

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas sobria* โดยใช้
แบคทีเรียทั้งเซลล์

ปริญญานิพนธ์
ของ
ธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2551
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas sobria* โดยใช้
แบคทีเรียทั้งเซลล์

ปริญญาานิพนธ์
ของ
ธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2551

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas sobria* โดยใช้
แบคทีเรียทั้งเซลล์

บทคัดย่อ
ของ
ธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2551

ธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม. (2551). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas sobria* โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์. ปรินูญานิพนธ์ วท. ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล.

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas sobria* 6 ไอโซเลต คือ AS1-AS6 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์เป็นแอนติเจน สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 28 โคลนซึ่งแบ่งได้เป็น 16 กลุ่มตามความจำเพาะ โดยกลุ่มที่ 1-8 มีความจำเพาะต่อ *A. sobria* เพียงแต่ไอโซเลต กลุ่มที่ 1 และ 2 จำเพาะต่อ AS1, กลุ่มที่ 3 จำเพาะต่อ AS2, กลุ่มที่ 4 จำเพาะต่อ AS3, กลุ่มที่ 5-7 จำเพาะต่อ AS4 และกลุ่มที่ 8 จำเพาะต่อ AS6 สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 9 และ 10 มีความจำเพาะต่อ *A. sobria* 2 ไอโซเลต โดยกลุ่มที่ 9 จำเพาะต่อ AS1 และ AS2 และกลุ่มที่ 10 จำเพาะต่อ AS2 และ AS4 สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 11, 12, และ 13 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. sobria* บางไอโซเลตเช่นกัน แต่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* และ *A. caviae* บางไอโซเลตที่นำมาใช้ทดสอบ สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 14 สามารถจับกับ *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. veronii* ที่นำมาใช้ทดสอบส่วนใหญ่ได้ สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 15 และ 16 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3, 11, 12, 13 และ 14 จับกับแอนติเจนที่เป็น lipopolysaccharide และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3, 6, 8, 11, 12, 13 และ 14 สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. sobria* ในเนื้อเยื่อปลานิลโดยวิธี immunohistochemistry ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการใช้ตรวจโดยวิธี dot blotting อยู่ในช่วง 10^6 – 10^8 CFU/มิลลิลิตร และสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ในการตรวจการติดเชื้อในแหล่งน้ำและตัวอย่างธรรมชาติต่าง ๆ โดยการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างที่ต้องการตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน 6 ชั่วโมงและนำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ วิธีการนี้สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. sobria* ได้เมื่อมีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10 CFU/มิลลิลิตร

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO *Aeromonas sobria*
USING WHOLE CELL ANTIGEN

AN ABSTRACT
BY
TANAPONG THAICHAITAM

Present in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
May 2008

Tanapong Thaichaitam. (2008). *Production of monoclonal antibodies specific to Aeromonas sobria using whole cell antigen*. Master thesis, M. S. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul.

Twenty eight monoclonal antibodies (MAbs) against six isolates of *Aeromonas sobria* (AS1-AS6) were generated using whole cell of bacteria for immunization. They were divided into 16 groups according to their specificities and abilities to bind to the antigen. The MAbs of group 1-8 were specific to individual isolate of *A. sobria*. The first and the second groups of MAbs bound only to AS1. The third and the fourth groups bound only to AS2 and AS3, respectively. MAbs in groups 5-7 were specific to AS4. MAbs in group 8 were specific to AS6. MAbs in group 9 were specific to AS1 and AS2. MAbs in group 10 were specific to AS2 and AS4. MAbs in groups 11, 12 and 13 were also specific to a few isolates of *A. sobria* but demonstrated cross reactivity to some isolates of *A. hydrophila* and *A. caviae*. MAbs in group 14 strongly bound to almost all isolates of *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. veronii* tested. MAbs in groups 15-16 recognized all *Aeromonas* spp. tested. The MAbs in groups 3, 11, 12, 13 and 14 bound to lipopolysaccharide. Only MAbs in groups 3, 6, 8, 11, 12, 13 and 14 could be used to detect *A. sobria* infection in tissue by immunohistochemistry. The sensitivity of detection of these MAbs determined by dot blotting was ranged from 10^6 – 10^8 CFU/ml. These MAbs can be used for detection of bacteria in natural water and several samples by pre-enrichment in tryptic soy broth for 6 hours and directly determined with MAbs by dot blotting. By this method, the sensitivity of detection increases up to 10 CFU/ml in original sample.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas sobria* โดยใช้

แบคทีเรียทั้งเซลล์

ของ

ธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 25.....

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ดร. วรณิกา เพี้ยนักตร์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และรองศาสตราจารย์ ดร.วิระวรรณ สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และ ดร.วรรณิภา เพียรภักดิ์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ และคุณสมบัติ รักประทานพร ที่ได้ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่ายิ่ง อีกทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือ สนับสนุน และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอขอบคุณ อริศรา ศิริประกาศิต เพื่อนคู่คิดของข้าพเจ้า ผู้ซึ่งคอยให้กำลังใจ สนับสนุนและช่วยเหลือในระหว่างที่ข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอณาเอาผลประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง และปลานิลทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	2
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
การจัดหมวดหมู่ของ <i>Aeromonas sobria</i>	4
การก่อโรคของ <i>A. sobria</i>	7
กลไกการก่อโรคของ <i>A. sobria</i>	9
การพิสูจน์ทราบ (identification) เชื้อ <i>A. sobria</i>	11
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย.....	17
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย.....	21
อุปกรณ์และสารเคมี.....	24
วิธีดำเนินการทดลอง.....	26
การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว.....	26
การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา.....	27
การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	27
การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	29
การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
4 ผลการทดลอง.....	41
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Aeromonas sobria</i>	41
ความจำเพาะของแอนติซีรั่ม.....	41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง (ต่อ)	
การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	41
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	42
การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA.....	44
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	45
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจหา <i>A. sobria</i> โดยวิธี dot blotting.....	45
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยทดสอบจากเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง.....	45
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	59
บรรณานุกรม.....	63
ภาคผนวก.....	69
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	88

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Aeromonas</i>	12
2 ไมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ.....	20
3 รายชื่อแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง.....	21
4 ส่วนผสมของไมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน.....	38
5 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี.....	46
6 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทป ของแอนติเจนที่จับโดยไมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ.....	56
7 คุณสมบัติต่าง ๆของไมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้.....	58
8 ส่วนผสมพอลิอะครีลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel.....	77

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การย้อมติดสีแกรมลบของ <i>A. sobria</i>	4
2 การจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มแบคทีเรียใน genus <i>Aeromonas</i>	6
3 แสดงอาการของปลาที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i>	7
4 ไร่น้ำนางฟ้าที่เป็นโรคจุดดำ.....	8
5 Pili ของแบคทีเรีย <i>A. sobria</i>	10
6 <i>A. sobria</i> ใช้ pili ในการยึดเกาะเซลล์.....	10
7 การเปลี่ยนแปลงของ toxin ที่แบคทีเรีย <i>A. sobria</i> สร้างขึ้น.....	11
8 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	15
9 การสังเคราะห์ DNA โดยวิธี de novo และ วิธี salvage.....	16
10 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	33
11 การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blotting.....	34
12 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี dot blotting.....	35
13 การเตรียมเนื้อเยื่อและการทดสอบ immunohistochemistry.....	36
14 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยทดสอบจากเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง.....	39
15 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม.....	47
16 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ.....	48
17 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่ละโคลนด้วยวิธี Western blotting.....	50
18 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มที่ 3, 6, 8 ด้วยวิธี immunohistochemistry.....	51
19 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มที่ 11, 12, 13, 14 ด้วยวิธี immunohistochemistry.....	52
20 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting.....	53
22 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting ในตัวอย่างปลานิลที่เพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	54

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อรองรับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของประชากรโลก จึงได้มีการพัฒนาให้มีการเลี้ยงแบบหนาแน่น ซึ่งทำให้เกิดปัญหาด้านโรคตามมา ทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และปรสิตต่าง ๆ โดยพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* เป็นกลุ่มที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง โดยมี *Aeromonas hydrophila* และ *Aeromonas sobria* เป็นสปีชีส์หลัก ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะพบในแหล่งน้ำจืดและน้ำกร่อยทั่วไป (Massa; Altieri; & Angela. 2001: 169; Marcel; Antoinette; & Mireille. 2002: 1343) และสามารถทำให้เกิดโรคได้ โดยเฉพาะเมื่อสัตว์น้ำเกิดความเครียดหรือมีสภาพร่างกายอ่อนแอ ซึ่งอาจเกิดจากการเลี้ยงอย่างหนาแน่น การจับหรือขนย้ายสัตว์น้ำถี่เกินไป หรือการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างของน้ำ ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้สามารถช่วยส่งเสริมให้การติดเชื้อแบคทีเรียเกิดได้ง่ายขึ้น เมื่อสัตว์น้ำมีการติดเชื้อแล้ว มักจะมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วและทำให้สัตว์น้ำตายเป็นจำนวนมากภายใน 1 หรือ 2 วัน อาการที่พบโดยทั่วไปของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ สัตว์จะเป็นแผลแดงตามลำตัว โคนครีบทวม ท้องบวม น้ำอวัยวะในตกเลือด ตับและไตบวม (Robert. 1993: 312)

A. sobria เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง สามารถเคลื่อนที่ได้และก่อโรคสำคัญในปลา น้ำจืดเกือบทุกชนิด เช่น ปลานิล (Cai; Li; & Ma. 2004: 80) ปลาเพิร์ช (perch) (Wahli; et al. 2005: 141) ปลาทอง (Dror; et al. 2006: 279) ปลาดุกและปลาช่อน (จิตติมา เขียวแก้ว; และคนอื่น ๆ 2541: 125) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการติดเชื้อในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์เลื้อยคลานบางชนิด เช่น เต่า (Macneill; & Elizabeth. 2002: 134) กบ (ยลประภา ดำรงผล; และคนอื่น ๆ 2541: 102) และตะพาบน้ำ (เต็มดวง สมสิริ. 2541: 16) ในขณะที่การติดเชื้อ *A. sobria* ในคนส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Daily; et al. 1981: 769) แต่ก็สามารถพบการติดเชื้อในบริเวณอื่น ๆ ได้ เช่น การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (Figueras. 2007: unpagged) และการติดเชื้อบริเวณบาดแผล (Lai; et al. 2007: 255) การติดเชืวนั้นอาจเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนหรือสัมผัสกับแหล่งน้ำที่มีเชื้อโดยมีบาดแผล แม้แต่ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *A. sobria* ได้ อีกทั้งยังพบการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ได้แก่ สุนัข แมว (Ghenghesh; et al. 1999: 177) หนู (Heuzenroeder; Christopher; & Robert. 1999: 135) และกระต่าย (Pazzaglia; et al. 1990: 1926)

จากการศึกษาอย่างแพร่หลายถึงปัจจัยและกลไกที่ทำให้เกิดโรคของแบคทีเรียชนิดนี้พบว่า *A. sobria* จะสร้าง toxin หลายชนิดซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในสัตว์ที่ได้รับเชื้อ ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการตรวจหาการติดเชื้อ *A. sobria* จึงมีหลายวิธี เช่น การใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์ จำแนกและพิสูจน์ทราบชนิด (Abbott; Cheung; & Landa. 2003: 2350; Macfaddin. 2000: 647) โดยทั่วไปการตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานานในการตรวจ จึงทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้ยากยิ่ง อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในการอ่านผล ส่วนวิธีทางชีวโมเลกุลโดยการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นหลัก มีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นานและเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง (Shibata; et al. 1996: 1268; Wang; et al. 2003: 1051)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies) เป็นแอนติบอดีที่สร้างจากเซลล์ที่มาจากโคลนเดียวกันและมีความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ที่เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อแอนติเจนชนิดนั้นสามารถทำปฏิกริยากับแอนติเจนชนิดเดียวกันนี้ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน โดยอาศัยปฏิกริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90) นอกจากนี้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันยังมีความไวและความแม่นยำสูง สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ในประเทศไทยนั้น ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. hydrophila* (Prahmkaeo. 2005) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria* ดังนั้นจึงควรที่จะพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. sobria* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. sobria* ในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ต่อไป

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria*
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเบื้องต้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria*

ความสำคัญของงานวิจัย

เป็นแนวทางในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. sobria* ในสัตว์น้ำเพื่อทำการรักษาและป้องกันการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว

ขอบเขตของงานวิจัย

1. การเตรียม *A. sobria* ที่ใช้เป็นแอนติเจนและนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนู
2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. sobria*
3. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria* โดยวิธี dot blotting วิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry
4. การตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

สมมติฐานงานวิจัย

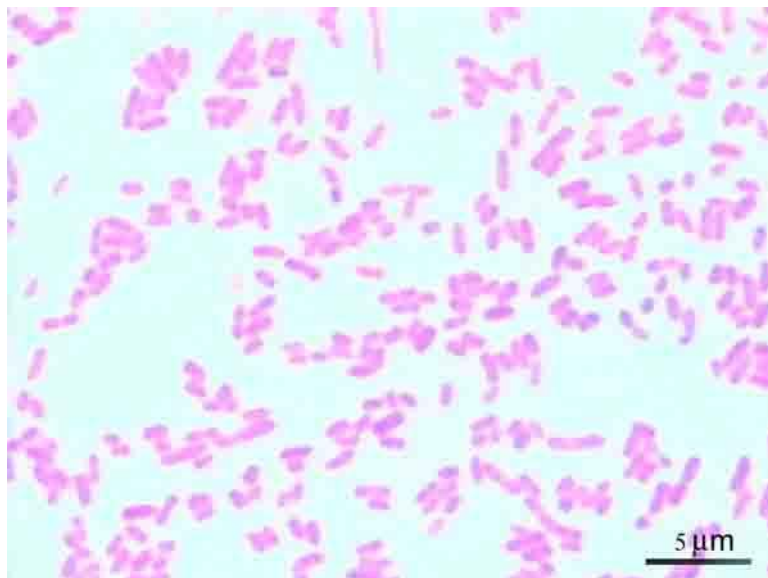
การปลูกภูมิคุ้มกันโดยใช้ *A. sobria* ในหนูขาวจะสามารถชักนำให้หนูสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria* ได้ และเมื่อนำหนูนี้นมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถผลิตและคัดเลือกเพื่อให้ได้โมโนโคลนอลที่มีความจำเพาะสูงต่อ *A. sobria*

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดหมวดหมู่ของ *Aeromonas sobria*

Aeromonas sobria เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พาก facultative anaerobe มีรูปร่างเป็นแท่ง (ภาพประกอบ 1) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติที่เป็นน้ำจืดและสามารถพบได้ในบริเวณปากแม่น้ำซึ่งเป็นน้ำกร่อย (Massa; Altieri; & Angela. 2001: 169; Marcel; Antoinette; & Mireille. 2002: 1343; Robert. 1993: 312)



ภาพประกอบ 1 การย้อมติดสีแกรมลบของ *A. sobria*

แบคทีเรียในสกุล (genus) *Aeromonas* นั้นแต่เดิมถูกจัดอยู่ในวงศ์ (family) Vibrionaceae (Popoff 1984: 547) ซึ่งในวงศ์นี้ประกอบไปด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, และ *Photobacterium* ต่อมา ได้มีการจัดแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* แยกออกจากวงศ์เดิมและตั้งชื่อใหม่เป็นวงศ์ Aeromonadaceae (Colwell; MacDonell; & De Ley. 1986: 473) ในภายหลังมีรายงานการสนับสนุนความถูกต้องในการจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ที่แยกออกเป็นวงศ์ Aeromonadaceae โดยมีผู้ศึกษาการจัดกลุ่มและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วย *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, และ *Photobacterium* โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลศึกษาลำดับเบสของส่วน small-subunit rRNAs ของแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียใน

กลุ่ม *Photobacterium* และ *Vibrio* นั้นมีความใกล้เคียงกันจึงควรจัดกลุ่มกันไว้ในวงศ์ Vibrionaceae ตามเดิม ขณะที่ผลการจัดกลุ่มของ *Plesiomonas* นั้นพบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae มากกว่าวงศ์ Vibrionaceae เดิม และผลการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย *Aeromonas* พบว่า แบคทีเรีย *Aeromonas* แยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวอย่างชัดเจน จึงสมควรแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* ออกจากเป็นวงศ์ใหม่คือ Aeromonadaceae (Murcia; et al. 1992: 419; Ruimy; et al. 1994: 424)

ส่วนความสัมพันธ์ภายในสกุล *Aeromonas* เองนั้นอาจแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่โดยอาศัยลักษณะความสามารถในการเคลื่อนที่ โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยมี *A. salmonicida* เป็นตัวหลัก ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะก่อโรคกับปลาที่อาศัยอยู่ในเขตหนาวเป็นส่วนใหญ่และไม่ก่อโรคในคน โดยจะเป็นพวก psychrophile คือสามารถเจริญได้แม้อยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 22 องศาเซลเซียส (Janda; & Duffey. 1988: 982) กลุ่มที่สองเป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้และสามารถก่อโรคในปลาน้ำจืดได้เกือบทุกชนิดและก่อโรคในคนได้โดยมี *A. hydrophila* และ *A. sobria* เป็นสายพันธุ์หลัก แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพวก mesophile คือเจริญที่อุณหภูมิปานกลางและมีอุณหภูมิเหมาะสมที่ 37 องศาเซลเซียส (Carnahan; & Altwegg. 1996: 1-38)

การทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ภายในสกุล *Aeromonas* ส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล โดยสกัด DNA ของแบคทีเรีย แล้วหาลำดับเบสและนำมาเปรียบเทียบเพื่อจัดกลุ่ม ในแต่ละการทดลองได้เลือกศึกษาบริเวณยีนแตกต่างกันออกไป โดยมีผู้เลือกศึกษายีนส่วน 16s rDNA แล้วนำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม พบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้บางส่วน แต่ในบางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องมาจากยีนส่วน 16s rDNA นั้นมีความอนุรักษ์สูงมากทำให้ไม่สามารถใช้ลำดับเบสส่วนนี้ในการจัดกลุ่ม *Aeromonas* สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาก ๆ ได้ (Figueras; et al. 2000) ต่อมาผู้ศึกษาความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม *Aeromonas* โดยเลือกศึกษายีน *gyrB* ซึ่งจะ encode β -subunit ของ DNA gyrase และนำผลการจัดกลุ่มมาเปรียบเทียบและประเมินค่าร่วมกับผลการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลของยีนส่วน 16s rDNA และการศึกษาโดยใช้เทคนิค DNA hybridization ซึ่งลักษณะของยีน *gyrB* นี้จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของเบส ณ ตำแหน่งใด ๆ (rate of base substitution) สูงกว่ายีนในส่วนของ 16s rDNA ประมาณ 4 เท่า (Yamamoto; & Harayama. 1996: 817) ซึ่งทำให้ยีนส่วน *gyrB* มีความอนุรักษ์น้อยกว่าและสามารถใช้ในการจัดกลุ่ม *Aeromonas* ได้ดีกว่า โดยจากผลของการจัดกลุ่ม (ภาพประกอบ 2) จะพบว่า *A. sobria* นั้นมีความใกล้เคียงกับ *A. allosaccharophila*, *A. veronii* และ *A. culicicola* มากที่สุด (Yanez; et al. 2003: 878)



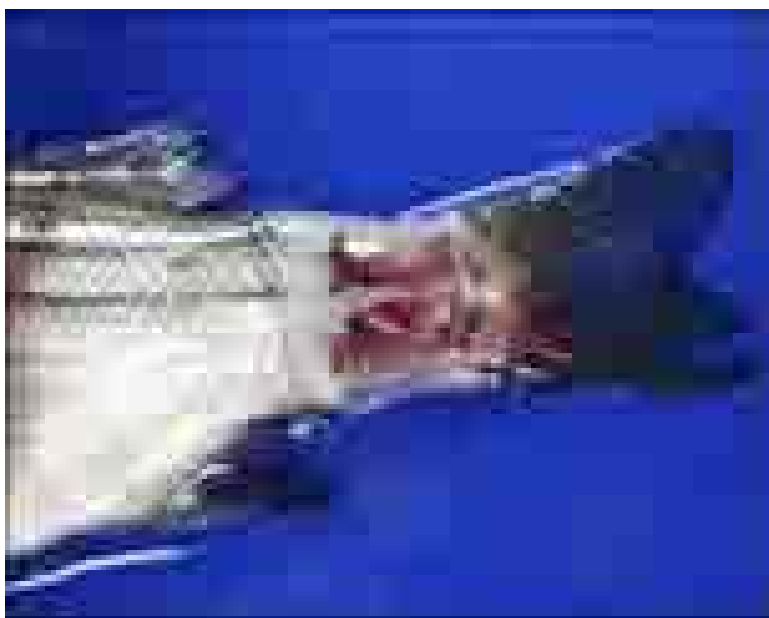
ภาพประกอบ 2 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* โดยใช้การวิเคราะห์ยีนในส่วน *gyrB* ที่มา: Yanez; et al. (2003). *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. 53: 878.

การก่อโรคของ *A. sobria*

การก่อโรคในสัตว์น้ำ

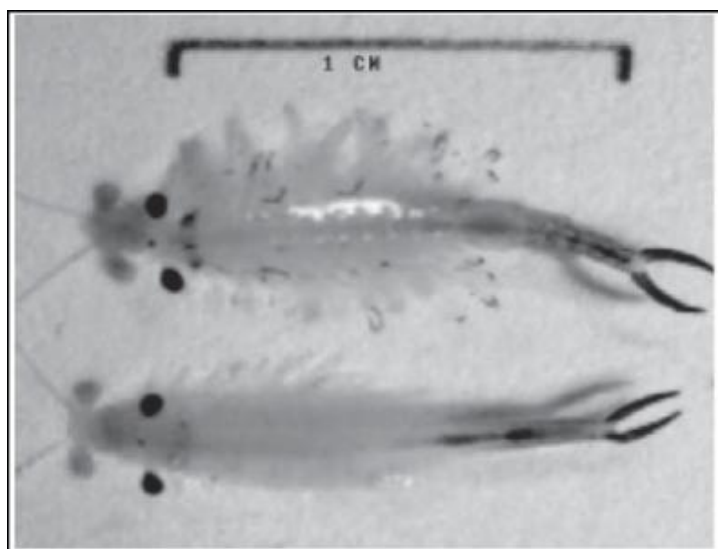
A. sobria สามารถก่อโรคในปลาน้ำจืดได้หลายชนิด เช่น ปลานิล (Cai; Li; & Ma. 2004: 80) ปลาเพิร์ช (perch) (Wahli; et al. 2005: 141) ปลาทอง (Dror; et al. 2006: 279) ปลาดุก และปลาช่อน (จิตติมา เขี้ยวแก้ว; เต็มดวง สมศิริ; และ สุปราณี ชินบุตร. 2541: 125) เป็นต้น โดยการติดเชื้อมักปรากฏเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็ว เช่น การเปลี่ยนของอุณหภูมิหรือการเปลี่ยนความเป็นกรดด่างของน้ำ นอกจากนี้การเลี้ยงอย่างหนาแน่น การขนย้าย การจับปลาที่จนเกินไป (Dror; et al. 2006: 285) ก็สามารถทำให้ปลาเกิดความเครียด ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ปลาติดเชื้อ *Aeromonas* ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้พบว่าหากปลามีการติดเชื้อของไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่นอยู่ก่อนแล้วซึ่งจะทำให้ปลาอ่อนแอก็จะทำให้ปลาสามารถติดเชื้อ *Aeromonas* ได้ง่ายเช่นเดียวกัน

เมื่อปลามีการติดเชื้อ แบคทีเรียจะเข้าสู่กระแสโลหิตของปลาแล้วไปตามอวัยวะต่าง ๆ หลังจากนั้นแบคทีเรียจะสร้าง toxin ซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อของปลา โดยปลาที่มีการติดเชื้อ จะมีอาการแผลเปื่อย หางเน่า คีบเน่า ตาโปน ท้องบวมและตกเลือด การติดเชื้อที่รุนแรงในบางครั้งจะทำให้ปลาเสียชีวิตจนตายได้ (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 ปลาที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* (http://www.cnr.vt.edu/fisheries/afs/fisheries_techniques/Chapter14/20with%20aeromonas%20infection.jpg)

จากรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียจากโรคน้ำจืดสามชนิดที่เป็นโรคจุดดำจากโรงเพาะเลี้ยงในประเทศเบลเยียม พบแบคทีเรีย 5 กลุ่ม คือ *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Comamonas testosteroni*, *Aeromonas* spp. และ *Flavobacterium* spp. (Dierckens; et al. 1998) ต่อมาผู้ศึกษาถึงโรคจุดดำของโรน้านางฟ้า ซึ่งโรน้านางฟ้าเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย โดยมีศักยภาพทดแทนการนำเข้าอาร์ทีเมีย (artemia) หรือไรน้ำเค็มเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ แต่พบว่าในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้พบโรคจุดดำซึ่งมีลักษณะเป็นปมสีดำ (black nodule) และทำให้อาหารโรน้านางฟ้าตาย ส่งผลกระทบต่อปริมาณการผลิตและลดมูลค่าทางเศรษฐกิจของโรน้านางฟ้า เมื่อตรวจสอบพบการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด สามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มหลักคือ *Chryseobacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, และ *Enterobacter* spp. โดยลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นคือ มีลักษณะปมสีดำตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยพบปมสีดำมากบริเวณขาว่ายน้ำ และโรน้านางฟ้าจะตายหลังจากเกิดโรค 1-5 วัน (ภาพประกอบ 4) ปมสีดำที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลผลิตสุดท้าย เช่น เมลานิน ที่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวกครัสเตเชียสร้างขึ้นในปฏิกิริยาตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหรืออาจเป็นกลุ่มเซลล์ที่ตายแล้ว และเป็นไปได้ว่าการตายของโรน้านางฟ้าที่เป็นโรคอาจเกิดจากปมสีดำไปขัดขวางกระบวนการกินอาหารที่เป็นแบบการกรองและกระบวนการหายใจ (หนูเดือน เมืองแสนและคนอื่น ๆ 2549: 41-42)



ภาพประกอบ 4 โรน้านางฟ้าที่เป็นโรคจุดดำมีลักษณะเป็นปมสีดำตามขาว่ายน้ำ (บน) และโรน้านางฟ้าที่ไม่แสดงอาการของโรค (ล่าง)

ที่มา: หนูเดือน เมืองแสน; และคนอื่น ๆ. (2549). วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 11(1):

การก่อโรคในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ

A. sobria สามารถก่อโรคในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำบางชนิดได้ โดยมีรายงานการตายของเต่า (wood turtle) จำนวนมากในปี ค.ศ. 2002 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการตรวจวินิจฉัย พบการติดเชื้อของ *A. sobria* ร่วมกับโปรโตซัวอีกหลายชนิด (Macneill; & Elizabeth. 2002: 134) ขณะที่ในอุตสาหกรรมเลี้ยงกบในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย พบว่า *A. sobria* และ *A. hydrophila* สามารถก่อโรคขาแดง (red leg disease) ทำให้เกิดความเสียหายในด้านผลผลิตของการเพาะเลี้ยง โดยอาการที่พบคือ ผิวหนังบริเวณท้องและหน้าขามักตกลือดเป็นผื่นสีชมพูถึงแดงเข้ม บางตัวท้องบวมและมีน้ำเหลืองปนเลือดในช่องท้อง หากติดเชื้อรุนแรงมากอาจตายได้ (ยลประภา ดำรงผล; และคนอื่นๆ. 2541: 102) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อในตะพาบน้ำโดยมีอาการตกลือดเป็นผื่นแดง บริเวณกระดอง และหน้าท้อง จะสังเกตเห็นแผลเป็นจำลือด เป็นตุ่มบริเวณกระดองในระยะแรกของการติดเชื้อ และเมื่ออาการป่วยมากขึ้น ตุ่มเหล่านี้จะปะทุออกกลายเป็นแผลหลุม ซึ่งถ้าถึงขั้นหนักมากกระดองจะทะลุ โดยการติดเชื้อมักจะเกิดร่วมกับแบคทีเรียอีกหลายชนิด (เต็มดวง สมสิริ. 2541: 16)

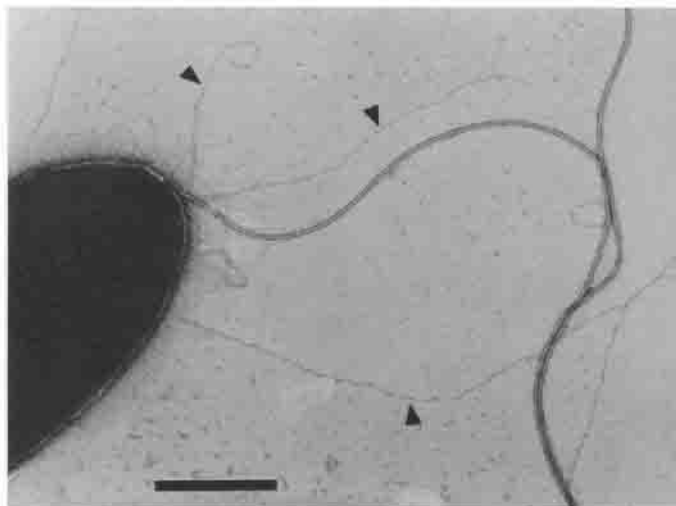
การก่อโรคในคน

การติดเชื้อ *A. sobria* ในคนนั้นมีรายงานการติดเชื้อทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ โดยส่วนมากจะเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Daily; et al. 1981: 769-777) แต่ยังพบการติดเชื้อบริเวณบาดแผลและบริเวณทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อที่ระบบทางเดินอาหารจะมีอาการท้องร่วง ถ่ายเป็นเลือด เป็นไข้ อาเจียนและปวดท้องอย่างรุนแรง ส่วนการติดเชื้อบริเวณทางเดินปัสสาวะจะทำให้เกิดอาการไตวายเฉียบพลัน (hemolytic uremic syndrome) ซึ่งจะทำให้ไตทำงานผิดปกติ (Figueras. 2007: unpagged; Bou; Cervero; & Martinez. 1998: 11) การติดเชื้อ *A. sobria* บริเวณที่มีบาดแผลจะทำให้แผลมีการเน่าเปื่อย พุพอง (Lai; et al. 2007: 255-257)

กลไกการก่อโรคของ *A. sobria*

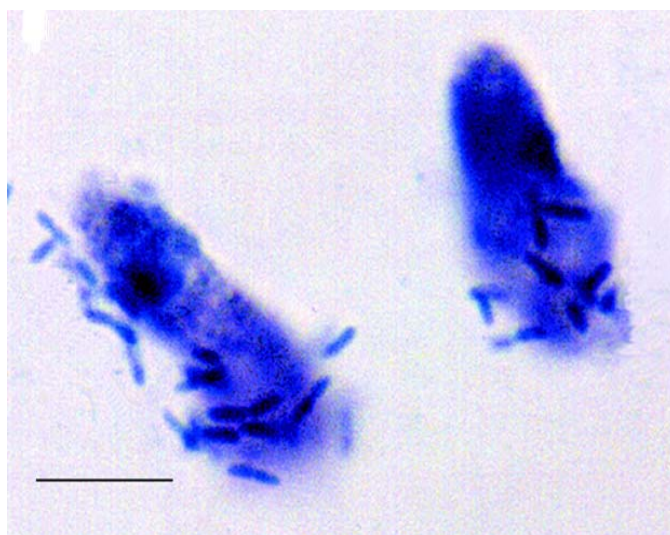
การศึกษาถึงกลไกการยึดเกาะผิวเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่า *A. sobria* จะใช้ pili ในการยึดเกาะผิวเซลล์เป้าหมายเพื่อใช้ในการเกิด colonization (ภาพประกอบ 5-6) (Hokama; & Iwanaga. 1991: 3481) และหลั่ง toxin โดย toxin ของ *A. sobria* จะหลั่งออกมาในรูป dimer ที่ยังคงไม่สามารถก่อโรคได้ แต่เมื่อถูกเอนไซม์โปรตีเอสตัดโปรตีนบางส่วน (42 กรดอะมิโน) ทางด้านปลาย C ของสายโปรตีนออกไป ส่วนที่เหลือจะกลายเป็น dimer ที่สามารถก่อโรคได้ (ภาพประกอบ 7) (Nomura; et al. 2000: 30; Nomura T. 2001: 484) โดย toxin จะจับกับ receptor บนผิวเซลล์ลำไส้ ต่อมาพบว่า receptor นั้นคือ เอนไซม์ placental alkaline phosphatase ซึ่งมีขนาด 66 kDa และพบ

ได้มากในบริเวณลำไส้และอวัยวะของระบบทางเดินอาหารและยังพบว่า intestinal alkaline phosphatase สามารถทำหน้าที่เป็น receptor ได้เช่นเดียวกัน (Wada; et al. 2005: 431; Wang; et al. 1999: 218)



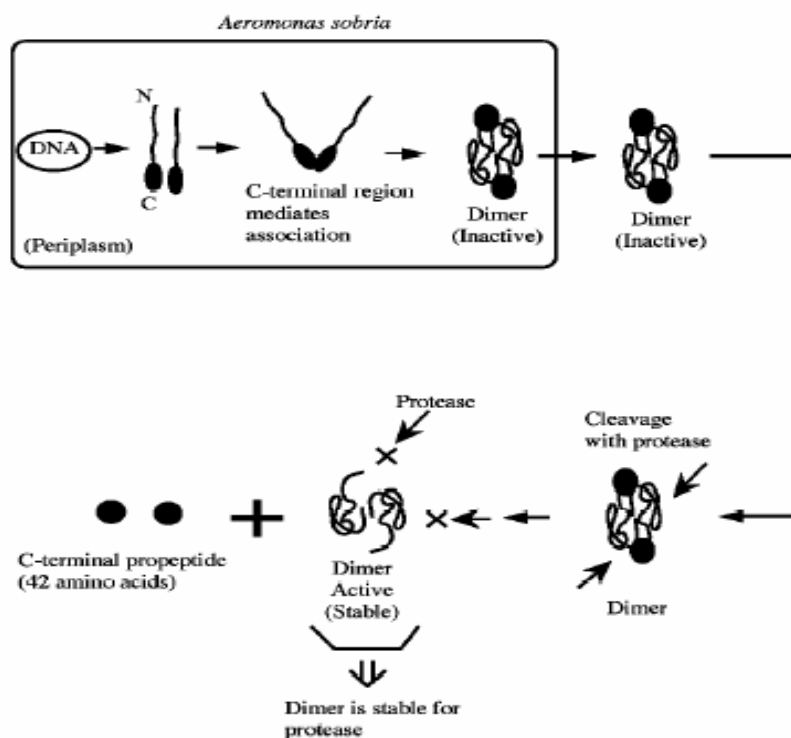
ภาพประกอบ 5 pili ของแบคทีเรีย *A. sobria* จากการถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งของ pili) bar 500 nm.

ที่มา: Hokama; & Iwanaga. (1991). *Infection and Immunity*. 59: 3479.



ภาพประกอบ 6 *A. sobria* ใช้ pili ในการยึดเกาะเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (Henle 407 cell) ย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin bar 10 μ m

ที่มา: Kirov.; et al. (1999). *Infection and Immunity*. 67: 5449.



ภาพประกอบ 7 การเปลี่ยนแปลงของ toxin ที่แบคทีเรีย *A. sobria* สร้างขึ้น

ที่มา: Nomura. (2001). *Yakugaku Zasshi*. 121: 483.

ภายหลังจากเซลล์ลำไส้ได้รับ toxin ของ *A. sobria* toxin จะกระตุ้นการเพิ่มของ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) และ Ca^{2+} ภายในเซลล์ลำไส้ และจะเกิดการกระตุ้นต่าง ๆ ต่อเนื่องภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการหลั่ง Cl^- ออกสู่นอกเซลล์ผ่านทาง cAMP-dependent Cl^- secretory pathway และ Ca^{2+} dependent Cl^- secretion และยังทำให้เกิดการยับยั้งการดูดซึม NaCl ในบริเวณลำไส้ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการสะสมของของเหลวภายในโพรงลำไส้และเกิดอาการท้องร่วงในเวลาต่อมา (Fujii; Nomura; & Okamoto. 1999: 69-71; Tanoue; et al. 2005: 197-200; Takahashi; et al. 2005: 173-180)

การพิสูจน์ทราบ (identification) เชื้อ *A. sobria*

ในการพิสูจน์ทราบชนิดแบคทีเรียนั้นมีวิธีการต่าง ๆ หลายวิธี และมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันดังนี้

1. การใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

การใช้วิธีการทั่วไปในการพิสูจน์ทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นเทคนิคที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย (ตาราง 1) แต่การพิสูจน์ทราบโดยใช้เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้ระยะเวลานาน จึงทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้อย่างล่าช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ

ตาราง 1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas*

Test	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
$\text{No}_3 \rightleftharpoons \text{No}_2$	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	-	+	-	-	-	-	-
Motility	+	+	-	-	+	+	+
Brown soluble pigment	-	-	+	+	-	-	-
Glucose	A	A	A	A	-	A	A
Lactose	V	V	V	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	A	A	A	A	-	-	-
Cellobiose	V+	-	A	-	-	V	V
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	A	A	A	A	A	A	A
Glycerol	V	A	V	V	V	V	A
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	A	A	A	A	A	A	A
Mannitol	A	A	A	A	-	V	A
Mannose	V	V+	A	A	A	A	A
Melibiose	-	-	-	NR	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 1(ต่อ)

Test	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	A	A	A	V	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	V	-
Sucrose	A	A	A	-	-	V	A
Trehalose	A	A	A	A	A	V	A
Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	V	-	-	+	+
DNase	+	+	+	+	+	+	+
Citrate (Christensen)	V	-	-	-	+	-	+
Citrate (Simmons)	V	V	V	-	V	-	+
Esculin hydrolysis	+	+	V	+	-	-	+
Arginine dehydrolase	+	+	+	+	+	+	-
Lysine decarboxylase	-	V	-	V	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	+
Gelatin liquefaction, 22°C	+	+	+	+	+	+	V+
KCN	G	G	G	NG	NG	NG	V
Lipase	+	V	V	+	+	-	+
Malonate	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	V+	V	+	-	V+
Phenylalanine deaminase	-	-	V	-	V	+	V+
Methyl red (MR)	+	+	+	+	+	-	+
Voges-Proskauer (VP)	-	+	-	+	-	V+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Sensitivities: 0/129	R	R	R	NR	R	R	R

(V= variable reactions (26-75%); V+= variable usually positive (76-90%); G=growth; NG= no growth; R= resistance; NR= no results; A=acid production (+); 0/129= vibriostatic agent, 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine.)

ที่มา: Macfaddin. (2000). *Biochemical tests for identification of medicine bacteria*. 646-647.

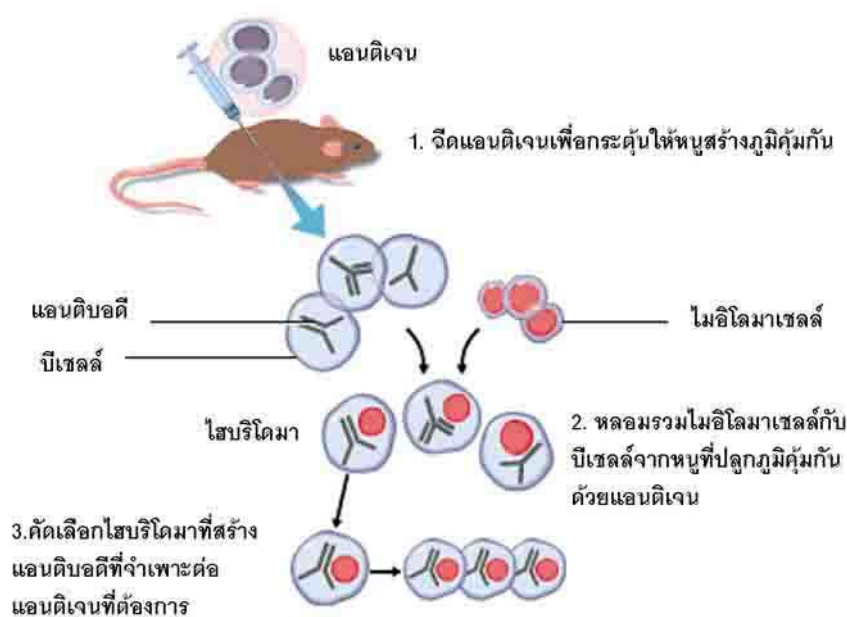
2. การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นานและเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง โดยมีการศึกษาตรวจหาเชื้อ *A. sobria* โดยใช้เทคนิค PCR สังเคราะห์ DNA fragment ซึ่งอยู่ภายใน 16s rDNA gene และ *A. sobria* hemolysin gene (*asa* gene) ทำให้สามารถตรวจพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียได้ว่าเป็น *A. sobria* โดยจะให้ผลบวกต่อยีนทั้งสองยีน หากเป็นแบคทีเรีย *Aeromonas* ชนิดอื่น ๆ จะให้ผลบวกต่อยีน 16s rDNA เพียงยีนเดียวเท่านั้น (Shibata; et al. 1996)

ต่อมาผู้พัฒนาการใช้เทคนิค multiplex PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อและจำแนก *A. hydrophila* และ *A. sobria* โดยการใช้ primer หลายคู่ในการทำ PCR พร้อมกันซึ่ง primer ที่ใช้มีความจำเพาะต่อ DNA fragment ของยีนส่วนต่าง ๆ ของ *A. sobria* และ *A. hydrophila* ได้แก่ 16s rDNA gene, *A. sobria* hemolysin gene (*asa* gene) และ *A. hydrophila* hemolysin gene (*ahh* และ *AaerA* gene) เมื่อนำ *A. sobria* มาตรวจโดยใช้ primer ชุดนี้จะได้แถบ DNA 2 แถบ ซึ่งก็คือส่วนของยีน 16s rDNA และ *A. sobria* hemolysin gene ในขณะที่หากแบคทีเรียเป็น *A. hydrophila* จะได้แถบ DNA 3 แถบ ซึ่งก็คือส่วนของยีน 16s rDNA และ *A. hydrophila* hemolysin gene อีก 2 แถบ ทำให้สามารถใช้ primer ชุดนี้ในการตรวจและจำแนกแบคทีเรีย *A. sobria* และ *A. hydrophila* ได้ภายในการทำ PCR เพียงครั้งเดียว (Wang; et al. 2003: 1051)

3. การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เซลล์เดียว จึงทำให้แอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น ในปี ค.ศ. 1975 (Köhler และ Milstein) สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้เป็นผลสำเร็จ โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือบี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่ไม่สามารถมีชีวิตยาวนานในภาวะ *in vitro* และไมอีโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ตลอดในภาวะ *in vitro* ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) (ภาพประกอบ 8) ซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตในภาวะ *in vitro* ได้ไม่สิ้นสุด เทคนิคนี้จึงเป็น



ภาพประกอบ 8 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

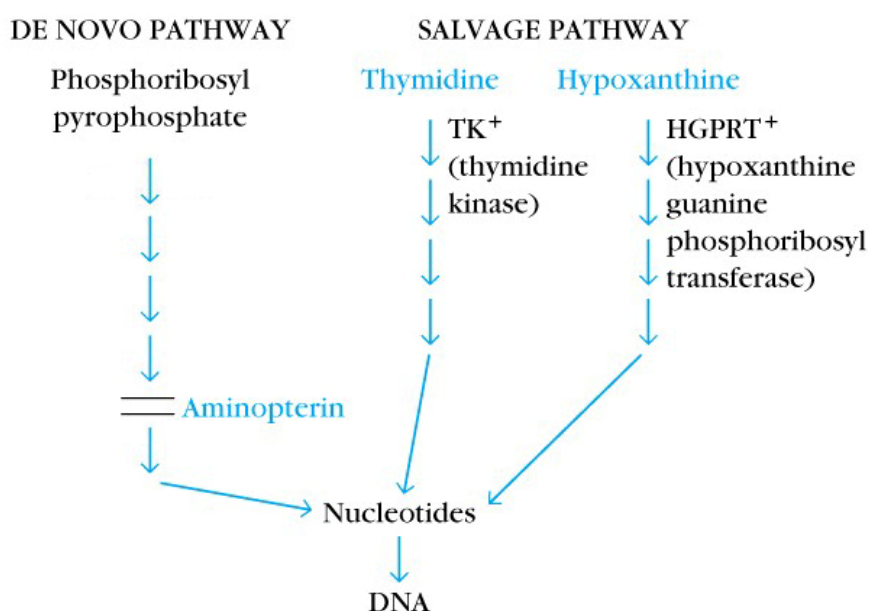
(<http://images.encarta.msn.com/xrefmedia/aencmed/targets/illus/ilt/T059309A.gif>)

เทคนิคที่มีศักยภาพสูงและได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91)

ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่ การใช้ไมอีโดมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอีโดมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอีโดมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91)

การคัดเลือกของ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 วิธีคือ วิธี de novo และวิถี salvage ในกรณีของวิถี de novo นั้นสามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ได้ ดังนั้นเมื่อวิถี de novo ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้วิถี

salvage เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถี salvage นั้นได้แก่ เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยวิถี salvage ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวางวิถี de novo ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้วิถี salvage ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้วิถี salvage ในการสังเคราะห์ DNA ได้ (ภาพประกอบ 9) การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมโอโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์มะเร็ง และไมโอโลมาเพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยามัคคุ่มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่น ๆ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 92 - 93)



ภาพประกอบ 9 การสังเคราะห์ DNA โดยวิถี de novo และ วิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิถี de novo (<http://immuneweb.xxmc.edu.cn/images/figure04-21.jpg>)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรียต่าง ๆ มีผู้ทดลองผลิตแล้วหลายครั้ง (ตาราง 2) ซึ่งอาจใช้รูปแบบแอนติเจนและวิธีการคัดเลือกที่แตกต่างกันไป โดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* spp. นั้น มีผู้ผลิตต่อส่วน iron-regulated outer membrane protein และ lipopolysaccharide (LPS) ของ *Aeromonas salmonicida* โดยทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และ Western blotting ซึ่งผลิตได้ 6 โคลน 4 โคลนจำเพาะต่อ LPS และ 2 โคลนจำเพาะต่อ iron-regulated outer membrane protein ของ *A. salmonicida* โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ (Neelam; et al. 1995: 201-208) และมีผู้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* โดยได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 กลุ่ม แบ่งตามลักษณะความจำเพาะ กลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* หนึ่งไอโซเลต ซึ่งจับกับส่วน LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-190 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 2 จำเพาะต่อ *A. hydrophila* 2 ไอโซเลต (จาก 3 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง) โดยจับกับกลุ่มของ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5-190 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 3 จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ทั้ง 3 ไอโซเลต, จำเพาะต่อ *A. sobria* 2 ไอโซเลต และแสดงปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ *A. caviae* โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน ซึ่งพิสูจน์โดยใช้วิธี dot blotting และ Western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อ LPS ของเชื้อ *A. hydrophila* ตรงบริเวณที่แตกต่างกัน ทำให้นำมาใช้อำนาจความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. hydrophila* ได้ และสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ซึ่งจำเพาะต่อ *Aeromonas* ทุกสายพันธุ์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัย *Aeromonas* spp. เบื้องต้นได้โดยวิธี dot blotting (Prahmkao. 2005)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ก็มีผู้ผลิตเช่นกัน โดยมีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ heat-stable enterotoxin ของแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* non-O1 ซึ่งเป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในคนได้ โดยใช้วิธีทางเคมีสังเคราะห์ส่วนสารพิษขึ้นเพื่อเตรียมเป็นแอนติเจน ก่อนนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว และคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้วิธี indirect ELISA โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ heat-stable enterotoxin ของ *V. cholerae* non-O1 และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ heat-stable enterotoxin ของ *V. mimicus* และ *Yersinia enterocolitica* ได้ แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับสารพิษจาก *Escherichia coli* ได้ (Takeda; et al. 1990: 2755-2759) และได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ซึ่งใช้ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จาก คน

ปลา และ หอย โดยใช้แบคทีเรียที่ฆ่าด้วยการเติม 0.1 % sodium azide เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ปลุกภูมิคุ้มกัน และทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 102 โคลน และแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะความจำเพาะ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 จะมีความจำเพาะต่อ *Vibrio* sp. เพียงสปีชีส์เดียว โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 จะจำเพาะต่อ 2 สปีชีส์ และกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อสกุล *Vibrio* นอกจากนี้ยังได้ใช้วิธี Western blotting ตรวจสอบพบว่าแอนติเจนที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางโคลนทำปฏิกิริยาก็คือส่วน LPS และ flagella ของแบคทีเรีย (Chen; et al. 1992: 3694-3700) ต่อมาได้มีผู้พัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยตรวจหา hemolysin ของ *V. vulnificus* โดยใช้เทคนิค sandwich enzyme-linked immunosorbent assay ซึ่งการใช้วิธีนี้ในการตรวจจะต้องมีแอนติบอดี 2 กลุ่มที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดเดียวกันแต่จับกับแอนติเจนที่ตำแหน่งอีพิโทปต่างกัน และจะต้องผลิตจากสัตว์ทดลองต่างชนิดกัน โดยในการทดลองนี้ได้เลือกใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากแกะและกระต่ายในการตรวจสอบ และเพิ่มความจำเพาะโดยทำการ adsorption โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากแกะและกระต่ายนี้ด้วย acetone powder ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ก่อนนำมาใช้ตรวจ ขณะเดียวกันก็ได้ทดลองผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเช่นกัน แต่ไม่ประสบผลสำเร็จเพราะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผู้ทดลองผลิตได้มีความไวในการตรวจต่ำมาก (Parker & Lewis. 1995: 476-480) นอกจากนี้ยังมีผู้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus* โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์เป็นแอนติเจน และทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 1 ไอโซเลตจาก 3 ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อ 3 ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ และกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. อีกหลายชนิดที่ใช้ทดสอบได้ (Tansirisittikul; et al. 2005)

แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ก็มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบเช่นกัน โดยมีผู้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วน H7 แอนติเจนของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่ง H7 นี้เป็นโปรตีนแฟลกเจลลาของแบคทีเรียชนิดนี้ โดยเลือกใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ที่ถูกทำให้แตกโดยใช้คลื่นเสียงในการปลุกภูมิคุ้มกันครั้งแรกและใช้ flagellin ที่สกัดแยกได้ในการปลุกภูมิคุ้มกันครั้งต่อมา และทำการคัดเลือกโดยใช้วิธี indirect ELISA และ Western blotting โดยสามารถผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 2 โคลนที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* H7 และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *E. coli* H23 และ H24 ได้ (He; et al. 1996: 3325-3332) และมีผู้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* เพื่อจะนำไปใช้ตรวจการ

ปนเปื้อนของเชื้อนี้ในอาหาร โดยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 2 โคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *B. cereus* แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดนี้ในรูปแบบสเปิร์ได้ และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *Bacillus* spp. บางสายพันธุ์ได้ โดยสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนนี้มาใช้ตรวจด้วยวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay ได้ นอกจากนี้ยังตรวจสอบลักษณะอิพิโทปที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยา โดยทำการใส่ trypsin และ protease ลงในหลุมที่เคลือบด้วย *B. cereus* อยู่ก่อนแล้ว จากนั้นจึงใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เข้าตรวจสอบ พบว่าไม่สามารถตรวจสอบได้ จึงสรุปว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลน ทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นโปรตีนของแบคทีเรีย (Charni; et al. 2000: 2278-2281)

นอกจากนี้ก็มีผู้ประยุกต์การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจวัดเฉพาะจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเช่นกัน ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดที่มี probiotic bacteria เป็นส่วนประกอบ พบว่าแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้นจึงจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค แต่การประเมินค่าจำนวนแบคทีเรียในอาหาร มักไม่สามารถแยกจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตออกจากกันได้ จึงมีการพัฒนานำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจ โดยทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Bifidobacteria* ซึ่งเป็น probiotic bacteria ที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยใช้ cell wall protein ของ *Bifidobacterium bifidum* และ *B. longum* ในการปลูกภูมิคุ้มกัน และใช้ วิธี indirect ELISA และ Western blotting ในการคัดเลือกเมื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ จึงนำมาใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective culture medium) โดยเริ่มจากการเคลือบกันหลุม plate 6 well ด้วย protein A และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ใส่ในหลุมดังกล่าว และเติมสารละลายที่มีแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งไว้ให้เกิดการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแบคทีเรียที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ ทั้งไว้ 1-2 วัน จะเกิดโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นในหลุม ก็จะสามารถประเมินค่าของจำนวนแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตได้ (Amrouche; et al. 2006: 159-170)

ตาราง 2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรีย	แอนติเจนที่ใช้	วิธีที่ใช้ในการ พิสูจน์ เอกลักษณ์	ผู้วิจัย
<i>V. cholerae</i>	heat stable enterotoxin	ELISA, amino acid sequence	Takeda; et al., 1990
<i>Vibrio</i> spp.	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Chen; et al., 1992
<i>V. vulnificus</i>	hemolysin	ELISA, WB	Parker; and Lewis, 1995
<i>A. salmonicida</i>	iron-regulated outer membrane protein และ lipopolysaccharide (LPS)	ELISA, WB	Neelam; et al. 1995
<i>Escherichia coli</i>	แฟลกเจลลา	ELISA, WB	He; et al., 1996
<i>Bacillus cereus</i>	vegetative cells	ELISA, WB	Charni; et al., 2000
<i>A. hydrophila</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	dot blotting, WB, IHC	Prahkarnkao. 2005
<i>V. alginolyticus</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	dot blotting, WB, IHC	Tansirisittikul; et al., 2005
Bifidobacteria	cell wall protein	ELISA, selective medium	Amrouche; et al. 2006

IHC= immunohistochemistry, WB= Western blotting, ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

1. หนูพันธุ์ swiss mice เพศเมีย อายุประมาณ 6 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
2. ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จากตลาดนัดจตุจักร มีความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร
3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 3)

ตาราง 3 รายชื่อแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง เฉพาะ *A. sobria* 6 ไส้หลอด (AS1- AS6) ที่ใช้ในการปลูกหมักร่วมกันเพื่อใช้สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี

แบคทีเรีย	สถาบัน	แหล่งที่แยกเชื้อ
<i>A. sobria</i> 12056 (AS1)	NCIMB	-
<i>A. sobria</i> 12446 (AS2)	DMST	-
<i>A. sobria</i> 22099 (AS3)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22100 (AS4)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22101 (AS5)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22102 (AS6)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24061 (AS7)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24062 (AS8)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24063 (AS9)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24064 (AS10)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 1234 (AH1)	VMARC	Carp's kidney
<i>A. hydrophila</i> 04082 (AH2)	AAHRI	-
<i>A. hydrophila</i> 2798 (AH3)	DMST	-
<i>A. hydrophila</i> 22095 (AH4)	DMST	Hemo
<i>A. hydrophila</i> 22096 (AH5)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 22097 (AH6)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 22098 (AH7)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 490601 (AH8)	SWU	Gold fish
<i>A. hydrophila</i> 24057 (AH9)	DMST	Stool

ตาราง 3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สถาบัน	แหล่งที่แยกเชื้อ
<i>A. hydrophila</i> 24058 (AH10)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 24059 (AH11)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 24060 (AH12)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 13016 (AC1)	NCIMB	Stool
<i>A. caviae</i> 22103 (AC2)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 22104 (AC3)	DMST	Rectal swab
<i>A. caviae</i> 22105 (AC4)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 22106 (AC5)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24065 (AC6)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24066 (AC7)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24067 (AC8)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24068 (AC9)	DMST	Pus
<i>A. veronii</i> 21255	DMST	-
<i>A. jandaei</i> 21256	DMST	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i> 22107	DMST	Rectal swab
<i>P. shigelloides</i> 22108	DMST	Rectal swab
<i>P. shigelloides</i> 22109	DMST	Rectal swab
<i>V. cholerae</i> 22135	DMST	Stool
<i>V. alginolyticus</i> 22082	DMST	Stool
<i>V. fluvialis</i> 22085	DMST	Rectal swab
<i>V. harveyi</i> 639	CENTEX	<i>Penaeus monodon</i>
<i>V. mimicus</i> 22088	DMST	Food
<i>V. parahaemolyticus</i> 22091	DMST	Stool
<i>V. campbellii</i>	Ghent	-
<i>V. ordalii</i>	DABU	-
<i>V. penaeicida</i>	DMSC	-
<i>V. vulnificus</i>	DABU	-
<i>Photobacterium damsela damsela</i>	DABU	Sea bass
<i>Photobacterium damsela piscicida</i>	DABU	Sea bream

ตาราง 3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สถาบัน	แหล่งที่แยกเชื้อ
<i>Salmonella Typhi</i>	DMSM	-
<i>Salmonella Enteritidis</i> 7108	DMST	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CPF	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	DMSM	-
<i>Shigella flexneri</i>	DMSM	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DMSM	-
<i>Proteus vulgaris</i>	DMSM	-

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health

DMSC = Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

DABU = Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

VMARC = Veterinary Medical Aquatic Research Center, Chulalongkorn University

AAHRI = Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture

NCIMB = The National Collection of Industrial, Marine Food Bacteria. Khonkaen University

SWU = Department of Biology, Faculty of Science, Srinakarinwirot University

CENTEX = Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Company Limited

Ghent U. = Ghent University. Belgium

- = ไม่ทราบแหล่งที่แยกเชื้อ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเลี้ยงเซลล์ (laminar flow) บริษัท NUAIRE (horizontal laminar flow cabinets)

2. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO₂ incubator; water jacket system) บริษัท NUAIRE

3. ชุด transblot apparatus บริษัท Bio-Rad

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 6400 ของบริษัท

JENWAY

5. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มีดหมุน (rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท

LEICA

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth) ของบริษัท Difco laboratories, USA (ภาคผนวก ก)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco laboratories, USA (ภาคผนวก ก)

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท Gibco BRL, USA (ภาคผนวก ค)

4. Fetal bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

5. cCalf bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

6. D-glucose ของบริษัท Sigma

7. L-glutamine ของบริษัท Sigma

8. Sodium pyruvate (C₃H₃O₃Na) ของบริษัท Sigma

9. NaHCO₃

10. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) บริษัท Sigma

11. HT supplement ของบริษัท Gibco BRL, USA

12. Aminopterin ของบริษัท Sigma

13. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma

14. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD

15. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide) ของบริษัท BIO-RAD

16. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท BIO-RAD

17. SDS (sodium dodecyl sulfate) ของบริษัท BIO-RAD
18. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD
19. SDS molecular weight markers ของบริษัท Sigma
20. ชุดตรวจสอบ hybridoma sub-isotyping, mouse ของบริษัท Zymed
21. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70%, 80%, 90%, 95% ของบริษัท BDH
22. N-butyl alcohol ของบริษัท Univar
23. ไชลีน (xylene) ของบริษัท Panreacquimicasa
24. Formaldehyde ของบริษัท Carlo Erba
25. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (ภาคผนวก ข)
26. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10) (ภาคผนวก ข)
27. ไดอะมีโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) ของบริษัท Sigma
28. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide, H_2O_2) 30% ของบริษัท Sigma
29. อีโอซีน (eosin Y) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% บริษัท Harleco (ภาคผนวก ข)
30. ฮีมาทอกไซด์ (hematoxylin) ของบริษัท Harleco (ภาคผนวก ข)
31. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (paraplast plus paraffin) ของบริษัท Sherwood
32. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution) (ภาคผนวก ข)
33. Davidson's fixative (ภาคผนวก ข)
34. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) ของบริษัท Merck
35. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid , HCl) ของบริษัท Merck
36. Permout ของบริษัท Fisher Scientific
37. GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ของบริษัท BioRad

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำ *A. sobria* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 3 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วเลือกใช้การทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสมเพื่อยืนยันชนิดอีกครั้ง (ตาราง 1) จากนั้นนำไปเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ triptic soy broth ที่เติมกลีเซอรอล 20% เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงแบคทีเรีย *A. sobria* และแบคทีเรียอื่น ยกเว้นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง triptic soy agar ขณะที่แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ให้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง triptic soy agar ซึ่งเติม NaCl เข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายใน phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและเจือจางสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ซึ่งจะมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมแอนติเจน

นำ *A. sobria* 6 ไอโซเลต (AS1–AS6) ที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 1.1 มาทำให้ตายด้วยความร้อน (heat-killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่ง *A. sobria* เป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งเก็บในสภาพ heat-killed ปกติ ส่วนที่สองนำมาทำให้เสียสภาพ (denature) โดยการเติม 2x treatment buffer (10% SDS และ beta-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไป dialysis ขณะที่แบคทีเรียส่วนที่สามนำไปเติม formaldehyde ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% formaldehyde ทิ้งไว้ข้ามคืน นำไป dialysis เช่นเดียวกัน จากนั้นจึงนำแอนติเจนทั้ง 3 รูปแบบมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

1.3 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

การฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะนำแอนติเจนที่เตรียมได้จากวิธีการในข้อ 1.2 โดยใช้แบคทีเรียทั้ง 3 รูปแบบ ผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน แล้วจึงนำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาว (swiss mice) จำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทุก 2 สัปดาห์ จะฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง โดยใช้แอนติเจนผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 ประมาณ 1 สัปดาห์ จึงทำการเก็บซีรัม แล้วนำไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *A. sobria* ด้วยวิธี Western blotting

1.4 การตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ *A. sobria* โดยวิธี Western blotting

นำ *A. sobria* (AS1-AS6) มาแยกบน 15% SDS-PAGE โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างส่วนหนึ่งในเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus (BioRad) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto ตัดแบ่งแล้วนำมาบ่มด้วยซีรั่ม (จากข้อ 1.3) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ภาพประกอบ 11) ตรวจดูแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเพื่อเลือกหนูตัวที่มีการตอบสนองที่ดีที่สุดนำไปใช้ในการผลิตไฮบริโดมาเซลล์ต่อไป

2. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดัดแปลงจากวิธีการซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein (1975) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *A. sobria* ที่ตอบสนองดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลเข้มข้น 40% กระจายเซลล์ออกเลี้ยงใน 96 well microculture plate จำนวน 20 เพลต ทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria* โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (ภาพประกอบ 10) ตามวิธีการที่อธิบายในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

นำ *A. sobria* เข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร ทั้ง 3 รูปแบบมาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่เจือจาง 1: 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น

ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปป้อนในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เลือกลีโบริโดมาโคลนที่ให้ผลบวกต่อ *A. sobria* แล้วนำไปคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2

3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2

3.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting

นำ *A. sobria* มาแยกบน 15% SDS-PAGE โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างส่วนหนึ่งในเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus (BioRad) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto ตัดแบ่งแล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์โฮบริโดมาที่เจือจาง 1: 100 จากแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้งและนำไปป้อนในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ภาพประกอบ 11) ตรวจดูแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

3.2.2 การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

นำ *A. sobria* และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 มาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์โฮบริโดมาที่เจือจาง 1: 100 จากแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปป้อนในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ภาพประกอบ 12) เลือกลีโบริโดมาโคลนที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อ *A. sobria* แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ หรือแสดงปฏิกิริยากับข้ามแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก

3.2.3 การคัดเลือกโดยวิธี immunohistochemistry

นำลูกปลานิลซึ่งมีความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตรมาแบ่งเลี้ยงในถังพลาสติก ขนาด 100 ลิตร 7 ถัง ถึง ถึงละ 10 ตัว ด้วยน้ำซึ่งมีความเค็ม 5 ส่วนในพัน จากนั้นนำปลานิลในถังที่ 1-6 ฉีดด้วย *A. sobria* AS1-AS6 แต่ละไอโซเลตตามลำดับ โดยใช้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^9 CFU/ มิลลิลิตร ฉีดเข้าตรงบริเวณด้านหลังลำตัวของปลา โดยฉีด 50 ไมโครลิตร/ตัว สังเกตแล้วเก็บปลาที่ตาย แช่ลงในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการดองน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และไซลีน นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วนำเนื้อเยื่อไปตัดด้วย เครื่องไมโครโตมให้ได้ความหนา 8 ไมครอน ตัดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน จากนั้นล้าง พาราฟินออกด้วยไซลีนและนำน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ตยงเนื้อเยื่อด้วย ฟอรัมาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วย PBS และ block ด้วย P_1^+ (10% calf bovine serum ใน PBS) นำน้ำ เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง เติม GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,000 ใน P_1^+ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง แล้วนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่ง ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมด้วยสี อีโอซิน แล้วนำไปผ่านกระบวนการดองน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพประกอบ 13) เนื้อเยื่อที่ให้ผลบวก กับแอนติบอดีจะติดสีน้ำตาล

3.3 การ reclone และการเก็บรักษาเซลล์

นำเซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 มา reclone โดยวิธี limiting dilution (Eshhar, 1985: 1-42) หลังจากนั้นขยายเพิ่มจำนวนเซลล์และนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเก็บน้ำ เลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

4. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการ reclone เซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA ตรวจสอบชนิดของ heavy chain และ light chain ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหา *A. sobria* ด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีการดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

นำ *A. sobria* รูปแบบ heat-killed มาทำให้แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) และตรึง *A. sobria* ลงที่ก้นหลุมของถาด 96 well ELISA microtiter plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เสร็จแล้วเติมสารละลาย 5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (hybridoma condition medium) ที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่าง ๆ ของถาด 96 หลุม (ตาราง 4) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร ป่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H₂O₂ ใน citrate buffer 0.1 โมลาร์ pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที บันทึกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) (ภาคผนวก จ)

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. sobria* โดยวิธี dot blotting

นำ *A. sobria* รูปแบบ heat-killed เข้มข้น 10⁹ CFU/มิลลิลิตร มาทำเจือจางแบบ serial dilution ด้วย PBS แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แขนในสารละลาย 5% blotto นำไปป่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละไฮบริโดมาโคลนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปป่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปป่มในสารละลายผสมซึ่ง

ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS ตรวจสอบระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้

4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบจากเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง

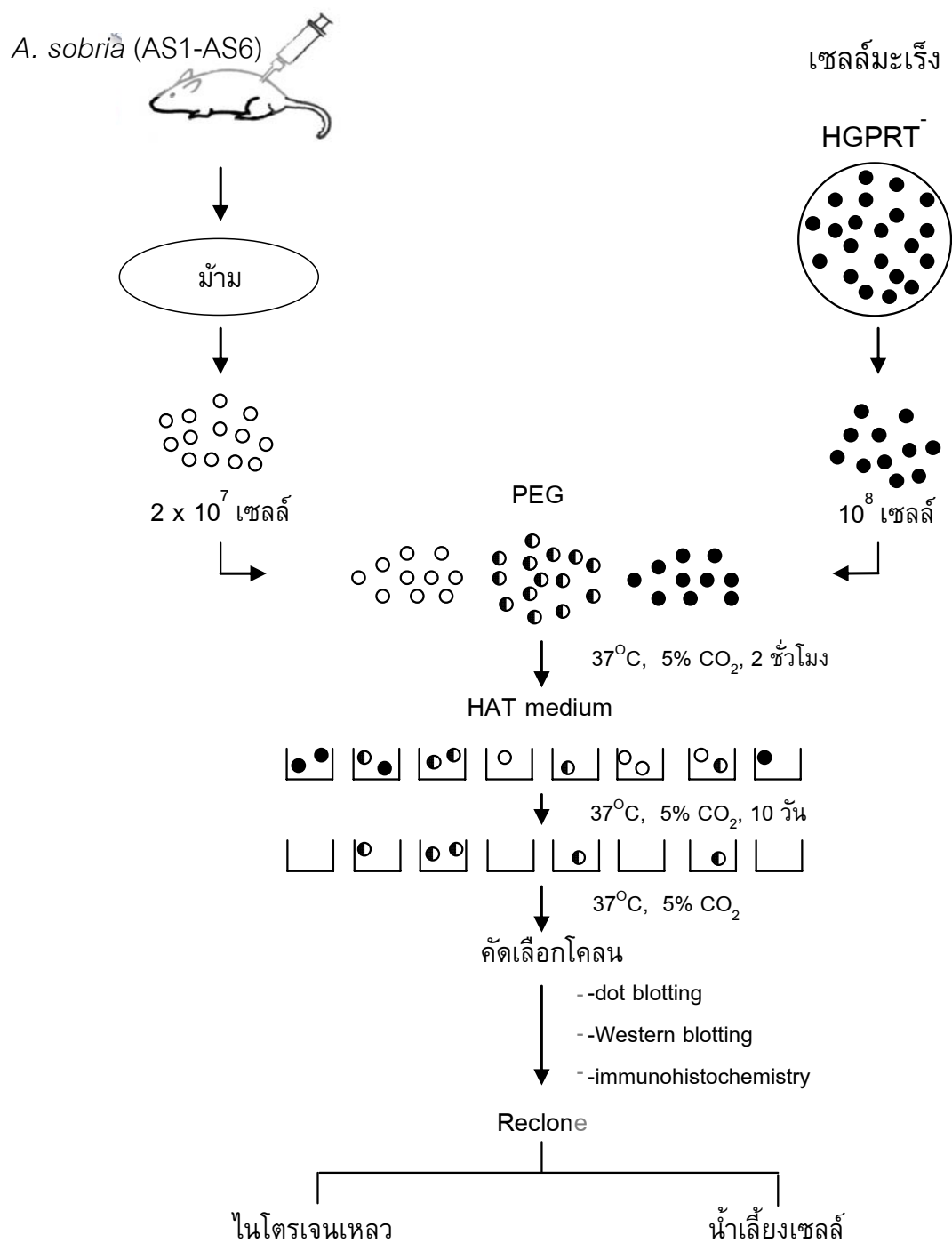
4.4.1 การตรวจสอบการติดเชื้อเดิมในปลาที่จะใช้ในการทดลอง

ก่อนทำการทดลองต้องทำการตรวจสอบว่าในเนื้อปลาที่ใช้ในการทดลองมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. sobria* ไอโซเลตใดหรือไม่ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการทดสอบเพื่อเลือกใช้แบคทีเรียไอโซเลตที่ไม่พบในปลานิล โดยการนำเนื้อปลา 5 กรัม มาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 4.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศา 60 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตาย (heat-killed) และนำส่วนของเหลวด้านบนมาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แขนในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้และมีความจำเพาะต่อ *A. sobria* ไอโซเลตต่าง ๆ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง แล้วนำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้งและนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS ตรวจสอบผลว่าในเนื้อปลาที่จะใช้ในการทดลองนี้มีการติดเชื้อ *A. sobria* ไอโซเลตใดอยู่ก่อนแล้ว และเลือก *A. sobria* ไอโซเลตที่ไม่พบในเนื้อปลามาใช้ในการทดลอง

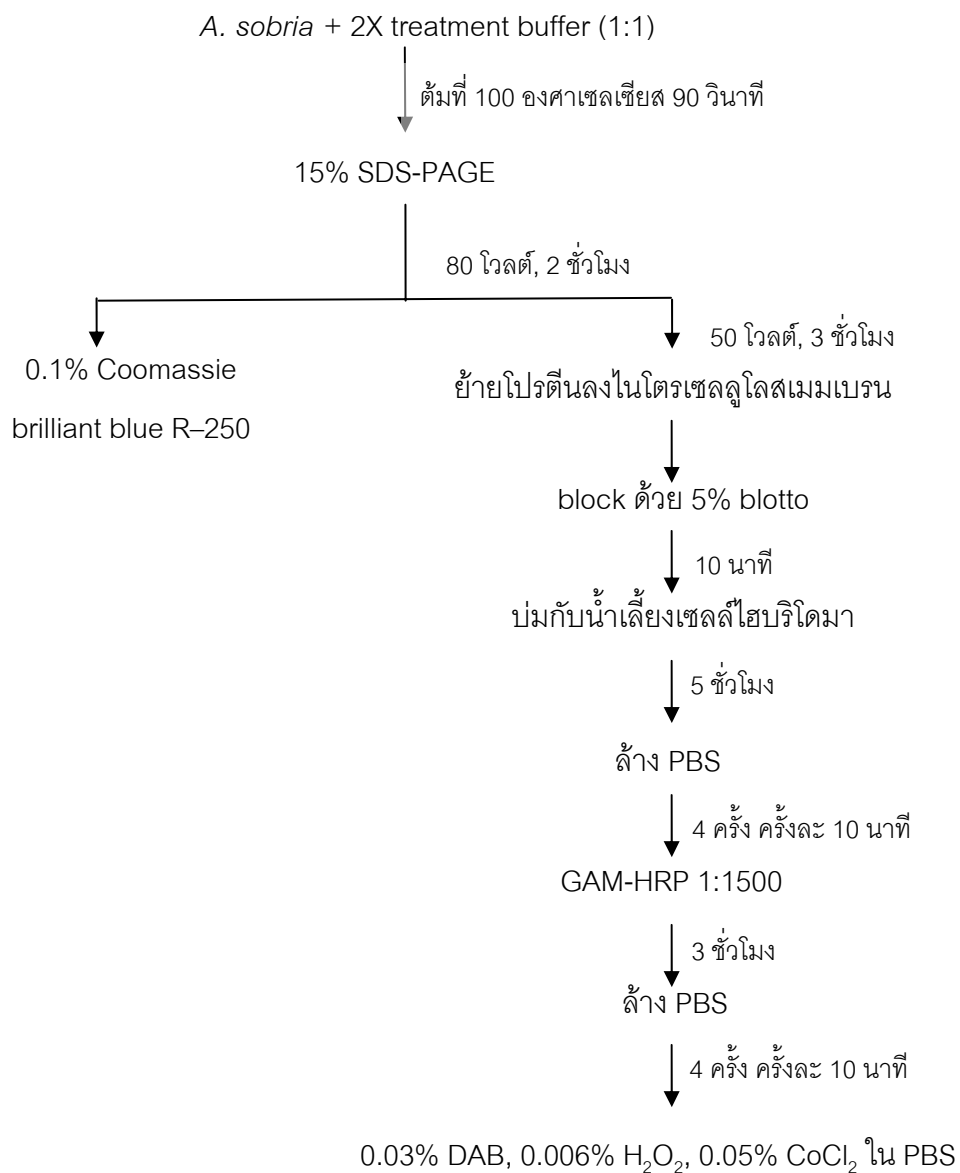
4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบจากเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง

นำแบคทีเรีย *A. sobria* ไอโซเลตที่ไม่พบในเนื้อปลา มาเจือจางใน PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสง = 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร และทำการเจือจางลง 10 เท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำ 10 fold serial dilution ทั้งหมด 8 หลอด ซึ่งในแต่ละหลอดมีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 4.5 มิลลิลิตรและเนื้อปลา 5 กรัม ทำให้หลอดที่ 8 จะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^0 CFU/มิลลิลิตร และเก็บหลอดควบคุม 1 หลอด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและเนื้อปลาจำนวนเท่ากันแต่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย นำหลอดทดลองทั้งหมด 9 หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างจากทุกหลอด ที่ 0, 3, 6, 9, 24 ชั่วโมง (ภายหลังจากการเก็บตัวอย่างทุกครั้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศา 60 นาทีเพื่อให้

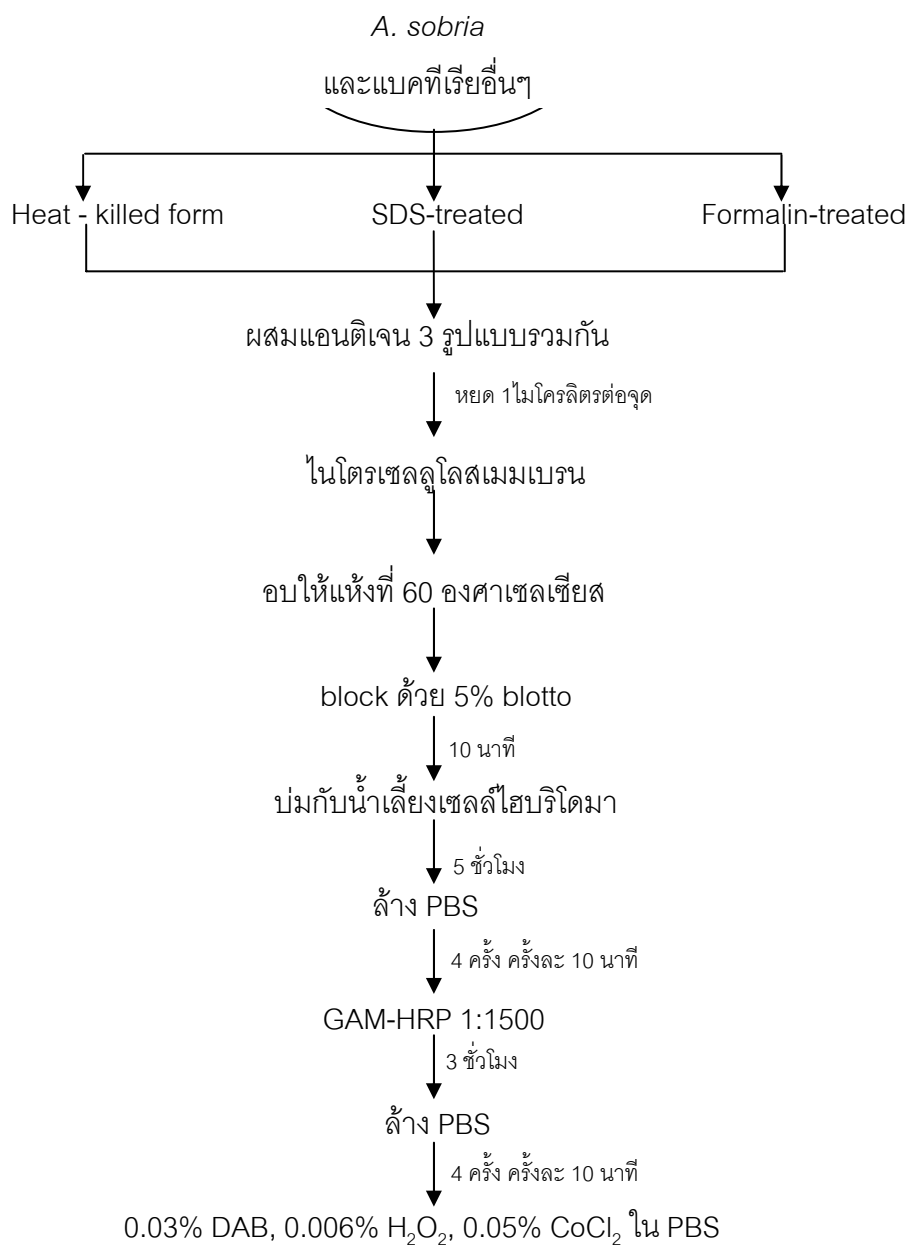
แบบที่เรียกว่า) และนำมาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อ *A. sobria* ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลองและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas* ทุกสายพันธุ์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้งและนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ภาพประกอบ 14)



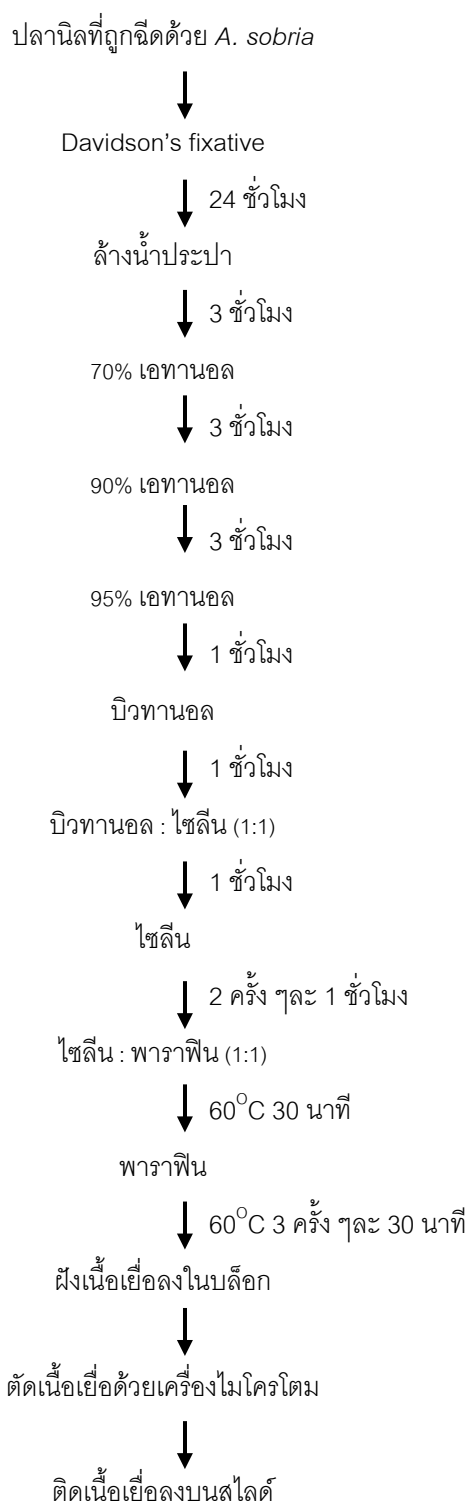
ภาพประกอบ 10 ไดอะแกรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี



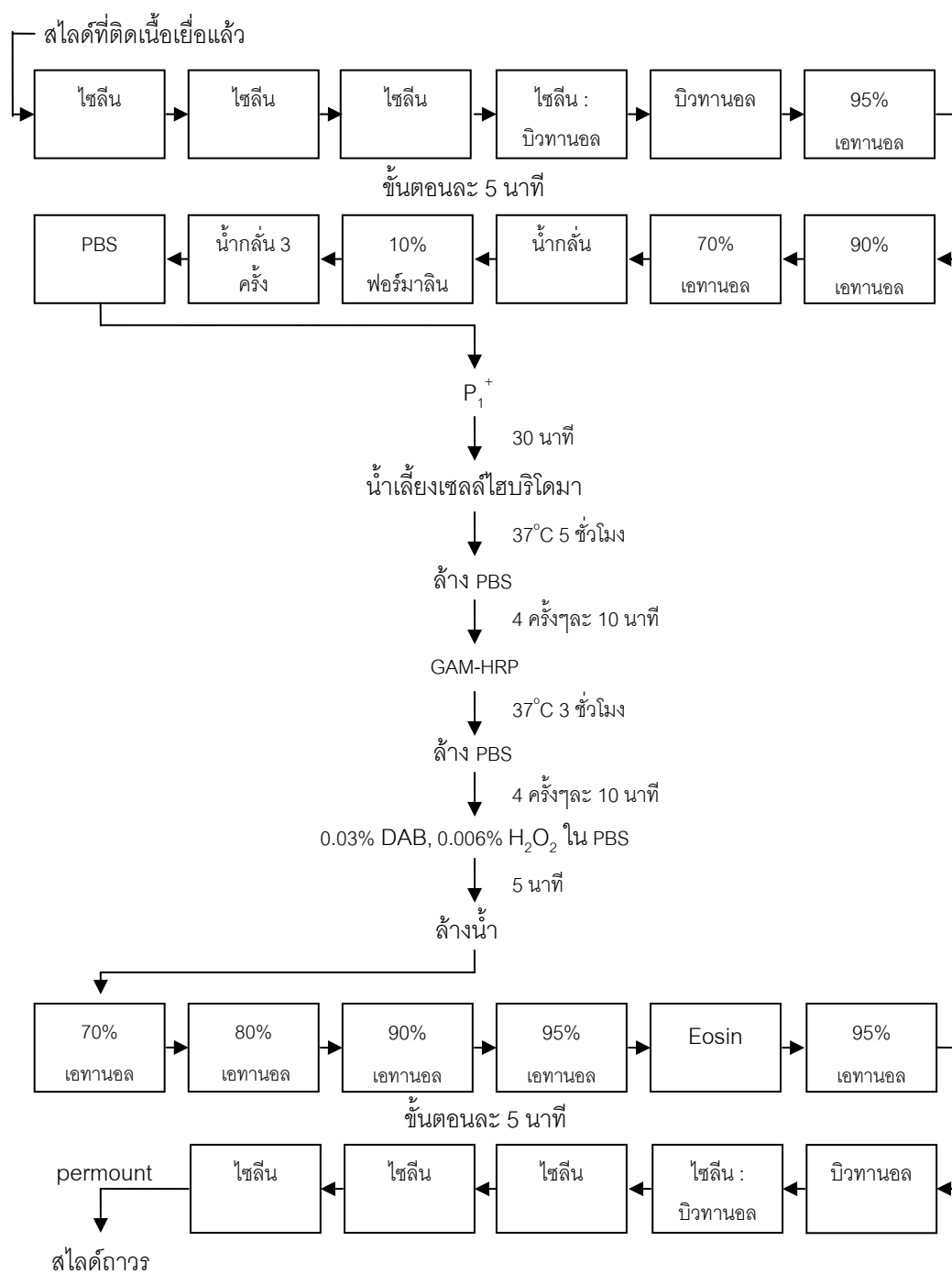
ภาพประกอบ 11 ไดอะแกรมการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี
Western blotting



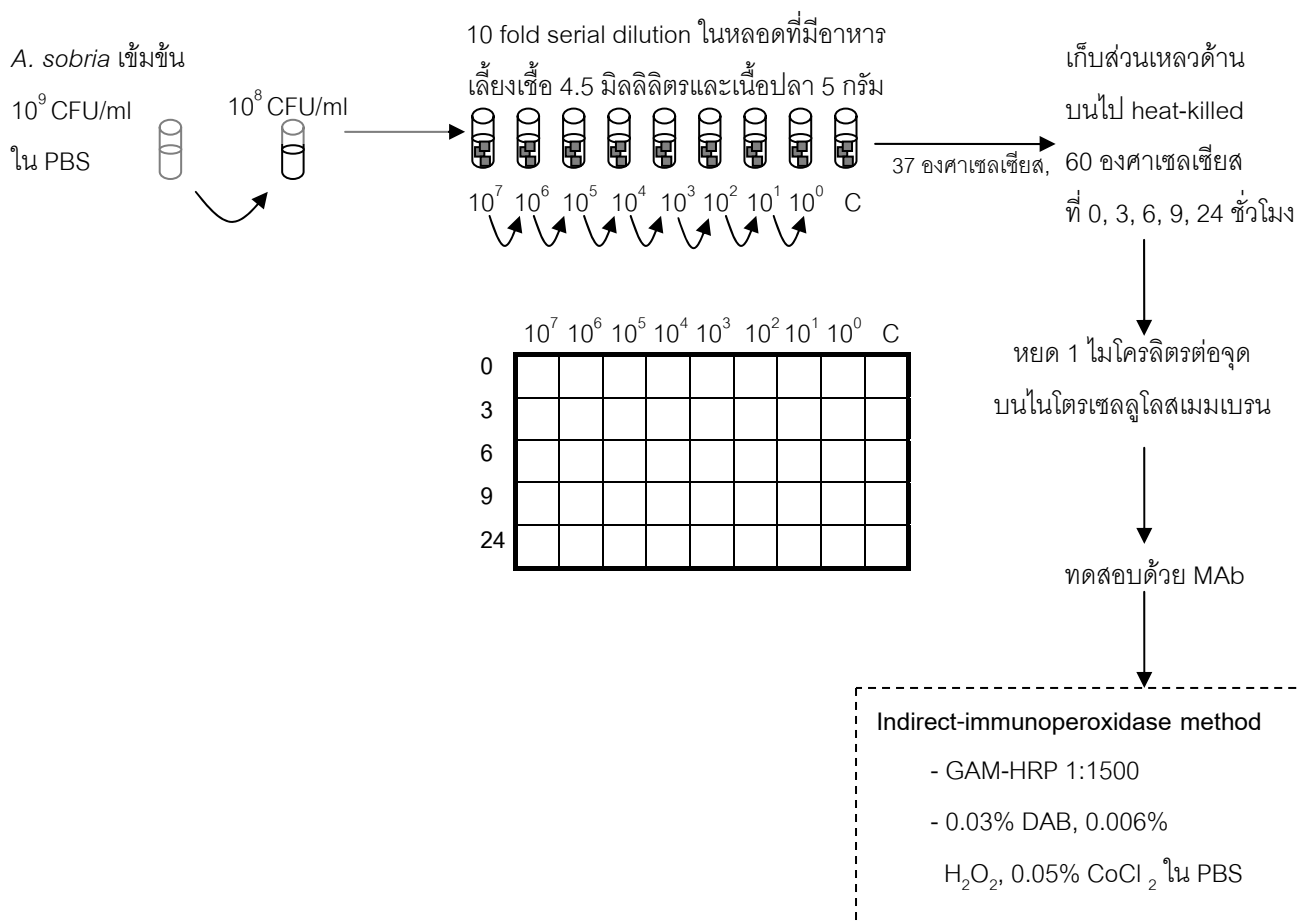
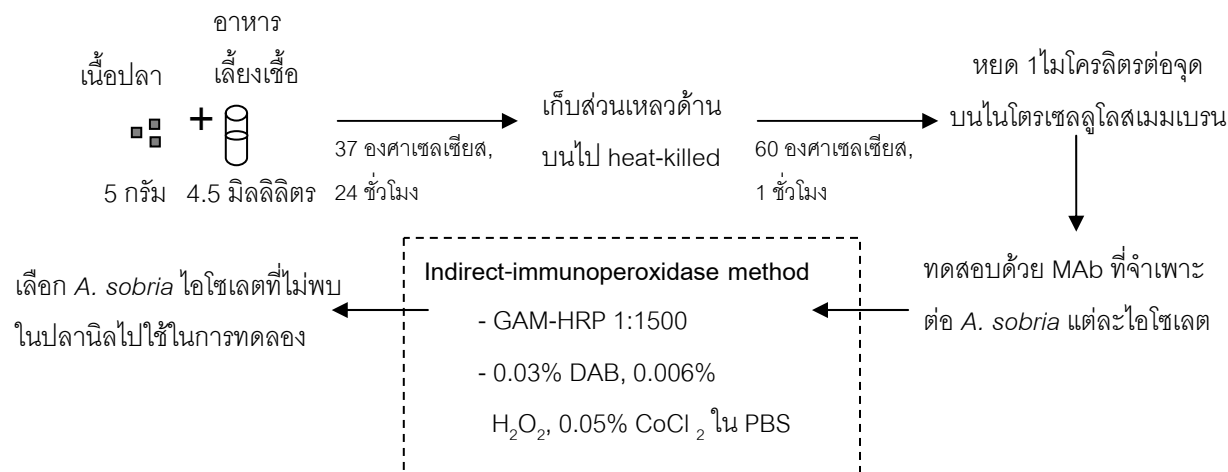
ภาพประกอบ 12 ไดอะแกรมการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี dot blotting



ภาพประกอบ 13 ไดอะแกรมการเตรียมเนื้อเยื่อและการทดสอบ immunohistochemistry



ภาพประกอบ 13 ไดอะแกรมการเตรียมเนื้อเยื่อและการทดสอบ immunohistochemistry (ต่อ)



ภาพประกอบ 14 ไดอะแกรมการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบจากเชื้อที่
เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้วิธี Western blotting, dot blotting และถ่ายภาพ nitrocellulose membrane
2. วิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้วิธี immunohistochemistry และถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อ *A. sobria*
3. ตรวจสอบชนิด isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA และบันทึกผลตัวเลขจากการอ่านของเครื่อง ELISA plate reader
4. ตรวจสอบตำแหน่ง epitope ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และบันทึกผลตัวเลขจากการอ่านของเครื่อง ELISA plate reader

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Aeromonas sobria*

นำ *Aeromonas sobria* ทั้ง 6 ไอโซเลต ได้แก่ AS1- AS6 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเลือกใช้การทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสม มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันชนิด โดยการทดสอบที่ใช้ ได้แก่ Glucose, Esculin, Voges-Proskauer (VP), Lysine, Arabinose, Indole, Salicine, Cellobiose, Mannitol, Ornithine, TCBS, 0% NaCl, 3% NaCl และ 6% NaCl พบว่าการทดสอบกับ Esculin และ Salicine จะสามารถแยก *A. sobria* ออกจาก *A. hydrophila* และ *A. caviae* ได้ และการทดสอบ Voges-Proskauer (VP) สามารถแยก *A. caviae* ออกจาก *A. hydrophila* และ *A. sobria* ได้ (ตาราง 5)

2. ความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 แล้วเก็บแอนติซีรั่มจากหนูทั้ง 4 ตัว นำมาทดสอบความจำเพาะกับ *A. sobria* ทั้ง 6 ไอโซเลต โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรั่มจากหนูทั้ง 4 ตัวสามารถจับกับแถบโปรตีนของ *A. sobria* ทั้ง 6 ไอโซเลตได้เป็นจำนวนมาก โดยหนูตัวที่ 3 ให้ผลการตอบสนองดีที่สุด พบแถบแอนติเจนเป็นจำนวนมากและชัดเจนกว่าหนูตัวอื่น ๆ (ภาพประกอบ 15) ดังนั้นจึงใช้หนูตัวที่ 3 สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

3. การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์ในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่า มีหลุมที่ให้ผลบวกประมาณ 100 หลุมจาก 1920 หลุม และในแต่ละหลุมมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blotting, immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่ามีไฮบริโดมาโคลนจำนวน 28 โคลน ซึ่งสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก โดยสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 16 กลุ่มตามความจำเพาะ (ตาราง 7)

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน ได้แก่ AS-133, AS-218 และ AS-226 ซึ่งจำเพาะต่อ AS1 เพียงไอโซเลตเดียวและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพประกอบ 16) แอนติบอดีในกลุ่มนี้สามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-185 ซึ่งจำเพาะต่อ AS1 เพียงไอโซเลตเดียวเหมือนกับกลุ่มที่ 1 (ภาพประกอบ 16) แต่แอนติบอดีกลุ่มนี้จับแอนติเจนที่มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-12 ซึ่งจำเพาะต่อ AS2 เพียงไอโซเลตเดียวและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพประกอบ 16) สามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดประมาณ 15-140 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ AS2 ในบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 18)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน ได้แก่ AS-7 และ AS-18 ซึ่งจำเพาะต่อ AS3 เพียงไอโซเลตเดียวและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพประกอบ 16) และสามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดประมาณ 15-25 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-52 ซึ่งจำเพาะต่อ AS4 เพียงไอโซเลตเดียวและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพประกอบ 16) แอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถจับกับแอนติเจนใด ๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน ได้แก่ AS-6-4G และ AS-7-7F ซึ่งจำเพาะต่อ AS4 เพียงไอโซเลตเดียวและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพประกอบ 16) โดยจับกับแอนติเจนที่มีขนาด 30-140 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) แอนติบอดีในกลุ่มนี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ AS4 ในเนื้อเยื่อส่วนลำไส้ของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 18)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน ได้แก่ AS-12-1B และ AS-37 ซึ่งจำเพาะต่อ AS4 เพียงไอโซเลตเดียว (ภาพประกอบ 16) เหมือนแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 และ 6 แต่แอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแอนติเจนที่มีขนาด 60 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 5 โคลน ได้แก่ AS-11-6A, AS-60, AS-74, AS-75 และ AS-79 ซึ่งทั้งหมดมีความจำเพาะต่อ AS6 เพียงไอโซเลตเดียวและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ภาพประกอบ 16) และสามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาด 75 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) แอนติบอดีในกลุ่มนี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ AS6 ในเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 18)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน ได้แก่ AS-56 และ AS-71 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AS1 และ 2 (ภาพประกอบ 16) แอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถจับกับแอนติเจนใด ๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-86 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AS2 และ AS4 (ภาพประกอบ 16) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ขนาดประมาณ 50-85 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน ได้แก่ AS-391 และ AS-15-1G ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AS1 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ AH5, AH9, AC3 (ภาพประกอบ 16) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ขนาดประมาณ 20 -140 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) แอนติบอดีในกลุ่มนี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ AS1 ในบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 19)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 12 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-13-10F ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AS1 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ AS8, AH5, AH9, AC3 (ภาพประกอบ 16) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ขนาดประมาณ 20 -140 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ AS1 ในบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 19)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 13 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน ได้แก่ AS-51 และ AS-59 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AS5 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ AS7, AH3, AC1, (ภาพประกอบ 16) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ขนาดประมาณ 20 -140 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ AS5 ในบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 19)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 14 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-87 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด ยกเว้น AH2, AS10, AC2, AC4, AC5, AC7, AJ (ภาพประกอบ 16) และสามารถจับกับแอนติเจนที่ขนาดประมาณ 5-140 กิโลดาลตัน

(ภาพประกอบ 17) และสามารถตรวจสอบการติดเชื่อในบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 19)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 15 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-10-8E ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. (ภาพประกอบ 16) ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด และสามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดประมาณ 10 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 16 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน ได้แก่ AS-85 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด (ภาพประกอบ 16) และสามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17)

5. การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกัน พบว่า ในกลุ่มที่ 1 (AS-133, AS-218, AS-226) เมื่อนำแอนติบอดีโคลน AS-218 ผสมรวมกับแอนติบอดีโคลน AS-133 หรือ AS-226 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีโคลน AS-218 นี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างจากการจับโดยแอนติบอดีโคลน AS-133 และ AS-226 และเมื่อนำ AS-133 ผสมรวมกับ AS-226 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีไม่เพิ่มสูงขึ้น (ตาราง 6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีโคลน AS-133 นี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งเดียวกันหรือทับซ้อนกันจากการจับโดยแอนติบอดีโคลน AS-226 และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 (AS-133, AS-218, AS-226) และกลุ่มที่ 2 (AS-185) ซึ่งจำเพาะต่อ *A. sobria* ไอโซเลตเดียวกันมาผสมกันพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีโคลน AS-185 นี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างจากการจับโดยแอนติบอดีโคลน AS-133, AS-218 และ AS-226 ในขณะที่กลุ่มอื่น ๆ เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ไม่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับค่าของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว (ตาราง 6) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันนั้นจับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน

6. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 16 กลุ่มที่ผลิตได้มี class และ subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA และ IgM (ตาราง 7)

7. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. sobria* โดยวิธี dot blotting

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหา *A. sobria* โดยวิธี dot blotting ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 8×10^5 - 10^8 CFU/มิลลิลิตร (ภาพประกอบ 20)

8. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบจากเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง

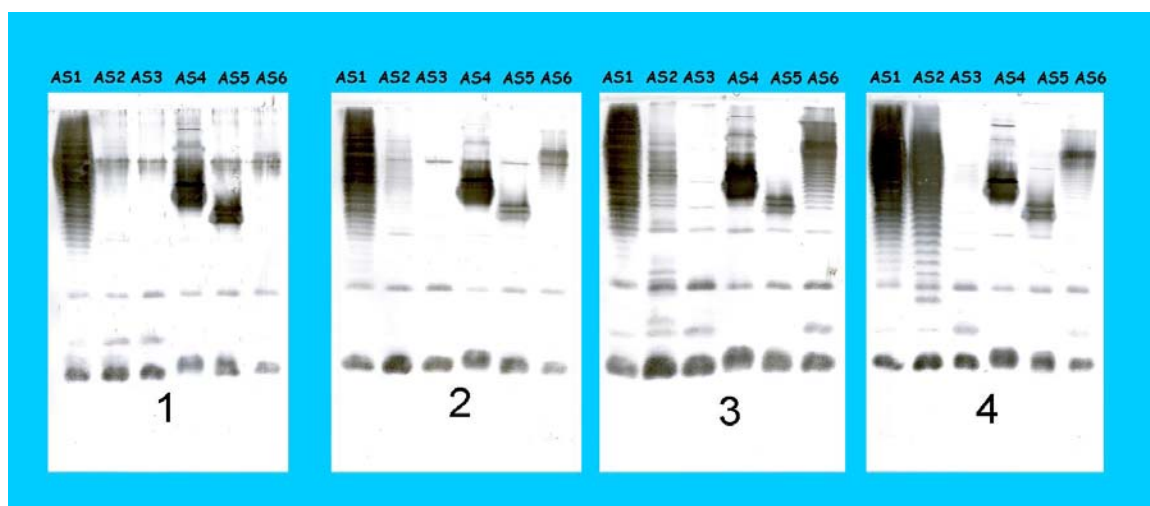
จากการตรวจสอบการติดเชื้อเดิมในปลานิลก่อนการทดลอง พบว่าไม่พบการติดเชื้อ *A. sobria* ไอโซเลต AS2, AS3, AS4, AS6 จึงเลือกใช้ *A. sobria* (AS2) ในการทดลอง

หลังจากการบ่มเชื้อ *A. sobria* (AS2) ในตัวอย่างปลานิลได้ 3 ชั่วโมง พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AS-12 สามารถตรวจพบ *A. sobria* (AS2) ได้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำสุดประมาณ 10^3 CFU/มิลลิลิตร และเมื่อทำการบ่มเชื้อตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะสามารถตรวจพบ *A. sobria* (AS2) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำสุดประมาณ 10^1 CFU/มิลลิลิตร ส่วนการทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AS-85 ซึ่งจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. จะมีความไวในการตรวจต่ำกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AS-12 โดยที่ 3 ชั่วโมงจะตรวจพบ *A. sobria* ได้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำสุดประมาณ 10^4 CFU/มิลลิลิตร และหลังจากทำการบ่มเชื้อตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะสามารถตรวจพบ *A. sobria* ได้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำสุดประมาณ 1 CFU/มิลลิลิตร และจะพบผลบวกที่แถวควบคุมที่ 6, 9 และ 24 ชั่วโมงเนื่องจากภายในเนื้อเยื่อปลามีการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. อื่น ๆ ยกเว้น *A. sobria* (AS2) ปนเปื้อนอยู่บ้างแล้ว (ภาพประกอบ 21)

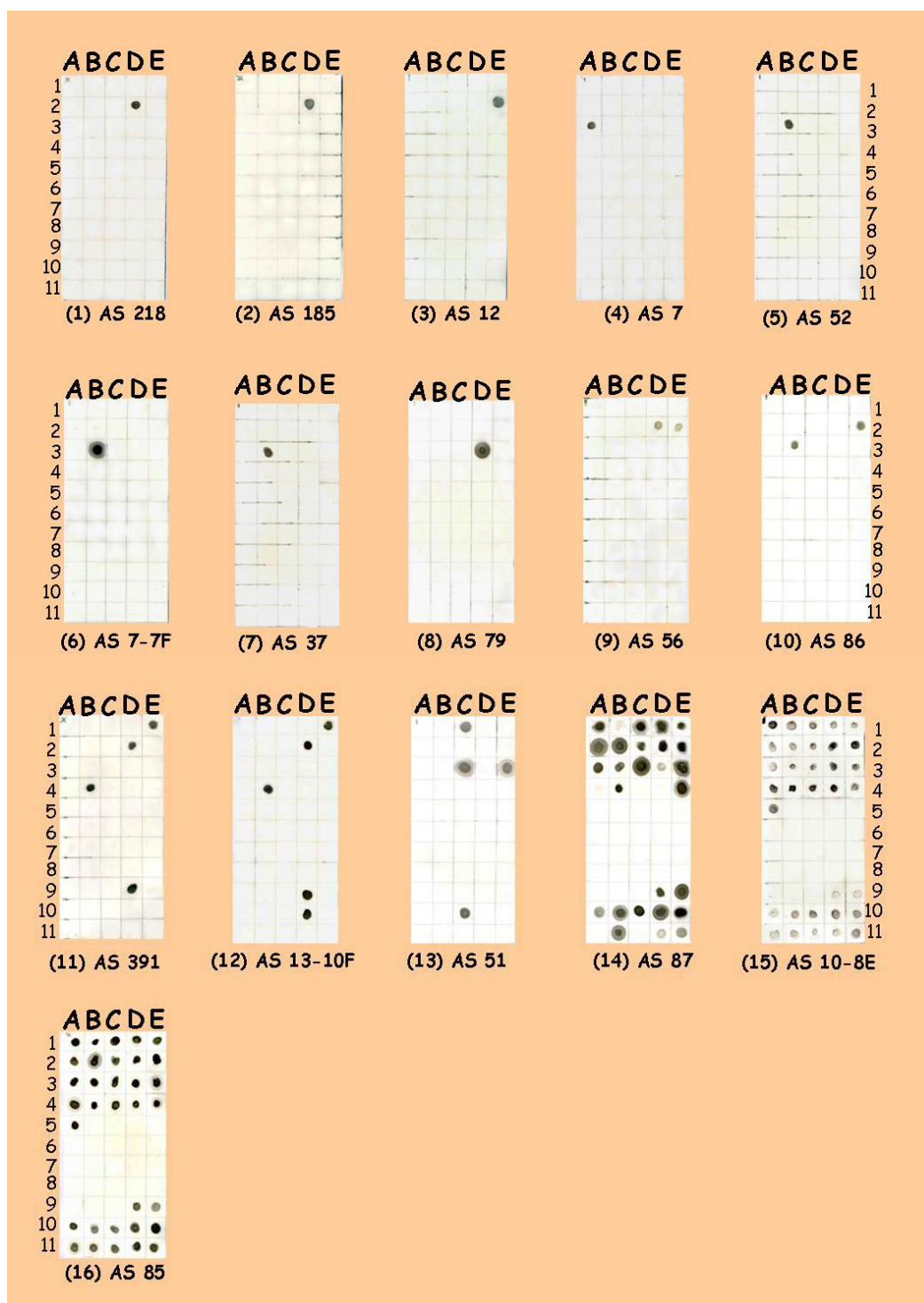
ตาราง 5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Aeromonas sobria* (AS), *A. hydrophila* (AH), *A. caviae* (AC)

เชื้อแบคทีเรีย \ การทดสอบ	Glucose	Esculin	Voges-Proskauer (VP)	Lysine	Arabinose	Indole	Salicine	Cellobiose
AS1	+ / gas	-	+	-	-	+	-	-
AS2	+ / gas	-	+	-	-	+	-	-
AS3	+ / gas	-	+	-	-	+	-	-
AS4	+ / gas	-	+	+ / -	-	+	-	-
AS5	+ / gas	-	+	+ / -	-	+	-	-
AS6	+ / gas	-	+	-	-	+	-	-
AH1	+ / gas	+	+	+	-	-	-	-
AH2	+ / gas	+	+	+	-	+	+	+
AH3	+ / gas	+	+	+	-	+	-	+ / -
AH4	+ / gas	+	+	+	-	+	+	-
AH5	+ / gas	+	+	+	-	+	+	-
AH6	+ / gas	+	+	+	-	+	+	-
AH7	+ / gas	+	+	-	+	+	+	+
AH8	+ / gas	+	+	-	-	+	+	-
AC1	+ / no gas	+	-	-	+	+	+	+
AC2	+ / no gas	+	-	-	+	+	+	+
AC3	+ / no gas	+	-	-	+	+	+	+
AC4	+ / no gas	+	-	-	+	+	+	+
AC5	+ / no gas	+	-	-	+	+	+	+

การทดสอบบางชนิดไม่ได้แสดงผลเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดในตารางให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน ได้แก่ Mannitol (+), Ornithine (-), TCBS = ไม่สามารถเจริญได้, 0% NaCl = (+), 3% NaCl = (+), 6% NaCl = (-)

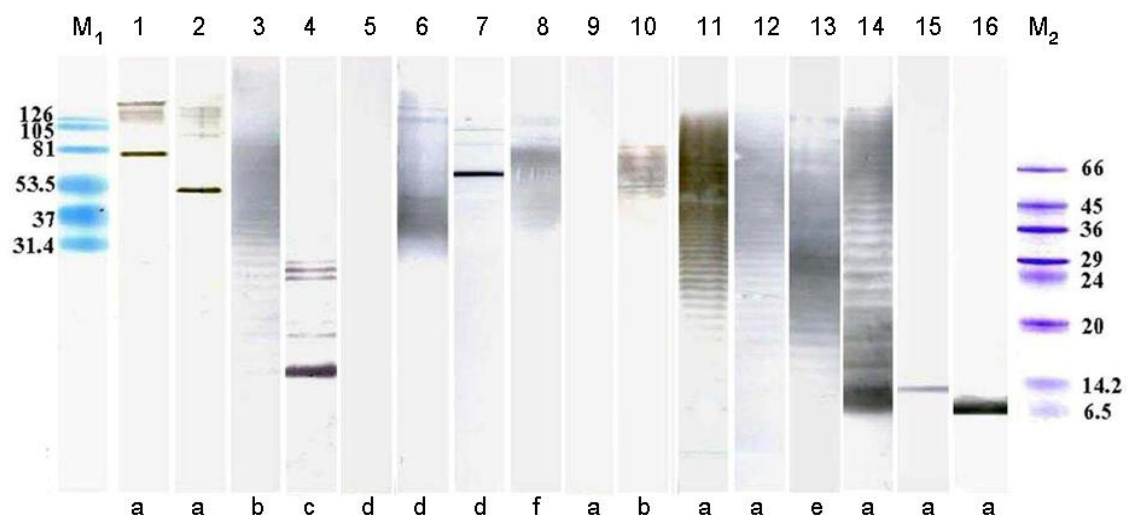


ภาพประกอบ 15 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blotting โดยใช้ AS1- AS6 ทดสอบกับซีรั่มที่เก็บจากจากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)

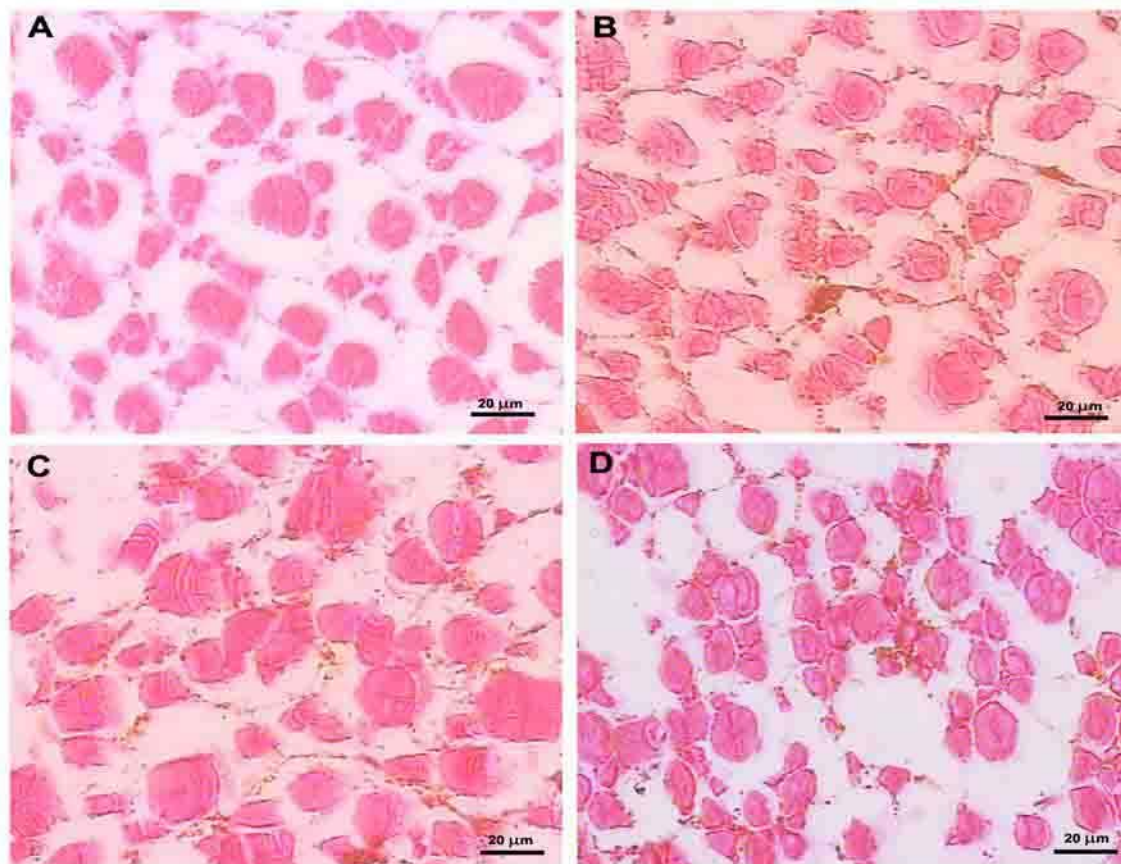


ภาพประกอบ 16 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของตัวแทนโมโนโคลนอล แอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting

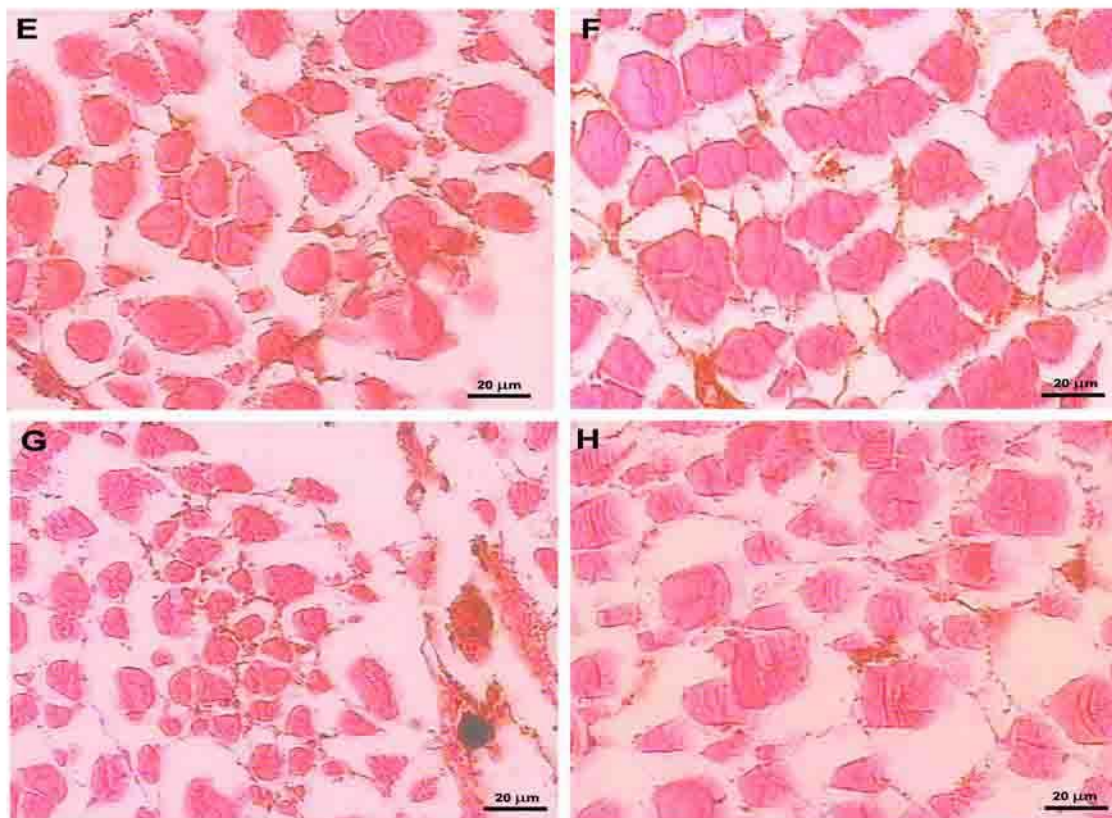
- แถวที่ 1: *A. hydrophila* (A) AH1; (B) AH2; (C) AH3; (D) AH4; (E) AH5
- แถวที่ 2: *A. hydrophila* (A) AH6; (B) AH7; (C) AH8 และ *A. sobria* (D) AS1; (E) AS2
- แถวที่ 3: *A. sobria* (A) AS3; (B) AS4; (C) AS5; (D) AS6 และ *A. caviae* (E) AC1
- แถวที่ 4: *A. caviae* (A) AC2; (B) AC3; (C) AC4; (D) AC5; (E) *A. veronii*
- แถวที่ 5: (A) *A. jandaei*; (B) *Plesiomonas shigelloides* 22107; (C) *P. shigelloides* 22108;
(D) *P. shigelloides* 22109; (E) *Vibrio cholerae*
- แถวที่ 6: (A) *V. alginolyticus*; (B) *V. fluvialis*; (C) *V. harveyi*;
(D) *V. mimicus*; (E) *V. parahaemolyticus*.
- แถวที่ 7: (A) *V. campbellii*; (B) *V. ordalii*; (C) *V. penaeicida*; (D) *V. vulnificus*;
(E) *Photobacterium damsela damsela*
- แถวที่ 8: (A) *Photobacterium damsela piscicida*; (B) *Salmonella* Typhi;
(C) *Salmonella* Enteritidis; (D) *Escherichia coli*; (E) *Enterobacter cloacae*
- แถวที่ 9: (A) *Shigella flexneri*; (B) *Pseudomonas aeruginosa*; (C) *Proteus vulgaris*;
A. hydrophila (D) AH9; (E) AH10
- แถวที่ 10: *A. hydrophila* (A) AH11; (B) AH12; *A. sobria* (C) AS7; (D) AS8; (E) AS9
- แถวที่ 11: *A. sobria* (A) AS10; *A. caviae* (B) AC6; (C) AC7; (D) AC8; (E) AC9



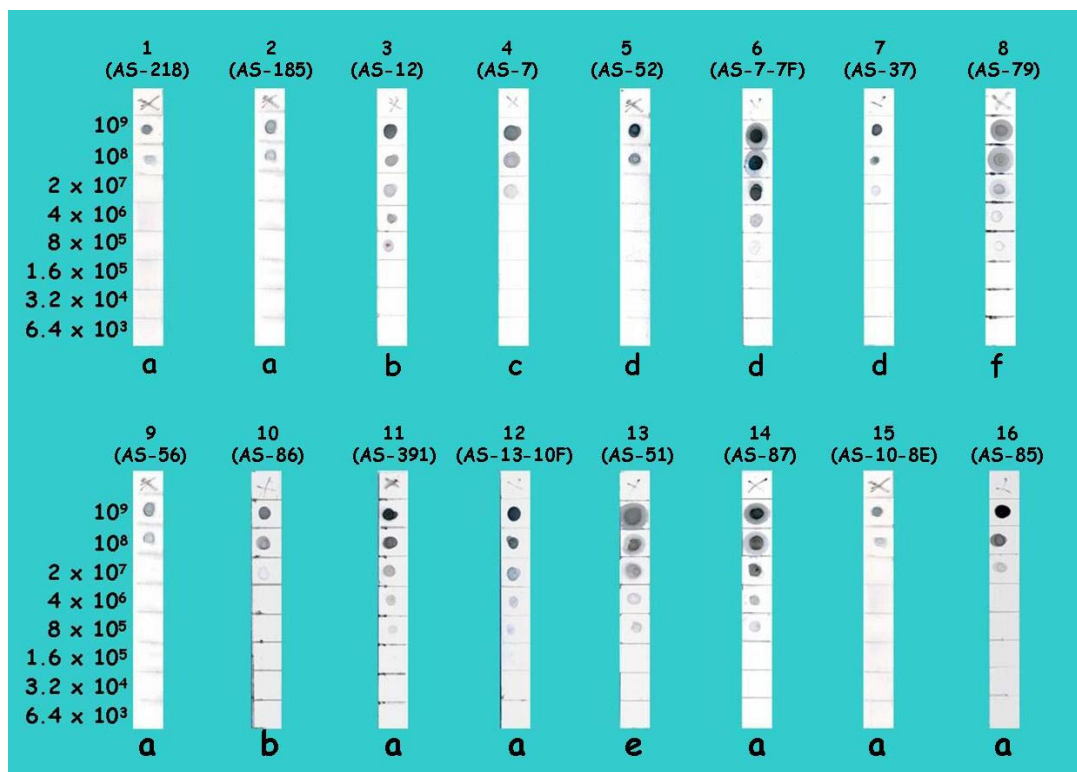
ภาพประกอบ 17 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี Western blotting ; โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวแทนของกลุ่ม 1-16; (1) AS-218, (2) AS-185, (3) AS-12, (4) AS-7, (5) AS-52, (6) AS-7-7F, (7) AS-37, (8) AS-79, (9) AS-56, (10) AS-86, (11) AS-391, (12) AS-13-10F, (13) AS-51, (14) AS-87, (15) AS-10-8E, (16) AS-85 ทำปฏิกิริยากับ *A. sobria* ไฮโซเลต (a) AS1, (b) AS2, (c) AS3, (d) AS4, (e) AS5, (f) AS6; M1 และ M2 = standard protein markers



ภาพประกอบ 18 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อปลานิล (A) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อของปลานิลที่ไม่ได้ทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (B), (C), และ (D) กล้ามเนื้อด้านข้างลำตัวซึ่งทดสอบด้วย MAb AS-12, AS-7-7F, AS-79 ตามลำดับ และย้อมด้วย hematoxylin และ eosin จุดสีน้ำตาลแสดงบริเวณที่แบคทีเรียทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

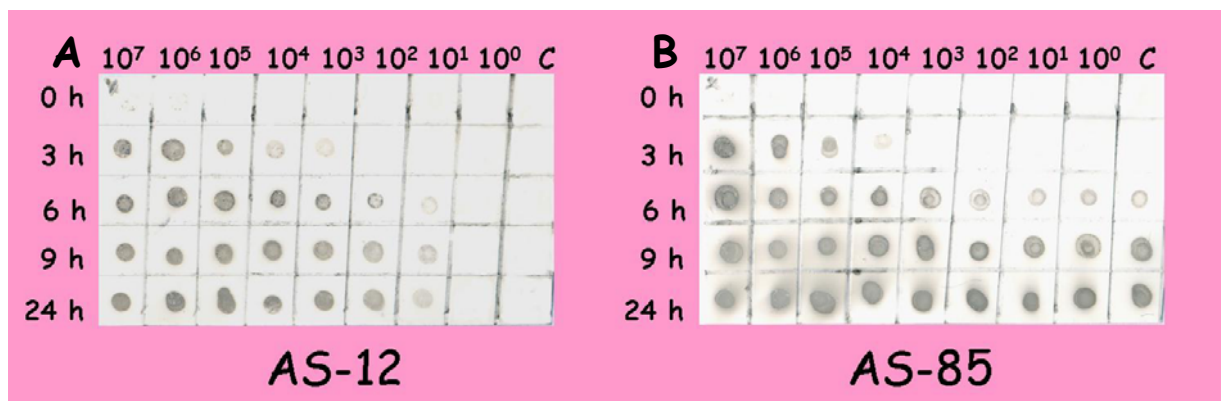


ภาพประกอบ 19 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อรก (E), (F), (G) และ (H) เนื้อเยื่อส่วนกล้ำมเนื้อของรกที่ทดสอบกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AS-391, AS-13-10F, AS-51, AS-87 ตามลำดับ และย้อมด้วย hematoxylin และ eosin จุดสีน้ำตาลแสดงบริเวณที่แบคทีเรียทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี



ภาพประกอบ 20 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting ($10^9 - 6.4 \times 10^3$ CFU/มิลลิลิตร) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวแทนของกลุ่ม 1-16; (1) AS-218, (2) AS-185, (3) AS-12, (4) AS-7, (5) AS-52, (6) AS-7-7F, (7) AS-37, (8) AS-79, (9) AS-56, (10) AS-86, (11) AS-391, (12) AS-13-10F, (13) AS-51, (14) AS-87, (15) AS-10-8E, (16) AS-85 ทำปฏิกิริยากับ *A. sobria* ไอโซเลต (a) AS1, (b) AS2, (c) AS3, (d) AS4, (e) AS5, (f) AS6 โดยใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรียดังนี้

- แถว 1: 10^9 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 2: 10^8 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 3: 2×10^7 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 4: 4×10^6 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 5: 8×10^5 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 6: 1.6×10^5 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 7: 3.2×10^4 CFU/มิลลิลิตร
- แถว 8: 6.4×10^3 CFU/มิลลิลิตร



ภาพประกอบ 21 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting ที่ทดสอบกับ *A. sobria* (AS2) ที่ป้อนในตัวอย่างปลานิลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลาชั่วโมงต่าง ๆ (h) และความเข้มข้นของแบคทีเรียต่าง ๆ (C= ไม่ได้ใส่เชื้อ *A. sobria* (AS2)) แล้วนำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) AS-12 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AS2 และ (B) AS-85 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp.

ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ (เลขยกเหนืค่าการดูดกลืนแสงเหมือนกัน=แอนติบอดีจับที่อิพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน เลขยกเหนืค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน= แอนติบอดีจับที่ต่างอิพิโทปกัน)

	←กลุ่มที่ 1→			←กลุ่มที่ 2→	←กลุ่มที่ 3→	
MAbs	1 AS 133	2 AS 218	3 AS 226	4 AS 185	1 AS7	2 AS 18
1 AS 133	0.202 ¹	0.253	0.221	0.353		
2 AS 218		0.198 ²	0.263	0.362		
3 AS 226			0.233 ¹	0.367		
4 AS 185				0.281 ³		
1 AS 7					0.73 ¹	0.801
2 AS 18						0.824 ¹

[illegible]

ตาราง 7 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 16 กลุ่ม ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (IHC) โคลนที่ขีดเส้นใต้เป็นตัวแทนโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละกลุ่มซึ่งใช้ในการทดลองต่าง ๆ AS = *Aeromonas sobria*; AH = *A. hydrophila*; AC = *A. caviae*; AJ = *A. Jandaei*; kDa = กิโลดาลตัน

group	Number of Monoclonal antibodies	isotype	sensitivity	Western blotting(kDa)	cross reactivity	IHC
1	AS-133	IgG ₁	10 ⁸	~70	AS1	-
	<u>AS-218</u>	IgG _{2a}	10 ⁸			
	AS-226	IgG _{2b}	10 ⁸			
2	<u>AS-185</u>	IgG _{2b}	10 ⁸	~50	AS1	-
3	<u>AS-12</u>	IgM	8 x 10 ⁵	~15-140	AS2	+++
4	<u>AS-7</u>	IgM	2 x 10 ⁷	~15-25	AS3	-
	AS-18	IgM	2 x 10 ⁷			
5	<u>AS-52</u>	IgM	10 ⁸	-	AS4	-
6	AS-6-4G	IgG _{2a}	4 x 10 ⁶	~30-140	AS4	++
	<u>AS-7-7E</u>	IgG _{2a}	8 x 10 ⁵			
7	AS-12-1B	IgG _{2b}	2 x 10 ⁷	~60	AS4	-
	<u>AS-37</u>	IgG _{2a}	2 x 10 ⁷			
8	AS-11-6A	IgG _{2a}	2 x 10 ⁷	~75	AS6	++
	AS-60	IgG ₃	2 x 10 ⁷			
	AS-74	IgM	2 x 10 ⁷			
	AS-75	IgM	8 x 10 ⁵			
	<u>AS-79</u>	IgM	8 x 10 ⁵			
9	<u>AS-56</u>	IgG _{2a}	10 ⁸	-	AS1, AS2	-
	AS-71	IgG ₁	10 ⁸			
10	<u>AS-86</u>	IgM	2 x 10 ⁷	~50-85	AS2, AS4	-
11	<u>AS-391</u>	IgG _{2b}	8 x 10 ⁵	~20-140	AS1, AH5, AH9, AC3	+++
	AS-15-1G	IgG _{2b}	2 x 10 ⁷			
12	<u>AS-13-10E</u>	IgG ₁	8 x 10 ⁵	~20-140	AS1, AS8, AH5, AH9, AC3	++
13	<u>AS-51</u>	IgG _{2b}	8 x 10 ⁵	~20-140	AS5, AS7, AH3, AC1	++
	AS-59	IgA	8 x 10 ⁵			
14	<u>AS-87</u>	IgG _{2a}	8 x 10 ⁵	~5-140	<i>Aeromonas</i> spp. except AH2, AS10, AC2, AC4, AC5, AC7, AJ	++
15	<u>AS-10-8E</u>	IgG _{2b}	10 ⁸	~10	<i>Aeromonas</i> spp.	-
16	<u>AS-85</u>	IgG _{2b}	2 x 10 ⁷	~5	<i>Aeromonas</i> spp.	-

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่เก็บได้จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว พบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวนั้นให้การตอบสนองต่อ *A. sobria* แตกต่างกันไป เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนั้นมีอิพิโทปเป็นจำนวนมาก อีกทั้งการใช้แอนติเจนรูปแบบ heat killed, SDS-mercaptoethanol treated และ formalin treated ร่วมกันก็สามารถเพิ่มความหลากหลายของแอนติเจนได้ จึงทำให้ปี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจนและเป็นผลให้มีการกระตุ้นการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม ซึ่งซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวนั้นสามารถจับกับอิพิโทปของแอนติเจนได้หลากหลาย และเมื่อตรวจดูปฏิริยาระหว่างแอนติซีรัมและแอนติเจนต่าง ๆ ของ *A. sobria* จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว จะพบบางแถบของแอนติเจนซึ่งปรากฏให้เห็นใน *A. sobria* ทั้ง 6 ไอโซเลต แถบดังกล่าวจึงเป็นแอนติเจนร่วมที่มีใน *A. sobria* ทั้ง 6 ไอโซเลต และยังพบแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งพบแต่ในบางไอโซเลตเท่านั้นโดยที่ไม่มีปรากฏให้เห็นในไอโซเลตอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. sobria* แต่ละไอโซเลตก็มีส่วนที่มีความแตกต่างกัน โดยหนูขาวตัวที่ 3 นั้นให้การตอบสนองที่ดีที่สุดเนื่องจากมีจำนวนของแถบแอนติเจนมากที่สุด และมีความเข้มของปฏิริยาที่เกิดขึ้นมากที่สุด ซึ่งหมายความว่าหนูตัวนี้สามารถสร้างแอนติบอดีที่ต้องการได้มากที่สุดและแอนติบอดีมี affinity ที่ดีกว่าหนูขาวตัวอื่น ๆ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำหนูขาวตัวที่ 3 มาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 28 โคลน แบ่งออกได้เป็น 16 กลุ่มตามความจำเพาะ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 มีความจำเพาะต่อ *A. sobria* แต่ละไอโซเลตแตกต่างกันไป และมีความจำเพาะต่อ *A. sobria* เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเหล่านี้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่พบเฉพาะในแต่ละไอโซเลต ทำให้สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จำแนก *A. sobria* แต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 9 และ 10 มีความจำเพาะต่อ *A. sobria* 2 ไอโซเลตและไม่ทำปฏิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น โดยกลุ่มที่ 9 จำเพาะต่อ AS1 และ AS2 และกลุ่มที่ 10 จำเพาะ AS2 และ AS4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดี 2 กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่มีอยู่ร่วมกันเฉพาะใน *A. sobria* AS1 และ AS2 และ *A. sobria* AS2 และ AS4 ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 15 และ 16 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ที่ใช้ในการทดสอบ เป็นไปได้ว่าอิพิโทปที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้เป็นอิพิโทปของแอนติเจนที่มีอยู่ในทุกสายพันธุ์ของ

แบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 11, 12, 13 มีความจำเพาะต่อ *A. sobria* บางไอโซเลตและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* และ *A. caviae* บางไอโซเลต ซึ่งอาจเกิดจาก *A. sobria* และแบคทีเรียที่ทำปฏิกิริยาข้ามนี้มีแอนติเจนส่วนของ LPS บางส่วนเหมือนกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 14 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดสอบยกเว้น *A. sobria* AS10, *A. hydrophila* AH2, *A. caviae* AC2, AC4, AC5, AC7 และ *A. jandaei* โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้จึงแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลเดียวกัน ปฏิกิริยาข้ามนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังเช่น ในการทดลองของ Takeda และคณะ ในปี 1990 ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ toxin ของ *Vibrio cholerae* พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ toxin ของ *Yersinia enterocolitica* หรือในการทดลองของ Prahkarnkao, K. ในปี 2005 ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ก็พบการทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีเช่นเดียวกัน

จากการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting พบว่า บริเวณที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่ม 3, 11, 12, 13 และ 14 ทำปฏิกิริยา มีลักษณะคล้ายบริเวณ lipopolysaccharide (O-antigen) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่อยู่บน outer membrane ของแบคทีเรีย ที่มีลักษณะเป็น repeating unit (Fomsgaard; et al. 1990; Rybka; et al. 2008) ขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 และ 9 ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Western blotting อาจเนื่องมาจากแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้สามารถจับกับแอนติเจนของแบคทีเรียที่คงสภาพเท่านั้น (Native form) เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Western blotting ซึ่งจะต้องผสมแอนติเจนกับ 2X treatment buffer ที่มีส่วนประกอบของ SDS และ mercaptoethanol จึงทำให้แอนติเจนมีลักษณะที่เปลี่ยนไป ทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3, 6, 8, 11, 12, 13 และ 14 สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. sobria* ในเนื้อเยื่อปลานิลโดยวิธี immunohistochemistry ได้ ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้มาใช้ตรวจหาการติดเชื้อ *A. sobria* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 16 กลุ่มที่ผลิตได้มี class และ subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA และ IgM

ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่ม 1 AS-218 จับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างไปจากแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อนำแอนติบอดี AS-218 ผสมกับแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่ม 1 และ 2 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. sobria* AS1 เหมือนกันมาผสมรวมกันมีค่าเพิ่มขึ้น จึงน่าที่จะนำแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้มาผสมรวมกันเพื่อเพิ่ม affinity ในการจับกับอิพิโทป

ของ *A. sobria* ไมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 เมื่อผสมกับไมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 หรือ 7 น่าจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแต่พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงไม่เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากแอนติบอดีกลุ่มหนึ่งอาจไปบดบังการจับอพิโทปของแอนติบอดีอีกกลุ่มหนึ่ง ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีค่าเท่าเดิมหรืออาจจะลดลงบ้างเล็กน้อย

ในการทดสอบพบว่า หลังจากบ่มเชื้อ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะสามารถตรวจพบ *A. sobria* โดยไมโนโคลนอลแอนติบอดี AS-12 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^1 CFU/มิลลิลิตรได้ และเมื่อทดสอบกับไมโนโคลนอลแอนติบอดี AS-85 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. พบว่าให้ผลบวกที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^0 CFU/มิลลิลิตร และบริเวณ control ด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากตัวอย่างปลาชนิดที่นำมาทดสอบนี้อาจจะติดเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* spp. และแบคทีเรียต่างๆ จากในแหล่งน้ำธรรมชาติมาอยู่ก่อนแล้ว ซึ่งแอนติบอดีนี้สามารถตรวจพบ *Aeromonas* spp. ที่ 6 ชั่วโมง หลังบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากงานวิจัยนี้สามารถผลิตไมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 28 โคลน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 16 กลุ่มตามความจำเพาะ ดังนี้

1. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 และ 2 มีความจำเพาะต่อ AS1
2. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อ AS2
3. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อ AS3
4. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5, 6, 7 มีความจำเพาะต่อ AS4
5. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 มีความจำเพาะต่อ AS6
6. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 มีความจำเพาะต่อ AS1 และ AS2
7. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 10 มีความจำเพาะต่อ AS2 และ AS4
8. ไมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 15 และ 16 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล

Aeromonas spp. ที่ใช้ทดสอบจำนวน 33 ไอโซเลต

9. สามารถนำไมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ไปใช้ในการพิสูจน์ทราบ *A. sobria* ได้เนื่องจากไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Aeromonas* spp. อื่นๆ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ

10. สามารถนำไมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 11, 12, และ 13 ไปใช้ในการพิสูจน์ทราบ *A. sobria* ได้แต่ต้องทำการทดสอบทางซีรเคมีเพิ่มเติม เนื่องจากไมโนโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* และ *A. caviae* บางไอโซเลต

11. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 14 ไปใช้ในการตรวจพิสูจน์ทราบแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ได้แต่ต้องทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* บางไอโซเลตได้

12. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3, 6, 8, 11, 12, 13 และ 14 มาใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. sobria* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

จากการทดลองนี้สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ตรวจพิสูจน์ทราบเชื้อแบคทีเรีย *A. sobria* ในแหล่งน้ำและตัวอย่างธรรมชาติต่าง ๆ ได้โดยการบ่มตัวอย่างที่ต้องการตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนประมาณ 6 ชั่วโมงและนำมาทดสอบโดยตรงกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้วิธี dot blotting

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จิตติมา เขี้ยวแก้ว; เต็มดวง สมศิริ; และ สุปราณี ชินบุตร. (2541). การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในปลา
 ดุกถูกผสมและปลาช่อน จากบ่อเลี้ยงในประเทศไทย. ในรายงานการประชุมทางวิชาการ
 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. หน้า 125.
- เต็มดวง สมศิริ. (2541). โรคตะพานน้ำ. วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ. 8(1) : 16.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548) แอนติบอดี. ใน วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย.
 กรุงเทพมหานคร; ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ: หน้า 90-100.
- ยลประภา ดำรงผล; และคนอื่นๆ (2541). ความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากกบที่
 เป็นโรคขาดเหงือก. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่
 36. หน้า 102.
- หนูเดือน เมืองแสน; สุวรรณนา เนียมสนิท; และ สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์. (2549). โรคจุดดำของไร่น้ำ
 นาข้าวและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 11(1): 39-45.
- Abbott, S.L.; Cheung, W.K.; & Landa, J.M. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical
 characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal*
of Clinical Microbiology. 41(6): 2348-2357.
- Amrouche, T.; et al. (2006). Production and characterization of anti-bifidobacteria
 monoclonal antibodies and their application in the development of an immuno-
 culture detection method. *Journal of Microbiological Methods*. 65: 159-170.
- Bou, G.; Cervero, G.; & Martinez, M. (1998). Dual infection due to *Aeromonas hydrophila*
 and *Aeromonas sobria* in woman after a home accident. *Clinical Microbiology*
Newletter 20: 11.
- Cai, W.Q.; Li, S.F.; & Ma, Y. (2004). Diseases resistance of Nile Tilapia (*Oreochromis*
niloticus), Blue Tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia
 male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. *Aquaculture* 229: 79-87.
- Carnahan, A.M.; & Altwegg, M. (1996). Taxonomy. In: Austin B, The genus *Aeromonas*.
 London, Wiley: 1-38.
- Charni, N.; et al. (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies against
 vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:
 2278-2281.

- Chen, P.; et al. (1992). Development of monoclonal antibodies to identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3694-3700.
- Colwell, R.R.; MacDonell, M.R.; & De Ley, J. (1986). Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 473-477.
- Daily, O.P.; et al. (1981). Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 13: 769-777.
- Dierckens, K.R.; et al. (1998). *Aeromonas hydrophila* causes "black disease" in fairy shrimps (Anostraca; Crustacea). *Journal of Fish Disease*. 21(2): 113-119.
- Dror, M.; et al. (2006). Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 109: 279-287.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer (ed), *Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine*. New York; Plenum Press: 1-42.
- Figueras, M.J.; et al. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16 S rDNA RFLP analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 2069-2073.
- Figueras, M.J.; (2007). *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. *Diagnostic and Microbiology and Infectious Disease*. unpagued.
- Fujii, Y.; Nomura, T.; & Okamoto, K. (1999). Hemolysin of *Aeromonas sobria* stimulates production of cyclic AMP by cultured cells. *FEMS Microbiology Letters*. 176: 67-72.
- Fomsgaard, A.; Freudenberg, A.M.; & Galanos, C. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2627-2631.
- Ghenghesh, K.S.; et al. (1999). Isolate and hemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 22: 175-179.

- He, Y.; et al. (1996). Monoclonal antibodies for detection of the H:7 antigen of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3325-3332.
- Heuzenroeder, M.W.; Christopher, Y.F.; & Robert, L.P. (1999). Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*. 174: 131-136.
- Hokama, A.; & Iwanaga, M. (1991). Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili a possible colonization factor. *Infection and Immunity*. 59: 3478-3483.
- Janda, J.M.; & Duffey, P.S. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Reviews in Infectious Diseases*. 10: 980-987.
- Kirov, S.M.; Donovan, L.A.; & Sanderson, K. (1999). Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species. *Infection and Immunity*. 67: 5447-5454.
- Lai, C.C.; et al. (2007). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in burn patient. *BURNS*. 33: 255-257.
- Macfaddin, J.F. (2000). *Biochemical tests for identification of medicine bacteria*. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins: 646-647.
- Macneill, A.L.; & Elizabeth, W. (2002). Mortality in wood turtle (*Clemmys insculpta*) collection. *Verterinary Clinical Pathology*. 31: 133-136.
- Marcel, K.A.; Antoinette, A.A.; & Mireille, D. (2002). Isolation and characterization of *Aeromonas* species from an eutrophic tropical estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 1341-1344.
- Massa, S.; Altieri, C.; & Angela, D.A. (2001). The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. *International Journal of Food Microbiology*. 63: 169-173.
- Murcia, A.J.; Benlloch, S.; & Collins, M.D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 412-421.

- Neelam, B.; et al. (1995). Development of monoclonal antibodies to iron-regulated outer membrane proteins and lipopolysaccharide of *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 201-208.
- Nomura, T.; Hamashima, H.; & Okamoto, K. (2000). Carboxy terminal region of haemolysin of *Aeromonas sobria* triggers dimerization. *Microbial Pathogenesis*. 28: 25-36.
- Nomura T. (2001). Maturation pathway of hemolysin of *Aeromonas sobria* and the mechanism of action of the hemolysin. *Yakugaku Zasshi*. 121: 481-485.
- Parker, R. W.; & Lewis, D.H. (1995). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *V. vulnificus* in environmental specimens. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 476-480.
- Pazzaglia, G.; et al. (1990). Diarrhea and intestinal invasiveness of *Aeromonas* strains in the removeable intestinal tie rabbit model. *Infection and Immunity*. 58: 1924-1931.
- Popoff, M. (1984). Genus *III Aeromonas* Kluver and van Niel 1936 398. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins: 545-548.
- Prahkarnkao, K. (2005). Production of monoclonal antibodies specific to a pathogenic of *Aeromonas hydrophila* in fish (Dissertation Master degree. Microbiology). Bangkok: Mahidol University.
- Robert, R.J. (1993). Motile *Aeromonas* septicemia. *Bacterial Disease of Fish*. Cambridge; The University Press: 312.
- Ruimy, R.; et al. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 416-426.
- Rybka, J.; et al. (2008). Application of supercritical carbon dioxide (scCO₂) for the extraction of lipopolysaccharides (LPS) from *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 2266. *Journal of Supercritical Fluids*. 45: 51-56.
- Shibata, M.; et al. (1996). Rapid detection of the hemolysin genes in *Aeromonas sobria* by polymerase chain reaction. *Kansen-shogaku Zasshi*. 70: 1266-1270.
- Takahashi, A.; et al. (2005). A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates Ca²⁺ dependent Cl⁻ secretion. *Microbial Pathogenesis*. 38: 173-180.

- Takeda, T.; et al. (1990). Production of a monoclonal antibody to *Vibrio cholerae* non-o1 heat-stable enterotoxin (ST) which is cross-reactive with *Yersinia enterocolitica* ST. *Infection and Immunity*. 58 : 2755-2759.
- Tanoue, N.; et al. (2005). A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates cAMP-dependent Cl⁻ secretory pathways to cause diarrhea. *FEMS Microbiology Letters*. 242: 195-201.
- Tansirisittikul, A.; et al. (2005) Production of monoclonal antibodies specific to *Vibrio alginolyticus* using whole cell antigens. *Proceeding of Congress on Science and Technology of Thailand*.
- Yamamoto, S. & Haraayma, S. (1996). Phylogenetic analysis of *Acinobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. 48; 813-819.
- Yanez, M.A.; et al. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. 53: 875-883.
- Wada, A.; et al. (2005). Placental and intestinal alkaline phosphatases are receptors for *Aeromonas sobria* hemolysin. *International Journal of Medical Microbiology*. 294: 427-435.
- Wahli, T.; et al. (2005). *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*. 28: 141-150.
- Wang, A.P.; et al. (1999). Identification and characterization of the *Aeromonas sobria* hemolysin glycoprotein receptor on intestine 407 cells. *Microbial Pathogenesis*. 27: 215-221.
- Wang, G.; et al. (2003). Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1048-1054.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2		

หมายเหตุ : หากต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Tryptic soy agar) เติม agar เพิ่ม

1.5 กรัม

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรตีโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.0	กรัม
ออกซัลกอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาไรส (Saccharose)	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2		

3. 15% Glycerol broth

Tryptone soya broth	30	กรัม
Glycerol	150	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โรซอล (Thimerosal) (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6	กรัม
แอล-กลูตามีน (L-glutamine) (Sigma)	0.2923	กรัม
โซเดียมไพรวาท (C ₃ H ₃ O ₃ Na) (Sigma)	1.1005	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO ₃)	2.0160	กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine -N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.9525	กรัม
เพนิซิลลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000.0	มิลลิลิตร

กรองด้วย Sterilized millipore membrane 0.22 ไมครอนเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย fetal bovine serum เข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)		
100 x HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%

ใน RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100 x HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายสำหรับหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol เข้มข้น 40%)

พอลิเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol)	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มิลลิลิตร

เติม RPMI (1) ลงในพอลิเอธิลีนไกลคอลที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide เข้มข้น 12%)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium (1)	88.0	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 สารละลายโมโนเมอร์ (30% T, 2.7% C_{Bis})

อะคริลาไมด์ (acrylamide)	58.4	กรัม
บิส-อะคริลาไมด์ (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร
เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

1.2 4 X Running gel buffer (tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N		

1.3 4 X Stacking gel buffer (tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8)

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 N		

1.4 SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

Tris เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

1.7 2 X Treatment buffer

Tris เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 การเตรียม separating gel สำหรับ SDS-PAGE 15% gel (15 % T 2.7 % C_{BIS})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15.0	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต		
เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	20.0	ไมโครลิตร

2.2 การเตรียม Stacking gel สำหรับ SDS-PAGE 4% gel (4% T 2.7% C_{BIS})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต		
เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

ตาราง 8 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15 % T 2.7% C _{BIS}	4% T 2.7 % C _{BIS}
30 % T 2.7 % C _{BIS}	15.0 มิลลิลิตร	2.66 มิลลิลิตร
Tris-Cl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มิลลิลิตร	-
Tris-Cl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5.0 มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.3 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75 มิลลิลิตร	12.2 มิลลิลิตร
ผสมและใช้ปั๊มสุญญากาศดึงอากาศออกจากสารละลาย		
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
TEMED	20 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
ผสมและเทอย่างรวดเร็วลงในช่องระหว่างกระจก		

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

Tris	12.0	กรัม
ไกลซีน	57.6	กรัม
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Staining stock solution (สี Coomassie blue R-250 เข้มข้น 1 %)

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Staining solution

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
เมทานอล	250.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

เมทานอล	500.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

เมทานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อมและล้างเจล

ถอดเจลจากกระจกแช่ในสี Coomassie blue (4.1.2) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง
ล้างเจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 1 (4.2.1) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา ½-1 ชั่วโมง จนเห็นแถบโปรตีน
จากนั้นแช่เจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 2 (4.2.2) จนกระทั่งสีพื้นใสปราศจากสี

5. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma)

- β -Galactosidase, <i>Escherichia coli</i>	126	กิโลดาลตัน
- Lactoferrin, Human milk	105	กิโลดาลตัน
- Pyruvate kinase, Chicken muscle	81	กิโลดาลตัน
- Albumin, bovine serum	66	กิโลดาลตัน
- Ovalbumin, Chicken egg	53.5	กิโลดาลตัน
- Ovalbumin, chicken egg	45	กิโลดาลตัน

- Lactic dehydrogenase, rabbit muscle	37	กิโลดาลตัน
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36	กิโลดาลตัน
- Triosphosphate isomerase, rabbit muscle	31.4	กิโลดาลตัน
- Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29	กิโลดาลตัน
- Trypsinogen, bovine pancreas	24	กิโลดาลตัน
- Trypsin inhibitor, soybean	20	กิโลดาลตัน
- α -Lactalbumin, bovine milk	14.2	กิโลดาลตัน
- Aprotinin, bovine lung	6.5	กิโลดาลตัน

6. Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blotting

Tris	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมทานอล	200.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด

ภาคผนวก จ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

2. สารละลาย 0.5% Blotto

สารละลาย Blotto เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (1)	50.0	มิลลิลิตร
PBS 0.15 M pH 7.2	950.0	มิลลิลิตร

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

โซเดียมซิเตรท	29.41	กรัม
Merthiolate เข้มข้น 1%	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N		

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น)	27.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ Isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

1. Goat anti-mouse immunoglobulin heavy and light chain specific antibody (GAM-H+L)
2. Rabbit anti-mouse
 - 2.1 Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific)
 - 2.2 Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ 2a chain specific)
 - 2.3 Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ 2b chain specific)
 - 2.4 Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ 3 chain specific)
 - 2.5 Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
 - 2.6 Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
 - 2.7 Rabbit anti-Mouse kappa light chain
 - 2.8 Rabbit anti-Mouse lambda light chain
3. Substrate Buffer (1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03 % H_2O_2)
4. HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L)
5. บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Enzyme-linked immunosorbent assay (ภาคผนวก จ)

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subsotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 201)

- เคลือบภาชนะ 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง
- สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

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

- ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- เติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด (1-8) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IgG ₁	→	A											
IgG _{2a}	→	B											
IgG _{2b}	→	C											
IgG ₃	→	D											
IgA	→	E											
IgM	→	F											
Kappa	→	G											
Lambda	→	H											

- ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- เติม HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

9. เตรียมสารละลาย Substrate ซึ่งประกอบด้วย O-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.006% ใน citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม
10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Immunohistochemistry (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

3. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลาย 10% Calf serum (P_1^+)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

5. สี Ehrlich's acid hematoxylin

สี Hematoxylin	8.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	400.0	มิลลิลิตร
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร

กลีเซอริน (Glycerine)	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร

6. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	100.0	มิลลิลิตร

การทดสอบการติดเชื้อ *A. sobria* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC) และวิธี indirect immunoperoxidase (ไพศาล สัททิกกุล. 2548: 234)

1. วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry

1.1 นำปลานิลที่เกิดการติดเชื้อ *A. sobria* ไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านจนหมดกลิ่นน้ำยาคงสภาพ

1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับดังนี้

1.3.1 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.2 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง

1.3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.5 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.6 แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราฟลอสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.8 แช่ในพาราฟลอสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที

1.4 นำเนื้อเยื่อของปลานิลที่ผ่านขั้นตอนการในข้อ 1.3 แล้วมาฝัง (embed) ในพาราฟลอสต์ที่อยู่ในบล็อกสีเหลือง

1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องไมโครทอมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซกชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบอน (ribbon)

1.6 นำ section มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยด น้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของ section ไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซกชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่น สไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยัดจนไม่มีการซ้อนทับของ เนื้อเยื่อแล้ว คูดน้ำออกขับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบใน ตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 นำสไลด์ที่มี section มาละลายเอาพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ

(deparafinization) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถ แก้วที่บรรจุไซลีน และดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ ต่าง ๆ กันดังนี้

1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.7.2 แช่ในนอร์มัลปิวิตแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.4 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.5 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 80% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.6 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.8 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.9 แช่ในสารละลายฟอรัมาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที

1.7.10 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.7.11 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.8 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊ม

สุญญากาศ (vacuum pump)

2 วิธี Indirect immunoperoxidase

2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking)

2.2.1 หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละ section ด้วยไมโครปิเปต

2.1.2 บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

2.2.1 คูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละ section ออก

2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละ section (แอนติบอดีตัวแรกคือโมโน

โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. sobria*)

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจาก section ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละ section ออก

2.3.2 หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุก section

2.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจาก section ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.4 นำ section มาทำปฏิกิริยากับ 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% H_2O_2 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

2.5 ล้าง section ด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอิโอซิน

3.1 ตี้น้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

3.2 ย้อมทับด้วยสีอิโอซิน 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% และล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

3.3 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 5 นาที

3.5 แช่ในไซลีนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการฉีกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางฉีก (permount)

3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี จะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายธนาพงษ์ ไทยชัยธรรม
วันเดือนปีเกิด	27 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 89/15 สุขุมวิท 46 แขวงพระโขนง เขตคลองเตย กรุงเทพฯ 10110
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนปทุมคงคา
พ.ศ. 2549	วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2551	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ