยปกติแล้วความยาวของ CDR3 region นี้มีความสำคัญต่อความสามารถในการจับกับ Antigen โดยความยาวของ CDR3 region ที่เพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อความหลากหลายของโครงสร้างโปรตีนให้มีเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ความยาวของ CDR3 region ที่มีขนาดสั้นที่พบมากในสัตว์เลือดเย็น (Cold-blooded vertebrates) นั้นอาจจะไปจำกัดความหลากหลายของโมเลกุล Antibody ในการจับกับ Antigen ก็เป็นไปได้ (Roman *et al.*, 1995) ซึ่ง CDR3 region ที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนสูงพบว่ามีบทบาททางด้านความจำเพาะและความชอบจับกับ Antigen ได้มากเช่นเดียวกัน (Casali and Schettino, 1996; Kabat and Wu, 1991) นอกจากนี้ Wu *et al.* (1993) ได้แสดงให้เห็นว่าความยาวของกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 region จะมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างของ CDR3 region ในการจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมด้วย โดยได้ให้ข้อสังเกตว่าความยาวของ CDR3 region ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 Residues จะมีโครงสร้างของโปรตีนค่อนข้างแบน (Flat) และจะ Form เป็นแอ่งหลุม (Pocket) ในขณะที่ CDR3 region ที่มีความยาวมากกว่าจะมีโครงสร้างที่มีการยื่นออกมา (Protrudes out) จากโมเลกุลของโปรตีน Immunoglobulin



ภาพที่ 15 การกระจายตัวของความยาวของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ CDR3 regions จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ทั้งหมด 126 โคลน โดยที่  $\bar{x}$  และ  $s^2$  แสดงถึงค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของ Amino acid residues ตามลำดับ

จากข้อมูลการศึกษาวิจัยความหลากหลายของ Variable region ของ cDNA ของยีน Immunoglobulin heavy chain ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันทั้งในระดับ Transcription และ Genome พบว่ามีการศึกษาทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ซึ่งได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ปีก รวมทั้งปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งที่ยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น การศึกษาของ Haire *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายบน Variable region ของ cDNA ของยีน Immunoglobulin heavy chain ในกบ (*Xenopus laevis*) โดยการทำให้ cDNA Library ของ mRNA ที่ได้จากม้าม โดยพบโคลนที่ Encode variable region ทั้งหมด 40 โคลน ซึ่งเมื่อใช้เกณฑ์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) ที่มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 70% ให้จัดอยู่ต่าง Family กัน (Brodeur and Riblet, 1984) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ V<sub>H</sub> family ที่แตกต่างกันได้อย่างน้อย 11 Families นอกจากนี้ยังพบว่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในแต่ละ Family มีค่ามากกว่า 90% โดย V<sub>H</sub> family ทั้ง 11 กลุ่มนี้พบว่ามีบริเวณ Hyperconserved sequence ประกอบด้วย YYC ซึ่งอยู่ภายในบริเวณปลายของส่วน FR3 ซึ่งสามารถพบได้ใน IgM heavy chain ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมทั้งปลานิลในการศึกษาครั้งนี้ด้วย ในส่วนของ D<sub>H</sub> segment พบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-29 Residues ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 1-10 Residues โดยมีเกณฑ์ในการจัดกลุ่มด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 4 Bases ที่มีความเหมือนกันในแต่ละโคลนอย่างน้อย 2 โคลน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้ 4-5 กลุ่มและที่ไม่ได้ทำการจัดอยู่ในกลุ่มเหล่านี้อีก 13 Families และยังพบการสร้าง ความหลากหลายทั้งแบบ Junctional และ N-type diversity ของ D<sub>H</sub> segment ใน 4 กลุ่มนี้ ในส่วนของ J<sub>H</sub> segment สามารถจัดกลุ่มได้ 10 กลุ่ม ซึ่งมีการสร้างความหลากหลายด้วยการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 3 Nucleotides และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ V<sub>H</sub> family ที่แตกต่างกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ J<sub>H</sub> segments เหมือนกันและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ V<sub>H</sub> family กลุ่มเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ J<sub>H</sub> segments ที่แตกต่างกันได้ Ota and Nei (1995) ทำการศึกษา Variable region ของยีน Immunoglobulin heavy chain ในไก่ (*Gallus gallus*) ในระดับ Genome พบว่ามี Single functional gene (V<sub>H1</sub>) ที่ Code ให้เป็น Variable region และความหลากหลายของ Ig จะถูกสร้างจากกระบวนการ Gene conversion ของยีน V<sub>H1</sub> จากการเชื่อมต่อของ Pseudogenes ( $\Psi V_H$ 's) ซึ่งพบว่ามีมากกว่า 80 ยีนที่อยู่ทางด้านปลาย 5' ของยีน V<sub>H1</sub> ซึ่งทางด้านปลาย 3' ของยีน  $\Psi V_H$ 's พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ Genomic D genes ซึ่งมีทั้งหมด 16 ยีน (Reynaud *et al.*, 1989; Reynaud *et al.*, 1991) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว V region ของ Immunoglobulins จะประกอบด้วย Complementarity-determining regions (CDRs) และ Framework regions (FRs) ซึ่ง CDRs ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Antigen binding และมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงซึ่งเกิดจากการ Insertions และ

Deletions ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน Matsuda *et al.* (1998) ทำการศึกษา Variable region ของยีน Ig heavy chain ในบริเวณ Variable ( $V_H$ ) region locus จาก Genomic DNA ในมนุษย์ (*Homo sapiens*) พบว่ามี  $V_H$  regions ทั้งหมด 123  $V_H$  segments โดยทำการจัดกลุ่มแล้ว ได้  $V_H$  ทั้งหมด 7 families และจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (Amino acid homology) พบว่ามีความเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ประกอบด้วยหนู Mouse 38.8%, หนู Rat 30.0%, Rabbit 38.6%, Dog 34.4%, Caiman 36.4%, Xenopus 33.7%, Teleost fish 36.7% และ Horned shark 28.6% เป็นต้น ในส่วนของ Diversity ( $D_H$ ) region gene พบอย่างน้อย 5 กลุ่มและในส่วนของ Joining ( $J_H$ ) region gene พบอย่างน้อย 6 กลุ่ม (Ravetch *et al.*, 1981) เพื่อนำมาใช้ในการสร้างความหลากหลายให้กับบริเวณ Antigen combining sites ของโมเลกุลของ Immunoglobulin

ในกลุ่มของปลา การศึกษาวิจัยความหลากหลายของ Variable region ของยีน Ig heavy chain ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ก็ได้มีการรายงานทั้งในระดับ cDNA และ Genomic DNA ทั้งใน ปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง เช่น ปลาทอง *Carassius auratus* (Order Cypriniformes) พบ  $V_H$  family 3 กลุ่ม (Wilson *et al.*, 1991) ปลาปักเป้า *Takifugu rubripes* (Order Tetradontiformes) พบ  $V_H$  gene 8 segments ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2  $V_H$  families (Peixoto and Brenner, 2000) ปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Order Salmoniformes) พบ  $V_H$  family 9 กลุ่ม (Solem *et al.*, 2001) ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) (Order Cypriniformes) ได้ทำการศึกษาในระดับ cDNA จากทั้งหมด  $V_H$  75 Segments และสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 7  $V_H$  families (Danilova *et al.*, 2005) ปลา Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) (Order Acipenseriformes) ได้ทำการศึกษาจาก cDNA ของ  $V_H$  ทั้งหมด 41 โคลน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3  $V_H$  families (Lundqvist *et al.*, 1998) ปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Order Siluriformes) ได้ทำการศึกษาจากทั้งหมด 560 โคลน สามารถจัดกลุ่ม  $V_H$  family ได้ 13 Families ซึ่งพบว่ามีกลุ่ม  $V_H$  family มากที่สุดในบรรดาสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ Yang *et al.* (2003)

Roman *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของ Variable domain ในระดับ cDNA ของปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Order Salmoniformes) ที่ได้จากการโคลนโดยใช้ mRNA ที่สกัดจากม้าม พบว่าได้โคลนของ  $V_H$  ทั้งหมด 46 โคลน แล้วมาทำการจัดกลุ่ม  $V_H$  family ได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม เช่นเดียวกับ Andersson and Matsunaga (1998) ได้ทำการศึกษา cDNA ของ  $V_H$  clones จากปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) (Order

Salmoniformes) พบว่าสามารถจัดกลุ่ม  $V_H$  family ของ Arctic charr ได้ 8 กลุ่ม จาก  $V_H$  cDNA 13 โคลน ต่อมา Stenvik *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของ Variable region ของ ยีน Ig heavy chain ในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) (Order Gadiformes) จาก ห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากม้ามและไตส่วนหน้าทั้งหมด 115 โคลน พบว่าสามารถจัดกลุ่ม  $V_H$  family ได้ 4 Families และสามารถจัดกลุ่มของ  $J_H$  segments ได้ 3 กลุ่ม ที่มีความแตกต่างกันของลำดับ นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $J_H$ ,  $J_{HIIa}$  และ  $J_{HIIb}$  ซึ่ง  $J_{HIIa}$  และ  $J_{HIIb}$  มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่างกันเพียง 1 Residue เท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นที่ยีน (Allelic variants) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนกรดอะมิโนของ  $J_{HIIa}$  และ  $J_{HIIb}$  น้อยกว่า  $J_H$  เท่ากับ 1 Residue เนื่องมาจาก Somatic D- $J_H$  rearrangement เป็นผลทำให้เกิด  $J_H$  ที่มีขนาดสั้นลง ( $J_H$  truncation) Coscia and Oreste (2003) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของ Variable region ของยีน Ig heavy chain ในปลา Emerald rockcod (*Trematomus bernacchii*) โดยทำการสกัด mRNA จากม้ามเพื่อนำมาสร้าง  $V_H$  cDNA library จากเทคนิค 5' RACE PCR จาก cDNA โคลน ทั้งหมด 45 โคลน ซึ่งทุกโคลนมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 52-100% และมี ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 79.9% นอกจากนี้  $V_H$  sequences ส่วนมากยังพบการแปลรหัสที่ไม่ปกติซึ่งเริ่มด้วย AUGAUG ซึ่งคาดว่า AUG codon ตัวแรกน่าจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเพิ่มอัตรในการแปลรหัส ของ  $V_H$  domain ในกลุ่มนี้ (Kozak, 1998) ซึ่งสามารถจัดกลุ่ม  $V_H$  family ได้ 2 กลุ่มและพบว่าความ เหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มมีค่าเท่ากับ 50-64% ในส่วนของการจัดเรียงตัวของ  $V_H/D/J_H$  segments พบว่าทางด้านปลาย 5' และ 3' ของ D segment อาจจะถูกประกอบด้วย N- หรือ P-region additions โดยใช้เกณฑ์ในการจัดกลุ่มให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกันอย่างน้อย 4 Base pairs เป็น D หลักและต้องมีสมาชิกอย่างน้อย 2 โคลนที่มี D หลักเหมือนกันให้จัดอยู่ในกลุ่ม เดียวกัน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 4-19 Residues ในส่วน ของ  $J_H$  segment สามารถจัดกลุ่มได้ 8 กลุ่ม ซึ่งมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 67-98% ซึ่ง  $J_H$  segment แต่ละกลุ่มก็จะไปเชื่อมต่อกับ  $V_H$  segment ที่ต่างกันไป การศึกษาวิจัย ของ Rumpf *et al.* (2004) ในปลากระดูกอ่อน Newborn nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) โดยทำการสกัด mRNA จาก Primary และ Secondary lymphoid tissues เพื่อนำมาสร้าง  $V_H$  cDNA clones ซึ่งพบ Positive clones ทั้งหมด 25 โคลน โดยสามารถจัดกลุ่ม  $V_H$  family ได้ 5 กลุ่ม ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Leader, FR และ CDR ซึ่งมาจาก Conventional  $V_H$  family 1 กลุ่ม เช่นเดียวกับที่พบใน Adult horn shark, Sandbar shark และ Ratfish ในส่วนของยีน  $D_H$  พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบใน Horn shark ซึ่ง ประกอบด้วย  $D_{HI}$  และ  $D_{HII}$  โดยพบว่ามีโครงสร้างความหลากหลายจาก Putative N-region additions ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ G และ C อีกด้วย Brown *et al.* (2006) ทำการศึกษา

ความหลากหลายของ Variable region ของยีน Immunoglobulin heavy chain ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) จากห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากไตส่วนหน้าทั้งหมด 130 โคลน สามารถจัดกลุ่ม  $V_H$  family ได้ 13 Families โดยก่อนหน้านี้ Roman *et al.* (1996) สามารถจัดกลุ่ม  $D_H$  segment ได้ 10 กลุ่ม สามารถจัดกลุ่ม  $J_H$  segment ได้ 6 กลุ่ม และจากการวิเคราะห์  $V_H-D_H$  และ  $D_H-J_H$  junctions สามารถพบ N nucleotides อยู่ในบริเวณนี้ด้วย Di *et al.* (2009)

ทำการศึกษาความหลากหลายของ Variable region ของยีน Immunoglobulin heavy chain ในปลา Amur sturgeons (*Acipenser schrenskii*) จากการทำให้ RT-PCR โดยใช้ mRNA ที่สกัดได้จากมีมามาเป็น Template ในการสร้าง cDNA ของ Variable region จากทั้งหมด 31 โคลน และเมื่อทำการหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดพบว่ามีค่ามากกว่า 70% ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 Sub-cluster แต่ถึงอย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Leader sequence มาทำการเปรียบเทียบกันทั้ง 31 โคลน พบว่ามีค่าความเหมือนกันมากกว่า 90% จึงสรุปได้ว่ามี  $V_H$  family เพียง 1 กลุ่มเท่านั้น ในส่วนของ D segments ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7-35 Residues ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างกันทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ในส่วนของ  $J_H$  segments พบ 15 โคลน ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันและเมื่อทำการจัดกลุ่มแล้วพบว่า มี  $J_H$  segments ทั้งหมด 12 กลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่ามีกรดอะมิโนอนุรักษ์ชนิด Cys และ Trp อีกด้วย ซึ่งจากผลที่ได้มาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการ Rearrangement ของ Variable repertoire ในปลานั้น V segment หนึ่ง ๆ ที่แตกต่างกันก็สามารถใช้ J segment อันเดียวกันหรือกลุ่มเดียวกันได้

จากผลของการศึกษาข้างต้นได้แสดงให้เห็นว่า IgM heavy chain ของปลานิลจะมีการสร้างความหลากหลายบนบริเวณ Variable domain โดยอาศัยองค์ประกอบของ  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  อย่างน้อย 9, 6 และ 4 families ของแต่ละ Segment ตามลำดับ ในการเกิดกลไก Junctional diversity ซึ่งยังไม่สามารถชี้ชัดได้ถึงจำนวนที่แท้จริงของ Gene segments ต่าง ๆ ซึ่งจะต้องอาศัยการศึกษาการตรวจสอบลำดับ Nucleotides บน Genome ของปลานิล ในการศึกษาในอนาคต และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDR3 ของ Variable regions จะพบว่า Variable domain ของ IgM heavy chain ของปลานิล ยังใช้กลไกอื่น ๆ ที่มีความสำคัญในการสร้างความหลากหลายของกรดอะมิโนเพื่อใช้จับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่สำคัญได้แก่ กลไก Junctional imprecision, P- และ N- nucleotides, D-D combination, Gene inversion, Deletion และ Addition เป็นต้น

### 3.5 การศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region

จากการศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region โดยไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Leader peptide ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธีของ Kabat and Wu (1971) พบว่าค่าความหลากหลาย (Variability) เฉลี่ยของบริเวณ FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 และ FR4 เท่ากับ 10.58, 21.78, 7.94, 28.86, 9.11, 52.16 และ 2.82 ตามลำดับ จากค่าที่ได้ดังกล่าวจะแสดงให้เห็นว่าบริเวณ Frame work region (FR) มีความหลากหลายของกรดอะมิโนน้อยกว่าบริเวณ Complementarity determining region (CDR) อย่างชัดเจน ซึ่งบริเวณ FR4 มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนน้อยที่สุดรองลงมาคือ FR2, FR3 และ FR1 ตามลำดับ และในบริเวณ CDR3 มีความหลากหลายของกรดอะมิโนมากที่สุดรองลงมาคือ CDR2 และ CDR1 ตามลำดับ โดยที่ตำแหน่งที่มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุดคือ ตำแหน่งที่ 106 ในบริเวณ CDR3 มีค่าความหลากหลายเท่ากับ 80.64 (ภาพที่ 16) ซึ่งให้ผลคล้ายกันกับผลการศึกษาที่ได้จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region โดยไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Leader peptide ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธี Shannon analysis (Stewart *et al.*, 1997) โดยพบว่าค่า Shannon entropy (H) เฉลี่ยของบริเวณ FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 และ FR4 มีค่าเท่ากับ 0.82, 1.25, 0.68, 1.37, 0.78, 1.66 และ 0.21 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าบริเวณ CDR มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากกว่าบริเวณ FR โดยที่ CDR3 มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุดที่ตำแหน่ง 106 ซึ่งมีค่า Shannon entropy (H) เท่ากับ 2.38 รองลงมาคือ CDR2 และ CDR1 ตามลำดับ ส่วนบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนน้อยได้แก่บริเวณ FRs ทั้งหมดโดยมีค่า H ตั้งแต่ FR1-FR4 มีค่าอยู่ระหว่าง 0.21-0.82 โดยพบว่าบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนน้อยที่สุดคือ FR4 ซึ่งให้ผลคล้ายกันกับการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยวิธี Kabat and Wu (1971) ในข้างต้น (ภาพที่ 17)

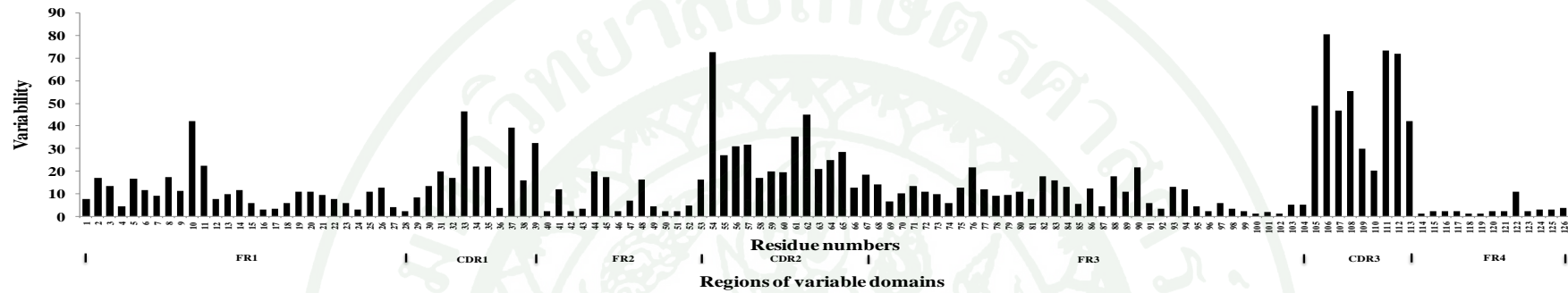
จากโครงสร้างของ Variable region ของ Immunoglobulin heavy chain ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญที่ทำหน้าที่ในการเป็น Antigen-binding site ที่ประกอบด้วย  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  ซึ่งบริเวณ Variable region นี้ถูกกำหนดให้เป็นตำแหน่งของ Complementarity-determining regions (CDRs) จากการทำ Variability plot ของลำดับกรดอะมิโนของ V region จำนวนมากในมนุษย์ หนู กระต่าย ม้าและฉลาม (Wu and Kabat 1970; Kabat and Wu, 1971) ซึ่ง V region นี้จะประกอบด้วยบริเวณ FR และ CDR ซึ่งบริเวณนี้จะมี CDR 3 ตำแหน่งด้วยกัน โดย CDR1 และ

CDR2 จะถูก Encoded อยู่ใน Germ-line V segment ส่วน CDR3 จะถูก Encoded โดย  $V_H D_H J_H$  junctional regions (Hsu *et al.*, 1989) ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ยีน Ig heavy chain ในบริเวณ Variable region ในกบ หนู มนุษย์และฉลามพบว่าบริเวณ FR2, ทางด้านปลายของ FR3 และ  $J_H$  (FR4) มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนน้อยที่สุดและเป็นบริเวณอนุรักษ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 4 ชนิดอีกด้วย (Hsu *et al.*, 1989) นอกจากนี้ Haire *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน Ig heavy chain บริเวณ Variable region ในกบเปรียบเทียบกับมนุษย์และหนูพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของ  $V_H$  domain ในบริเวณ Framework region (FR1) ตั้งแต่ Codons ตำแหน่งที่ 6-24 และ Codons ตำแหน่งที่ 67-85 เป็นตำแหน่งของ FR3 (Codons 2-23) ซึ่งทั้งสองตำแหน่งนี้มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มของแต่ละกลุ่ม  $V_H$  family และมีความหลากหลายอยู่ในช่วงกว้างเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มของ  $V_H$  family ในสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น ซึ่งจากวิธีการในการเปรียบเทียบแบบนี้จะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ  $V_H$  family ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้ (Schroeder *et al.*, 1990) ส่วน FR2 พบว่ามีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างน้อยในแต่ละกลุ่มของ  $V_H$  family เช่นเดียวกับกับบริเวณ Complementarity determining regions (CDR1 และ CDR2) ซึ่งมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าบริเวณ CDR3 ในบริเวณ FR3 พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ที่มีความเหมือนกันทั้งใน  $V_H$  11 families ประกอบด้วย Tyr (Y)-Tyr (Y)-Cys (C) นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณ FR1 และ FR2 กับมนุษย์ หนู ฉลาม จระเข้ ไก่และปลากระดุกแข็ง พบว่าเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายน้อยมากในแต่ละสิ่งมีชีวิต ซึ่ง  $V_H$  family ในกบพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนเพียง 1 หรือมากกว่านั้น ในตำแหน่งนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบความหลากหลายบริเวณ CDR1 และ CDR2 ภายใน V gene family เดียวกันพบว่าระดับการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ CDR2 ของกบเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในหนูมีค่า 5-10 Nucleotides ใน 51-57 โคลน และในกบมีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 8 Nucleotides ใน 48 โคลน ในส่วนของบริเวณ CDR1 ของกบมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าในหนู นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ใน  $V_H$  family เดียวกันจะมีบริเวณ CDR1 ที่เหมือนกันได้ เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ (Bothwell *et al.*, 1981) นอกจากนี้การศึกษาของ Ota and Nei (1995) ที่ศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน Ig heavy chain บริเวณ Variable region ในไก่เปรียบเทียบกับในหนูและมนุษย์พบว่าบริเวณ CDR มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าบริเวณ FR ในสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวมา Stenvik *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน Ig heavy

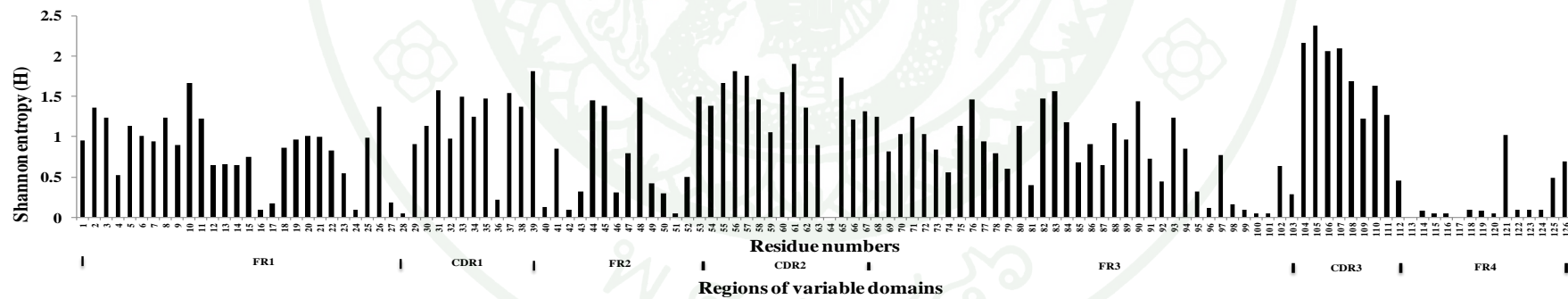
chain บริเวณ Variable region ในปลา Atlantic cod ด้วยวิธีการของ Kabat and Wu (1971) เปรียบเทียบกับกระต่าย โดยการใช้ cDNA ของ V<sub>H</sub> region ของ Ig heavy chain ในปลา Cod จำนวน 100 โคลน ทำการเปรียบเทียบกับ cDNA ของ V<sub>H</sub> region ของ IgM heavy chain ในกระต่ายจำนวน 90 โคลน พบว่าความหลากหลายบริเวณ FR1-FR3 ในกระต่ายมีค่าค่อนข้างมากกว่าในปลา Cod ขณะที่บริเวณ CDR3 มีความหลากหลายสูงและคล้ายกันทั้งในปลา Cod และกระต่าย แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบโดยใช้ cDNA ของ V<sub>H</sub> region ของ Ig heavy chain ในปลา Cod จำนวน 100 โคลน กับ cDNA ของ V<sub>H</sub> region ของ IgM heavy chain ในกระต่ายจำนวน 377 โคลน พบว่าความหลากหลายบริเวณ FR1-FR3 ของทั้งกระต่ายและปลา Cod มีความคล้ายกัน ขณะที่บริเวณ CDR3 ของปลา Cod จะมีความหลากหลายมากกว่ากระต่าย ซึ่งเมื่อทำการพิจารณาในแต่ละบริเวณ พบว่า CDR 1 ในปลากระต่ายหลายชนิดมีความยาวของกรดอะมิโนได้ 3-9 Residues และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ CDR1 และ CDR2 ในปลากระต่าย-หลายชนิดพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ต่างจากในปลา Cod ที่ค่อนข้างมีความหลากหลายของบริเวณ CDR1 และ CDR2 มากกว่าในปลากระต่ายชนิดอื่น ๆ ส่วนบริเวณ CDR2 ในสัตว์เลี้ยงลูก-ด้วยนมพบว่ามีความยาวของลำดับกรดอะมิโนได้ 16-19 Residues ซึ่งต่างจากปลา Cod ที่มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนได้ 15-18 Residues และมีบางโคลนที่มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 11 Residues ในส่วนของบริเวณ CDR3 ในปลา Cod พบว่ามีความหลากหลายของความยาวของลำดับกรดอะมิโนได้ 6-17 Residues และที่ความยาวของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 8-13 Residues พบว่ามีจำนวนมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของความยาวของ CDR3 มากกว่าปลา Trout, กบ และหนู ขณะที่ความหลากหลายของ CDR3 ในปลา Cod และ Trout มีค่อนข้างจำกัดมากกว่าในกบ และหนูอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่กระต่าย มนุษย์และวัวมีความยาวและความหลากหลายของบริเวณ CDR3 มากกว่าในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ Coscia and Oreste (2003) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน Ig heavy chain บริเวณ Variable region ในปลา Emerald rockcod ด้วยวิธีการหาค่า Shannon entropy (H) (Shannon, 1948; Stewart *et al.*, 1997) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 45 โคลน พบว่าบริเวณ CDR2 มีค่า H มากกว่า CDR1 โดย CDR2 มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 5-11 Residues และมีค่าเฉลี่ยของความยาวเท่ากับ 8.4 Residues ซึ่งเป็นความหลากหลายของความยาวที่สูงกว่าในปลาชนิดอื่น ๆ และเป็น CDR2 ที่มีความยาวมากที่สุด ขณะที่ CDR3 มีค่า Entropy มากที่สุดเท่ากับ 3.5 โดยความยาวของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 7-13 Residues และมีค่าเฉลี่ยของความยาวเท่ากับ 11.6 Residues ซึ่งมีความแตกต่างกันของความยาวที่น้อยกว่าในปลาชนิดอื่น ๆ ในทางตรงกันข้ามบริเวณ FR มีความหลากหลายน้อยและมีค่า Entropy ต่ำกว่า 1.5 นอกจากนี้ Di *et al.* (2009) ยังได้ทำการศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน Ig heavy chain บริเวณ Variable region ในปลา Amur

sturgeon ด้วยวิธีการของ Kabat *et al.* (1991) พบว่าบริเวณที่มีความหลากหลายมากคือ CDR โดย CDR1 มีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 5 Residues CDR2 มีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 15-19 Residues และ CDR3 มีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 4-11 Residues โดยพบว่า CDR2 มีความยาวมากกว่า CDR1 และ CDR3 ซึ่ง CDR3 มีความหลากหลายของกรดอะมิโนมากที่สุดและเมื่อทำการเปรียบเทียบความยาวของบริเวณ CDR3 กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่า CDR3 ของปลา Amur sturgeon มีความยาวน้อยกว่าในสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมซึ่ง Roman *et al.* (1995) ได้ให้ข้อสังเกตว่าความยาวของ CDR3 จะเพิ่มมากขึ้นตามลำดับวิวัฒนาการในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง





ภาพที่ 16 ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region โดยไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Leader peptide ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธีของ Kabat and Wu (1971)



ภาพที่ 17 ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในบริเวณ Variable region โดยไม่มีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Leader peptide ทั้งหมด 126 โคลน ด้วยวิธี Shannon analysis (Stewart *et al.*, 1997)

ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และความจำเพาะของ  $V_H$  domains ถูกสร้างจากการรวมตัวกันของ  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  gene segments โดยกระบวนการ Combinatorial and junctional shuffling ที่เกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาตัวของ B cell และกระบวนการ Somatic mutations ของ  $V_H$  domains ซึ่งขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นบนตำแหน่งของ Variable region ของ Immunoglobulin ภายหลังจากที่ Naive B cells ได้พบกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่มีความจำเพาะและเริ่มพัฒนาตัวเองให้กลายเป็น Mature B cells ในระหว่างการพัฒนาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนเพื่อให้ได้โครงสร้างของโปรตีน Immunoglobulin ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดนั้น ๆ ได้มากและแข็งแรงยิ่งขึ้น แสดงให้เห็นว่าความรู้ในเรื่องของ Gene segments ต่าง ๆ ที่จะมาประกอบหรือรวมตัวกันใหม่เพื่อให้ได้โมเลกุล Antibodies นั้นเป็นความรู้พื้นฐานสำคัญอย่างมาก เพื่อที่จะเข้าใจในธรรมชาติของระบบภูมิคุ้มกัน (De Bono *et al.*, 2004) ซึ่งจากผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากลไกการสร้างความหลากหลายของบริเวณ Variable region ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลานิลปกตินั้นมาจากกระบวนการ Combinatorial diversity และ Junctional imprecision โดยการนำ  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  อย่างน้อย 9, 6 และ 4 Families ตามลำดับ มาเชื่อมต่อกันใหม่แบบสุ่มโดยการทำงานของเอนไซม์ RAG (Tonegawa, 1983) ซึ่ง  $V_H$  family เดียวกันสามารถมี  $D_H$  และ  $J_H$  ที่เหมือนกันหรือต่างกันได้ กระบวนการ Junctional diversity เป็นการสร้างความหลากหลายบริเวณ  $V_H/D_H/J_H$  junction หรือ CDR3 โดยจะมีเอนไซม์ TdT เข้ามาช่วยในการตัดและเติม P และ N nucleotides เป็นต้น และคาดว่าในปลานิลน่าจะมีกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้มีความสามารถจับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้นโดยผ่านกระบวนการ Somatic hypermutation, secondary  $V_{H/L}$  gene recombination และ Heavy/light chain pairing ซึ่งเป็นกลไกที่ช่วยในการเพิ่มความหลากหลายของแอนติบอดีได้อีกด้วย จากการศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ เช่น ในมนุษย์และหนู พบว่ามีการสร้างความหลากหลายของ V region ผ่านทางกระบวนการ Germ-line combination และกระบวนการ Somatic processes อื่น ๆ ซึ่งการจัดเรียงตัวของ Germ-line gene segments ที่มีจำนวนมากนี้จะมีการเรียงตัวจากหลาย ๆ V gene segments (CDR1 และ CDR2), D gene segments และ J gene segments ตามลำดับ แล้วทำการจัดเรียงตัวใหม่ (Somatic rearrangement) ให้มีการรวมตัวกันอย่างมีความแตกต่างเพื่อที่จะสร้างบริเวณ CDR3 ให้มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ความหลากหลายยังถูกสร้างจากกระบวนการทางร่างกาย เช่น Junctional diversification และ Somatic hypermutation (Tonegawa, 1983; Rathbun *et al.*, 1989)

จากการศึกษาของ Jackson *et al.* (2004) พบว่า Germ-line V gene ในฉลามมีประมาณ 100-200 segments แต่กลับพบว่ามีการจัดเรียงตัวของ  $V_H-D_H-J_H-C_H$  units แบบซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ

ชุด ซึ่งมีส่วนทำให้พบการสร้างความหลากหลายแบบ Germ-line diversity และ Junctional diversity แต่จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าจะพบการสร้างความหลากหลายแบบ Combinatorial diversity ได้น้อยมาก (Kokubu *et al.*, 1988b) ในทางตรงกันข้ามความหลากหลายของ Antibody ในไก่ได้มาจากกระบวนการ Gene conversion ซึ่งมีการเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์จากชุดของ Pseudogene segments ที่อยู่ทางด้านหน้าของ V segments เพื่อนำไปประกอบเป็น Somaticly assembled V(D)J unit ใหม่ (Reynaud *et al.*, 1987) ซึ่งคล้ายกับทฤษฎี Minigene ที่ได้รายงานไว้โดย Kabat *et al.* (1979) ในกบพบว่าการรวมตัวกันของ VDJ gene segments เหล่านี้มาจาก กลไก Junctional diversification mechanisms ประกอบด้วย Nucleotide insertion และ Deletion เพื่อสร้างความหลากหลายของบริเวณ Antigen-binding sites ของ Immunoglobulin H-chain ให้มีมากขึ้น ซึ่งการจัดเรียงตัวของ  $V_H$  gene segments ที่มี  $V_H$ ,  $D_H$  และ  $J_H$  components จำนวนมากแล้วมารวมตัวกับ C region genes ที่มีจำนวนน้อยกว่านี้มีพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับการสร้างความหลากหลายของ  $V_H$  region ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังมีการสรุปเพิ่มเติมอีกว่า บางทีความหลากหลายของ Framework regions อาจจะมีส่วนช่วยให้บริเวณ Antigen-combining site เกิดการสร้างความหลากหลายในการจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่มากขึ้นก็เป็นได้ (Hsu *et al.* 1989) ในส่วนของ D segments นั้นพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ GC rich อยู่ทางด้านปลายของ D segment ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับ N sequences (Alt and Baltimore, 1982) และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการเติม N sequences ไปที่ DJ หรือ VD junctions ในระหว่างกระบวนการ Rearrangement อีกด้วย (Hsu *et al.*, 1989) และจากการศึกษาของ Haire *et al.* (1990) พบว่าการจัดเรียงตัวของ  $V_H$  locus ของ Ig heavy chain ในกบจะคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในขณะที่ ปลากระดูกอ่อนและสัตว์ปีกมีการจัดเรียงตัวของยีนเป็นแบบ Cluster หรือ Single gene-multiple pseudogene และพบว่ามี การสร้างความหลากหลายของ Variable region โดยกระบวนการ Combinatorial diversity ในแต่ละส่วนของ VDJ elements นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNAs กับ Genomic DNA ของ Variable region แสดงให้เห็นว่าอาจมีผลมาจากกระบวนการ Somatic mutation หรือ Limited gene conversion เป็นต้น Ota and Nei (1990) ได้รายงานว่ากลไกในการสร้างความหลากหลายของ Variable region ของ Ig heavy chain ในไก่ มาจากกระบวนการ Somatic gene conversion โดยใช้ Functional V gene ที่มีอยู่เพียง 1 segment มาเชื่อมต่อกับหลาย ๆ V pseudogenes ที่อยู่บริเวณปลาย 5' ของ Functional V gene ซึ่งเป็นกลไกการสร้าง ความหลากหลายที่ไม่เหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ยกเว้นในกระต่ายที่มีการสร้างความหลากหลายของ Variable region ของ Ig ด้วยกลไกนี้ (Knight, 1992)

นอกจากนี้ Stenvik *et al.* (2000) ได้รายงานว่าการสร้าง ความหลากหลายของ Variable region ของ Ig heavy chain ในปลา Atlantic cod บาง Family มาจากกระบวนการ Germline gene conversion ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Matsunaga and Andersson (1997) ที่พบว่าการสร้าง ความหลากหลายแบบ Germline gene conversion อาจเป็นกลไกที่ รวดเร็วและมีความสำคัญในการสร้าง ความหลากหลายของ Germline V gene ในสัตว์มีกระดูกสัน หลังชั้นต่ำทั่วไป Coscia and Oreste (2003) ได้รายงานว่าการสร้าง ความหลากหลายของ V region ของ Ig heavy chain ในปลา Emerald rockcod ส่วนใหญ่มาจากการเกิด Point mutations นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการสร้าง ความหลากหลายบริเวณ CDR3 มาจาก Junctional mechanisms โดยการเติมลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Putative N- และ P-region ใน ตำแหน่ง V<sub>H</sub>/D และ D/J<sub>H</sub> junctions และกลไกในการสร้าง ความหลากหลายของบริเวณ CDR2 มา จากกระบวนการ Hypermutation สอดคล้องกับการรายงานของ Rumpfelt *et al.* (2004) และ Malecek *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของบริเวณ Variable region ของ IgM heavy chain ใน Nurse shark พบว่ามีกลไกในการสร้าง ความหลากหลายแบบ Somatic hypermutation บริเวณ FR1 และ CDR1 และมีการเติม N nucleotide เพื่อสร้าง ความหลากหลาย ในบริเวณ CDR3 อย่างเห็นได้ชัด

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Immunoglobulin M heavy chain โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และเทคนิค Quantitative Real-time PCR ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของปลานิล

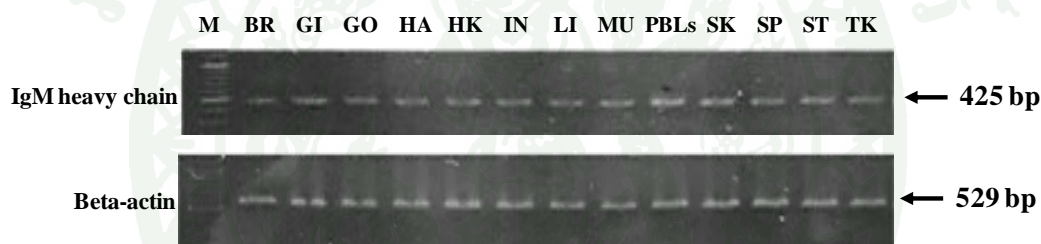
##### 4.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลปกติ โดยใช้เทคนิค RT-PCR

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิลปกติ โดย วิธี RT-PCR และใช้ Specific primers ที่ออกแบบมาจากบริเวณ Constant region (C<sub>μ</sub>2- C<sub>μ</sub>3) (ตารางที่ 3) ในเนื้อเยื่อ 13 ชนิด ได้แก่ สมอง (Brain), เหงือก (Gills), อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad), หัวใจ (Heart), ไตส่วนหน้า (Head kidney), ลำไส้ (Intestine), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต (Peripheral blood leukocytes), ผิวหนัง (Skin), ม้าม (Spleen), กระเพาะอาหาร (Stomach) และไตส่วนหลัง (Trunk kidney) โดยทำการเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีน β-actin ที่ใช้เป็น House keeping gene และได้ถูกใช้เป็น Internal control ในการศึกษาครั้งนี้ โดยพบว่า IgM heavy chain มีการแสดงออกได้ทั้ง 13 อวัยวะ ซึ่งจากผลการ

ทดลองที่ได้นี้พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของการแสดงออกได้อย่างชัดเจนนัก เนื่องจาก PCR products ที่เกิดขึ้นมีความหนาของ Band ใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อพิจารณาความเข้มของ Band ให้ดีด้วยสายตาจะสามารถสังเกตเห็นได้ว่ายีน IgM heavy chain มีการแสดงออกสูงสุดที่ Peripheral blood leukocytes (PBLs) และมีการแสดงออกน้อยที่สุดที่สมอง โดยขนาดของ PCR product ของยีน IgM heavy chain และยีน  $\beta$ -actin เท่ากับ 425 bp และ 529 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากปริมาณของ mRNA transcripts ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ในทุกอวัยวะมีปริมาณใกล้เคียงกันในระดับที่ค่อนข้างสูง จนทำให้การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ไม่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างที่แท้จริงได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ที่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ระยะ End point เท่านั้น นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการเกิดปรากฏการณ์ Plateau effect ของปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายในกระบวนการ PCR ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่มีการลดจำนวนของ DNA เป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวนในระยะของ Exponential phase ซึ่งจะเกิดขึ้นในรอบของการเพิ่มจำนวนในระยะท้าย ๆ โดยทั่วไปแล้วปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA จะเข้าสู่ระยะ Exponential phase ก่อนที่จะถึงระยะ Quasilinear phase และสุดท้ายจะเข้าสู่ระยะ Plateau phase โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปรากฏการณ์นี้ได้แก่ (1) การหมดไปของ dNTPs หรือ Primers (2) DNA polymerase เริ่มหมดประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ DNA เนื่องจากความร้อนและความเข้มข้นของสารที่มีจำกัด (3) ความเข้มข้นของ Pyrophosphate ที่มากขึ้นมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (4) การเกิด Reannealing ของ Specific product ที่ความเข้มข้นมากกว่า  $10^{-8}$  M (5) ประสิทธิภาพของการแยกสาย DNA (Denaturation) ต่อ Cycle ลดลง และ (6) เกิดการทำลาย Product เนื่องจากกิจกรรม (5'-3' exonuclease activity) ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Sardelli, 1993; Kainz, 2000)

เมื่อพิจารณาถึงระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain จากการศึกษาครั้งนี้จะให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Saha *et al.* (2005) ที่ได้ทำการหาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain (Secreted form) ในปลาปักเป้า (*Takifugu rubripes*) โดยวิธี Northern blot พบว่ามีการแสดงออกสูงที่ Lymphoid organs ซึ่งได้แก่ Spleen, Head kidney, Trunk Kidney และ Thymus แต่พบว่าการแสดงออกน้อยที่ Skin, Gills, Intestine และ Gonad ซึ่งก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาการกระจายตัว (Localization) ของ Ig positive cells ในปลาชนิดเดียวกันนี้แล้ว พบว่านอกเหนือจาก Lymphoid organ ของปลาแล้ว Ig positive cells ยังสามารถพบได้ใน Epithelial layer ของ Skin และ Lamina propria ของ Intestine ซึ่งให้ผลคล้ายกันกับการรายงานในปลา Wolfish ที่พบ B cells ใน Gills ของปลาชนิดนี้อย่างชัดเจน ขณะที่ Liver และ Muscle จะ

เป็นอวัยวะที่ไม่พบการแสดงออกเลย (Grontvedt and Espelid, 2003) เช่นเดียวกับ Tian *et al.* (2009) ซึ่งได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในปลา Large yellow crocker (*Pseudosciaena crocea*) พบว่ายีน IgM heavy chain มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่นำมาตรวจสอบได้แก่ Gills, Intestine, Liver, Kidney, Heart, Spleen, Muscle และ Whole blood ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกสูงที่ Kidney, Spleen และ Intestine และจากการศึกษาของ Honda *et al.* (2010) พบว่าการแสดงออกของยีน IgM ใน Banded houndshark มีการแสดงออกที่ Eyes, Gills, Intestine, Liver, Pancreas, PBLs, Spleen และ Testis แต่ไม่พบการแสดงออกที่ Brain, Heart, Kidney, Muscle, Skin และ Stomach เช่นเดียวกับ Xiao *et al.* (2010) ที่ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในปลา Grass carp พบว่ามีการแสดงออกที่ Gills, Head kidney, Intestine, Liver, Trunk kidney และ Spleen และมีการแสดงออกเบาบางที่ Muscle



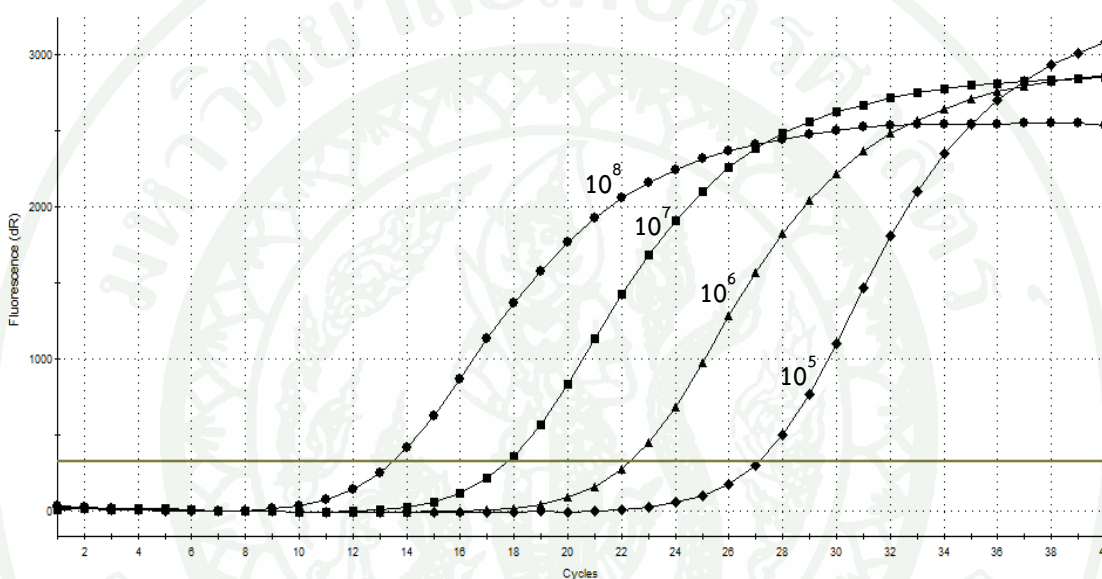
**ภาพที่ 18** การแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลปกติ เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน  $\beta$ -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย M คือ 100 bp plus DNA ladder, BR คือ สมอ, GI คือ เหงือก, GO คือ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์, HA คือ หัวใจ, HK คือ ไตส่วนหน้า, IN คือ ลำไส้, LI คือ ตับ, MU คือ กล้ามเนื้อ, PBLs คือ เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต, SK คือ ผิวหนัง, SP คือ ม้าม, ST คือ กระเพาะอาหารและ TK คือ ไตส่วนหลัง ตามลำดับ

## 4.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Immunoglobulin M heavy chain ของปลานิลปกติ โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-timePCR

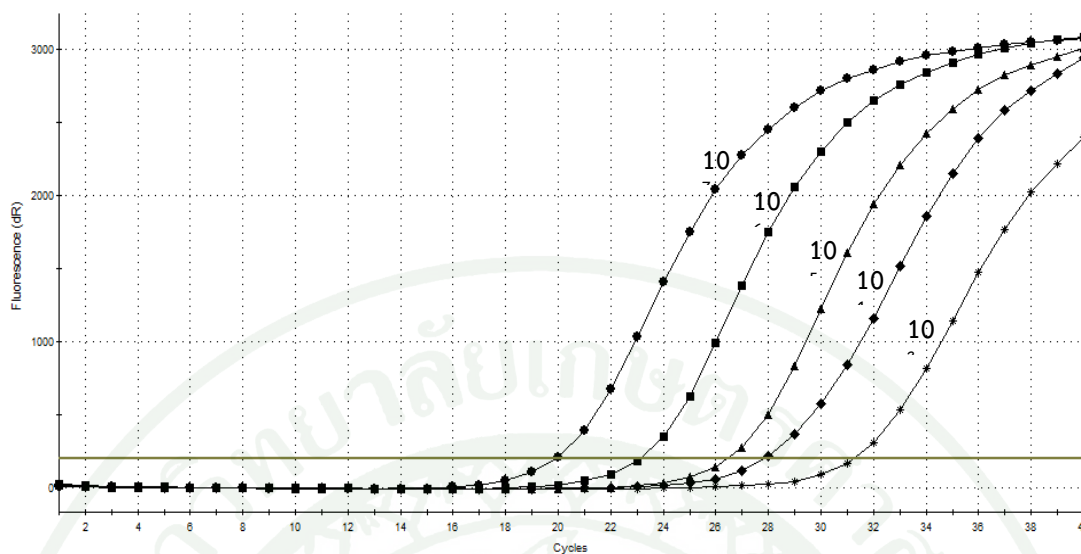
### 4.2.1 Absolute quantification ของยีน IgM heavy chain ในปลานิลปกติ

การศึกษาาระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิลปกติ ในเนื้อเยื่อ 13 ชนิด โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time PCR โดยเริ่มจากการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของยีน IgM heavy chain และยีน  $\beta$ -actin ที่ใช้เป็น Internal control การหาค่ามาตรฐานของการสังเคราะห์ยีน IgM heavy chain และยีน  $\beta$ -actin ของปลานิล ทำได้โดยการใช้ Plasmid ที่มีชิ้น Insert ของยีนทั้ง 2 ชนิด มาเป็นแม่แบบ (DNA template) แล้วทำการวัดความเข้มข้นของ DNA template ดังกล่าว ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน หลังจากนั้นจึงทำการคำนวณค่า Copy number ด้วยโปรแกรม DNA concentration to copy number version 1.5 (<http://stanice.euweb.cz/bio/DNAtoCopy.html>) แล้วจึงเตรียมความเข้มข้นของ Plasmid ให้มีจำนวน Copy number เท่ากับ  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  และ  $10^5$  สำหรับยีน IgM heavy chain และ  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  สำหรับยีน  $\beta$ -actin ตามลำดับ แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณของ DNA template โดยการวัดสัญญาณสารเรืองแสง Brilliant<sup>®</sup> II SYBR<sup>®</sup> Green ด้วยเครื่อง Mx3005P Real-time PCR ซึ่งจะแปลผลออกมาในรูปของ Amplification plot (ภาพที่ 19 และ 20) ซึ่ง Amplification plot เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแสง Fluorecence ที่ตรวจวัดได้กับจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา PCR ซึ่งพบว่า DNA template ที่มีปริมาณมากจะให้ค่า Threshold cycle ( $C_T$ ) น้อย เนื่องจากเครื่อง Real-timePCR สามารถตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงในตัวอย่างที่มี Template มากได้ก่อนตัวอย่างที่มี DNA template ที่มีปริมาณน้อย ซึ่งค่า  $C_T$  ที่ได้นี้จะนำมาทำการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $C_T$  และจำนวน Copy number ของ DNA template ซึ่งสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานนี้สามารถนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR (PCR efficiency; E) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ จากสูตร PCR Efficiency (E) =  $10^{(-1/\text{slope})}$  โดยที่ Slope คือค่าความชันของกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) แบบ Exponential phase ของปฏิกิริยา PCR ซึ่งอยู่ในรูปของ Logarithmic scale โดยปกติแล้วค่า PCR efficiency (E) ที่ดีควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.60-2.10 หรือหากคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ค่า E ที่ดีจะอยู่ในช่วง 90-110% ซึ่งให้ค่า Slope อยู่ในช่วง -3.58 ถึง -3.10 (Pfaffl, 2004; Kubista *et al.*, 2006) โดยค่า PCR efficiency ของยีน IgM heavy chain และยีน  $\beta$ -actin ของปลานิลที่คำนวณได้ในครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 2.015 และ 2.023 ตามลำดับ (ภาพที่ 21 และ 22) โดยค่าที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า DNA เป้าหมายนั้นได้มีการเพิ่มจำนวนประมาณ 2 Copy ทุกรอบของปฏิกิริยา PCR (2 copy numbers/cycle) ต่อ 1 Target DNA template ซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับ Ideal slope ที่มีค่า Slope เท่ากับ -3.322 คิดเป็นค่า E ได้ 100% นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่า Melting temperature ( $T_m$ ) ของ PCR product ที่เกิดขึ้นจาก DNA template ของยีนแต่ละชนิด จะแปลผลออกมาในรูปแบบกราฟ Dissociation curve โดยค่า  $T_m$  ของยีนแต่ละชนิดจะมีค่า

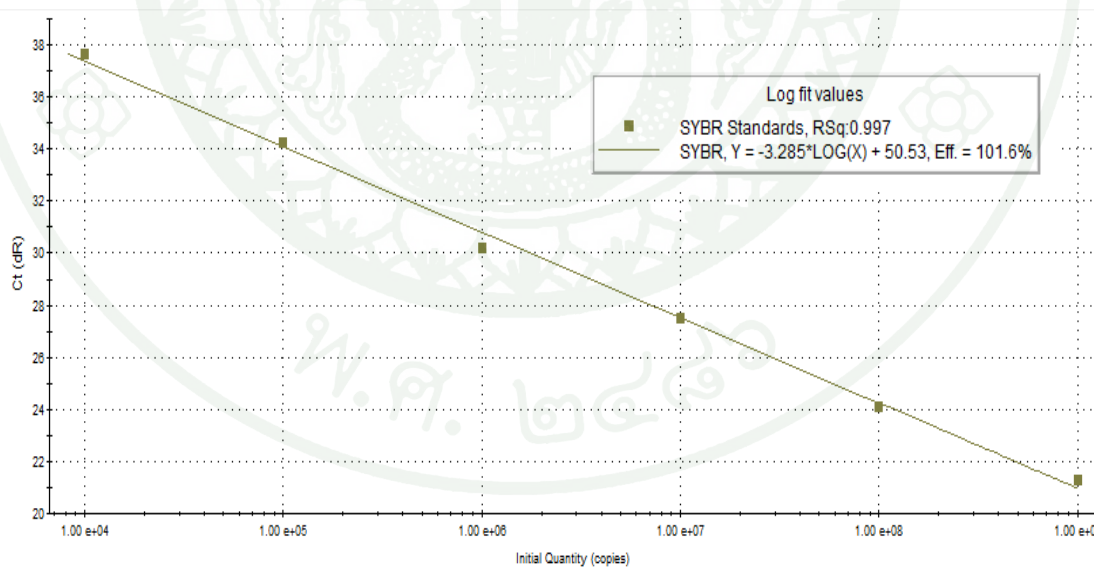
เฉพาะตัวที่แตกต่างกันและจะให้ Peak สูงสุดเพียง Peak เดียวที่อุณหภูมิมากกว่า 80 °C โดยค่า Tm ของยีน IgM heavy chain และยีน  $\beta$ -actin มีค่าประมาณ 81 °C และ 84 °C ตามลำดับ ในขณะที่ Primer dimer หรือ Non-specific product จะเกิด Peak ขนาดของฐานกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า 80 °C ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการศึกษาการแสดงออกทั้ง 2 ยีนมี Peak สูงสุดเพียง Peak เดียว และไม่พบ Peak อื่นที่แสดงถึงการปนเปื้อนจาก DNA template ชนิดอื่น, Primer dimer และ Non-specific PCR product อีกด้วย (ภาพที่ 23 และ 24)



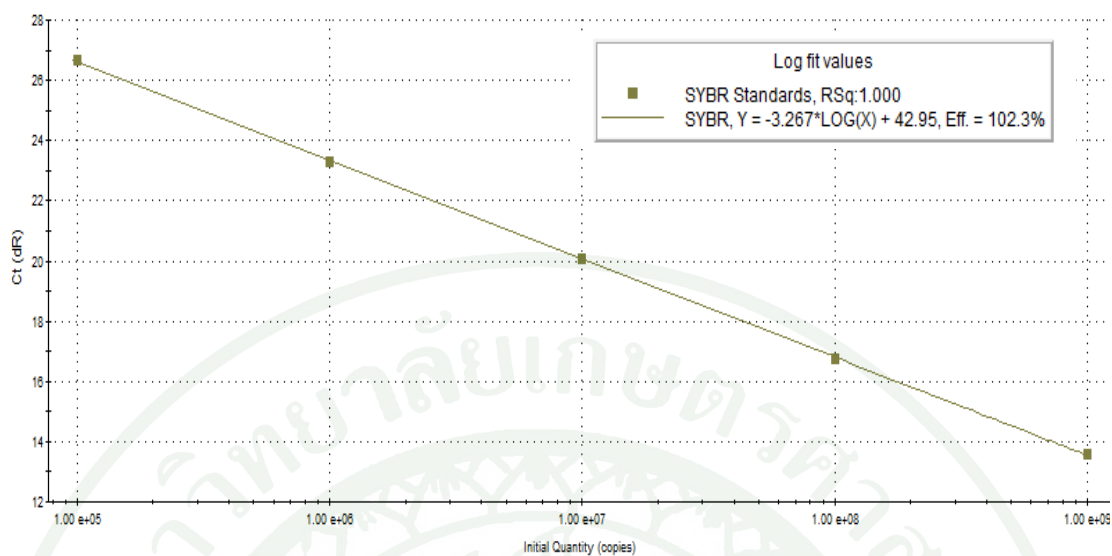
ภาพที่ 19 Amplification plots ของปฏิกิริยา PCR ในช่วง Exponential phase จากการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสง Brilliant<sup>®</sup> II SYBR<sup>®</sup> Green โดยใช้ Plasmid ที่มีชิ้น Insert ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล เป็นแม่แบบ (Template) ซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน โดยมีค่า Copy number เป็น  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  และ  $10^5$  ตามลำดับ



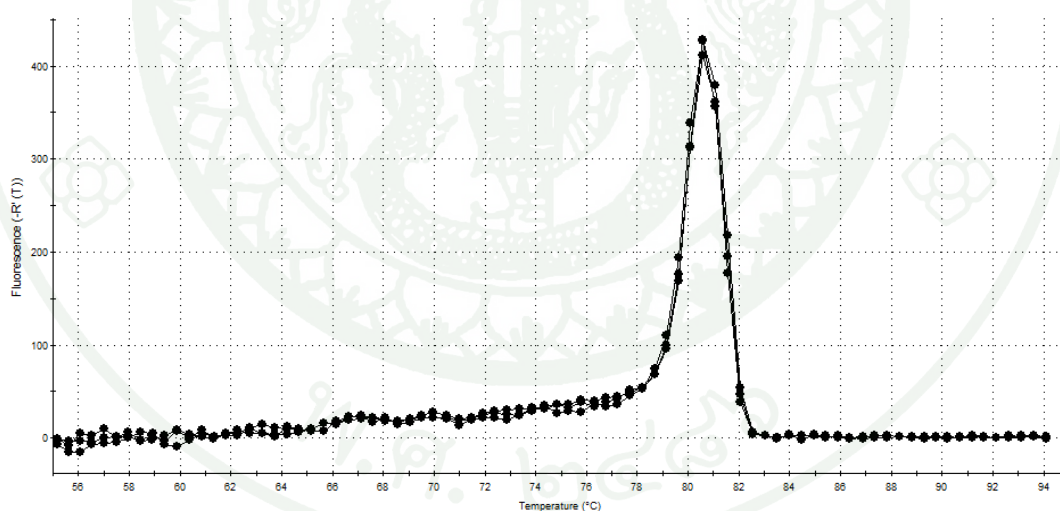
ภาพที่ 20 Amplification plots ของปฏิกิริยา PCR ในช่วง Exponential phase จากการตรวจวัดสัญญาณเรืองแสง Brilliant<sup>®</sup> II SYBR<sup>®</sup> Green โดยใช้ Plasmid ที่มีชิ้น Insert ของยีน  $\beta$ -actin ของปลานิล เป็นแม่แบบ (Template) ซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอนโดยมีค่า Copy number เป็น  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  ตามลำดับ



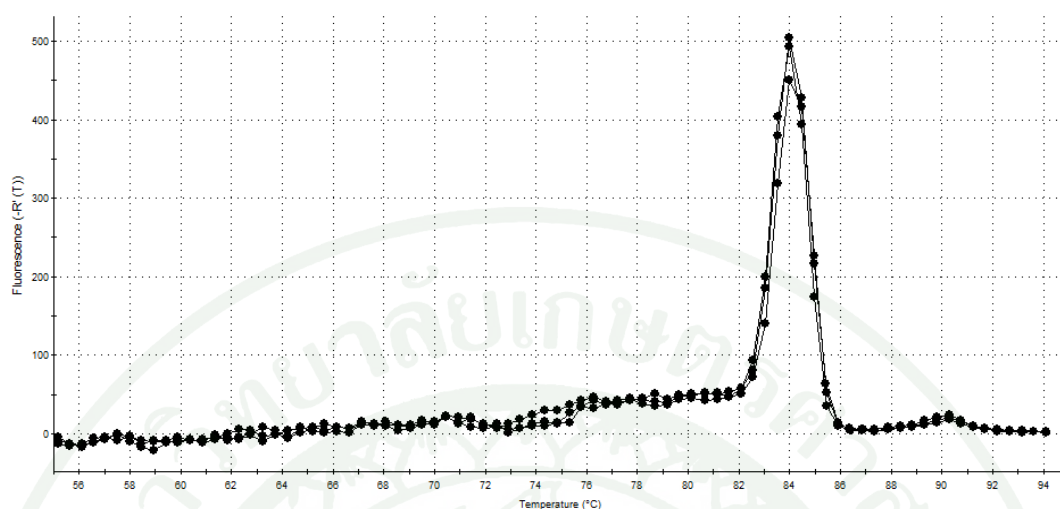
ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR



ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน  $\beta$ -actin ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR



ภาพที่ 23 Dissociation curve แสดงถึงค่า Melting temperature ( $T_m$ ) ของ Target DNA ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล

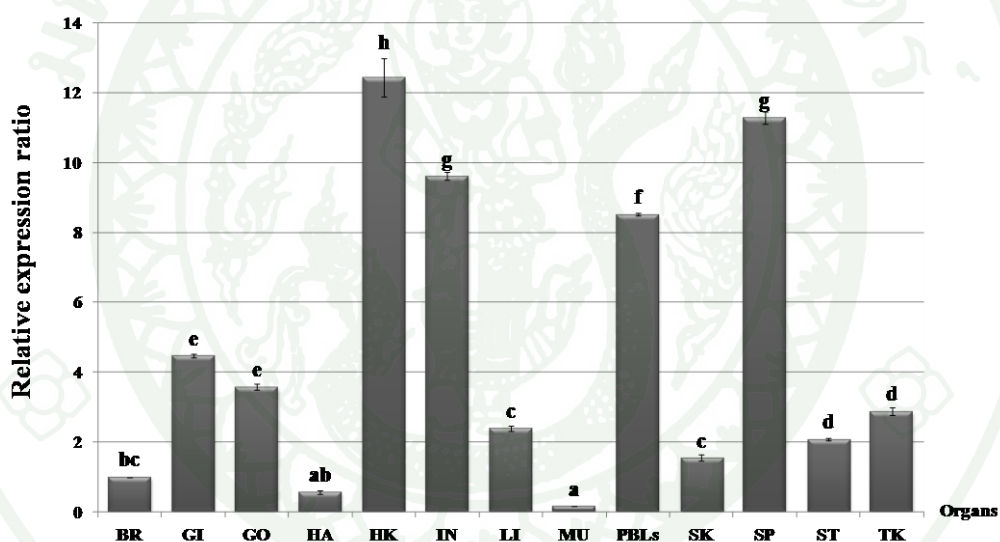


ภาพที่ 24 Dissociation curve แสดงถึงค่า Melting temperature ( $T_m$ ) ของ Target DNA ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน  $\beta$ -actin ของปลานิล

#### 4.2.2 Relative หรือ Comparative quantification ของยีน IgM heavy chain ของปลานิลปกติ

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิลปกติ ในอวัยวะ 13 ชนิด ได้แก่ สมอง (Brain), เหงือก (Gills), อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad), หัวใจ (Heart), ไตส่วนหน้า (Head kidney), ลำไส้ (Intestine), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต (Peripheral blood leukocytes), ผิวหนัง (Skin), ม้าม (Spleen), กระเพาะอาหาร (Stomach) และไตส่วนหลัง (Trunk kidney) ด้วยการใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR ซึ่งผลที่ได้จะแสดงออกมาเป็นค่า Ct โดยทำการเปรียบเทียบ (Normalize) กับค่า Ct ของยีน  $\beta$ -actin และใช้ค่า Ct ของระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ที่สมอง (Brain) เป็น Calibrator ซึ่งจะแสดงผลออกมาเป็นค่า Relative expression ratio การศึกษาครั้งนี้พบมีระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ได้ทั้ง 13 อวัยวะที่นำมาตรวจสอบและมีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ไตส่วนหน้า รองลงมาคือ ม้าม, ลำไส้และเม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต ตามลำดับ โดยมีค่า Relative expression ratio เท่ากับ 12.43, 11.28, 9.62 และ 8.51 เท่าตามลำดับ ในขณะที่กล้ามเนื้อพบว่ามีระดับการแสดงออกของ ยีน IgM heavy chain น้อยที่สุด โดยมีค่า Relative expression ratio เท่ากับ 0.15 เท่า ซึ่งเมื่อทำการทดสอบทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ที่อวัยวะเหล่านี้มีความแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 25) สอดคล้องกับการรายงานของ Jianjun *et al.* (2009) ที่ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IgM ในปลา European eel พบระดับการแสดงออกสูงสุดที่ Kidney โดยมีค่า Relative transcripts abundance ประมาณ 1.4 เท่า ตามมาด้วย Spleen, Gills และ Liver มีค่า Relative transcripts abundance ประมาณ 0.8, 0.6 และ 0.4 เท่า ตามลำดับ และพบระดับการแสดงออกน้อยที่ Muscle และ Heart โดยมีค่า Relative transcripts abundance ประมาณ 0.3 และ 0.2 เท่า ตามลำดับ ขณะที่การศึกษาของ Mao *et al.* (2012) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน IgM ในปลา Red-spotted grouper มีการแสดงออกได้ในทุกอวัยวะที่นำมาตรวจสอบได้แก่ Muscle, Kidney, Heart, Thymus, Brain, Intestine, Gonad, Spleen, Liver และ Gills ซึ่งมีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ Spleen โดยมีค่า Relative quantification ประมาณ 38 เท่า



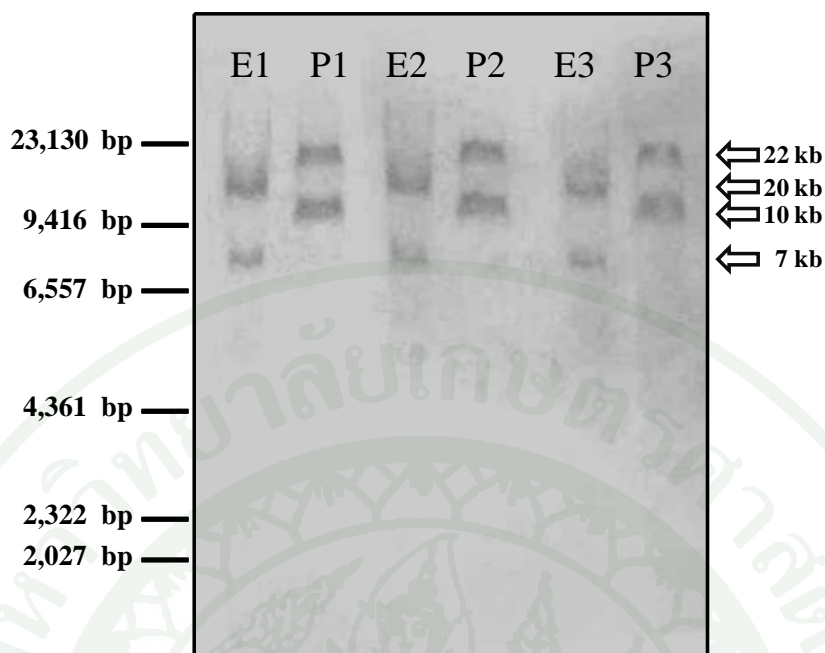
ภาพที่ 25 ระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในปลานิลปกติ โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time RT-PCR โดย BR คือ สมอง, GI คือ เหงือก, GO คือ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์, HA คือ หัวใจ, HK คือ ไตส่วนหน้า, IN คือ ลำไส้, LI คือ ตับ, MU คือ กล้ามเนื้อ, PBLs คือ เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต, SK คือ ผิวหนัง, SP คือ ม้าม, ST คือ กระจเพาะอาหารและ TK คือ ไตส่วนหลัง ตามลำดับ [ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟในแต่ละอวัยวะที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )]

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ดังที่ได้ข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิค Quantitative real-time RT-PCR จะสามารถตรวจสอบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ในแต่ละอวัยวะได้อย่างชัดเจน ซึ่งการใช้เทคนิค Conventional RT-PCR ไม่สามารถแสดงให้เห็นได้และเมื่อพิจารณาผลของการศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ทั้งการใช้เทคนิค Conventional RT-PCR และ Quantitative Real-time RT-PCR ที่พบว่ายีนชนิดนี้มีการแสดงออกในทุก ๆ อวัยวะที่ทำการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่า อวัยวะเหล่านี้ของปลานิลน่าจะมี Population ของ B cells ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้าง IgM กระจายตัวอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะใน Head kidney, Intestine, PBLs และ Spleen นั้นจะสามารถตรวจพบการแสดงออกได้มากที่สุด ทั้งนี้เป็นที่ทราบแล้วว่า Head kidney, Intestine และ Spleen จัดเป็น Lymphoid organs ที่สำคัญที่มีองค์ประกอบของ Haemopoietic tissues ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่สำคัญในการสร้างเซลล์เม็ดเลือด (Abbas *et al.*, 2007) จึงทำให้มีโอกาสพบการแสดงออกมากกว่าอวัยวะชนิดอื่น ๆ ขณะที่ PBLs นั้นน่าจะมี Mature B cells ไหลเวียนอยู่เป็นจำนวนมาก ส่วนการตรวจพบการแสดงออกในอวัยวะอื่น ๆ ในระดับที่ต่ำลงมานั้นอาจเป็นไปได้ว่า B cells บางส่วนสามารถหมุนเวียนอยู่ในกระแสโลหิตแทรกตัวเข้าไปอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลานิลได้ (Mao *et al.*, 2012) จึงทำให้พบการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ได้ในทุกอวัยวะที่นำมาตรวจสอบ โดยการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ที่ Lymphoid organs ที่ได้แก่ Head kidney, Spleen และ Intestine ซึ่งอวัยวะเหล่านี้ถือเป็นอวัยวะหลักที่มีความสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็ง โดย Head kidney นั้นจัดเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในการผลิตเซลล์เม็ดเลือด (Hematopoietic organ) ทุกชนิด ซึ่งเทียบเท่าได้กับ Bone marrow ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลังชั้นสูง (Bone marrow equivalent) ส่วน Spleen นั้นจัดเป็นอวัยวะที่สามารถกักเก็บแอนติเจนที่ไหลเวียนเข้ามาทางกระแสโลหิตเพื่อรอให้มาพบกับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลายชนิด (Germinal center) รวมทั้ง B cells ด้วย ทั้งนี้เพื่อสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแล้วก่อให้เกิดกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นอย่างจำเพาะเจาะจงต่อไป (Grontvedt and Espelid, 2003; Saha *et al.*, 2005) นอกจากนี้การออกแบบ Specific primers เพื่อใช้ในการแสดงออกของยีน IgM heavy chain โดยใช้เทคนิคทั้ง 2 ได้ทำการออกแบบในบริเวณ C<sub>μ</sub>2-C<sub>μ</sub>3 ซึ่งจะสามารถตรวจสอบได้ทั้ง Membrane-bound และ Secreted forms ทำให้ปริมาณการแสดงออกนั้นเป็นระดับการแสดงออกรวมทั้งของ Membrane-bound และ Secreted forms ด้วย ซึ่งถ้าหากต้องการตรวจสอบการแสดงออกเฉพาะ Membrane-bound form ควรต้องออกแบบ Forward primer ให้อยู่ในบริเวณ Constant regions และ Reverse primer ให้อยู่ในบริเวณ Transmembrane domains

นอกจากนี้การแสดงออกใน Lymphoid organ ชนิดต่าง ๆ นั้นจะรวมเอาการตรวจสอบของ IgM heavy chain ใน Population ของ B cells ได้ในทุก ๆ ระยะ ไม่ว่าจะเป็น Pro-B cells, Pre-B cells, Immature B cells ไปจนถึง Mature B cells ทั้งที่อยู่ในรูปของ Membrane-bound form และ Secreted forms ซึ่งอาจมีผลทำให้การแสดงออกของ IgM heavy chain ในอวัยวะเหล่านี้ มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าอวัยวะชนิดอื่น ๆ ส่วนการแสดงออกในอวัยวะที่ไม่ใช่ Lymphoid organs นั้นจะเป็นผลมาจากปริมาณ mRNA ของ IgM heavy chain ซึ่งสร้างจาก Population ของ B cells ที่เป็น Mature B cells เท่านั้น ซึ่งเป็นส่วนที่สนับสนุนว่า B cells นั้นสามารถเคลื่อนตัวไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ได้เพื่อเป็นการเตรียมพร้อมและรองรับกับการจดจำเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่จะสามารถเข้ามาสู่ร่างกายตามเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ เหล่านั้น

#### 5. การประเมินจำนวนและรูปแบบของยีน Immunoglobulin M heavy chain บริเวณ Constant region ที่อยู่บนสารพันธุกรรมทั้งหมด (Genome) ของปลาชนิด ด้วยวิธี Southern blot hybridization

จากการตัดจีโนม (Genomic DNA) ของปลานิล จำนวน 3 ตัว ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Eco* RI และ *Pst* I โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 นี้ไม่มีตำแหน่งตัดจำเพาะในส่วนของ Exon ของยีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region ที่  $C_{\mu}2$  และ  $C_{\mu}3$  หลังจากทำการตรวจสอบรูปแบบของ Bands ที่เกิดขึ้นพบว่า Genomic DNA ของปลานิลที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด มีรูปแบบการเกิด Band เหมือนกันในปลาทั้ง 3 ตัว โดยเอนไซม์ *Eco* RI มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ขนาดประมาณ 20 kb และ 7 kb ตามลำดับ ขณะที่ Genomic DNA ของปลานิลที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ขนาดประมาณ 22 kb และ 10 kb ตามลำดับ จากผลที่ได้ดังกล่าวแสดงว่าน่าจะมียีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region เพียง Copy เดียวในจีโนม (Genome) ของปลานิล เนื่องจากได้ทำการออกแบบ Probe ที่ใช้ในการจับกับยีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region ในบริเวณที่เป็น  $C_{\mu}2$  exon และ  $C_{\mu}3$  exon ให้มีขนาดใกล้เคียงกันจึงทำให้สามารถมองเห็นแถบของดีเอ็นเอที่มีความเข้มและขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 26)



**ภาพที่ 26** การวิเคราะห์จำนวนและรูปแบบของยีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization ของ Genome ของปลานิล จำนวน 3 ตัว ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ โดยตัวเลขทางด้านซ้ายมือแสดงถึงขนาดของ DNA มาตรฐานของ Lamda Hind III ladder, E คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ P คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ในปลาตัวที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการยืนยันให้เห็นว่าปลานิลเป็นปลาที่มีชุดโครโมโซมจำนวน 2 ชุด (Diploid) ซึ่งไม่มีการเกิด Duplication ของยีน IgM heavy chain ต่างจากปลา Carp และ Salmonid fish ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมจำนวน 4 ชุด (Tetraploid) หรือ Pseudo-tetraploid ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Hirono *et al.* (2003) ที่ได้ทำการสกัด Genomic DNA จาก Peripheral blood leukocytes (PBLs) ในปลา Japanese flounder แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI, *Hind* III และ *Pst* I หลังจากนั้นจึง Hybridize ด้วย IgM  $\mu$ 3- $\mu$ 4 domains probes พบ Band ขนาดประมาณ 6, 20 และ 4 kb ตามลำดับ และ Srisapoomee *et al.* (2004) ที่ได้ทำการสกัด Genomic DNA จาก Whole blood และ Genomic bacterial artificial chromosome (BAC) library ในปลา Japanese flounder แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Pst* I หลังจากนั้นจึง Hybridize ด้วย  $C_{\mu}1$ - $C_{\mu}2$  domains probes พบว่ามี Band เกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง ขนาดประมาณ 9 kb และ 6 kb เมื่อทำการตัดด้วย *Eco* RI และขนาด 4 kb เมื่อทำการตัดด้วย *Pst* I แสดงให้เห็นว่าปลา Japanese flounder มีชุดโครโมโซมจำนวน 2 ชุด (Diploid) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Channel catfish ก็มีการพบยีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region เพียง 1

Copy เท่านั้น (Ghaffari and Lobb, 1989b) ต่อมาได้มีการศึกษาครั้งใหม่ด้วยการสกัด Genomic DNA จาก Liver, Testes และ Erythrocytes จากปลา Channel catfish ทั้งหมด 3 ตัว แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst* I และ Hybridized ด้วย  $C_{\mu}1$  probe พบว่า *Pst* I fragment ที่ได้จากอวัยวะทั้ง 3 ชนิด มีขนาดประมาณ 3.1 kb นอกจากนี้ยังทำการตัด Genomic DNA ด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ hybridized ด้วย 1.6-kb *Pst* I-*Sst* I probe ซึ่งได้มาจากบริเวณที่อยู่ระหว่าง  $C_{\mu}1$  และ  $C_{\mu}2$  pseudogenes ของ Second H chain gene cluster พบ *Hind* III fragment ที่มีขนาดประมาณ 7.9 kb ซึ่งจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า IgH locus มีการเกิด Duplication ขนาดใหญ่ภายใน Locus นี้ ทำให้เกิด Gene clusters 2 ยีนเชื่อมต่อกันอยู่ด้วย Duplicated upstream cluster ที่ประกอบด้วย  $V_H$  segments หลาย Family,  $J_H$  segment, Germline-joined V-D-J segment และ Pseudogene C region exons (Ghaffari and Lobb, 1999) นอกจากนี้ Wilson *et al.* (1995) ทำการประเมินจำนวนยีน Immunoglobulin M heavy chain โดยทำการสกัด Genomic DNA จาก Erythrocytes ในปลา Bowfin (*Amia calva*) จำนวน 2 ตัว แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI และ *Sst* I หลังจากนั้น Hybridize ด้วย  $C_{\mu}4$  probe และจากปลา Longnose gar (*Lepisosteus osseus*) จำนวน 1 ตัว แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI, *Eco* RI+*Bam* HI, *Hind* III, *Bam* HI, *Pst* I และ *Sst* I หลังจากนั้น Hybridize ด้วย  $C_{\mu}1$  probe พบว่ารูปแบบของ Band ที่ได้แสดงให้เห็นว่า ยีน  $C_{\mu}$  ของปลา Bowfin เป็นแบบ Single copy แต่ในปลา Longnose gar คาดว่าน่าจะมีมากกว่า 1 Copy ซึ่งน่าจะเกิดการ Duplication ของยีน  $\mu$  ในขั้นของ Tetraploid state นอกจากนี้ การศึกษาของ Lundqvist *et al.* (2002) ใน Bottle dolphin โดยการตัด Genomic DNA จากตับด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Pst* I โดยใช้ Probe ที่จำเพาะกับ  $C_{\mu}2$  exon พบว่ามี Band ขนาด 4.5 kb เกิดขึ้น 1 band ได้ทั้ง 2 เอนไซม์ที่นำมาตัด แสดงให้เห็นว่ามียีน IgM heavy chain เพียง 1 Copy number เท่านั้น ขณะที่ Coscia *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษานับยีน Ig heavy chain ใน Skates 4 สายพันธุ์ โดยทำการสกัด Genomic DNA จากม้าม แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III หลังจากนั้นจึงทำการ Hybridize ด้วย  $C_{\mu}$  region probe ที่ออกแบบอยู่ในช่วงปลายของ FR3 ถึงปลายของ  $C_{\mu}4$  region ซึ่งพบว่ามี Band เกิดขึ้นหลายตำแหน่งและได้ทำการสรุปว่ามียีน  $Ig\mu$  หลาย Copy number เช่นเดียวกับการศึกษาของ Smith *et al.* (2012) ทำการศึกษาจำนวนยีน Ig heavy chain ในปลา Spiny dogfish โดยสกัด Genomic DNA จากตับแล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Sac* I, *Spe* I และ *Pst* I หลังจากนั้นจึงทำการ Hybridize ด้วย C4 domain probe พบว่ามีหลาย Band เกิดขึ้นที่ตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลสูง แสดงให้เห็นว่าการจัดเรียงตัวของ Ig heavy chain ในปลา Spiny dogfish เป็นรูปแบบที่มี Multiple clusters อยู่ใน 1 positive fragment โดยจัดเรียงตัวกันเป็น Clusters ในรูปแบบ Tandem เรียงต่อกันไปบนเส้นของโครโมโซม

## สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ในปลานิล โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid amplification cDNA ends (RACE) พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 1,921 bp ซึ่งประกอบด้วย Open reading frame ความยาว 1,740 bp โดยสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 580 residues เมื่อพิจารณาแล้วพบว่ามียูบแบบเป็นคุณลักษณะของ IgM heavy chain secreted form เนื่องจากมีโครงสร้างประกอบด้วย L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>μ</sub>1-C<sub>μ</sub>2-C<sub>μ</sub>3-C<sub>μ</sub>4 โดยไม่พบในส่วนของ Transmembrane domain (TM) โดยสามารถพบบริเวณอนุรักษ์ที่สำคัญของโมเลกุล IgM ประกอบด้วยกรดอะมิโน Cysteine (C) และ Tryptophan (W) ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ทั้งหมด 10 และ 8 ตำแหน่ง ตามลำดับ ซึ่งมีความสำคัญต่อโครงสร้างของโมเลกุล IgM ในการสร้างพันธะ Inter และ Intra disulfide กับสาย Heavy และ Light chain นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง N-glycosylated sites ได้แก่ NSS 1 ตำแหน่งที่บริเวณ C<sub>μ</sub>2, NKT 1 ตำแหน่งที่บริเวณ C<sub>μ</sub>3 และ NTT 2 ตำแหน่งที่บริเวณ C<sub>μ</sub>4 ซึ่งมีความสำคัญต่อโครงสร้างและความยืดหยุ่นของบริเวณที่ใช้ในการจับกับแอนติเจน นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อความสามารถในการละลายน้ำ การขนหรือเคลื่อนที่ส่งไปยังบริเวณต่างๆ ภายในร่างกาย (Transport) การหลั่ง (Secretion) และการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Clearance) รวมไปถึงการคงความมีประสิทธิภาพในหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของบริเวณ Fc ของโมเลกุล IgM ให้มีความเหมาะสมต่อการจับกับ Fc receptor ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังพบ Specific motifs <sup>62</sup>GKGLEW<sup>67</sup> ในบริเวณ FR2 และ <sup>113</sup>YYCVR<sup>117</sup> บริเวณ FR3 ทั้งสองตำแหน่งนี้อยู่ในบริเวณ Antigen binding site ของโมเลกุล IgM โดยมีความสำคัญในการม้วนพับ (Folding) โครงสร้างโปรตีนให้มีความเหมาะสมต่อการจับกับแอนติเจน และยังพบ Motif <sup>122</sup>FDYWGKGTTVTVTT<sup>135</sup> บริเวณ FR4 ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบใน Ig heavy chain ของปลาทุกชนิด ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด Motif <sup>216</sup>LQCAVTH<sup>222</sup> เป็น Signature motif ที่อยู่บริเวณ C<sub>μ</sub>1 และ Motif <sup>433</sup>HEDLIEP<sup>439</sup> ในบริเวณ C<sub>μ</sub>3 ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ที่แสดงลักษณะที่สำคัญของ Immunoglobulin M เช่นเดียวกันกับที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrates) ทุกชนิด

2. การศึกษาความเหมือนและคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน IgM heavy chain ของปลานิล พบว่ามีค่าความเหมือนของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนสูงสุดกับปลา Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ที่ 62.6% และ 55.4% ตามลำดับ และมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ 75.0% นอกจากนี้การศึกษาค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า IgM heavy chain ของปลานิลจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ IgM heavy chain ของปลากระดูกแข็ง โดยมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากที่สุดกับ IgM heavy chain ของปลาที่จัดอยู่ใน Order

Perciformes และมีความสัมพันธ์รองลงมากับปลาที่จัดอยู่ใน Order Pleuronectiformes และ Order Tetraodontiformes ตามลำดับ

3. การศึกษาความหลากหลายของ Variable domain ของ cDNA ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล จาก cDNA library ของ Variable domains พบว่าสามารถจัดกลุ่ม  $V_H$ ,  $D_H$ , และ  $J_H$  ได้ 9, 6 และ 4 กลุ่ม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปลานิลมีการใช้  $V_H$  อย่างน้อย 9 กลุ่ม,  $D_H$  อย่างน้อย 6 กลุ่ม และ  $J_H$  อย่างน้อย 4 กลุ่ม ในการสร้างความหลากหลายของ Variable domain เพื่อใช้ในการจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายของกรดอะมิโนในส่วน of Variable domain ซึ่งประกอบด้วย Frame work region (FR) และ Complementary determining region (CDR) ของยีน IgM heavy chain ของปลานิล พบว่าวิธีของ Kabat and Wu (1971) แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในส่วนของ Variable domain ได้มากกว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Shannon analysis โดยผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า FR มีความหลากหลายของกรดอะมิโนน้อยกว่า CDR ซึ่ง CDR3 มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุด รองลงมาคือ CDR2 และ CDR1 ตามลำดับ

4. การศึกษาการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล ในเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน IgM heavy chain ของปลานิล มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่นำมาตรวจสอบโดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ Peripheral blood leukocytes (PBLs) นอกจากนี้การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน IgM heavy chain ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time RT-PCR พบว่ายีน IgM heavy chain ของปลานิล มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่นำมาตรวจสอบเช่นเดียวกัน โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ที่ไตส่วนหน้า รองลงมาคือ ม้าม ลำไส้และเม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการศึกษาล้ำกึ่งกับในกลุ่มของปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ

5. การประเมินจำนวนยีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region ที่อยู่บนสารพันธุกรรมทั้งหมด (Genome) ของปลานิล ด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่ายีน IgM heavy chain บริเวณ Constant region มีเพียง 1 copy number เท่านั้น จึงสรุปได้ว่าปลานิลมีชุดโครโมโซมจำนวน 2 ชุด (Diploid) เท่านั้น ต่างจาก Carp, Salmonid fish และ Longnose gar ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมจำนวน 4 ชุด (Tetraploid) ที่ใช้ในการสร้างโมเลกุล IgM heavy chain สำหรับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ Adaptive immunity

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนทั้งหมดของ cDNA ของยีน Immunoglobulin M heavy chain ของปลานิล ความหลากหลายของบริเวณที่ใช้ในการจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม จำนวนยีน Immunoglobulin M heavy chain บนโครโมโซมของปลานิล รวมถึงคุณลักษณะและการแสดงออกของยีนนี้ในสภาวะปกติ ซึ่งถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการทำให้สามารถเข้าใจถึงระบบการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาเพื่อหาแนวทางในการควบคุม ป้องกันและแก้ไขปัญหาโรคต่าง ๆ ในปลานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการต่อยอดงานวิจัยเพิ่มเติมในการศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ที่สามารถสร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย อาทิเช่น เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาใช้ในการหาวิธีที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลได้อย่างเป็นรูปธรรมและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กมลพร ทองอุไทย. 2539. **โรคปลานิล**. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 176/2539. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กรมประมง. 2555. **สถานการณ์เศรษฐกิจปลานิล**. กรมประมงเกษตรกลาง, กรุงเทพฯ.  
แหล่งที่มา: [http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/situation/Tilapia\\_main.html](http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/situation/Tilapia_main.html), 25 มกราคม 2555.
- กองประมงต่างประเทศ. 2555. **ข้อมูลการส่งออกสินค้าประมง**. กรมประมงเกษตรกลาง, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: [http://www.fisheries.go.th/foreign/index.php?option=com\\_content&view=category&id=36&Itemid=32](http://www.fisheries.go.th/foreign/index.php?option=com_content&view=category&id=36&Itemid=32), 25 มกราคม 2555.
- ชนกันต์ จิตมนัส. 2548. **เอกสารประกอบการสอนวิชาโรคปลา**. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 142 น.
- ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล. 2550. แนวคิดและการประยุกต์ทางวิทยาภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ, น. 329-334. ใน **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ครั้งที่ ๓๓**. โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทาราแกรนด์, กรุงเทพฯ.
- มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล พรรณศรี จริโมภาส สุจินต์ หนูขวัญ กำชัย ลาวัณยวุฒิวีระ วัชรกรโยธิน และ วิมล จันทโรทัย. 2536. การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล. **เอกสารเผยแพร่** ฉบับที่ 23. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- สมเจตน์ ปัญจวานิชย์. 2550. **ปลาเศรษฐกิจ**. หนังสือวิชาการประมงเพื่อส่งเสริมการเลี้ยงปลาเศรษฐกิจของไทย, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. **สถานการณ์การผลิตและการตลาดรายสัปดาห์**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: [http://www.oae.go.th/more\\_news.php?cid=95](http://www.oae.go.th/more_news.php?cid=95), 25 มกราคม 2555.

ฝ่ายเผยแพร่งานส่งเสริมการประมง. 2545. การเลี้ยงปลานิลในกระชัง. บทความการเพาะเลี้ยงปลา. แหล่งที่มา: [http://www.nicaonline.com/articles1/site/view\\_article.asp?idarticle=133](http://www.nicaonline.com/articles1/site/view_article.asp?idarticle=133), 19 กุมภาพันธ์ 2552.

Abbas, A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai. 2007. **Cellular and Molecular Immunology**. W. B. Saunder company, Philadelphia.

Abd-El-Rhman, A. M. 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 27: 454-459.

Abel, C. A., H. L. Spiegelberg and H. M. Grey. 1968. The carbohydrate content of fragments and polypeptide chains of human  $\gamma$ -myeloma proteins of different heavy chain subclasses. **Biochemistry** 7: 1271-1278.

Acton, R. T., P. F. Weinheimer, S. J. Hall, W. Niedermaier, E. Shelton and J. C. Bennett. 1971. Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 68: 107-111.

Al-Harbi, A. H. 1994. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture** 128: 195-201.

Al-Harbi, A. H. and M. N. Uddin. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture** 229: 37-44.

Alt, F. W. and D. Baltimore. 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79: 4118-4122.

- Amemiya, C. T. and G. W. Litman. 1990. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 811-815.
- Anderson, D. P. 1990. Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. **Am. Fish. Soc. Symp.** 8: 38-50.
- Andersson, E. and T. Matsunaga. 1993. Complete cDNA sequence of a rainbow trout IgM gene and evolution of vertebrate IgM constant domains. **Immunogenetics** 38: 243-250.
- Andersson, E. and T. Matsunaga. 1995. Evolution of immunoglobulin heavy chain variable region genes: a  $V_H$  family can last for 150-200 million years or longer. **Immunogenetics** 41: 18-28.
- Andersson, E. and T. Matsunaga. 1998. Evolutionary stability of the immunoglobulin heavy chain variable region gene families in teleost. **Immunogenetics** 47: 272-277.
- Aoki, T., T. Takano, M. D. Santos, H. Kondo and I. Hirono. 2008. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives, pp. 263-276. *In* Tsukamoto, K., T. Kawamura, T. Takeuchi, T. D. Beard, Jr. and M. J. Kaiser., eds. **Fisheries for Global Welfare and Environment, 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress.** Tokyo, Japan.
- Arakawa, H. and J. M. Buerstedde. 2004. Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. **Dev. Dynam.** 229: 458-464.
- Arason, G. 1996. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish Shellfish Immunol.** 6: 277-289.

- Bag, M. R., M. Makesh, K. V. Rajendran and S. C. Mukherjee. 2008. Characterization of IgM of Indian major carps and their cross-reactivity with anti-fish IgM antibodies. **Fish Shellfish Immunol.** 26: 275-278.
- Bazin, R., A. Darveau, F. Martel, A. Pelletier, L. Piche, M. St-Laurent, L. Thibault, A. Demers, L. Boyer and G. Lemieux. 1992. Increased avidity of mutant IgM antibodies caused by the absence of COOH-terminal glycosylation of the mu H chain. **J. Immunol.** 149: 3889-3893.
- Bengten, E., M. Wilson, N. Miller, L. W. Clem, L. Pilstrom and G. W. Warr. 2000. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 248:189-219.
- Bengten, E., S. Stromberg and L. Pilstrom. 1994. Immunoglobulin V<sub>H</sub> regions in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): their diversity and relationship to V<sub>H</sub> families from other species. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 109-122.
- Bengten, E., T. Leanderson and L. Pilstrom. 1992. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern. **Eur. J. Immunol.** 22: 294-301.
- Berens, S. J., D. E. Wylie and O. J. Lopez. 1997. Use of a single V<sub>H</sub> family and long CDR3s in the variable region of cattle Ig heavy chains. **Int. Immunol.** 9: 189-199.
- Berger, G. 2004. Hypotheses on a germline origin of antibody diversity. Possible applications: Improvement of the efficiency of immune response and autoimmune disease treatment. **Med. Hypotheses** 63: 847-854.

- Biswasa, S., D. Raoulta and J. M. Rolain. 2008. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. **Int. J. Antimicrob. Ag.** 32: 207-220.
- Bothwell, A. L. M., M. Paskind, M. Reth, T. Imanishi-Kari, K. Rajewsky and D. Baltimore. 1981. Heavy chain variable region contribution to the NP<sup>b</sup> family of antibodies : somatic mutation evident in a  $\gamma$ 2a variable region . **Cell.** 24: 625-637.
- Brodeur, P. H. and R. Riblet. 1984. The immunoglobulin heavy-chain variable region (IgH-V) locus in mouse. I. One hundred IgH-V genes comprise seven families of homologous genes. **Eur. J. Immunol.** 14: 922-930.
- Brown, G. D., I. M. Kaattari and S. L. Kaattari. 2006. Two new Ig V<sub>H</sub> gene families in *Oncorhynchus mykiss*. **Immunogenetics** 58: 933-936.
- Cao, D., A. Kocabas, Z. Ju, A. Karsi, P. Li, A. Patterson and Z. Liu. 2001. Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head kidney. **Anim. Genet.** 32: 169-188.
- Casali, P. and E. M. Schettino. 1996. Structure and function of natural antibodies. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 210: 167-179.
- Cheng, C. A., J. A. C. John, M. S. Wub, C. Y. Lee, C. H. Lin, C. H. Lin and C. Y. Chang. 2006. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. **Vet. Immunol. Immunop.** 109: 255-265.
- Coscia, M. R. and U. Oreste. 2003. Limited diversity of the immunoglobulin heavy chain variable domain of the emerald rockcod *Trematomus bernacchii*. **Fish Shellfish Immunol.** 14: 71-92.

- Coscia, M. R., E. Cocca, S. Giacomelli, F. Cuccaro and U. Oreste. 2012. Immunoglobulin from Antarctic fish species of Rajidae family. **Mar. Genom.** 5: 35-41.
- Coscia, M. R., V. Morea, A. Tramontano and U. Oreste. 2000. Analysis of a cDNA sequence encoding the immunoglobulin heavy chain of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. **Fish Shellfish Immunol.** 10: 343-357.
- Daggfeldt, A., E. Bengtén and L. Pilström. 1993. A cluster type organization of the loci of the immunoglobulin light chain in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) indicated by nucleotide sequences of cDNA and hybridization analysis. **Immunogenetics** 38: 199-209.
- Danilova, N., J. Bussmann, K. Jekosch and L. A. Steiner. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, Immunoglobulin Z. **Nat. Immunol.** 6: 295-302.
- Danilova, N., V. S. Hohman, E. H. Kim and L. A. Steiner. 2000. Immunoglobulin variable region diversity in the zebrafish. **Immunogenetics** 52: 81-91.
- Davis, B. D. 1973. **Microbiology; Including Immunology and Molecular Genetics.** Harper and Row, Hagerstown, USA.
- de Bono, B., M. Madera and C. Chothia. 2004. V<sub>H</sub> gene segments in the mouse and human genomes. **J. Mol. Biol.** 342: 131-143.
- de Lalla, C., C. Fagioli, F. S. Cessi, D. Smilovich and R. Sitia. 1998. Biogenesis and function of IgM: the role of the conserved mchain tail piece glycans. **Mol. Immunol.** 35: 837-845.

- Di, W., L. Tong-yan and L. Hong-bai. 2009. Characterization and genetic diversity of the sturgeon *Acipenser schrenskii* Ig heavy chain. **Immunobiology** 214: 359-366.
- Dooley, H. and M. F. Flajnik. 2005. Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. **Eur. J. Immunol.** 35: 936-945.
- Dooley, H., M. F. Flajnik and A. J. Porter. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. **Mol. Immunol.** 40: 25-33.
- Du Pasquier, L. D. 1993. Evolution of the immune system, pp. 199-233. *In* Paul, W. E., ed. **Fundamental immunology**. Raven Press, New York.
- Du Pasquier, L. D. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. **Biochem. Mol. Biol.** 129: 1-15.
- Dylke J., J. Lopes, M. D. Lawson, S. Machtaler and L. Matsuuchi. 2007. Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig $\alpha\beta$  in assembly of the B cell antigen receptor (BCR). **Immunol. Lett.** 112: 47-57.
- Ehlich, A., S. Schaal, H. Gu, D. Kitamura and W. Muller. 1993. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. **Cell** 72: 695-704.
- Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 827-839.

- FAO. 2012. **Fisheries Statistic**. Food and Agricultural Organization of the United Nation, Rome, Italy. Available Source: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>, March 26, 2012.
- Fahey, J. L. 1965. Antibodies and immunoglobulins. **J. Am. Med. Assn.** 194: 71-74.
- Flajnik, M. F. 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. **Nat. Rev. Immunol.** 2: 688-698.
- Flajnik, M. F. and L. Du Pasquier. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **Trends Immunol.** 25: 640-644.
- Frazer, J. K. and J. D. Capra. 1999. Immunoglobulin: structure and function., *In*: Paul, W. E. (Eds.), **Fundamental Immunology**. Lippencott- Raven, Philadelphia, pp. 37-74.
- Ghaffari, S. H. and C. J. Lobb. 1989a. Cloning and sequence analysis of channel catfish heavy chain cDNA indicate phylogenetic diversity within the IgM immunoglobulin family. **J. Immunol.** 142: 1356-1365.
- Ghaffari, S. H. and C. J. Lobb. 1989b. Nucleotide sequence of channel catfish heavy chain cDNA and genomic blot analyses: implications for the phylogeny of Ig heavy chains. **J. Immunol.** 143: 2730-2739.
- Ghaffari, S. H. and C. J. Lobb. 1991. Heavy chain variable region gene families evolved early in phylogeny. Ig complexity in fish. **J. Immunol.** 146: 1037-1046.
- Ghaffari, S. H. and C. J. Lobb. 1999. Structure and genomic organization of a second cluster of immunoglobulin heavy chain gene segments in the channel catfish. **J. Immunol.** 162: 1519-1529.

- Grontvedt, R. N. and S. Espeild. 2003. Immunoglobulin producing cells in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olfasen): localization in adults and during juvenile development. **Dev. Comp. Immunol.** 27: 1-10.
- Haire, R. N., C. T. Amemiya, D. Suzuki and G. W. Litman. 1990. Eleven distinct  $V_H$  gene families and additional patterns of sequence variation suggest a high degree of immunoglobulin gene complexity in a lower vertebrate, *Xenopus laevis*. **J. Exp. Med.** 171: 1721-1737.
- Hansen, J., J. A. Leong and S. Kaattari. 1994. Complete nucleotide sequence of a rainbow trout cDNA encoding a membrane bound form of immunoglobulin heavy chain. **Mol. Immunol.** 31: 499-501.
- Hansen, J. D., Landis, E. D., and R. B. Phillips. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 102: 6919-6924.
- Harding, F. A., Amemiya, C. T., Litman, R. T., Cohen, N., and G. W. Litman. 1990. Two distinct immunoglobulin heavy chain isotypes in a primitive, cartilaginous fish, *Raja erinacea*. **Nucleic Acids Res.** 18: 6369-6376.
- Hinds, K. R. and G. W. Litman. 1986. Major reorganization of immunoglobulin  $V_H$ -segmental elements during vertebrate evolution. **Nature** 320: 546-549.
- Hiltschmann, N. and L. C. Craig. 1965. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 53: 1403-1409.
- Hirono, I. and T. Aoki. 2003. Immuno-related genes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, pp. 286-300. In: Shimizu, N., T. Aoki, I. Hirono and F. Takashima, eds. **Aquatic Genomics**. Tokyo, Japan.

- Hirono, I. B. H. Nam, J. Enomoto, K. Uchino, T. Aoki. 2003. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 63-70.
- Hohman, V. S., D. B. Schuchman, S. F. Schluter and J. J. Marchalonis. 1993. Genomic clone for sandbar shark light chain: Generation of diversity in the absence of gene rearrangement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 9882-9886.
- Hohman, V. S., S. F. Schluter and J. J. Marchalonis. 1992. Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain: gene organization and implications for the evolution of light chains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 276-280.
- Holland, M. C. H. and J. D. Lambris. 2002. The complement system in teleosts. **Fish Shellfish Immunol.** 12: 399-420.
- Hombach, J., F. Lottspeich and M. Reth. 1990. Identification of the genes encoding the IgM- $\alpha$  and Ig- $\beta$  components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. **Eur. J. Immunol.** 20: 2795-2799.
- Honda, Y., H. Kondo, C. M. A. Caipang, I. Hirono and T. Aoki. 2010. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain genes in banded houndshark *Triakis scyllium*. **Fish Shellfish Immunol.** 29: 854-861.
- Honjo, T., A. Shimizu and Y. Yaoita. 1989. Constant-region genes of the immunoglobulin heavy chain and molecular mechanism of class switching. pp. 123-149. *In*: Honjo, T., F. W. Alt and T. H. Rabbits, eds. **Immunoglobulin Genes**. London.

- Hordvik, I., J. Thevarajan, I. Samdal, N. Bastani, and B. Krossoy. 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. **Scand. J. Immunol.** 50: 202-210.
- Hordvik, I., L. DeVries, C. Lindstr, A. M. Voie, A. L. J. Jacob and C. Endresen. 1997. Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic Salmon, *Salmo salar*. **Mol. Immunol.** 34: 631-639.
- Hordvik, I., A. M. Voie, J. Glette, R. Male and C. Endresen. 1992. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Eur. J. Immunol.** 22: 2957-2962.
- Hsu, E, J. Schwager and F. W. Alt. 1989. Evolution of immunoglobulin genes: V<sub>H</sub> families in the amphibian *Xenopus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 8010-8014.
- Jackson, K. J. L., B. Gaeta, W. Sewell and A. M. Collins. 2004. Exonuclease activity and P nucleotide addition in the generation of the expressed immunoglobulin repertoire. **BMC Immunol.** 5: 19.
- Jankovic, M., R. Casellas, N. Yannoutsos, H. Wardemann and M. C. Nussenzweig. 2004. RAGs and regulation of autoantibody. **Annu. Rev. Immunol.** 22: 485-501.
- Jianjun, F., G. Ruizhanga, L. Peng and G. Songlina. 2009. Molecular cloning and characterization analysis of immunoglobulin M heavy chain gene in European eel (*Anguilla anguilla*). **Vet. Immunol. Immunop.** 127: 144-147.
- Kabat, E. A. and T. T. Wu. 1971. Attempts to locate complementary-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. **Ann. NY. Acad. Sci.** 190: 382-393.

- Kabat, E. A. and T. T. Wu. 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of  $V_H$  and  $V_L$  genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody combining sites. **J. Immunol.** 147: 1709-1719.
- Kabat, E. A., T. T. Wu and H. Bilofsky. 1979. Evidence supporting somatic assembly of the DNA segments (minigenes), coding for the framework, and complementarity-determining segments of immunoglobulin variable regions. **J. Exp. Med.** 149: 1299-1313.
- Kabat, E. A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman and C. Foeller. 1991. **Sequences of proteins of immunological interest.** US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda.
- Kainz, P. 2000. The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations. **Biochim. Biophys. Acta** 1494: 23-27.
- Knight, K. L. 1992. Restricted  $V_H$  gene usage and generation of antibody diversity in rabbit. **Annu. Rev. Immunol.** 10: 593-616.
- Kobayashi, K., S. Tomonaga and T. Kajii. 1984. A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of cartilaginous fish, the skate, *Raja kenoei*: Isolation and characterization. **Mol. Immunol.** 21: 397-404.
- Kokubu, F., K. Hinds, R. Litman, M. J. Shablott, and G.W. Litman. 1988a. Complete structure and organization of immunoglobulin heavy chain constant region genes in a phylogenetically primitive vertebrate. **EMBO J.** 7: 1979-1988.

- Kokubu, F., R. Litman, M. J. Shamblott, K. Hinds, and G.W. Litman. 1988b. Diverse organization of immunoglobulin V<sub>H</sub> gene loci in a primitive vertebrate. **EMBO J.** 7: 3413-3422.
- Kozak, M. 1998. Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes. **Nucleic Acids Res.** 26: 4853-4859.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.** 27: 95-125.
- Kumar, S. and S. B. Hedges. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. **Nature** 392: 917-920.
- Lam, S. H., H. L. Chua, Z. Gong, T. J. Lam and Y. M. Sin. 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 9-28.
- Leal, C. A. G., G. A. Carvalho-Castro, P. S. C. Sacchetin, C. O. Lopes, A. M. Moraes and H. C. P. Figueiredo. 2010. Oral and parenteral vaccines against *Flavobacterium columnare*: evaluation of humoral immune response by ELISA and *in vivo* efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquacult. Int.** 18: 657-666.
- Lee, M. A., E. Bengten, A. Daggfeldt, A. S. Rytting and L. Pilstrom. 1993. Characterization of rainbow trout cDNAs encoding a secreted and membrane-bound Ig heavy chain and the genomic intron upstream of the first constant exon. **Mol. Immunol.** 30: 641-648.

- Lee, U. H., H. J. Pack, J. W. Do, J. D. Bang, H. R. Cho, B. K. Ko, C. W. Nam, D. H. Choi, H. K. Yu, C. S. Jeong, I. S. Han and J. W. Park. 2001. Flounder (*Paralichthys olivaceus*) cDNA encoding a secreted immunoglobulin M heavy chain. **Fish Shellfish Immunol.** 11: 537-540.
- Lee, V., J. L. Huang, M. F. Lui, K. Malecek, Y. Ohta, A. Mooers and E. Hsu. 2008. The evolution of multiple isotypic IgM heavy chain genes in the shark. **J. Immunol.** 180: 7461-7470.
- Levraud, J. P. and P. Boudinot. 2009. The immune system of teleost fish. **Med. Sci.** 25: 405-411.
- Li, Y. S., K. Hayakawa and R. R. Hardy. 1993. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. **J. Exp. Med.** 178: 951-960.
- Lieber, M. R. 1992. The mechanism of V(D)J recombination: A balance of diversity, specificity and stability. **Cell** 70: 873-876.
- Litman, G. W., M. K. Anderson and J. P. Rast. 1999. Evolution of antigen binding receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 17: 109-147.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods** 25: 402-408.
- Lundqvist, M. L., S. Stromberg and L. Pilstrom. 1998. Ig heavy chain of the sturgeon *Acipenser baeri*: cDNA sequence and diversity. **Immunogenetics** 48: 372-382.

- Lundqvist, M. L., D. L. Middleton, C. Radford, G. W. Warr and K. E. Magor. 2006. Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. **Dev. Comp. Immunol.** 30: 93-100.
- Lundqvist, M. L., K. E. Kohlberg, H. A. Gefroh, P. Arnaud, D. L. Middleton, T. A. Romano and G. W. Warr. 2002. Cloning of the IgM heavy chain of the bottle dolphin (*Tursiops truncatus*), and initial analysis of VH gene usage. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 551-562.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immunol.** 20: 137-151.
- Magor, B. G. and K. E. Magor. 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 651-682.
- Malecek, K., J. Brandman, J. E. Brodsky, Y. Ohta, M. F. Flajnik and E. Hsu. 2005. Somatic hypermutation and junctional diversification at Ig heavy chain loci in the nurse shark. **J. Immunol.** 175: 8105-8115.
- Manning, M. J. and T. Nakanishi. 1996. The specific immune system: Cellular defenses, pp. 160-195. *In* Iwama, G. and T. Nakanishi, eds. **The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment.** Academic Press, Inc, San Diego.
- Mao, M. G., J. L. Lei, P. M. Alex, W. S. Hong and K. J. Wang. 2012. Characterization of RAG1 and IgM (mu chain) marking development of the immune system in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). **Fish Shellfish Immunol.** 33: 725-735.

- Matsuda, F., E. K. Shin, H. Nagaoka, R. Matsumura, M. Haino, Y. Fukita, S. Taka-ishi, T. Imai, J.H. Riley, R. Anand, E. Soeda and T. Honjo. 1993. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3' 0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy chain locus. **Nat. Genet.** 3: 88-94.
- Matsuda, F., K. Ishii, P. Bourvagnet, K. Kuma, H. Hayashida, T. Miyata and Tasuku Honjo. 1998. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. **J. Exp. Med.** 188: 2151-2162.
- Matsunaga, T. and E. Andersson. 1997. Analysis of VH gene diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): both nonsynonymous and synonymous nucleotide changes are more frequent in CDRs than FRs. **Immunogenetics** 45: 201-208.
- Matsunaga, T., T. Chen and V. Tormanen. 1990. Characterization of a complete immunoglobulin heavy-chain variable region germline gene of rainbow trout. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 7767-7771.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway. 1997. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. **Cell** 91: 295-298.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway. 2002. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. **Science** 296: 298-300.
- Mietzner, T. A. and S. A. Morse. 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Nutr.** 14: 471-493.

- Miracle, A. L., M. K. Anderson, R. T. Litman, C. J. Walsh, C. A. Luer and E. V. Rothenberg. 2001. Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. **Int. Immunol.** 13: 567-580.
- Miyar, Y. C., S. Bird, J. W. Treasurer and C. J. Secombes. 2007. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 71-85.
- Mohamed H. M. and N. A. G. A. Refat. 2011. Pathological evaluation of probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) Fish in Sharkia Governorate, Egypt. **J. Am. Sci.** 7: 244-256.
- Morrison, R. N. and B. F. Nowak. 2002. The antibody response of teleost fish. **J. Exot. Pet Med.** 11: 46-54.
- Musmann, R., L. D. Pasquier and E. Hsu. 1996. Is *Xenopus* IgX an analog of IgA?. **Eur. J. Immunol.** 26: 2823-2830.
- Nagaoka, H., W. Yu and M. C. Nussenzweig. 2000. Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.** 12: 187-190.
- Nakanishi, T. and M. Ototake. 1999. The graft-versus host reaction (GVHR) in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. **Dev. Comp. Immunol.** 23: 15-26.
- Nakao, M., T. Moritomo, M. Tomana, K. Fujiki and T. Yano. 1997. Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy-chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Shellfish Immunol.** 8: 425-434.

- Nuttall, S. D., U. V. Krishnan, M. Hattarki, R. D. Gori, R. A. Irving and P. J. Hudson. 2001. Isolation of the new antigen receptor from Wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. **Mol. Immunol.** 38: 313-326.
- Ota, T. and M. Nei. 1995. Evolution of immunoglobulin V<sub>H</sub> pseudogenes in chickens. **Mol. Biol. Evol.** 12: 94-102.
- Ota, T., J. P. Rast, G. W. Litman and C. T. Amemiya. 2002. Lineage-restricted retention of a primitive immunoglobulin heavy chain isotype within the Dipnoi reveals an evolutionary paradox. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100: 2501-2506.
- Ota, T., T. Nguyen, E. Huang, H. W. Detrich and C. T. Amemiya. 2003. Positive Darwinian selection operating on the immunoglobulin heavy chain of Antarctic fishes. **J. Ex. Zool.** 295: 45-58.
- Ototake, M., K. Okamura, K. Hashimoto and T. Nakanishi. 2000. The function of the most primitive MHC class I genes comparable to those of humans. **Dev. Comp. Immunol.** 24 (Suppl 1): S79.
- Ozaki, K., R. Spolski, R. Ettinger, H. P. Kim, G. Wang, C. F. Qi, P. Hwu, D. J. Shaffer, S. Akilesh and D. C. Roopenian. 2004. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. **J. Immunol.** 173: 5361- 5371.
- Padlan, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. **Mol. Immunol.** 31: 169-217.
- Peixoto, B. R. and S. Brenner. 2000. Characterization of approximately 50 kb of the immunoglobulin V<sub>H</sub> locus on the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. **Immunogenetics** 51: 443-451.

- Pelletier, N. and M. G. M. Williams. 2009. B cell memory: how to start and when to end. **Nat. Immunol.** 10: 1233-1235.
- Pfaffl, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *In*: BUSTIN, S. A. ed. **A-Z of quantitative PCR.** La Jolla, CA, International University Line, p. 87-112.
- Pilstrom L. and E. Bengten. 1996. Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure. **Fish Shellfish Immunol.** 6: 243-262.
- Plouffe, D. A., P. C. Hanington, J. G. Walsh, E. C. Wilson and M. Belosevic. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. **Xenotransplantation** 12: 266-277.
- Popma, T. and M. Masser. 1999. **Tilapia: Life history and Biology.** Southern Regional Aquaculture Center Pub. SRAC-283: 4.
- Pridgeon, J. W., M. Aksoy, P. H. Klesius, Y. Li, X. Mu, K. Srivastava and G. Reddy. 2011. Identification and expression profiles of multiple genes in Nile tilapia in response to bacterial infections. **Vet. Immunol. Immunop.** 144: 111-119.
- Raison, R. L., C. J. Hull. and W. H. Hildemann. 1978. Characterization of immunoglobulin from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75: 5679-5682.
- Rast, J. P., M. K. Anderson, T. Ota, R. T. Litman, M. Margittai, M. J. Shablott and G. W. Litman. 1994. Immunoglobulin light chain class multiplicity and alternative organizational forms in early vertebrate phylogeny. **Immunogenetics** 40: 83-99.

- Rathbun, G., J. Berman, G. Yancopoulos and F. W. Alt. 1989. Organization and expression of the mammalian heavy chain variable region locus. **Immunoglobulin Genes**. Acad. Press Inc., San Diego, p. 63.
- Ravetch, J. V., U. Siebenlist, S. Korsmeyer, T. Waldmann and P. Leder. 1981. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. **Cell**. 27: 583-591.
- Reynaud, C. A., A. Dahan, V. Anquez and J. C. Weill. 1989. Somatic hyperconversion diversifies the single  $V_H$  gene of the chicken with a high incidence in the D region. **Cell** 59: 171-183.
- Reynaud, C. A., V. Anquez and J. C. Weill. 1991. The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. **Eur. J. Immunol.** 21: 2661-2670.
- Reynaud, C. A., V. Anquez, H. Grimal and J. C. Weill. 1987. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. **Cell** 48: 379-388.
- Reth, J. W., T. Tsubata, J. Hombach and M. Reth. 1991. Identification of components of the B cell antigen receptor complex. **Adv. Exp. Med. Biol.** 292: 207-214.
- Rodkhum, C., P. Kayansamruaj and N. Pirarat. 2011. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Thai J. Vet. Med.** 41: 309-314.
- Roitt, I., J. Brostoff and D. Male. 1993. **Immunology**. 3<sup>rd</sup> edition. Mosby Publishing, London.

- Roitt, I., J. Brostoff and D. Male. 2001. **Immunology**. 6<sup>th</sup> edition. Gower Medical Publishing, London.
- Roman, T., A. De Guerra and J. Chrlemagne. 1995. Evolution of specific antigen recognition: size reduction and restricted length distribution of the CDRH3 regions in the rainbow trout. **Eur. J. Immunol.** 25: 269-273.
- Roman, T., E. Andersson, E. Bengten, J. Hansen, S. Kaattari, L. Pilstrom, J. Charlemagne and T. Matsunaga. 1996. Unified nomenclature of Ig V<sub>H</sub> genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): definition of eleven V<sub>H</sub> families. **Immunogenetics** 43: 325-326.
- Romer, A. S. 1963. **The vertebrate body**. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Romer, A. S. 1967. Major steps in vertebrate evolution. **Science** 158: 1629-1637.
- Rumfelt, L. L., R. L. Lohr, H. Dooley and M. F Flajnik. 2004. Diversity and repertoire of IgW and IgM V<sub>H</sub> families in the newborn nurse shark. **BMC Immunol.** 5: 8.
- Saha, N. R., H. Suetake and Y. Suzuki. 2005. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes*. **Mol. Immunol.** 42: 113-124.
- Sardelli, A. D. 1993. Plateau effect-Understanding PCR limitations. **Amplifications** 9: 1-5.
- Savan, R., A. Aman, K. Sato, R. Yamaguchi and M. Sakai. 2005a. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. **Eur. J. Immunol.** 35: 3320-3331.

- Savan, R., A. Aman, M. Nakao, H. Watanuki and M. Sakai. 2005b. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Immunogenetics** 57: 458-463.
- Schaerlinger, B., M. Bascope and J. P. Fripiat. 2008. A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. **Mol. Immunol.** 45: 776-786.
- Schneck, J. L. and L. F. Caslake. 2006. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from fish collected from warm and cold water. **J. Fish. Dis.** 29: 245-249.
- Schroeder, H. W., J. L. Hillson, and R. M. Perlmutter. 1990. Structure and evolution of mammalian V families . **Int. Immunol.** 2: 41-50.
- Schwager, J., C. A. Mikoryak and L. A. Steiner. 1988. Amino acid sequence of heavy chain from *Xenopus laevis* IgM deduced from cDNA sequence: implications for evolution of immunoglobulin domains. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 85: 2245-2249.
- Secombes, C. J., J. Zou, K. Laing, G. D. Daniels and C. Cunningham. 1999. Cytokine genes in fish. **Aquaculture** 172: 93-102.
- Shakin-Eshleman, S. H., S. L. Spitalnik and L. Kasturi. 1996. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. **J. Biol. Chem.** 271: 6363-6366.
- Shamblott, M. J. and G. W. Litman. 1989a. Complete nucleotide sequence of primitive vertebrate immunoglobulin light chain genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 4684-4688.

- Shamblott, M. J. and G. W. Litman. 1989b. Genomic organization and sequences of immunoglobulin light chain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization. **EMBO J.** 8: 3733-3739.
- Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. **Bell Syst. Tech. J.** 27: 379-423.
- Shulman, M. J., N. Pennell, C. Collins, N. Hozumi. 1986. Activation of complement by immunoglobulin M is impaired by the substitution serine-406—asparagine in the immunoglobulin mu heavy chain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 7678-7682.
- Smith, L. E., K. Crouch, W. Cao, M. R. Muller, L. Wub, J. Steven, M. Lee, M. Liang, M. F. Flajnik, H. H. Shih, C. J. Barelle, J. Paulsen, D. S. Gill and H. Dooley. 2012. Characterization of the immunoglobulin repertoire of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). **Dev. Comp. Immunol.** 36: 665-679.
- Solem, S. T., I. Hordvik, J. A. Killie, G. W. Warr and T. O. Jorgensen. 2001. Diversity of the immunoglobulin heavy chain in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is contributed by genes from two parallel IgH isoloci. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 403-417.
- Srisapoom, P., T. Ohira, I. Hirono and T. Aoki. 2004. Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Immunogenetics** 56: 292-300.
- Srisapoom, P., E. Wangkahart, N. Areechon. 2008. Gene expression analyses in head kidney and spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus agalactiae* by Expressed Sequence Tags (ESTs). **NCBI GenBank database**, Direct submission.

- Stafford, J. L. and M. Belosevic. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. **Dev. Com. Immunol.** 27: 539-554.
- Stavnezer, J. and C. T. Amemiya. 2004. Evolution of isotype switching. **Semin. Immunol.** 16: 257-275.
- Stenvik, J. and T. O. Jorgensen. 2000. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. **Immunogenetics** 51: 452-461.
- Stenvik, J., A. S. Lundback, T. O. Jorgensen and L. Pilstrom. 2000. Variable region diversity of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) immunoglobulin heavy chain. **Immunogenetics** 51: 670-680.
- Stewart, J. J., Lee, C. Y., Ibrahim, S., Watts, P., Shlomchik, M., Weigert, M. and Litwin, S. 1997. A Shannon entropy analysis of immunoglobulin and T cell receptor. **Mol. Immunol.** 34: 1067-1082.
- Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **J. Fish Biol.** 40: 963-965.
- Taylor, B., J. F. Wright, S. Arya, D. E. Isenman, M. J. Shulman, R. H. Painter. 1994. C1q binding properties of monomer and polymer forms of mouse IgM mu-chain variants. Pro544Gly and Pro434Ala. **J. Immunol.** 153: 5303-5313.
- Tellez-Banuelos, M. C., A. Santerre, J. Casas-Solis and G. Zaitseva. 2010. Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunol.** 28: 401-405.

- Tian, C., X. Chen and J. Ao. 2009. The up-regulation of large yellow croaker secretory IgM heavy chain at early phase of immune response. **Fish. Physiol. Biochem.** 36: 483-490.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. **Nature** 302: 575-581.
- Tort, L., J. C. Balasch and S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Immunologia** 22: 277-286.
- Tutter, A., P. Brodeur, M. Shlomchik, R. Riblet. 1991. Structure, map position, and evolution of two newly diverged mouse Ig V<sub>H</sub> gene families. **J. Immunol.** 147: 3215-3223.
- Wang, D. and H. B. Liu. 2007. Immunoglobulin heavy chain constant region of five Acipenseridae: cDNA sequence and evolutionary relationship. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 46-51.
- Wang, F., A. Nakouzi, R. H. Angeletti and A. Casadevall. 2003. Site-specific characterization of the N-linked oligosaccharides of a murine immunoglobulin M by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. **Anal. Biochem.** 314: 266-280.
- Walport, M. J. 2001. Complement, first of two parts. **N. Engl. J. Med.** 344: 1058-1066.
- Warr, G. W. 1995. The immunoglobulin genes of fish. **Dev. Comp. Immunol.** 19: 1-12.
- Warr, G. W. 1997. The adaptive immune system of fish. **Dev. Biol. Stand.** 90: 15-21.

- Warr, G. W., D. L. Middleton, N. W. Miller, L. W. Clem and M. R. Wilson. 1991. An additional family of V<sub>H</sub> sequences in the channel catfish. **Eur. J. Immunogenet.** 18: 393-397.
- Williams, A. F. and A. N. Barclay. 1988. The immunoglobulin super family-domains for cell surface recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 6: 381-405.
- Willems van Dijk, K., F. Mortari, P. M. Kirkham, H. W. Schroeder Jr., E. C. B. Milner. 1993. The human immunoglobulin V<sub>H</sub> gene family consists of a small, polymorphic group of six to eight gene segments dispersed throughout the V<sub>H</sub> locus. **Eur. J. Immunol.** 23: 832-839.
- Willett, C. E., A. G. Zapata, N. Hopkins and L. A. Steiner. 1997. Expression of zebrafish rag genes during early development identifies the thymus. **Dev. Biol.** 182: 331-341.
- Wilson, R., C. Chen and N. A. Ratcliffe. 1999. Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. **J. Immunol.** 162: 1590-1596.
- Wilson, M. R., A. Marcuz, F. van Ginkel, N. W. Miller, L. W. Clem, D. Middleton and G. W. Warr. 1990. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. **Nucleic Acids Res.** 18: 5227-5233.
- Wilson, M., E. Bengten, N. W. Miller, L. W. Clem, L. D. Pasquier and G. W. Warr. 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 4593-4597.

- Wilson, M. R., D. Middleton and G. W. Warr. 1991. Immunoglobulin V<sub>H</sub> genes of the goldfish, *Carassius auratus*: a re-examination. **Mol. Immunol.** 28: 449-457.
- Wilson, M. R., E. van Ravenstein, N. W. Miller, L. W. Clem, D. L. Middleton and G. W. Warr. 1995. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Dev. Comp. Immunol.** 19: 153-164.
- Wu, L., K. Oficjalska, M. Lambert, B. J. Fennell, A. Darmanin-Sheehan, D. N. Shuilleabhain, B. Autin, E. Cummins, L. Tchistiakova, L. Bloom, J. Paulsen, D. Gill, O. Cunningham and W. J. J. Finlay. 2012. Fundamental characteristics of the immunoglobulin V<sub>H</sub> repertoire of chickens in comparison with those of humans, mice, and camelids. **J. Immunol.** 188: 322-333.
- Wu, T. T. and E. A. Kabat. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. **J. Exp. Med.** 132: 211-250.
- Wu, T. T., Johnson G. and Kabat E. A. 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. **Proteins** 16: 1-7.
- Xiao, F. S., Y. P. Wang, W. Yan, M. X. Chang, W. J. Yao, Q. Q. Xu, X. X. Wang, Q. Gao and P. Niea. 2010. Ig heavy chain genes and locus in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. **Fish Shellfish Immunol.** 29: 594-599.
- Yang, F., T. Ventura-Holman, G. C. Waldbieser and C. J. Lobb. 2003. Structure, genomic organization, and phylogenetic implications of six new V<sub>H</sub> families in the channel catfish. **Mol. Immunol.** 40: 247-260.
- Zhang, Y. A., P. Nie, Y. P. Wang, Z. Y. Zhu. 2003. cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. **Fish Shellfish Immunol.** 14: 477-480.

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ - นามสกุล	นางสาวจิราภรณ์ ภูยินดี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 20 พฤศจิกายน 2528
สถานที่เกิด	จันทบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ประกาศเกียรติคุณ รางวัลผลงานวิจัยระดับชมเชย จิราภรณ์ ภูยินดี ประพันธ์ศักดิ์ ศีระชะภูมิและ ศศิมนัส อุดจักษ์. การศึกษาโครงสร้างทางอณูวิทยาและ การวิเคราะห์ความหลากหลายของบริเวณที่ใช้จับ แอนติเจนของ Complementary DNA ของยีน Immunoglobulin M สายหลักของปลาไนล <i>Oreochromis niloticus</i> ในงานประชุมวิชาการแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร ภายใต้ โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิทยาการ ขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	