The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 32
Issue 1 *March, 2002*

Article 1

3-1-2002

DNA VACCINE DEVELOPMENT FOR FISH

Chanagun Chitmanut

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Chitmanut, Chanagun (2002) "DNA VACCINE DEVELOPMENT FOR FISH," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 32: Iss. 1, Article 1.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1867
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol32/iss1/1

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

บทความปริทัศน์

การพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับปลา

ชนกันต์ จิตมนัส

Abstract

Chanagun Chitmanut

DNA VACCINE DEVELOPMENT FOR FISH

DNA vaccines might be a new option to help prevent the economic losses caused by infectious fish diseases. It might also reduce the use of the imported antibiotics. The subject of this review is the development of DNA vaccines for fish. The previous successes of DNA vaccines against various diseases in livestock challenge fish immunologists to research and develop such a vaccine for fish. Evidence of success includes proteins expressed inside fish cells, the enhancement of neutralizing antibodies and the ability of immunized fish to survive after exposure to deadly pathogens. However, other issues need to be resolved, such as suitable methods of vaccine administration, optimal dosage, safety and consumer acceptance.

Additional research in these areas are required to develop knowledge that could lead to effective and practical DNA vaccines for fish.

Keywords : DNA vaccine, fish vaccine, fish immunity

Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiangmai 50290

ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ชนกันต์ จิตมนัส

การพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับปลา

วัคซีนดีเอ็นเออาจจะเป็นทางเลือกใหม่ในป้องกันความเสียหายทางเศรษฐกิจของสัตว์น้ำ อันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อต่างๆ วัคซีนดีเอ็นเอน่าจะช่วยลดการใช้และนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศได้ งานเขียนนี้เป็นการรวบรวมองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับวัคซีนดีเอ็นเอและงานวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับปลา ความสำเร็จของวัคซีนดีเอ็นเอต่อโรคต่างๆ ในสัตว์บกได้กระตุ้นให้นักวิชาการทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาสัตว์น้ำได้เริ่มวิจัยและพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับสัตว์น้ำ การตอบสนองของปลาที่ได้รับวัคซีนดีเอ็นเอตรวจสอบได้จากโปรตีนแอนติเจนที่ปลาสร้างขึ้นภายในเซลล์ การเพิ่มความสามารถของแอนติบอดีในการยับยั้งการเกิดโรคและความสามารถของปลาในการป้องกันการเกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อที่มีความรุนแรงสูง

อย่างไรก็ตามยังมีหลายประเด็นที่ต้องศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ไม่ว่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการให้วัคซีน ปริมาณที่ให้ ความปลอดภัยและการยอมรับของผู้บริโภค เพื่อให้ได้มาซึ่งวัคซีนสัตว์น้ำที่มีคุณภาพสูงและสามารถนำไปใช้ได้ในทางปฏิบัติ

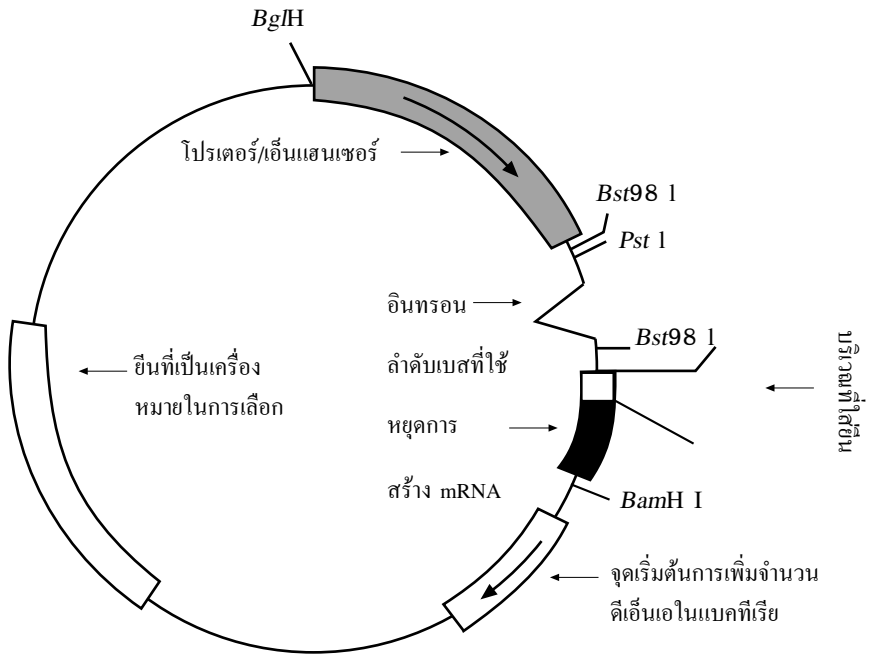
คำสำคัญ : วัคซีนดีเอ็นเอ วัคซีนปลา ภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

บทนำ

วัคซีนดีเอ็นเอเป็นวัคซีนอีกชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะ (specific immunity) และไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) อันได้แก่ การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immunity) การกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell-mediated immune response) รวมถึงกระตุ้นการสร้างโปรตีนอีกหลายชนิดที่มีส่วนต่อการป้องกันการเกิดโรค เช่น ไซโตไคน์ (cytokines) ชนิดต่างๆ วัคซีนดีเอ็นเอมีความทนทานต่ออุณหภูมิที่สูงทำให้สะดวกในการเก็บรักษา (Heppell and Davis, 2000) นอกจากนี้การใช้วัคซีนดีเอ็นเอเพียงปริมาณน้อยสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงและยาวนาน (Ulmer et al., 1993; Heppell et al., 1998; Davis, 2000) จากผลการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้วัคซีนดีเอ็นเอเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ (Ulmer et al., 1993) ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคพิษสุนัขบ้า (Xiang et al., 1994) และไวรัสโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Wang et al., 1993) รวมทั้งยังมีการศึกษาเพื่อใช้วัคซีนดังกล่าวในการป้องกันวัณโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (Tascon et al., 1996) และโรคมาลาเรียที่เกิดจากปรสิต (Smooker et al., 2000) ความสำเร็จของวัคซีนดีเอ็นเอพบในการทดลองกับสัตว์หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นหนู (Fynan et al., 1995) ไก่ (Robinson et al., 1993) วัว (Harpin et al., 1999) ม้า (Ruitenberg et al., 1999) และปลา (Heppell et al., 1998; Lorenzen et al., 1998)

ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วเพื่อตอบสนองความต้องการบริโภคที่สูงขึ้น ขณะเดียวกัน เกษตรกรหลายรายที่ประสบความล้มเหลวอันเนื่องมาจากการแพร่ระบาดของเชื้อโรคต่างๆ ส่งผลให้เกิดความคิดที่จะพัฒนาวัคซีนที่มีราคาถูก ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันปลาไม่ให้เกิดโรค วัคซีนสัตว์น้ำในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นวัคซีนเชื้อตาย โดยยังเป็นเพียงงานทดลองในห้องปฏิบัติการ และไม่มีการพัฒนามาใช้ในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ยังให้ผลที่ไม่คงที่ รวมทั้งต้องใช้ต้นทุนสูงมากในการเตรียมวัคซีนชนิดดังกล่าว วัคซีนดีเอ็นเอน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ของเกษตรกรในการป้องกันโรคติดเชื้อต่างๆ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะว่าวัคซีนดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง กล่าวคือ การใช้ในปริมาณน้อยก็ให้ความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำได้ (Corbeil et al., 2000) ลดความเสี่ยงในการเปลี่ยนจากวัคซีนเป็นเชื้อโรคที่มีความรุนแรง เพราะโดยส่วนใหญ่วัคซีนดีเอ็นเอจะสร้างโปรตีนแอนติเจนจากยีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

วัตถุประสงค์ของบทความวิชาการนี้ เพื่อรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอในปลา และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการหาแนวทางการวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนปลาที่มีคุณภาพมากขึ้น



ภาพที่ 1 แผนผังแสดงส่วนประกอบของวัคซีนดีเอ็นเอ [ดัดแปลงมาจาก Promega (2001)]

วัคซีนดีเอ็นเอคืออะไร

วัคซีนดีเอ็นเอ ผลิตมาจากการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมตัดต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือพลาสมิด (plasmid) แล้วเชื่อมต่อกับยีนที่สร้าง (encode) โปรตีนหรือแอนติเจน (antigen) จากเชื้อโรคชนิดต่างๆ ที่สนใจ (ภาพที่ 1) โดยยีนนี้จะแสดงออกในเซลล์ของสัตว์ที่ได้รับวัคซีนวัคซีนดีเอ็นเอมีส่วนประกอบหลักที่สำคัญได้แก่ 1) ส่วนของโปรโมเตอร์หรือเอ็นแฮนเซอร์ (promoter/enhancer) ที่ทำหน้าที่เร่งหรือเพิ่มการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่แล้วพัฒนามาจากไวรัส อย่างไรก็ตามโปรโมเตอร์บางชนิดจะช่วยให้ยีนได้แสดงออกในบางเนื้อเยื่อเท่านั้น 2) บริเวณที่ใส่ยีน (cloning site) ประกอบด้วยลำดับเบสที่สามารถตัดต่อได้ด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อให้สะดวกในการใส่ยีนที่สร้าง แอนติเจนไปบนพาหะที่ใช้ผลิตวัคซีนดีเอ็นเอ 3) ลำดับเบสที่ใช้หยุดการสร้าง mRNA (transcription termination sequence หรือ polyadenylation/termination sequence) ดังนั้นเมื่อวัคซีนเข้าสู่เซลล์ในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ ส่วนของยีนเท่านั้นที่จะถูกคัดลอกรหัสพันธุกรรม 4) จุดเริ่มต้นของการคัดลอกดีเอ็นเอในแบคทีเรีย (origin of replication) เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีการตัดต่อยีนสมบูรณ์แล้ว เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนที่จะนำไปสกัดเพื่อเป็นวัคซีนบริสุทธิ์ 5) เครื่องหมายที่ใช้เลือก (selection marker) ส่วนใหญ่จะเป็นยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ เช่น ยีนต้านทาน ampicillin เพราะฉะนั้นเฉพาะพลาสมิดที่มีการตัดต่อเท่านั้นจะถูกคัดเลือก

ส่วนที่ช่วยเสริมให้วัคซีนดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดีขึ้น

ปัจจัยบางอย่างที่อาจจะทำให้การพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับปลาดีขึ้น ได้แก่

1) อินทรอน (intron) ซึ่งช่วยให้ mRNA มีความคงตัว (Norman et al., 1997) ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณของแอนติเจนที่สร้างขึ้นในสัตว์ที่ได้รับวัคซีน อย่างไรก็ตามไม่มีการศึกษาผลของอินทรอนในวัคซีนดีเอ็นเอต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา

2) ลำดับเบส non-methylated CpG โดยปกติดีเอ็นเอของแบคทีเรียและตัวพาหะที่ใช้ทำวัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vector) มีลำดับเบสที่ประกอบด้วย non-methylated CpG โดยมีพิวรีน 2 ตัวอยู่ทางตำแหน่ง 5' และไพริมิดีน 2 ตัวอยู่ด้าน 3' ซึ่งลำดับเบสเหล่านี้จะไม่พบมากในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นเมื่อดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าสู่เซลล์สัตว์ชั้นสูง ระบบภูมิคุ้มกันสามารถตรวจสอบได้ว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย จึงมีการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะขึ้น เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (polyclonal B-cell proliferation) การกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจ (macrophage) และการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ natural killer (Krieg et al., 1998) Jorgensen et al. (2001) รายงานว่าตัวพาหะที่ทำวัคซีนดีเอ็นเอและส่วนของดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่มีลำดับเบส non-methylated CpG จะสามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาแอตแลนติคแซลมอนให้สร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อไวรัส (anti-viral cytokine) Heppell and Davis (2000) กล่าวว่า การเติมลำดับเบส non-methylated CpG เข้าไปในพาหะที่ผลิตวัคซีนดีเอ็นเอจะช่วยเพิ่มความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา ทำให้สามารถลดปริมาณการใช้วัคซีนดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามลำดับเบสที่อยู่ก่อนและหลังของ CpG จะมีผลต่อความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ (species)

3) การทดลองฉีดวัคซีนดีเอ็นเอควบคู่ไปกับพลาสมิดที่มียีนสร้างโปรตีนที่ควบคุมปฏิกิริยาระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือไซโตไคน์ เช่น IL-12 หรือพลาสมิดที่มียีนสร้างโปรตีนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลุ่ม granulocyte (granu-

locyte-macrophage colony stimulating factor; GM-CSF) จะช่วยให้มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้น Kanellos et al. (1999) ได้ฉีดวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีน GM-CSF ร่วมกับวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนที่สร้างเอนไซม์ β-galactosidase ให้กับปลาทอง พบว่าปลาสามารถสร้างภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (cell-mediated immunity) เพิ่มสูงขึ้นจากปรากฏการณ์ดังกล่าวเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนดีเอ็นเอในปลา

การทำงานของวัคซีนดีเอ็นเอ

Seder (1999) กล่าวว่า หลังจากมีการให้วัคซีนดีเอ็นเอ ส่วนของวัคซีนเอ็นเอจะเข้าไปอยู่ในเซลล์ในลักษณะอิสระหรือที่เรียกว่าอิพิโซม (episome) โดยไม่ได้เข้าไปรวมกับดีเอ็นเอของเซลล์ และยีนจะสร้างโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน จึงเชื่อว่าจะได้โปรตีนที่คงรูปแบบเดิม (native structure) โดยมีขบวนการปรับเปลี่ยนรูปร่างที่ถูกต้อง (correctly folded and modified) เหมือนโปรตีนถูกสร้างโดยเชื้อภายในเซลล์ร่างกาย คุณสมบัตินี้จะเป็นข้อดีที่สำคัญมากอันหนึ่งของวัคซีนดีเอ็นเอ เพราะว่าวัคซีนที่มีการตัดแต่งพันธุกรรม (recombinant vaccine) บางชนิด โปรตีนที่ใช้เป็นวัคซีนจะได้จากแบคทีเรีย ซึ่งการสร้างโปรตีนอาจจะแตกต่างจากโปรตีนที่ถูกผลิตในตัวสัตว์น้ำเอง แม้ว่าวัคซีนที่ตัดแต่งพันธุกรรมของไวรัสพาหะ (recombinant viral vector) จะสร้างโปรตีนที่คงรูปแบบเดิม แต่วัคซีนชนิดนี้อาจมีผลร้ายถึงตายต่อสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ขบวนการในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำเนื่องมาจากการให้วัคซีนดีเอ็นเอยังไม่มีการศึกษามากนัก เนื่องจากยังไม่มีสัตว์น้ำที่มีพันธุกรรมที่เหมือนกัน (inbreed) มาใช้เป็นสัตว์ทดลอง เพื่อลดปัญหาความแปรปรวนของผลการทดลองจากความแตกต่างทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังไม่มีสารเคมีและแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ รวมทั้งความรู้ทางด้านภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำยังมีจำกัด

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ก่อนที่จะมีการผลิตวัคซีนสัตว์น้ำสำหรับปลาจะต้องทดสอบความสามารถของเซลล์สัตว์น้ำในการสร้างโปรตีนจากวัคซีนดีเอ็นเอ โดยการให้วัคซีนที่มียีนนำเสนอหรือรีพอร์ทเตอร์ (reporter gene) ซึ่งตัวอย่างของยีนดังกล่าวนี้ เช่น ยีนที่สร้าง chloramphenical acetyltransferase (CAT) ยีนที่สร้าง firely luciferase และยีนที่สร้างเอนไซม์ β-galactosidase (ยีน lac Z) การทดลองฉีดวัคซีนดีเอ็นเอเข้าในกล้ามเนื้อปลาคาร์พครั้งแรกของ Hansen et al. (1991) ประสบผลสำเร็จ โดยสามารถตรวจพบโปรตีนที่สร้างขึ้นบริเวณกล้ามเนื้อที่ฉีดวัคซีนดีเอ็นเอ และระดับการแสดงออกของยีน CAT จะสูงในปลาขนาดเล็กที่มีการเจริญเติบโตสูง (ความยาวเฉลี่ย 10 ซม.) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดเดียวกันที่มีขนาดโตกว่าแต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่า (ความยาวเฉลี่ย 20 ซม.) งานวิจัยชิ้นนี้ส่งผลให้นักภูมิคุ้มกันวิทยาปลาให้ความสนใจคิดค้นวิจัยเกี่ยวกับวัคซีนดีเอ็นเอเพื่อใช้ในสัตว์น้ำ ต่อมา Russell et al. (1998) ได้ฉีดวัคซีนที่มียีน lac Z เข้ากล้ามเนื้อปลาทองเพียงครั้งเดียว และหลังจากฉีดเพียง 4 วัน สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวบริเวณที่ฉีด รวมทั้งสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน β-galactosidase 4-8 อาทิตย์ต่อมา จากตัวอย่างงานวิจัยทั้งสองจะเห็นได้ว่า ยีนในวัคซีนดีเอ็นเอสามารถแสดงออกภายในเซลล์ปลาและกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนแอนติเจนที่ถูกสร้างขึ้น

หลังจากที่รู้ว่ายีนสามารถแสดงออกในปลาแล้ว จึงมีการเพิ่มจำนวนหรือโคลน ยีนที่สร้างแอนติเจนแล้วตัดต่อเข้ากับพลาสมิดของวัคซีนดีเอ็นเอ การแสดง

ออกของยีนที่สร้างโปรตีนแอนติเจนสามารถทดสอบภายนอกตัวปลา *(in vitro)* วิธีการตรวจสอบนี้จะรวดเร็วในการตรวจเลือกความถูกต้องของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์สัตว์ โดยการใส่พลาสมิดที่มีการตัดต่อยีนที่เราสนใจเข้าในเซลล์ปลา (transfection) เซลล์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) และ Fathead Minnow (FHM) หรืออาจจะใช้เซลล์ COS-7 ที่ได้มาจากลิงในการทดสอบก็ได้ แล้วตรวจว่ามีโปรตีนแอนติเจนถูกสร้างขึ้นหรือเปล่า ด้วยวิธีอิมมูโนบล็อท (immunobloting) เพื่อตรวจสอบถึงขนาดของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นหรือวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในเนื้อเยื่อ (immunohistochemical staining) เพื่อศึกษาว่าเนื้อเยื่อใดบ้างที่มีการสร้างโปรตีนดังกล่าวโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ

การทดลองวัคซีนดีเอ็นเอเพื่อป้องกันโรคในปลา

การใช้วัคซีนดีเอ็นเอในปลายังอยู่ในระดับงานวิจัยในปลาบางชนิด เช่น Anderson et al. (1996) ได้ผลิตวัคซีนดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นโดยการใช้ยีนที่สร้างไกลโคโปรตีน จากไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค infectious haematopoietic necrosis (IHN) แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อปลาแรนโบว์เทร้าต์ขนาด 1 กรัม หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ จึงทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน พบว่าวัคซีนดีเอ็นเอสามารถป้องกันปลาแรนโบว์เทร้าต์ ไม่ให้ตายจากการติดเชื้อไวรัส IHN ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่แสดงให้เห็นว่า วัคซีนดีเอ็นเอน่าจะสามารถใช้ได้กับปลา ต่อมา Lorenzen et al. (1998) ได้ทดลองฉีดวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนสร้างไกลโคโปรตีนอย่างเดียว หรือวัคซีนที่มียีนสร้าง nucleocapsid ของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค viral haemorrhagic septicemia (VHS) ให้กับปลาแรนโบว์เทร้าต์ ผลปรากฏว่า สามารถปกป้องการตายจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ Corbeil et al. (2000) รายงานว่า ลูกปลาแรนโบว์เทร้าต์ที่ได้รับวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนสร้างไกลโคโปรตีนจากเชื้อไวรัส IHN เพียง 1-10 นาโนกรัมต่อตัวสามารถป้องกันการตายจากการได้รับเชื้อไวรัส IHN 10^3-10^4 PFU/ml นอกจากวัคซีนดีเอ็นเอจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเหมือนวัคซีนชนิดอื่น ๆ แล้ว วัคซีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเหตุการณ์ดังกล่าวได้มาจากการทดลองของ Kim et al. (2000) ซึ่งได้ทดลองให้วัคซีนที่มียีนสร้างไกลโคโปรตีนจากเชื้อไวรัส IHN ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มแรปโดไวรัส (Rhabdovirus) ในปลาแรนโบว์เทร้าต์ และพบว่า โดยดูจากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของอินเตอร์-เฟอรอน (interferon) Jorgensen et al. (2001) รายงานว่าพลาสมิดดีเอ็นเอและส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซีพีจีสามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกมาจากไตส่วนหน้าของปลาแอตแลนติคแซลมอนให้สร้างอินเตอร์เฟอรอนทั้งชนิด I และ II

เพื่อความปลอดภัยในการใช้วัคซีนดีเอ็นเอต่อผู้บริโภคและตัวสัตว์น้ำเอง จึงควรศึกษาหาตัวเร่งการแสดงออกของยีนหรือโปรโมเตอร์ (gene regulatory element หรือ promoter) ในสัตว์น้ำ มาทดแทนโปรโมเตอร์ที่ใช้กันมากในคนหรือสัตว์ชนิดอื่นๆ นั่นคือ human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter/enhancer ซึ่งแม้ว่าโปรโมเตอร์นี้จะให้การแสดงออกของยีนในระดับสูงในหลายอวัยวะ แต่ Liu et al. (1990) กล่าวว่า โปรโมเตอร์ดังกล่าวมีต้นกำเนิดมาจากไวรัสซึ่งอาจมีการชักนำให้เกิดมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามคำกล่าวนี้ยังไม่มีการพิสูจน์ที่แน่นอน เพราะฉะนั้นการใช้โปรโมเตอร์จากปลาจึงน่าจะได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่า การศึกษาวิจัยหาโปรโมเตอร์ชนิดใหม่มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างโปรตีนแอนติเจนอีกด้วย ด้วยสาเหตุนี้ Gomez-Chiarri and Chiaverini (1999) ได้ทดลองใช้ β-lactin promoter จากปลาคาร์พเพื่อทดแทนโปรโมเตอร์จากไวรัส (CMV

promoter) และพบว่าโปรโมเตอร์ดังกล่าวสามารถทำให้ยีนที่สร้าง luciferase แสดงออกในกล้ามเนื้อปลาแอตแลนติคแซลมอนในระดับที่สูงกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานว่าโปรโมเตอร์ชนิดนี้สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันสำหรับปลาในการทดลองนี้

วิธีการให้วัคซีน

การให้วัคซีนทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะมีผลต่อการป้องกันโรคที่ต่างกัน การฉีดเข้าตัวสัตว์โดยตรงไม่ว่าจะเป็นการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือเข้าใต้ผิวหนังจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณสูงและยาวนาน แต่วิธีนี้มีผลทำให้ปลาเครียดและต้องใช้แรงงานในการฉีดมาก Ellis (1998) กล่าวว่าการให้วัคซีนทางปากเป็นวิธีการที่ให้ผลดีน้อยที่สุด อาจจะเนื่องมาจากวัคซีนอาจจะถูกทำลายโดยกรดในกระเพาะและลำไส้ตอนต้น อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์ ควรใช้วิธีการแช่หรือผสมในอาหาร ซึ่งแม้ว่าการให้วัคซีนโดยการจุ่มจะให้ระดับของการป้องกันโรคน้อยกว่าการฉีดแต่เป็นวิธีที่ดีกว่าการให้แบบผสมอาหาร (Palm et al., 1998) แสดงว่า เหงือกและผิวหนังปลาเป็นส่วนสำคัญในการรับวัคซีนเข้าสู่ร่างกาย เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว Fernandez-Alonso et al. (1999) ได้ทดลองเคลือบวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนสร้างสารเรืองแสง (green fluorescent protein) ด้วยไลโปโซม (liposome) แล้วนำไปทำให้แห้ง (lyophilize) ก่อนที่จะนำไปให้ปลาแรนโบว์เทราต์โดยการแช่ พบว่า สามารถตรวจพบสารเรืองแสงในปลาดังกล่าวหลังจากให้วัคซีน 2 วัน Herrmann et al. (1999) ได้ทดลองใช้สารวุ้นเหนียว (gelatin) เคลือบวัคซีนเพื่อป้องกันวัคซีนดีเอ็นเอถูกทำลายโดยกรดในตัวหนู อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาการใช้สารวุ้นเหนียว ในการเตรียมวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับสัตว์น้ำ

นอกจากวิธีการต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งล้วนแต่เป็นวิธีการสร้างภูมิคุ้มกันโดยตรง ยังสามารถนำซีรั่มจากปลาตัวเต็มวัยที่ฉีดวัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนที่สร้างไกลโคโปรตีนของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค IHN และ VHS มาฉีดให้กับลูกปลาแรนโบว์เทร้าต์ หรือที่เรียกว่า การให้วัคซีนแบบ passive พบว่า สามารถป้องกันการตายของลูกปลาจากการติดเชื้อไวรัสได้เช่นกัน (Boudinot et al., 1998)

ตัวบ่งชี้ความสำเร็จของวัคซีนดีเอ็นเอ

ความสำเร็จของวัคซีนดีเอ็นเอตรวจสอบได้ทั้งแบบในห้องปฏิบัติการและในตัวสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอเพื่อดูว่ายีนดังกล่าวสามารถคัดลอกรหัส ซึ่งหมายถึงการตรวจสอบการสร้าง mRNA ของยีนนั้นๆ หรือการทดสอบในขั้นการแปลรหัส โดยทดสอบปริมาณและคุณภาพของโปรตีนที่สร้างขึ้นในเซลล์สัตว์หลังจากให้วัคซีนดีเอ็นเอ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ ส่วนการตรวจสอบในตัวสัตว์ทำได้โดยการตรวจหาแอนติบอดีหลังจากให้วัคซีนสัตว์น้ำ ส่วนใหญ่จะใช้วิธี enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) รวมทั้งการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานที่เพิ่มขึ้นของแอนติบอดี เช่น ความสามารถในการจับตัวกับสิ่งแปลกปลอมแล้วทำให้แอนติเจนไม่สามารถทำอันตรายต่อเซลล์ (neutralizing antibody) สำหรับประสิทธิภาพวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัส อาจดูได้จากแอนติบอดีที่สามารถทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเป็นสำหรับการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ (cytotoxic T-lymphocytes) อย่างไรก็ตาม ปัญหาของวัคซีนปลาคือการขาดตัวชี้วัดประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ และสารที่ใช้ตรวจสอบไซโตไคน์ (Leong et al., 1997) นอกจากนี้บางครั้งความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคของปลาไม่ได้สัมพันธ์กับปริมาณของ neutralizing antibodies (Lorenzen et al., 1998)

ปริมาณที่เหมาะสมของวัคซีนจะขึ้นอยู่กับขนาดของปลา (Heppell and Davis, 2000) ปลาคาร์พที่มีอายุน้อยและโตเร็วจะให้ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้าง CAT มากกว่าปลาที่มีอายุมากกว่า (Hansen et al., 1991) โดยการแสดงออกของปลาโตจะอยู่เฉพาะบริเวณที่ฉีดเท่านั้น (Boudinot et al., 1998) ในขณะที่ปลาขนาดเล็ก การแสดงออกของยีนสามารถตรวจสอบได้ในหลายอวัยวะไม่ว่าจะเป็นเหงือก ม้าม ไตและกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีด (Heppell et al., 1998) ระยะเวลาในการแสดงออกของยีนในวัคซีนดีเอ็นเอเป็นปัจจัยบ่งชี้ถึงความสำเร็จของการผลิตวัคซีน เพราะเพื่อให้มั่นใจว่าโปรตีนที่ได้มีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ที่ได้รับวัคซีน Dijkstra et al., (2001) สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ luciferase นานอย่างต่ำ 2 ปี ในปลาเนื้ออ่อนที่ได้รับวัคซีนดีเอ็นเอจำนวน 20 ไมโครกรัม ปรากฏการณ์นี้ค่อนข้างจะให้ผลในแง่ลบต่อการใช้วัคซีนดีเอ็นเอเชิงปฏิบัติ เช่น ยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะบนวัคซีนดีเอ็นเออาจจะส่งผลร้ายต่อผู้บริโภคได้ เพื่อขจัดปัญหาดังกล่าวจึงควรมีการศึกษาหาลำดับเบสที่ช่วยในการทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอลดความคงตัว อย่างไรก็ตาม ยีนที่ Dijkstra และคณะเป็นยีนรีพอร์ทเตอร์ เพราะฉะนั้นการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์อาจจะน้อยกว่าการให้วัคซีนดีเอ็นเอที่มียีนสร้างแอนติเจนอื่นๆ จึงมีควรมีการทดลองใช้วัคซีนดีเอ็นเอที่สร้างแอนติเจนจากเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในปลาเนื้ออ่อน แล้วตรวจสอบว่า การแสดงออกของยีนยาวนานถึง 2 ปีหรือไม่

บทสรุป

วัคซีนได้มีการใช้อย่างแพร่หลายในสัตว์บกเพื่อป้องกันความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการติดเชื้อโรคต่างๆ รวมทั้งเป็นการลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ ลดปัญหาการพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียที่ดื้อยา ลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีและยาปฏิชีวนะในตัวสัตว์และสิ่งแวดล้อม แม้ว่าวัคซีนสัตว์น้ำโดยเฉพาะวัคซีนดีเอ็นเอจัดได้ว่าเป็นเรื่องใหม่สำหรับนักวิจัยในประเทศไทยแต่มีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ในอนาคต เนื่องจากวัคซีนดีเอ็นเอมีข้อดีเหนือกว่าวัคซีนรุ่นแรกๆ หลายด้าน เป็นต้นว่า ความคงทนต่ออุณหภูมิที่สูงและต่ำ ทำให้ง่ายแก่การเก็บรักษา ไม่มีความเสี่ยงในการเปลี่ยนกลับเป็นเชื้อที่มีความรุนแรง (reversion to virulent strains) ใช้ในปริมาณน้อยและไม่จำเป็นต้องใช้แอดจูแวนท์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงต้นทุนการผลิต ปริมาณที่เหมาะสมที่จะให้วัคซีน ระยะเวลาที่วัคซีนสามารถป้องกันสัตว์น้ำจากโรคต่างๆ รวมถึงความปลอดภัยและการยอมรับของผู้บริโภค สำหรับโอกาสที่จะเกิดผลเสียของการใช้วัคซีนดีเอ็นเออันเนื่องมาจากการรวมของดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอของสัตว์ที่ได้รับวัคซีน (chromosomal integration) ไม่มากนักเทียบกับการผลิตวัคซีนดีเอ็นเอให้กับมนุษย์ เนื่องจากช่วงชีวิต (life span) ของสัตว์จะน้อยกว่ามนุษย์ เพราะฉะนั้นโอกาสที่จะเกิดเหตุการณ์ดังกล่าวจะน้อยลงด้วย (Anderson et al., 1996) Kanellos et al. (1999) กล่าวว่า พลาสมิดไม่ได้กระตุ้นภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmune-like antibodies)

เอกสารอ้างอิง

Anderson, E.D., Mourich, D.V., Fahrenkrug, S.C, LaPatra, S., Shepherd, J. and Leong, J.C. 1996. Genetic immunization of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* against infectious haematopoietic necrosis virus. Mol. Marine Biol. Biotech. 5(2): 114-122.

Boudinot, P., Blanco, M., de Kinkelin, P. and Benmansour, A. 1998. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of

viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. Virology 249: 297-306.

Corbeil, S., LaPatra, S.E., Anderson, E.D. and Kurath, G. 2000. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. Vaccine 18: 2817-2824.

Dijkstra, J.M., Okamoto, H., Ototake, M. and Nakanishi, T. 2001. Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish *(Kryptopterus bicirrhus)* Fish and Shellfish Immun. 11: 199-202.

Ellis, A.E. 1998. Recent development in oral vaccine delivery systems. Fish Pathol. 30: 293-300.

Fernandez-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., Blasco, R. and Coll, J.M. 1999. A model to study fish DNA immersion vaccination by using the green fluorescent protein. J. Fish Dis. 22: 237-241.

Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., and Robinson, H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal, and gene-gun inoculations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11478-11482.

Gomez-Chiarri, M and Chiaverini, L.A. 1999. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. Gen. Anal.: Biomol. Eng. 15: 121-124.

Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Butterworth, P., Umeda, P.K. and Chang, K. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. FEBS letters 290: 73-76.

Harpin, S., Hurley, D.J., Mbikay, M., Talbot, B., and Elazhary, Y. 1999. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. J. Gen. Virol. 80: 3137-3144.

Heppell, J., Lorenzen, N., Amstrong, N.K., Wu, T., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K, Schorr, J. and Davis, H.L. 1998. Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicemia virus genes as model. Fish and Shellfish Immun. 8: 271-286.

Heppell, J. and Davis, H.L. 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. Advanced Drug Delivery Reviews. 43: 29-43.

Herrmann, J.E., Chen, S.C., Jones, D.H., Tinsley-Bown, A., Fynan, E.G., Greenberg, H.B. and Farrar, G.H. 1999. Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. Virology 259: 148-153.

Joosten, H.M., Aviles-Trigueros, M., Sorgeloos, P. and Rombout, J.H. 1995. Oral vaccination of juvenile carp *(Cyprinus carpio)* and gilthead seabream *(Sparus aurata)* with bioencapsulated Vibrio anguillarum bacterin. Fish and Shellfish Immun. 5: 289-299.

Jorgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B. and Sommer, A. 2001. CpG oligonucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon *(Salmon salar L.)* leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. Dev. Comp. Immun. 25: 313-321.

Kanellos, T.S., Sylvester, I.D., Butler, V.L., Ambali, A.G., partidos, C.D., Hamblin, A.S. and Russell, P.H. 1999. Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenenicity of DNA and subunit vaccines in fish. Immunology 96: 507-510.

Kim, C.H., Johnson, M.C., Drennah, J.D., Simon, B.E., Thomann, E. and Leong, J.C. 2000. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. J. Virol. 74: 7048-7054.

Krieg, A.M., Yi, A., Schorr, J, and Davis, H.L. 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. Trends in Microbiol. 6: 23-26.

Leong, J.C., Anderson, E., Bootland, L.M., Chiou, P.W., Johnson, M., Kim, C., Mourich, D. and Trobridge, G. 1997. Fish Vaccine Antigens Produced or Delivered by Recombinant DNA Technologies. Dev Biol Stand. 90: 267-277.

Liu, Z., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., and Hackett, P.B. 1990. Development of expression vectors for transgenic fish. Bio/Techology 8: 268-272.

Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T. and Davis, H. 1998. Protective immunity to VHS in rainbow trout *(Onchorhynchus mykiss, Walbaum)* following DNA vaccination. Fish and Shellfish Immun. 8: 261-270.

Norman J.A., Hobart, P., Manthorpe, M., Felgner, P., and Wheeler, C. 1997. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. Vaccine 15: 801-803.

Palm, R.C., Landolt, M.L., Busch, R.A. 1998. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Dis. Aqua. Organ. 33: 157-166.

Promega. 2001. Life Science Catalog. Promega Corporaton, U.S.A.

Robinson, H.L., Hunt, L.A. and Webster, R.G. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine 11: 957-960.

Ruitenberg, K.M., Walker, C., Wellington, J.E., Love, D.N. and Whalley, J.M. 1999. Potential of DNA-mediated vaccination for equine herpesvirus1. Vet. Microbiol. 68: 35-48.

Russell, P.H., Kannellos, T., Sylvester, I.D., Chang, K.C. and Howard, C.R. 1998. Nucleic acid immunisation with a reporter gene results in antibody production in goldfish *(Carassius auratus L.)* Fish and Shellfish Immun. 8: 121-128.

Seder, R.A. 1999. DNA vaccines-designer vaccines for the 21st century. NEJM 341: 277-278

Smooker, P.M., Setiady, Y.Y., Rainczuk, A., and Spithill, T.W. 2000. Expression library immunization protects mice against a challenge with virulent rodent malaria. Vaccine 18: 2533-2540.

Tascon, R.E., Colston, M.J., Ragno, S., Stavropoulos, E., Gregory, D., and Lowie, D.B. 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nat. Med. 2: 888-892.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Hawe, L.A., Leander, K.R., Martinex, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.L. and Liu, M.A. 1993. Heterologous protein against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 259: 1745-1749.

Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V., Agadjanyan, M.G., Dang, K., Refaeli, Y., Sata, A.I., Boyer, J., Williams, W.V. and Weiner, D.B. 1993. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156-4160.

Xiang, Z.Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W.H., Cheng, J. and Ertl, H C J. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. Virology 199: 132-140.