



การพัฒนาSubunit vaccineไทย

เพื่อการเพาะเลี้ยงปลาที่ยั่งยืน

By KMUTT

KMUTT's Protein Research Group



Dr. Triwit Rattanarojpong



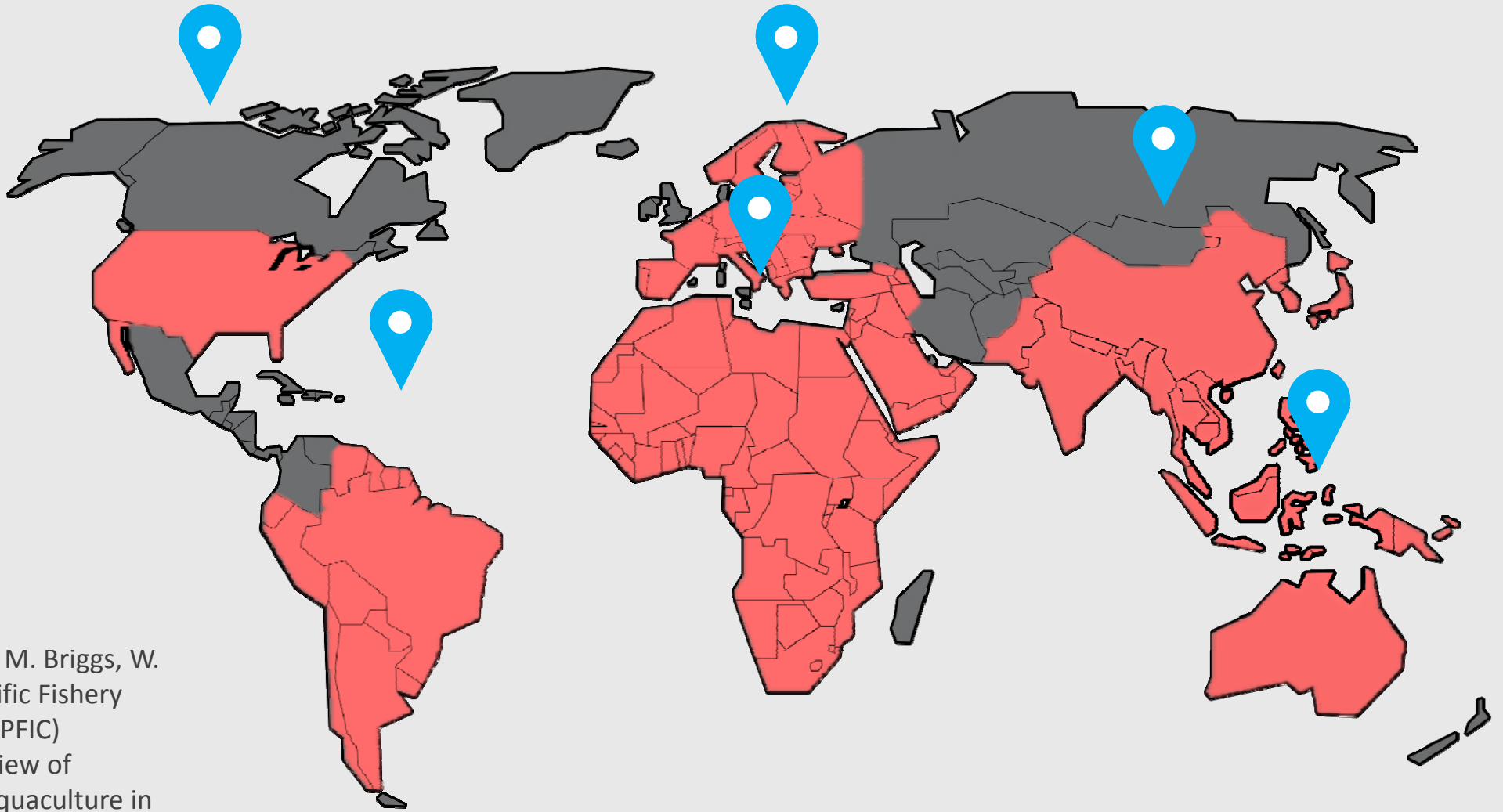
Asst. Dr. Pongsak Khunrae



Dr. Ha Thanh Dong

Microbiology Department, Faculty of Science, KMUTT

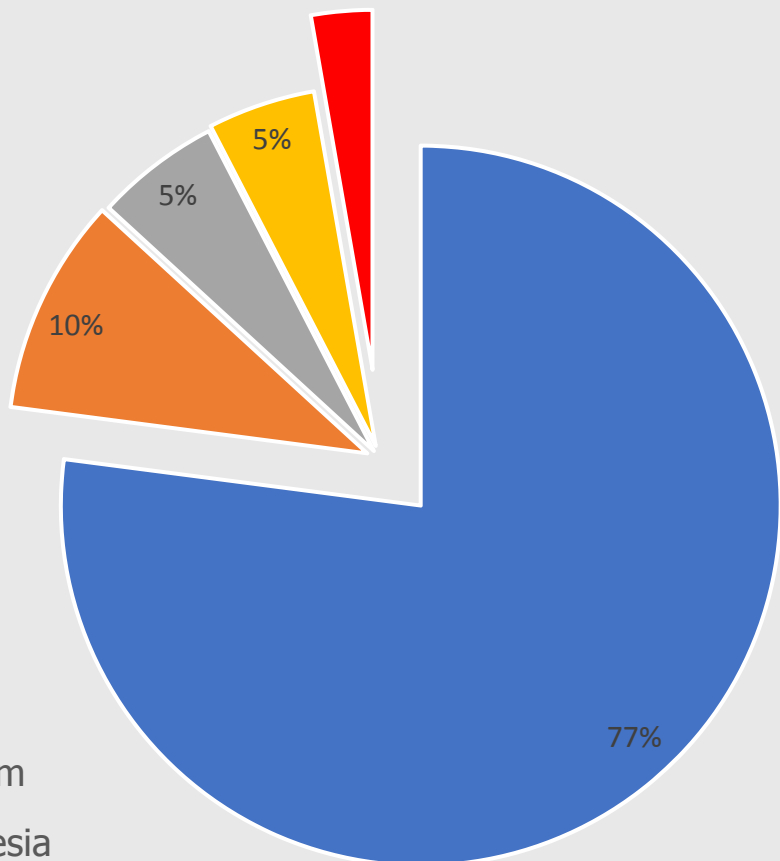
ประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงปลา



of: S. F. Smith, M. Briggs, W. ...
ao, Asia-Pacific Fishery
Commission (APFIC)
Regional overview of
fisheries and aquaculture in
Asia and the Pacific 2012, p

ภาพแสดงการเพาะเลี้ยงปลาใน เอเชียในปี 2013

[PERCENTAGE]



China
India
Vietnam
Indonesia
Thailand

- 1st is China = 77%
- 2nd is India = 10%
- 3rd is Vietnam = 5%
- 4th is Indonesia = 5%
- **5th is Thailand** = 3%

Ref: S. F. Smith, M. Briggs, W. Miao, Asia-Pacific Fishery Commission (APFIC) Regional overview of fisheries and aquaculture in Asia and the Pacific 2012, p 78.

การเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทย

1st ปลานิล

2nd ปลาดุก

3rd ปลาทับทิม

4th ปลาตะเพียน

5th ปลาสลิด

1st ปลานิล = 147,400 ตัน

2nd ปลาดุก = 130,000 ตัน

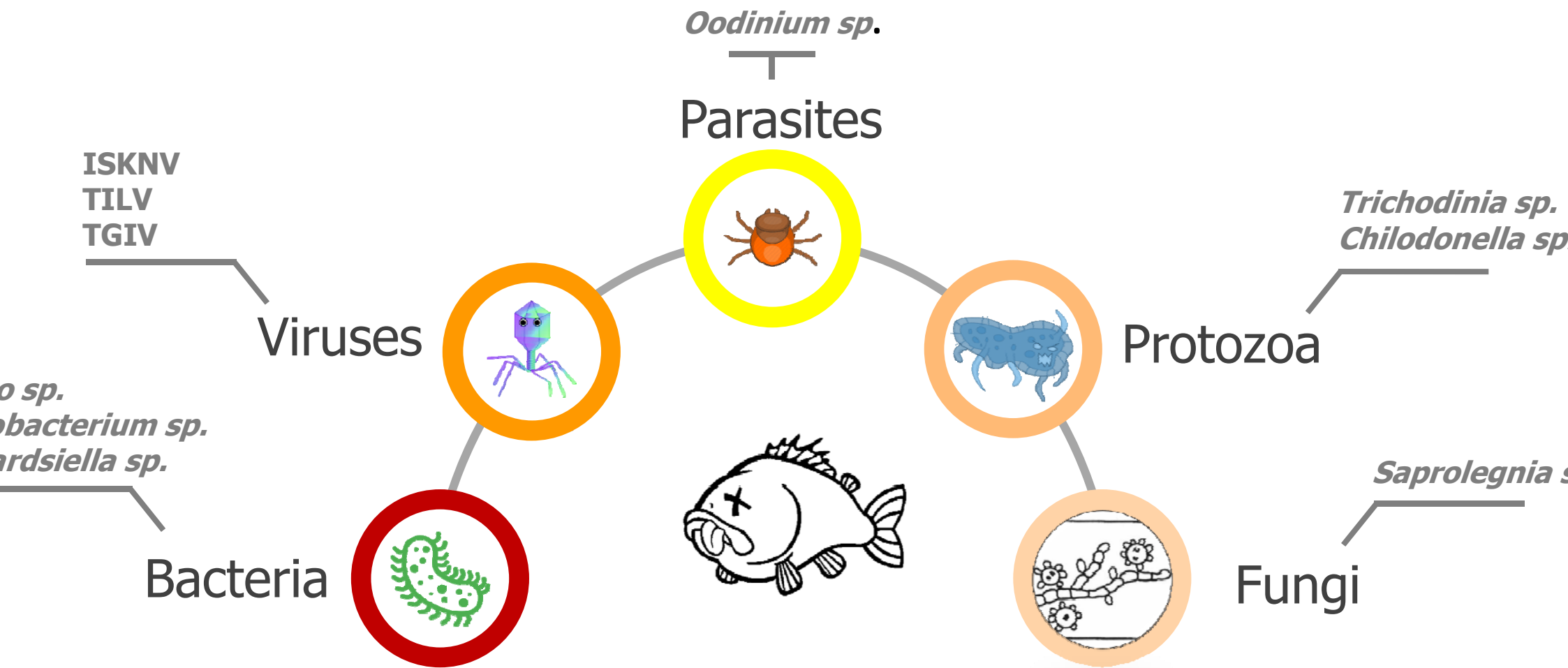
3rd ปลาทับทิม = 67,400 ตัน

4th ปลาตะเพียน = 47,200 ตัน

5th ปลาสลิด = 34,200 ตัน

Ref: S. F.Smith, M. Briggs, W. Miao, Asia-Pacific
Fishery Commission (APFIC)
Regional overview of fisheries and aquaculture in
Asia and the Pacific 2012, p 78.

สาเหตุของการเกิดโรคในปลา



การพัฒนาวัคซีน

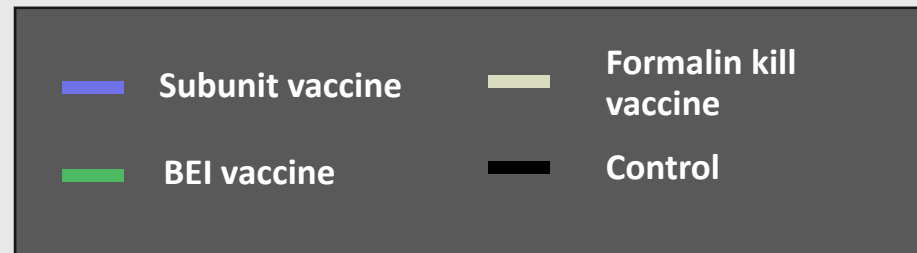
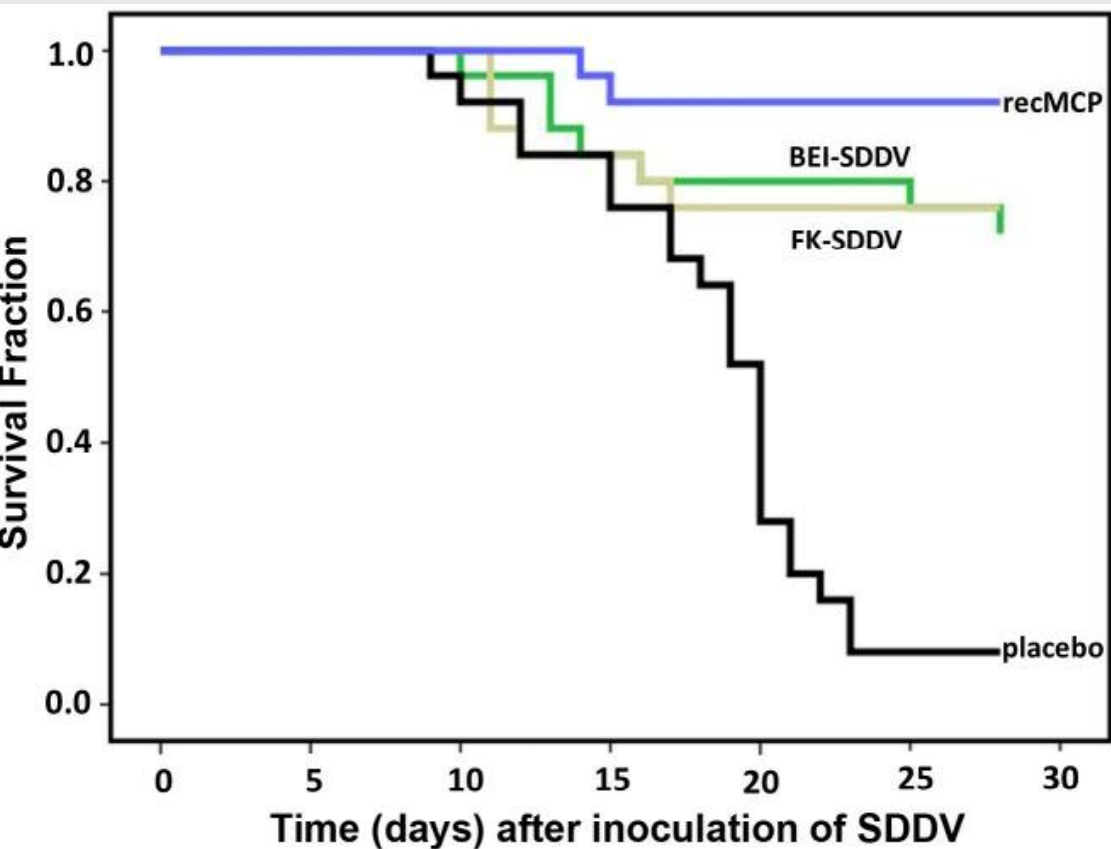


1 วัคซีนเชื้อตาย = วัคซีนที่ผลิตขึ้นโดยใช้เชื้อโรคทั้งตัวที่ตายแล้ว

2 วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ = วัคซีนที่ใช้เชื้อโรคมานำให้อ่อนฤทธิ์ลงจนไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้

3 วัคซีนที่ใช้ชิ้นส่วนบางส่วน = วัคซีนที่ทำจากบางส่วนของแบคทีเรียหรือไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกัน

ตัวอย่างการใช้วัคซีน (SDDV)

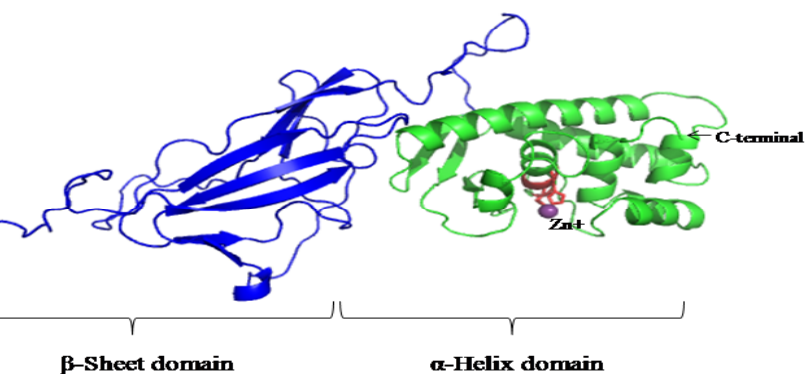


จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า
การใช้วัคซีนที่ได้จาก RecMCP
สามารถช่วยป้องกันการตาย
ได้มากกว่า **Inactivated virus**
ทั้ง 2 รูปแบบ

Epr3 is a conserved immunogenic protein among *Aeromonas* species and able to induce antibody response in Nile Tilapia

Termsri Peepim¹, Ha Thanh Dong^{2,3}, Saengchan Senapin^{3,4}, Pongsak Khunrae¹ and Triwit Rattanarojpong^{1, *}

β-sheet domain strongly induce antibody in fish due to its nature form is conserved.



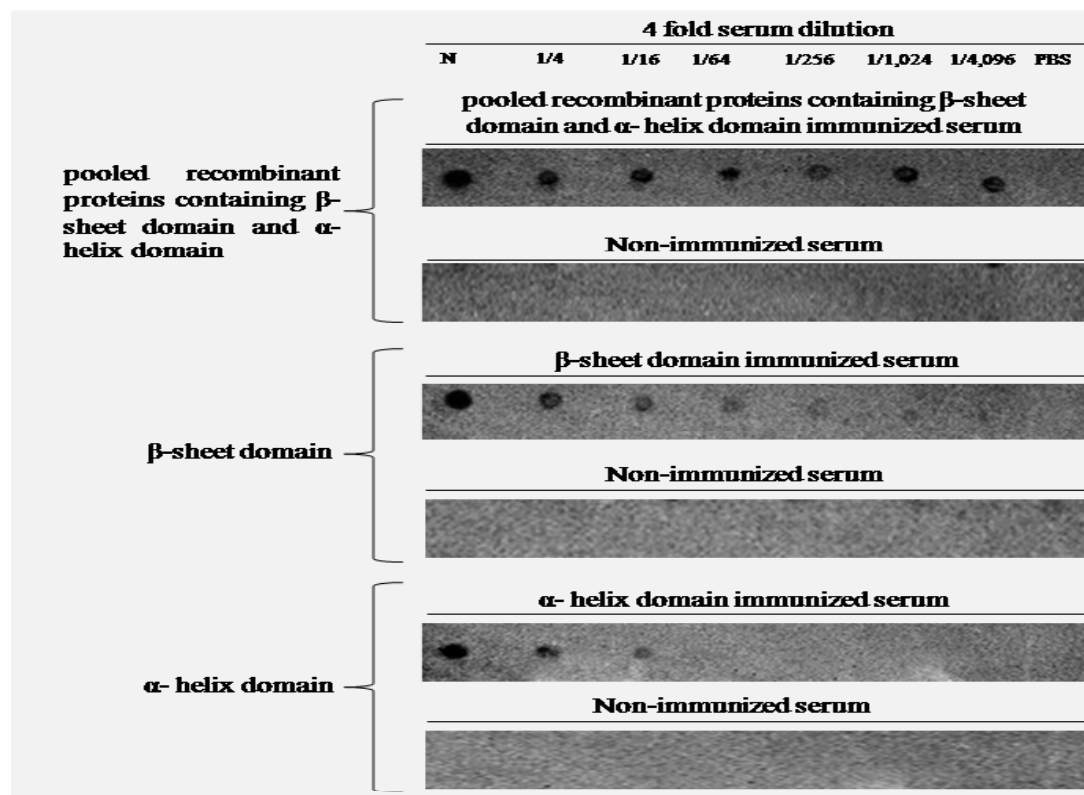
Dilution of Nile Tilapia Serum

Infected fish

Un infected fish

1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32

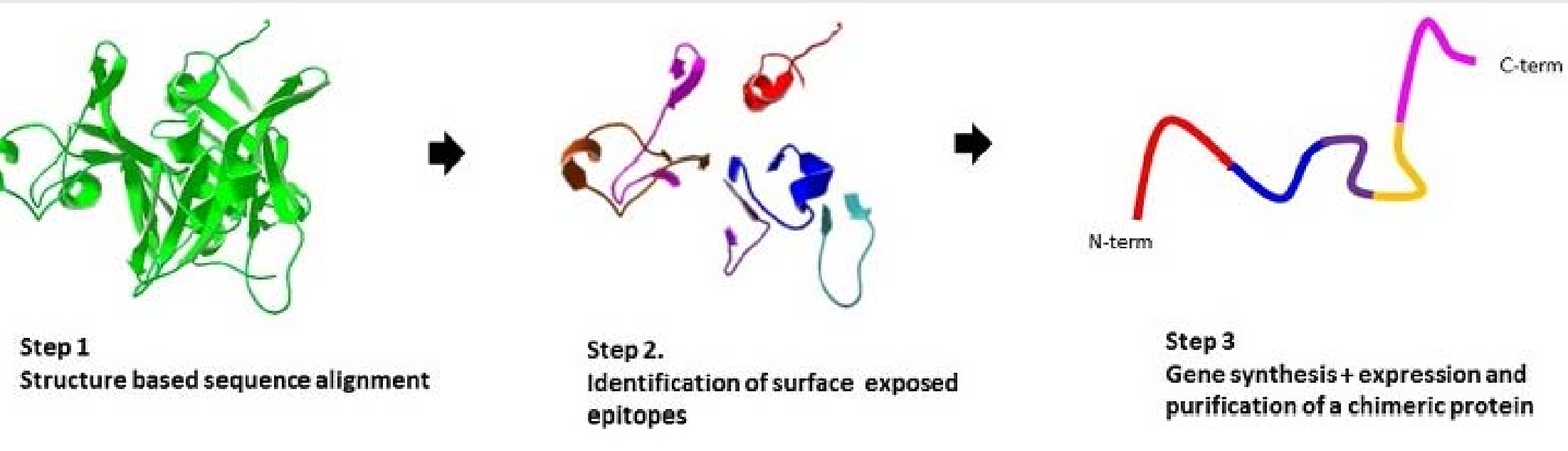
				*						
		*								
	*									



Epr3 domains acts as subunit vaccine by inducing antibody in fish body.

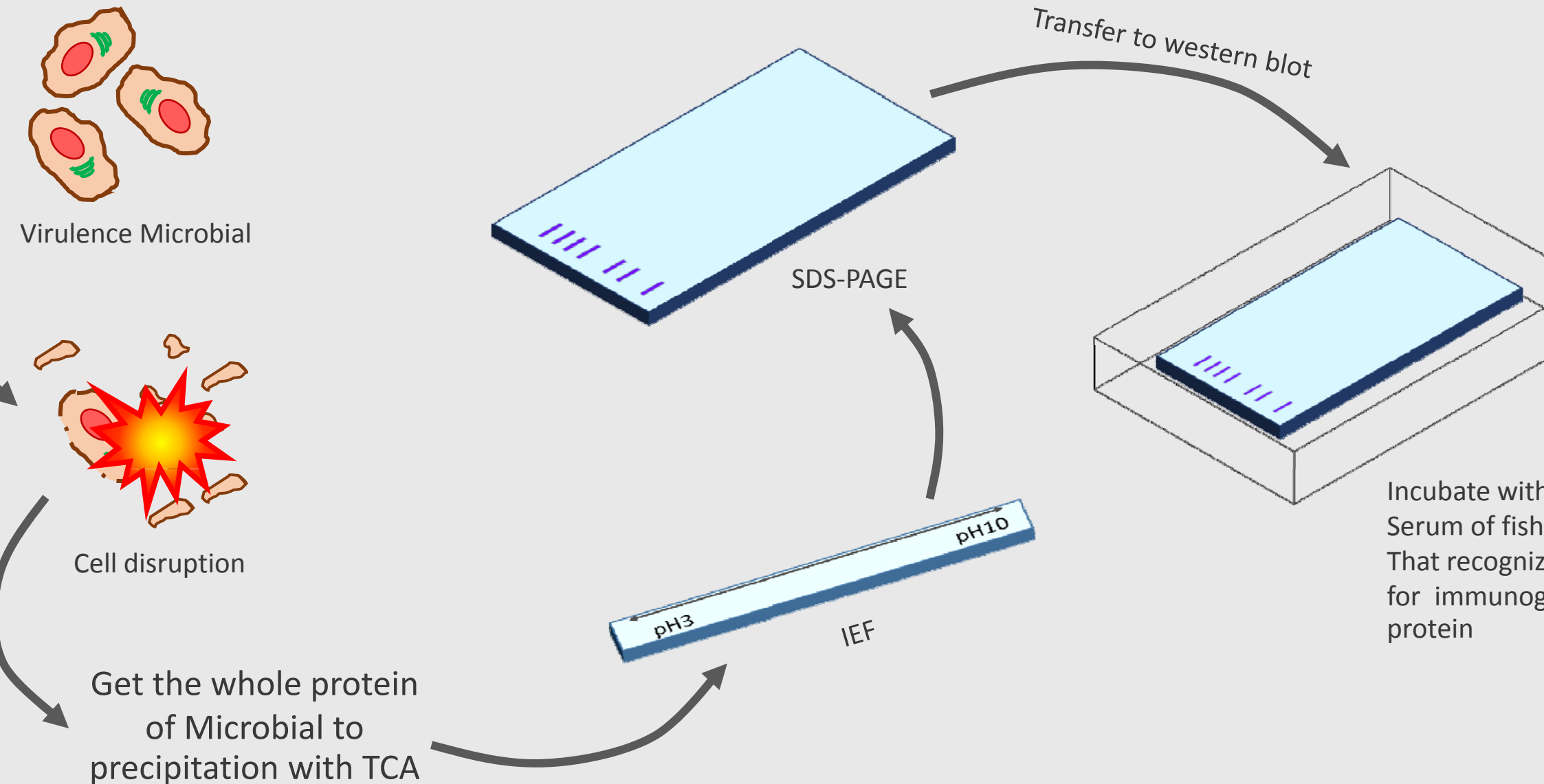
of infected shrimp recognized Epr3

ข้อได้เปรียบของ Subunit vaccines



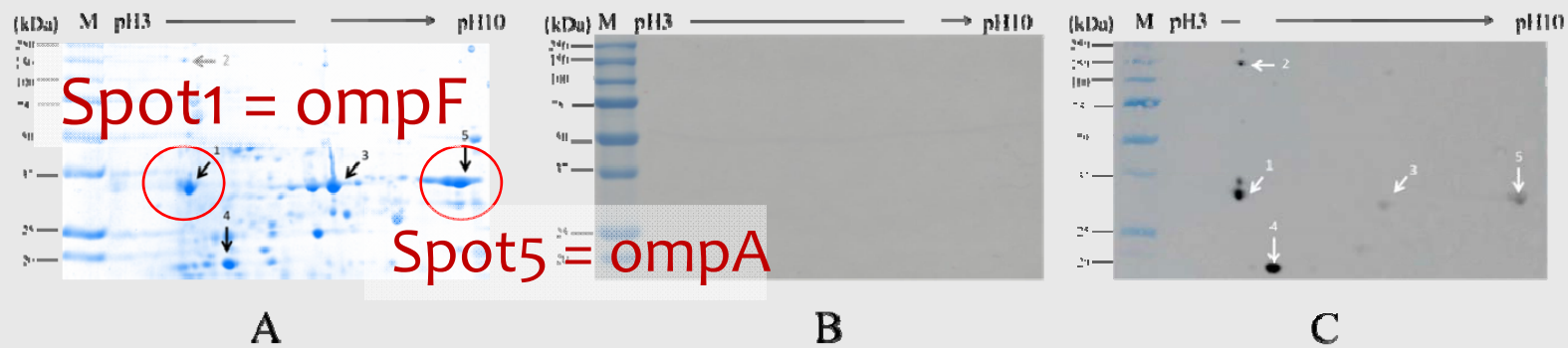
สามารถพัฒนาวัคซีนที่บรรจุ **epitopes** ที่หลากหลายเพื่อให้เกิด **cross protection**

2D-Gel กับ การหา vaccine candidates

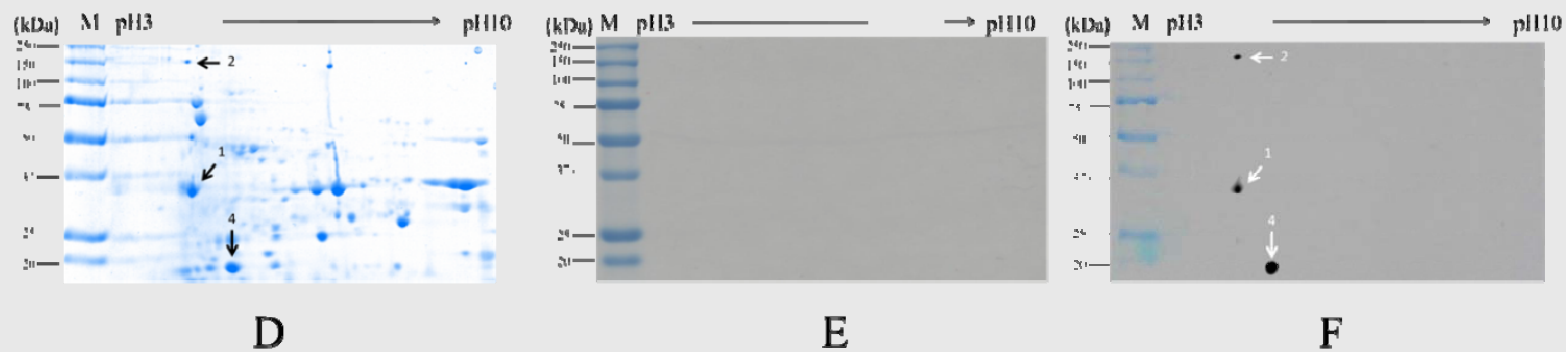


การพัฒนาวัคซีน

1. การหา specific spot เพื่อใช้พัฒนาวัคซีน



Striped catfish serum : A = SDS-PAGE, B = Control and C = Survival

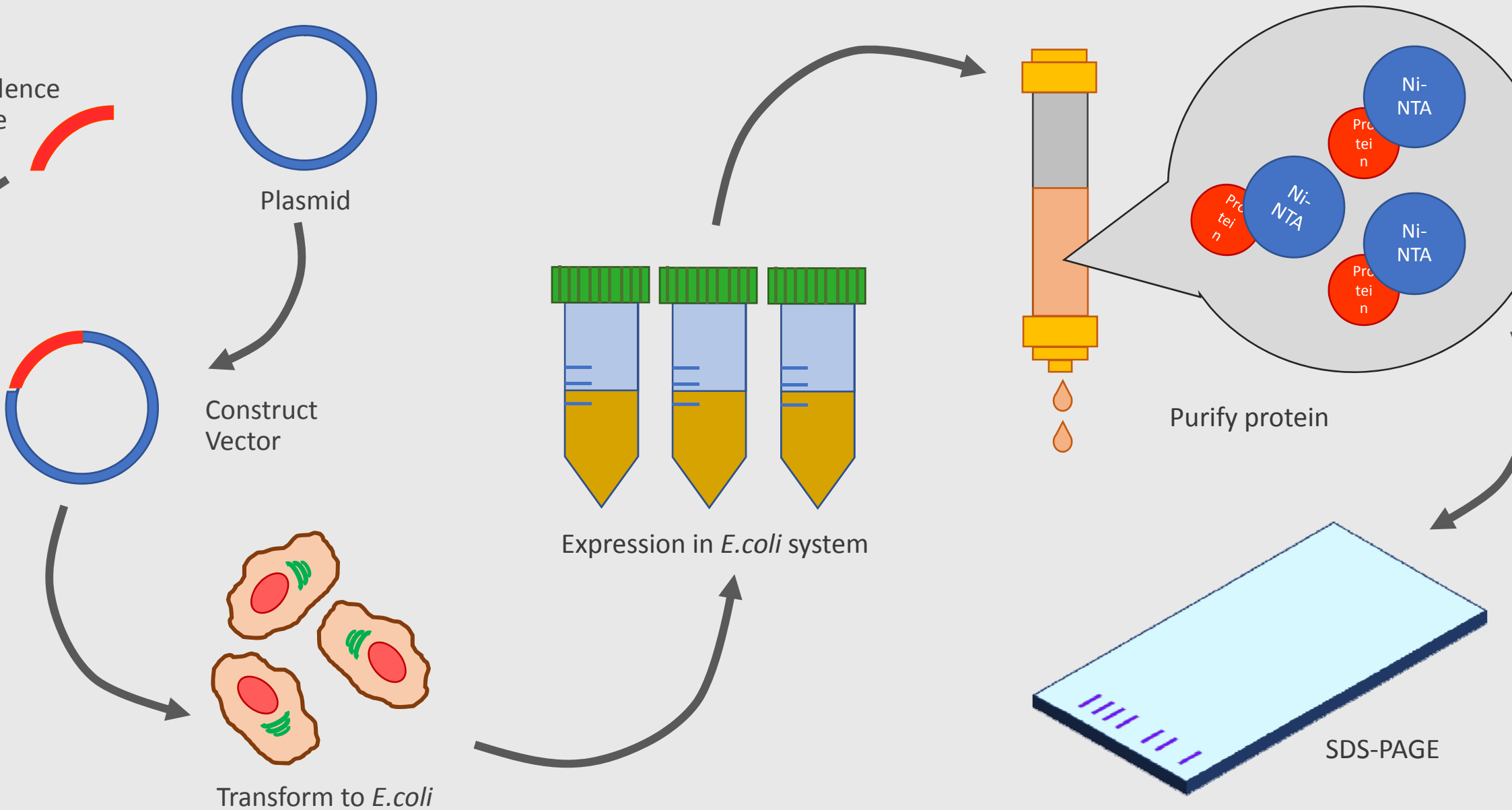


Nile Tilapia serum : D = SDS-PAGE, E = Control and F = Survival

- พบ spot โปรตีน ที่เป็น unique spot นั้นคือ Spot1 = OmpF และ Spot5 = OmpA

- จากนั้นนำ Spot protein ไปส่ง mass spectrometry เพื่อให้รู้ว่าเป็นโปรตีนอะไร

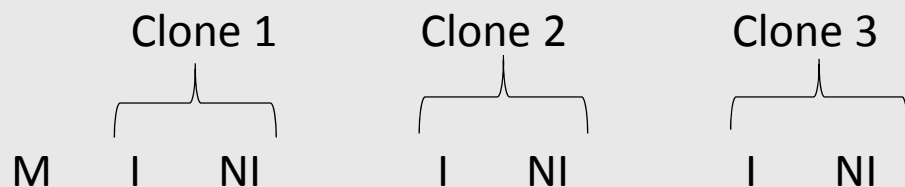
Recombinant vaccines



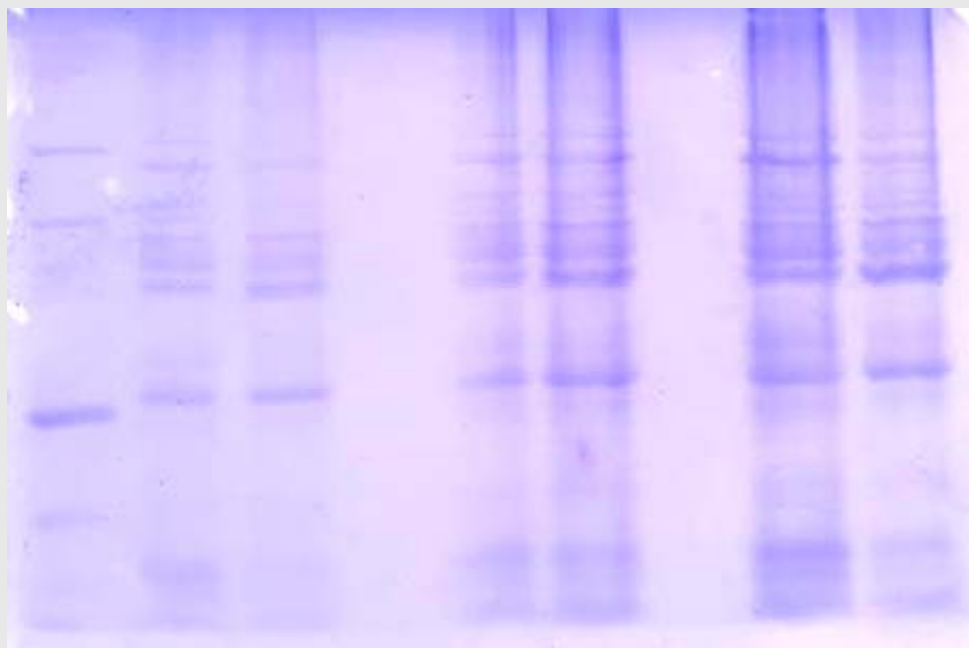
หลายครั้งที่ **Recombinant vaccine** ผลิตไม่ได้เนื่องจาก

1. โปรตีนมีขนาดใหญ่
2. มี **Disulfide bond** เยอะมาก
3. **D**ดการกำหนดขอบเขตของ **globular domain** ผิดตำแหน่ง
4. มี **Hydrophobic region** อยู่ภายนอกโมเลกุล

ตัวอย่างการผลิต Segment 5 ของ TiLV ยากมาก

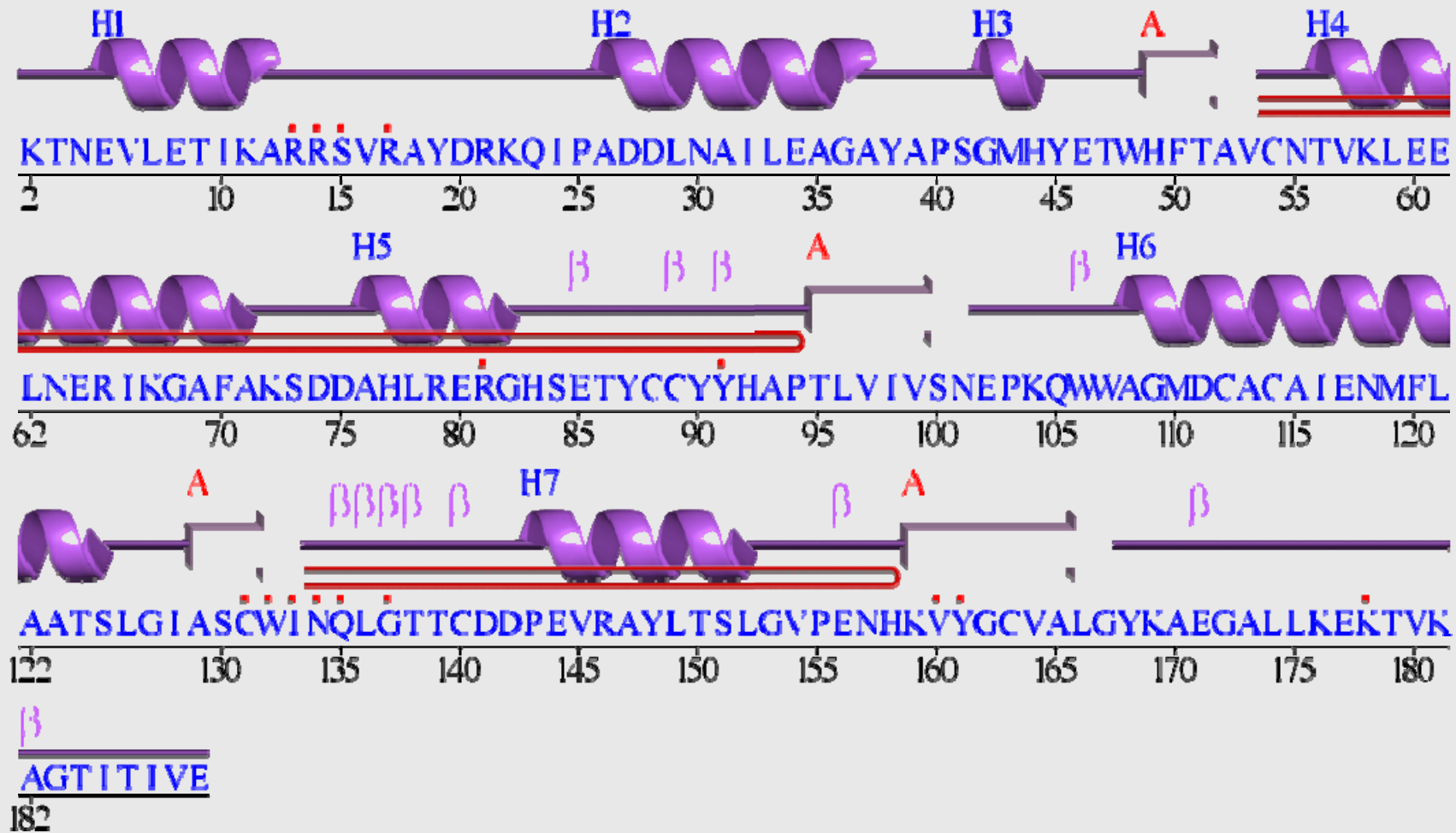


75
50
37
25



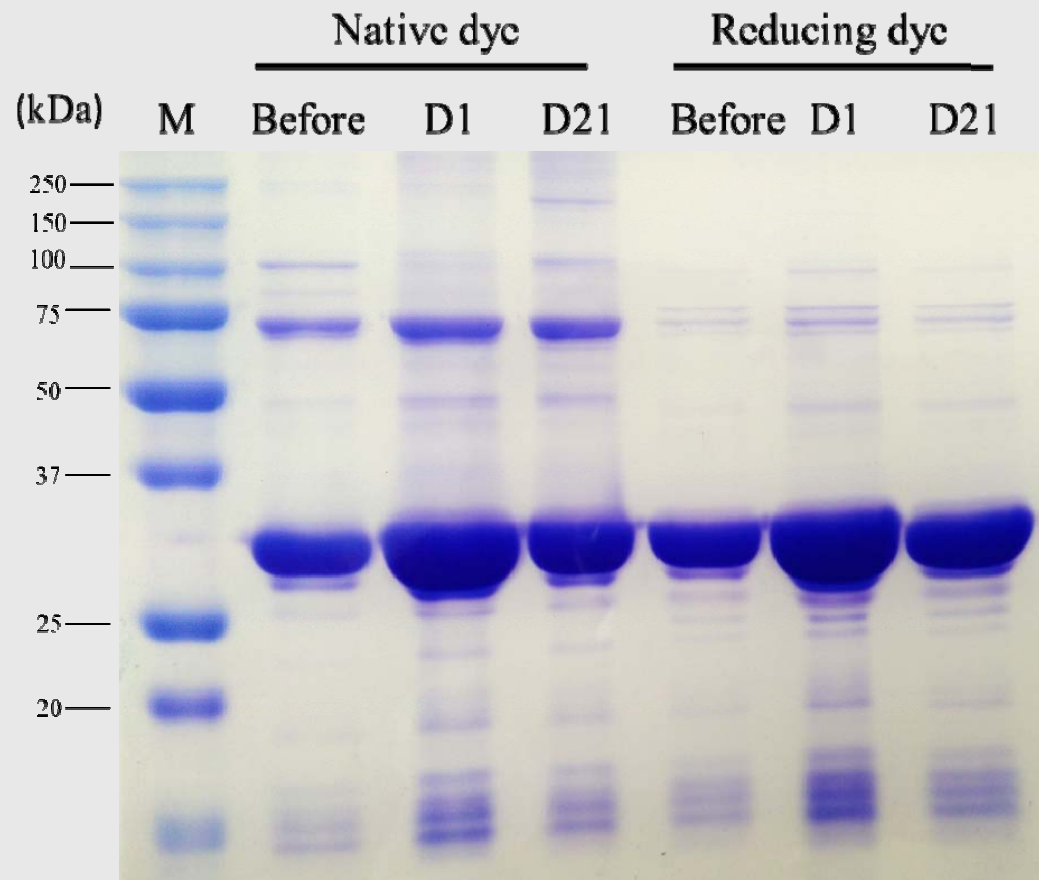
Segment5 ของ **TiLV** พบว่าเมื่อทำการผลิตโปรตีนในระบบของ ***E.coli*** พบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีนออกมาได้

วิเคราะห์โครงสร้างอันดับ 2 เพื่อรู้จักโปรตีนให้ดีขึ้น



การพัฒนาวัคซีน

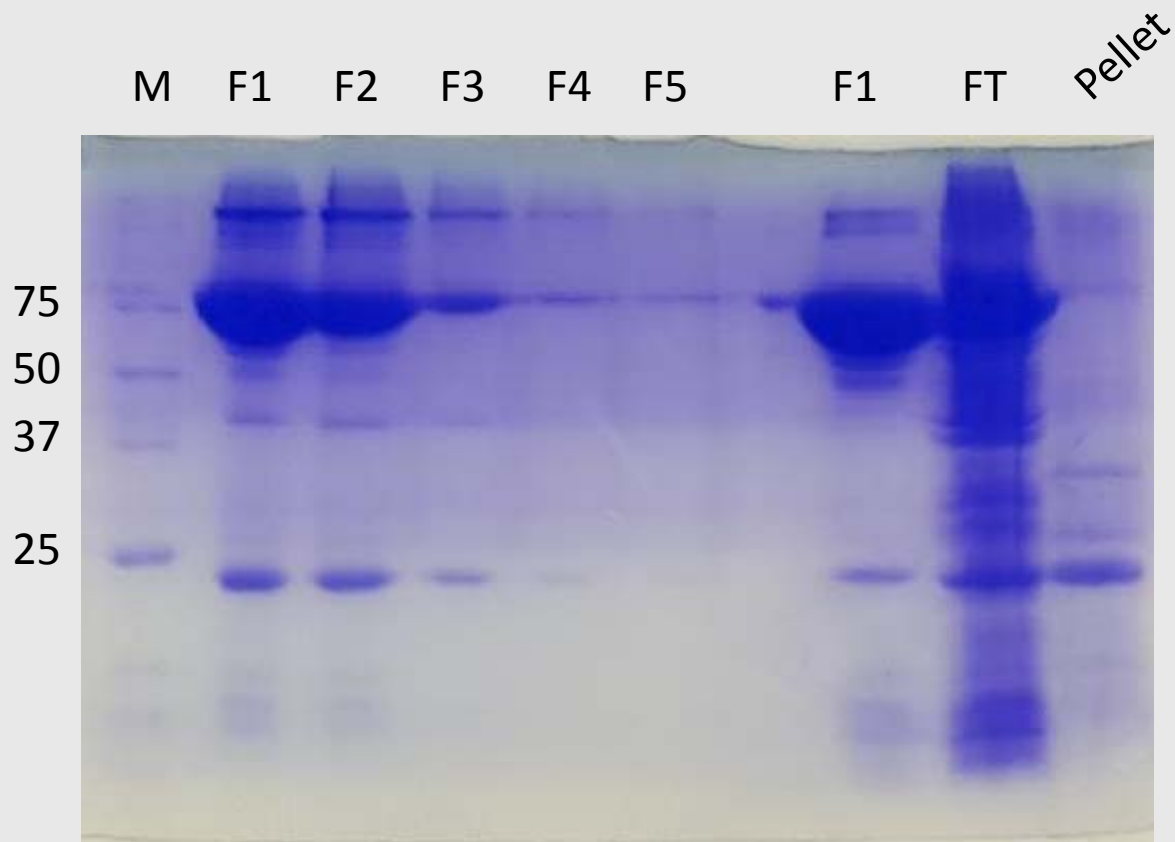
2. การทำ Recombinant protein



การ purify โปรตีนของเชื้อ *E. ictaluri*
พบว่า มีขนาด 28 kDa

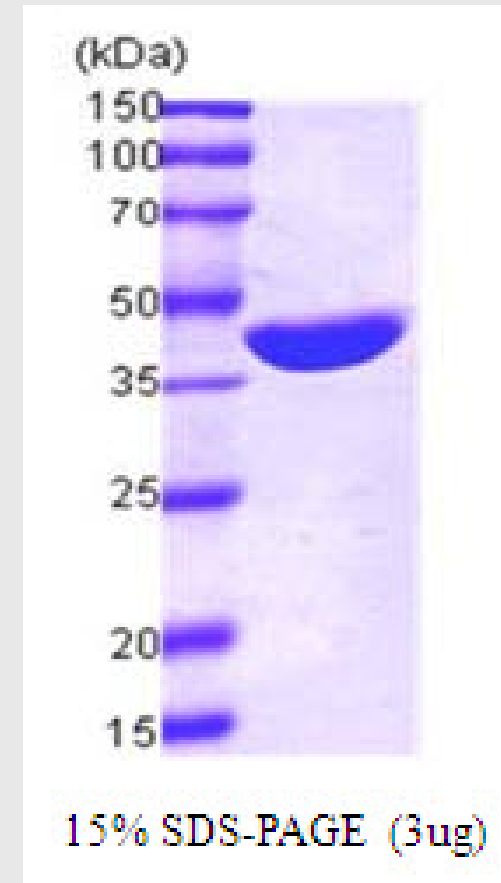
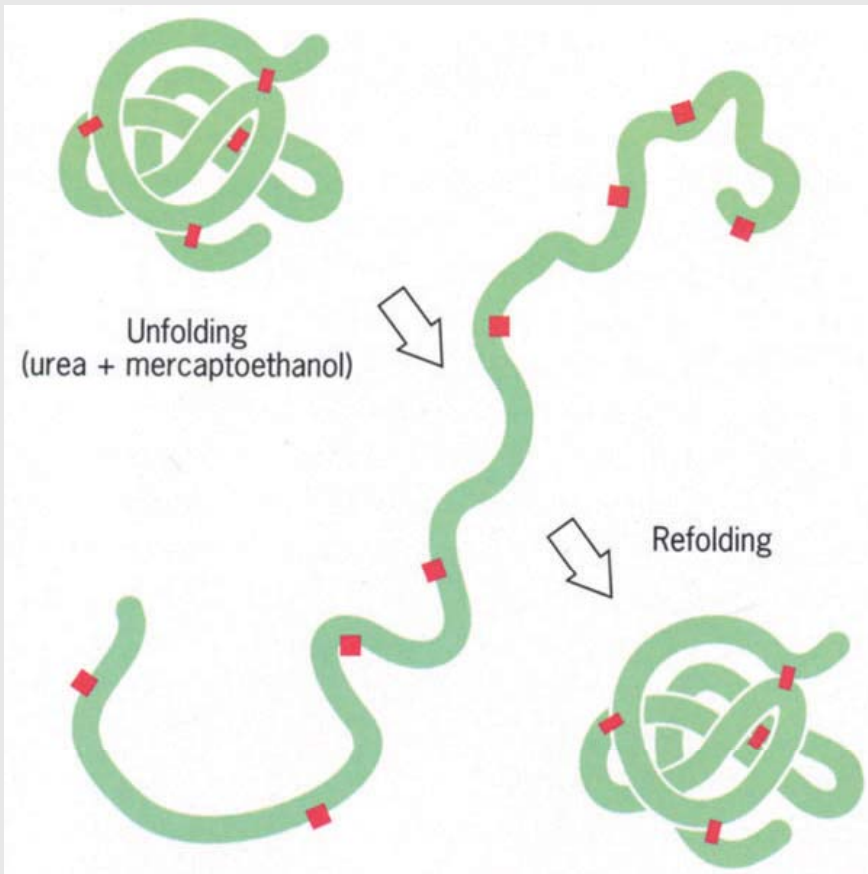
การพัฒนาวัคซีน

2. การทำ Recombinant protein



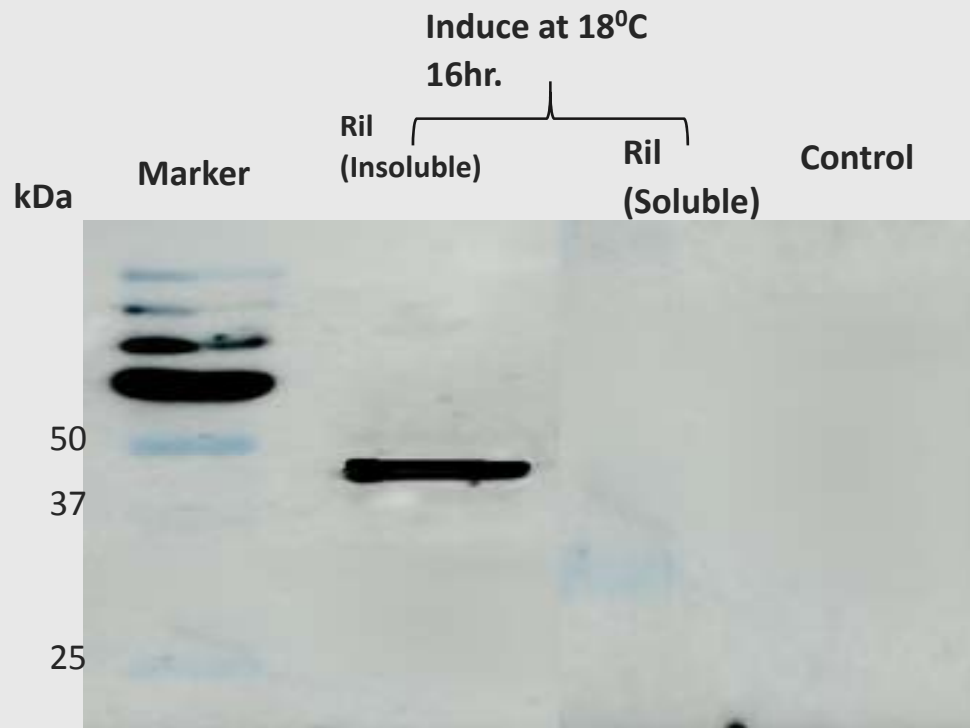
การ purify โปรตีนของเชื้อ
TILV (segment5)
พบว่ามีขนาด 24 kDa (Monomer),
48kDa(Dimer) และ 75kDa(Trimer)

บางครั้งโปรตีนที่ผลิตมาอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ!!!



การพัฒนาวัคซีน

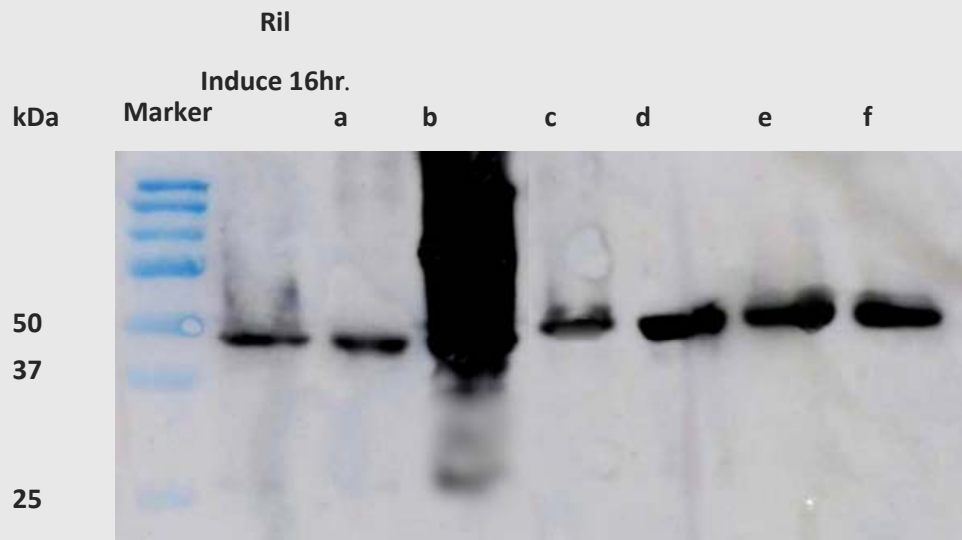
2. การทำ Recombinant protein



ในผลของWestern blot โปรตีนผลิต
ออกมาได้พบว่าอยู่ในรูปแบบของโปรตีน
ไม่ละลายน้ำ

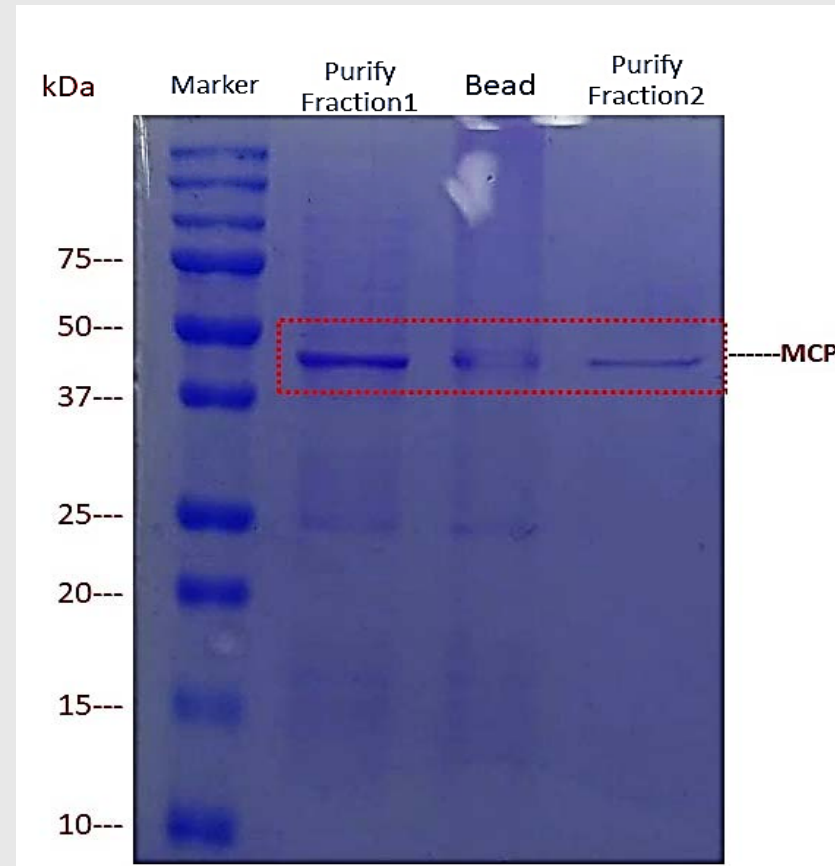
การพัฒนาวัคซีน

2. การทำ Recombinant protein



Urea Dialysis

- a = pellet of protein after sonicate with 8M urea.
- b = supernatant of protein after sonicate with 8M urea.
- c = protein that dialysis at 6M
- d = protein that dialysis at 4M
- e = protein that dialysis at 2M
- f = protein that dialysis at 0M



การ purify โปรตีนของเชื้อ ISKNV พบว่ามีขนาด 49 kDa



ขอบคุณครับ