การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio mimicus* และ *Vibrio cholerae*

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชลินันท์ เพ็งสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2552

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio mimicus* และ *Vibrio cholerae*

ปริญญานิพนธ์
ของ
ชลินันท์ เพ็งสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2552
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio mimicus* และ *Vibrio cholerae*

บทคัดย่อ

ของ

ชลินันท์ เพ็งสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2552

ชลินันท์ เพ็งสุข. (2552). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ Vibrio mimicus และ Vibrio cholerae.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์.

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *V. mimicus* และ *V. cholerae* โดยใช้แบคทีเรีย (VM2-4) หรือ (VC2, 6, 10, 15 และ 16) ทั้งเซลล์ในการปลูกภูมิคุ้มกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม และใช้ทดสอบกับ *V. mimicus* 10 ไอโซเลต (VM1-10), *V. cholerae* ซีโรไทป์ต่างๆ 23 ไอโซเลต (VC1-23), *Vibrio* spp. 8 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2, และ 3 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *V. mimicus* เพียง 1 หรือ 2 ไอโซเลตเท่านั้น (VM2 หรือ VM4 หรือ VM 1 และ VM3) โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 สามารถจับกับแอนติเจนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 จับกับแถบแอนติเจนในช่วง 18-30 กิโลดาลตัน ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 จับกับแถบแอนติเจนในช่วง 15-30 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 สามารถจับกับ *V. mimicus* ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (VM1-10) ขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 จับกับ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 และ 5 จับกับแถบแอนติเจน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5 และ 14 กิโลดาลตัน และจับกับแถบแอนติเจนบางๆ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 จับกับ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบและจับกับแถบแอนติเจน 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 และ 32 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 สามารถจับกับ *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 8 สามารถจับกับ *V. cholerae* O1, O139 และ O141 ได้ แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 และ 8 ไม่สามารถจับกับแอนติเจนได้โดยวิธี Western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบทุกกลุ่ม (ยกเว้น กลุ่มที่ 4, 7 และ 8) สามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *V. mimicus* ในเนื้อเยื่อได้โดยวิธี immunohistochemistry ความไวในการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ในการตรวจสอบเชื้อ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* โดยวิธี dot blotting อยู่ในช่วง 10^8-10^5 CFU/ml อย่างไรก็ตามการนำตัวอย่างมาเพิ่มจำนวนในอาหาร alkaline peptone water ก่อนนำมาตรวจที่เวลา 3-6 ชั่วโมงสามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบอยู่ในช่วง 10^5-10^2 CFU/ml จึงสามารถใช้วิธี dot blotting ในการตรวจสอบและแยกความแตกต่างของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* โดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio mimicus* AND *Vibrio cholerae*

AN ABSTRACT

BY

CHALINAN PENGSUK

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Biotechnology

at Srinakharinwirot University

February 2009

Chalinan Pengsuk. (2009). *Production of monoclonal antibodies against Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Assist. Prof. Dr. Siwaporn Longyant.

Monoclonal antibodies (MAbs) against *V. mimicus* and *V. cholerae* were generated using whole cell of bacteria (VM2-4) or (VC2, 6, 10, 15 และ 16) for immunization. Eight groups of MAbs were cloned to establish cell lines and tested against 10 isolates of *V. mimicus* (VM1-10), 23 isolates of different serotype of *V. cholerae* (VC1-23), 8 isolates of *Vibrio* spp. and other Gram negative bacteria. The MAbs in group 1, 2 and 3 were specific to only one isolate or two isolates of *V. mimicus* (VM2 or VM4 or VM1 and VM3). The antigens recognized by MAbs in group 1 bound to a high molecular mass antigen around 200 kilodalton (kDa). The MAbs in the second group bound to a smear of antigens at molecular masses ranged from 18 to 30 kDa while MAbs in group 3 bound to a series of antigens at molecular masses ranged from 15 to 30 kDa. MAb in group 4 recognized all isolates of *V. mimicus* tested (VM1-10) while MAbs in group 5 recognized all isolates of *V. mimicus* and *V. cholerae*. Groups 4 and 5 of MAbs recognized the same antigens, two major bands at molecular masses of 5 and 14 kDa and one minor band at molecular mass of 12 kDa. The MAbs in group 6 recognized all isolates of *V. mimicus* and *V. cholerae* and bound strongly to the antigens at molecular mass of 30 and 32 kDa. The MAbs in group 7 could recognize all isolates of *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa tested (VC6-9). The MAbs in group 8 could recognize only clinical isolates of *V. cholerae* (O1, O139 and O141). The MAbs in group 7 and 8 could not be determined by Western blotting. All MAbs (except MAbs in group 4, 7, and 8) could be used to detect *V. mimicus* infection in the tissue by immunohistochemistry. The detection of sensitivity of MAbs determined by dot blotting ranged from 10^8-10^5 CFU/ml. However, the detection of sensitivity increased to 10^5-10^2 CFU/ml after preincubation in alkaline peptone water for 3-6 hr. In conclusion MAbs in group 4, 5 and 6 could be used for rapid detection and differentiation of *V. mimicus* and *V. cholerae* in complex sample by dot blotting without isolation and biochemical tests.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio mimicus* และ *Vibrio cholerae*

ของ

ชลินันท์ เพ็งสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(อาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณมังกูล)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วรรนิภา เพี้ยนภักตร์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีทางสำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิทยาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ อาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นุจรี สุวรรณมังกูล และ อาจารย์ ดร.วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวารุณี หะยีมะสาและ คุณชุติมา ศรีสุข คุณกัลยา ไชยสิทธิตระกูล พี่น้องและเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่ายิ่งอีกทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอน้อมระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุน และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอระลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยและจะนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง และกุ้งทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ชลินันท์ เพ็งสุข

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	สมมติฐานของการวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ภูมิหลัง *Vibrio mimicus*	5
	การแพร่ระบาด	7
	การก่อโรค	7
	ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค	8
	ภูมิหลัง *Vibrio cholerae*	11
	การแพร่ระบาด	12
	การก่อโรค	13
	ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค	14
	การรักษา และการควบคุมโรค	15
	วิธีการตรวจวิเคราะห์	15
	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	16
	หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	16
	การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	17
	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค	19
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	21
	สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย	21
	อุปกรณ์และสารเคมี	21
	วิธีดำเนินการวิจัย	25
	การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว	25
	การเตรียมแบคทีเรีย	25
	การเตรียมแอนติเจน	25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	(ต่อ)	
	การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว	25
	การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา	26
	การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	28
	การคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting	28
	การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2	28
	การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting	28
	การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)	28
	การคัดเลือกโดยวิธี immunohistochemistry	31
	การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution	34
	การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา	34
	การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	34
	การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	35
	การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	37
	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. mimicus* โดยวิธี dot blotting	38
	การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างอุจจาระ	38
4	**ผลของการทดลอง**	39
	การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขา	39
	การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	40
	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	41
	การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	42
	การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	43
	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี dot blotting	43
	ตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างอุจจาระ	43

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 53

บรรณานุกรม 57

ภาคผนวก 64

ภาคผนวก ก 65

ภาคผนวก ข 68

ภาคผนวก ค 70

ภาคผนวก ง 73

ภาคผนวก จ 79

ภาคผนวก ฉ 83

ภาคผนวก ช 85

ประวัติย่อผู้วิจัย 90

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *V. mimicus* และ *V. cholerae*…….	6
2	โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ……	20
3	แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน (*) และใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. cholerae* และ *V. mimicus*.....	24
4	ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน.....	37
5	การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ในกลุ่มที่ 2, 4 และ 5 โดยวิธี indirect ELISA……	50
6	ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting, western blotting และ immunohistochemistry……..	52

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	รูปแสดงการจำแนกชนิดของ *Vibrio cholerae*……	12
2	หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization……..	17
3	การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิถี *de novo* และ วิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ aminopterine ในวิถี *de novo*……..……..	19
4	แผนภาพการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา.....	27
5	แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting……...	29
6	แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ Western blotting ปฏิกิริยาข้ามด้วย dot blotting และ Immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อกุ้งขาว……..	30
7	แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งขาวสำหรับการวิเคราะห์ immunohistochemistry……..	32
8	แผนผังการเตรียม IHC ในเนื้อเยื่อกุ้งขาว……...	33
9	ไดอะแกรมการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี…….	36
10	การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus*……	39
11	การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae*……	40
12	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ (1-8) ด้วยวิธี dot blotting…….	44
13	การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting……	45
14	การตรวจสอบการติดเชื้อ VM2 ด้วยวิธี immunohistochemistry……	46
15	การตรวจสอบการติดเชื้อ VM3 และ VM4 ด้วยวิธี immunohistochemistry……..	47
16	การตรวจสอบการติดเชื้อ VM4 ด้วยวิธี immunohistochemistry……	48
17	การตรวจสอบการติดเชื้อ VM3 และ VM4 ด้วยวิธี immunohistochemistry……	49
18	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	51
19	การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างอุจจาระ……	52

บทที่ 1
บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนับเป็นอุตสาหกรรมที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและทำรายได้ให้กับประเทศอย่างสูงในแต่ละปี ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำประสบปัญหาหลายด้าน โดยปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งได้แก่การแพร่ระบาดของโรคจากไวรัสและแบคทีเรีย ทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำประสบกับความเสียหายเป็นอย่างมาก โดยการระบาดของโรคจากแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ โรควิบริโอสิส (Vibriosis) ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ ในปี ค.ศ.1854 Filippo Pacini นักวิทยาศาสตร์ชาวอิตาเลียนสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรคได้เป็นสปีชีส์แรกของแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ต่อมามีรายงานการระบาดของโรคจากแบคทีเรียในกุ้งซึ่งมีสาเหตุมาจาก *V. alginolyticus, V. vulnificus, V. parahaemolyticus , V. harveyi* และ *V. mimicus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส (เพ็ญศรี บุญตาม-ช่วย และ อรอนงค์ คงทวี. 2548) และมีการพบ *V. cholerae* และ *V. mimicus* ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรืองแสงในกุ้งก้ามกราม (นิลุบล กิจอันเจริญ และคนอื่นๆ. 2546 [online]) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ยังมีความสำคัญทางการแพทย์โดยก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ได้แก่ *V. cholerae, V. vulnificus,* และ *V. parahaemolyticus* เป็นต้น (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 137)

V. mimicus เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกับ *V. cholerae* มาก โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีคล้ายกัน แต่สามารถใช้การผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครสเป็นสิ่งบอกความแตกต่างได้โดย *V. mimicus* ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครส (Davis; et al. 1981: 631-639) *V. mimicus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงเช่นเดียวกับ *V. cholerae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรค มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นโค้ง ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดยอาศัยโพลาร์แฟลกเจลลาร์ (polar flagellar) สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเดินทางผ่านกระเพาะอาหารและไปเจริญเติบโตที่ผิวมิวโคซ่า (mucosa) ของลำไส้เล็ก โดยอาศัยความสามารถในการเคลื่อนที่และสร้างมิวซิเนส (mucinase) หรือเอนไซม์อื่นๆทำให้เชื้อเข้าไปถึงเซลล์ของลำไส้เล็กเพื่อยึดเกาะกับเซลล์และปล่อยสารพิษ (toxin) ออกมา โดยเชื้อชนิดนี้จะไม่เข้ากระแสเลือดและไม่บุกรุกเข้าเนื้อเยื่อชั้นใน เยื่อบุลำไส้เล็กจะหลั่งสารที่เป็นน้ำและ อิเล็กโตรไลต์ออกมามาก ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ร่างกายขาดน้ำและแร่ธาตุ (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 137)

ในปี ค.ศ. 1991 มีการระบาดของอหิวาตกโรคในลาตินอเมริกา โดยมีสาเหตุจากเชื้อ *V. cholerae* O1 El Tor โดยระหว่างการระบาดนี้มีรายงานการพบเชื้อ *V. mimicus* จากโรคท้องร่วงอย่างรุนแรงใน Costa Rica ในช่วงเวลาเดียวกันทางตอนเหนือของบราซิลบริเวณแม่น้ำอะเมซอน

พบ *V. cholerae* ที่ให้ผลลบกับการหมักน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วง (Campos; et al.1996: 1141-1144)

V. mimicus และ *V. cholerae* มีโซมาติกแอนติเจน (somatic antigen) ร่วมกันและมียีนควบคุมความรุนแรงของโรคใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคท้องร่วงอย่างรุนแรงร่วมกัน (Boyd; et al. 2000: 1507–1513; Davis; et al.1981: 631-639) แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติเช่น บริเวณน้ำทะเล น้ำจืด และน้ำกร่อย นอกจากนี้ยังพบได้ทั่วไปในสัตว์น้ำเช่น หอยนางรม กุ้ง ปลา และไข่เต่าเป็นต้น (Chowdhury; et al. 1989: 2073-2078)

V. mimicus สามารถก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบได้ (Lee; et al. 2002: 269-276) ซึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ เช่น หอยนางรมดิบ กุ้งทะเล และกุ้งแม่น้ำเป็นต้น (Shandera; et al. 1983: 169-171)

V. mimicus และ *V. cholerae* มักพบการระบาดร่วมกัน ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์และการแยกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดออกจากกัน และแยกออกจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ จึงมีความสำคัญมาก การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อตรวจสอบและวินิจฉัยสาเหตุของโรคท้องร่วงอย่างรุนแรงจากเชื้อวิบริโอโดยวิธีปกตินั้นค่อนข้างยุ่งยากและใช้ระยะเวลาในการตรวจนาน ทำให้การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อเป็นไปอย่างล่าช้า จึงได้มีผู้พัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular method) โดยการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) (Chun; Hug; & Colwell. 1999: 2202-2208) ซึ่งมีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นานและมีความแม่นยำ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูง ซึ่งการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลจำเป็นต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะทางซึ่งต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันโดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี มาประยุกต์ใช้ในการตรวจและวินิจฉัยโรคการติดเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specificity) ต่อกันสูงมาก โดยผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เพียง 1 เซลล์ จึงมีความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนที่ใช้เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น แอนติบอดีจะจดจำโครงสร้างโดยรวมของอิพิโทปบนแอนติเจน และสามารถแยกแยะความแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยที่เกิดบนอิพิโทปได้ ดังนั้นการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์จะเป็นประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากมีความไวและความแม่นยำสูง หลังจากการพัฒนาไปเป็นชุดตรวจจะทำให้ง่ายต่อการใช้งาน และเป็นเทคนิคที่สะดวก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

จากรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งที่มีอาการเสี้ยนดำและเขม่าดำโดยการทดสอบด้วยเทคนิคทางชีวเคมีสามารถแยกเชื้อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ได้ (Suksawat personal communication) ดังนั้นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* จึงอาจนำมาช่วยในการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นของการเกิดโรค Vibriosis รวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อ

แบคทีเรียในกุ้งและสัตว์น้ำอื่นๆทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์สำหรับโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ได้มีผู้ศึกษาหลายสปีชีส์ด้วยกัน ในปี 1988 มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแกนของโปรตีน flagellar (H) บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *V. mimicus* พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ เกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง *V. cholerae* และ *V. mimicus* และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. (Simonson & Siebeling. 1988: 1962-1966) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. mimicus* และสายพันธุ์ใกล้เคียงสำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบวินิจฉัยการติดเชื้อ *V. mimicus* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ และสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์สำหรับโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เพื่อที่จะสามารถแยกการติดเชื้อจาก *V. mimicus* ออกจาก *V. cholerae* และ *Vibrio* spp.อื่นๆ ได้ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* เพื่อนำมาใช้จำแนก *V. mimicus* และ *V. cholerae* ออกจากกัน และแยกจาก *Vibrio* spp. และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

2. เพื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ด้วยวิธี dot blotting

ความสำคัญของการวิจัย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ การติดเชื้อในมนุษย์ และสามารถประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความไวเพิ่มขึ้นและความสะดวกในการใช้ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมแบคทีเรียที่ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

2. ผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และ คัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม

3. เหนี่ยวนำการติดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดโดยการฉีด *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ในกุ้งขาวสำหรับใช้ทำการทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry

4. ตรวจสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยวิธี indirect ELISA และ sandwich ELISA

สมมติฐานของการวิจัย

V. mimicus และ *V. cholerae* มีอิพิโทปที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนได้หลายลักษณะซึ่งมีทั้งลักษณะเฉพาะแต่ละสายพันธุ์หรือมีลักษณะร่วมกันในแต่ละชนิดของแบคทีเรีย หากผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออิพิโทปดังกล่าวได้ จะทำให้สามารถแยกความแตกต่างของชนิดของแบคทีเรียจาก *Vibrio* spp. และความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ภูมิหลัง *Vibrio mimicus*

V. mimicus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพลาร์แฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือ 0-6% ช่วง pH ประมาณ 6.8-8 และอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ โดยจะไม่พบ *V. mimicus* ในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Rodkhum; et al. 2001: 29-35; Chowdhury; et al. 1989: 2073-2078) แบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะทางชีวเคมีคล้ายกับ *V. cholerae* โดยความแตกต่างระหว่าง 2 สายพันธุ์ ที่สำคัญคือ *V. mimicus* จะไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครส ทำให้โคโลนีเป็นสีเขียวเมื่อเจริญบนอาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆที่ต่างจาก *V. cholerae* คือให้ผลเป็นลบเมื่อทดสอบกับ Voges-Proskauer, corn oil (Lipase) และ Jordan tartrate นอกจากนี้ยังพบว่า *V. mimicus* สามารถต้านต่อ polymyxin 50 unit มากกว่า *V. cholerae* ด้วย (Davis; et al.1981: 631-639; Lee; et al. 2002: 269-276) ซึ่งการค้นพบ *V. mimicus* ในช่วงแรกมีรายงานว่าเป็น *V. cholera*e–sucrose negative Davis และคนอื่นๆ (1981) ได้ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอไฮบริดไดเซชัน พบว่า *V. mimicus* มีค่า relative binding ratio กับ *V. cholerae* classical biotype 9061 อยู่ในช่วง 24-54 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจากการตรวจลักษณะทางกายภาพของ *V. cholerae* พบว่ามี *V. cholerae* ที่มีลักษณะแตกต่างจาก *V. cholera*e กลุ่มอื่นๆ จึงระบุว่าเป็น *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ไม่ปกติ (atypical strains of *V. cholerae*) และภายหลังได้มีการตั้งชื่อใหม่เป็น *V. mimicus* ซึ่งมาจาก คำว่า mimic แปลว่า มีความคล้ายคลึงกัน โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ดังแสดงในตาราง 1

ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ารูปแบบการต้านยาปฏิชีวนะของ *V. mimicus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ แต่ *V. mimicus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในบังคลาเทศพบว่าต้านต่อ kanamycin, tetracycline และ trimethoprim-sulfamethoxazole และมีเปอร์เซ็นต์การต้าน amplicilin ต่ำ *V. mimicus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่โอกายามา ประเทศญี่ปุ่น มีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะมากกว่าที่แยกได้จากผู้ป่วย และรูปแบบของการต้านยาปฏิชีวนะแตกต่างจากการศึกษาที่บังคลาเทศ (Chowdhury; et al. 1986: 622-623) พบว่ามีการต้าน amplicilin สูงกว่าและไวต่อ trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, kanamycin และ tetracycline (Chowdhury; et al. 1989: 2073-2078) เป็นที่น่าสนใจว่ารูปแบบการต้านยาปฏิชีวนะจากทั้ง 2 แหล่ง มีความแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นในการศึกษาต่อไปเพื่อประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคท้องร่วง

ตาราง 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* (Rodkhum ; et al. 2001)

สมบัติ	***V. mimicus***	***V. cholerae***
Hemolysis บน blood agar	+	+
โคโลนีบน TCBS	เขียว	เหลือง
การติดสีแกรม	แกรมลบ	แกรมลบ
รูปร่าง	แท่งสั้น	แท่งสั้น
Oxidase	+	+
การเคลื่อนที่	+	+
Lipase	-	+
Jordan tartrate	-	+
Decarboxylation of :		
Arginine	-	-
Lysine	+	+
Ornithine	d	d
Nitrate Reduction	+	+
Voges-Proskauer	-	+
Growth in :		
0% NaCl (W/V)	+	+
5% NaCl (W/V)	d	d
7% NaCl (W/V)	d	-
10% NaCl (W/V)	-	-
Production of		
Indole	+	+
Urease	-	-
Acid from :		
Salicin	-	-
Lactose	v	-
Arabinose	-	-
Sucrose	-	+

หมายเหตุ + = ผลบวก 85-100%, - = ผลบวก 0-15%, d = ผลบวก 16-84%, v = ไม่คงที่

1.1 การแพร่ระบาด (Outbreak)

V. mimicus พบในการระบาดเป็นครั้งคราว (epidemic) โดยร่วมกับการระบาดของโรคอหิวาตกโรคซึ่งมีสาเหตุจาก *V. cholerae* (Vieira; et al. 2001: 2360-2364) โดยแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถพบได้ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น น้ำทะเล น้ำจืด และน้ำกร่อย นอกจากนี้ยังพบในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติได้แก่ หอยนางรม กุ้ง แพลงก์ตอนสัตว์ แพลงก์ตอนพืช ปลา และไข่เต่า (Jermyn & Boyd. 2005: 311-322; Vieira; et al. 2001: 2360-2364; Acuna; et al. 1999: 336-338; Chun; Hug; & Colwell. 1999: 2202-2208; Davis; et al. 1981: 631-639)

V. mimicus เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถก่อโรคกับมนุษย์ได้หลายลักษณะ โดยสามารถแยกได้จากตัวอย่างของผู้ป่วยที่พบการระบาดในหลาย ๆประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น บังคลาเทศ นิวซีแลนด์ และแคนาดา (Davis; et al.1981: 631-639) ซึ่งตัวอย่างที่ทำการแยกมาจากผู้ป่วยนั้น สามารถแยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการต่าง ๆ เช่น ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งที่กล้ามเนื้อท้องพร้อมมีไข้ และอาการหูอักเสบ (Shandera; et al.1983: 169-171)

ในประเทศญี่ปุ่นพบการระบาดของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของ *V. mimicus* และสามารถแยกได้จากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และปลาดิบ (Chowdhury; et al. 1989: 2073-207)

ปี ค.ศ. 1983 ในสหรัฐอเมริกามีรายงานการตรวจพบเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์ที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *V. fluvialis, V. hollise, V. cholerae, V. mimicus* และ *V. parahaemolyticus* ก่อให้เกิดอาการโรคท้องร่วงและการติดเชื้อนอกลำไส้ เช่น การติดเชื้อจากบาดแผล หู กระแสโลหิต และถุงน้ำดี (Blake; et al. 1983: 558-559)

ในปี ค.ศ. 1991 พบการระบาดครั้งใหญ่ของโรคอหิวาตกโรคในลาตินอเมริกา ซึ่งมีสาเหตุจาก *V. cholerae* O1 biotype El Tor ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า มีรายงานการพบ *V. mimicus* ในการระบาดครั้งนี้ในคอสตาริกา (Costa Rica) ด้วย ซึ่งในเวลาเดียวกันก็พบการระบาดของ *V. mimicus* ทางตอนเหนือของบราซิล (Campos; et al.1996: 1141-1144)

1.2 การก่อโรค (Pathogenicity)

V. mimicus จะเข้าสู่มนุษย์โดยการรับประทานอาหารดิบ เช่น หอยนางรม และไข่เต่า ที่ปนเปื้อน แบคทีเรียชนิดนี้จะเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน กล้ามเนื้อเป็นตะคริว กระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) หูอักเสบ เป็นไข้ และติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ในมนุษย์ (Lee; et al. 2002: 269-276; Kang; et al. 1998: 85-89; Chowdhury; et al. 1989: 2073-2078)

V. mimicus เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสโดยสามารถติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นได้ในสัตว์น้ำ มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าพบ *V. mimicus* ในกุ้งที่ป่วยเป็นโรค และมีการศึกษาการเกิดโรคของ *V. mimicus* ในกุ้งโดยการแช่เชื้อ พบว่ากุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 80% (Oanh; Hoa; & Phuong.) (online) ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียสกุลวิบริโอจากตับกุ้งกุลาดำพบเชื้อวิบริโอที่พบ

ในกุ้งที่ป่วย คือ *V. parahaemolyticus, V. anguilarum, V. mimicus* และ *V. vulnificus* ซึ่งในตับกุ้งที่ป่วยส่วนใหญ่มักมีอาการตับซีดร่วมด้วย 62 % แต่ท่อตับถูกทำลายอย่างรุนแรง (เพ็ญศรี บุญตาม-ช่วย และ อรอนงค์ คงทวี. 2548.) (online) ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่เลี้ยงในบ่อดิน พบแบคทีเรียวิบริโอในตับ ตับอ่อน ลำไส้ และเลือดของกุ้งขาว และน้ำในบ่อเลี้ยงจำแนกได้ 6 ชนิด แยกเป็นกลุ่มโคโลนีสีเหลืองได้แก่ *V. alginolyticus* และ *V. cholerae* กลุ่มโคโลนีสีเขียวได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus* และ *V. mimicus* ส่วนกลุ่มโคโลนีเรืองแสงจำแนกเป็น *V. harveyi* (ชัยวุฒิ สุดทองคง; ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และ ลิลา เรืองแป้น. 2550: 280-292)

1.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค (Virulence factor)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ *V. mimicus* เช่น cholera toxin (CTX), heat-labile hemolysin, heat-stable hemolysin และ cytotoxin นอกจากนี้ *V. mimicus* ยังมีการสร้างโปรตีนที่สัมพันธ์กับการก่อโรคอีกหลายชนิด เช่น hemagglutinin, metalloprotease, lipase และ phospholipase

1.3.1 Hemolysin

จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ hemolysin ที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile hemolysin) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ El Tor hemolysin ที่ผลิตโดย *V. cholerae* อีกชนิดคือ hemolysin ที่ทนความร้อน (heat-stable hemolysin) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ thermostable direct hemolysin ที่ผลิตโดย *V. parahaemolyticus* (Honda; et al. 1987: 201; Miyoshi; et al. 1997: 1830-1835)

hemolysin ของ *V. mimicus* (VMH) ที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับ El Tor hemolysin โดยมีคุณสมบัติในการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) และมีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร VMH เป็น pore-forming toxin และการทำลายเม็ดเลือดนั้นเนื่องมาจากการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Miyoshi; et al. 1997: 1830-1835)

ยีนที่ควบคุมการผลิต VMH คือ ยีน *VmhA* ซึ่งจะถอดรหัสเป็นสารตั้งต้นของ VMH มีความคล้ายกับยีน *HlyA* ของ *V. cholerae* biotype El Tor ที่ถอดรหัสเป็นสารตั้งต้นของ enterotoxin hemolysin (HlyA) เท่ากับ 76% (76% homology) (Rahman; et al. 1997: 169-173) ยีน *VmhA* จะถอดรหัสให้ VMH ขนาด 83 กิโลดาลตัน แต่ VMH ที่สมบูรณ์ มีขนาดเท่ากับ 63 กิโลดาลตัน โดยถูกตัด signal peptide ทางปลาย N ของ protoxin ระหว่างกรดอะมิโนอะลานีน และแอสพาราจีนตำแหน่งที่ 25 และ 26 ตามลำดับ โดยจากการทดสอบกระบวนการสลายเม็ดเลือดแดงของม้า สามารถตรวจสอบได้เมื่อผ่านช่วง log phase ของ *V. mimicus* ไปแล้ว และการแตกสลายของเม็ดเลือดจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ VMH (Sultan; et al. 2007: 430-434) โดยจะทำให้เกิดรู

บนเยื่อหุ้มเซลล์ขนาด 3 nm ทำให้น้ำและไอออนต่างๆเช่น Na^+ และ K^+ เข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์แตก (Shinoda; et al. 1993: 405-409)

พบว่า Aerolysin-like hemolysin (ALH) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคท้องร่วง โดยชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ cyclic AMP (cAMP) ซึ่ง cAMP จะไปกระตุ้น cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ซึ่งเป็น chloride channel ทำให้เกิดการหลั่งของ Cl^- เข้าสู่ทางเดินอาหารจำนวนมากทำให้เกิดโรคท้องร่วงและการสูญเสียน้ำไปกับอุจจาระ (Gabriel; et al. 1994: 107-109) VMH อาจมีความสามารถในการชักนำให้เกิดโรคท้องร่วงคล้ายกันและทำการทดสอบโดยใช้วิธี intestinal loop assay เพื่อวัด enterotoxin activity ของ VMH โดยดูการสะสมของของเหลวภายในลำไส้ พบว่า VMH 0.4 µg กระตุ้นให้เกิดการสะสมของของเหลวเท่ากับ 0.20 g/cm และทำการตรวจสอบผลของ VMH ในการผลิต ATP โดยใช้ colonic adenocarcinoma cell line (T84 cell line) โดยดูจากจำนวนของ VMH ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ T84 พบว่าปริมาณของ ATP (ATP content) ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนเดียวกับจำนวนของ VMH ที่เติมลงไป จากการทดลองยังพบว่า VMH 150 ng/ml ทำให้มีการผลิต ATP สูงที่สุด 0.6 µg/ml เช่นเดียวกับ cAMP ที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนของ VMH และ VMH 150 µg/ml ทำให้มีการผลิต cAMP สูงที่สุด 20 ng/ml (Li; et al. 2004: 73-78)

1.3.2 Cholera toxin (CTX)

V. mimicus สามารถผลิต CTX ได้เช่นเดียวกับ *V. cholerae* ซึ่ง CTX เป็น เอนเทอโร-ทอกซินที่มีสมบัติไม่ทนกรด ไม่ทนความร้อน และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วง (Lee; et al. 2002: 269-276; Acuna; et al. 1999: 336-338; Miyoshi; et al. 1997: 1830-1835; Campos; et al. 1996: 1141-1144) *V. mimicus* บางสายพันธุ์สามารถผลิต CTX ได้ซึ่งเกิดจากการปรากฏของยีน *ctxAB* บนโครโมโซม ปกติยีน *ctxAB* จะอยู่บนจีโนมของ filamentous bacteriophage CTXϕ ซึ่งจะถอดรหัสสร้าง CTX ใน *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง โดยอาศัย toxin coregulated pilus (TCP) เป็นตัวรับ (receptor) ทำให้เกิด *V. cholerae* ที่ก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ใหม่จากสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (Faruque; et al. 1998: 3752–3757) *V. mimicus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง ที่แยกได้จากผิวน้ำในบังกลาเทศ ทำการทดสอบความไวในการติดเชื้อ CTXϕ และการเกิด lysogenic conversion ของ CTXϕ จาก *V. mimicus* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนั้นไม่มีการแสดงออกของ TCP แต่พบว่า CTXϕ สามารถเข้าสู่ *V. mimicus* และแทรกจีโนมของ CTXϕ เข้าไปในโครโมโซมของ *V. mimicus* ได้ 2 สายพันธุ์ จาก 27 สายพันธุ์ นอกจากนี้ *V. mimicus* ที่มีจีโนมของ CTXϕ สามารถสร้างอนุภาคของไวรัสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้และอนุภาคไวรัสจะเพิ่มขึ้นเมื่อชักนำด้วย mitomycin C *V. mimicus* ที่มีจีโนมของ CTXϕ สามารถผลิต CTX ที่ยังก่อให้เกิดการสะสมของของเหลวในลำไส้ของกระต่าย จากการทดลองดังกล่าวจะพบว่า *V. mimicus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง สามารถเปลี่ยนไปเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงได้โดยการติดเชื้อ CTXϕ (Faruque; et al. 1999: 5723-5729)

1.3.3 Hemagglutinin

มีบทบาทสำคัญในการเกาะกับชั้นเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก และตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งคาดว่าผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้มีโฮโมลอก (homolog) ของสารเมือกที่เกี่ยวข้องกับการเกาะของ *V. mimicus* แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิต Hemagglutinin ได้ 3 ชนิด คือ metalloprotease, lipopolysacharide (VM-LPSHA) และ outer membrane protein ขนาด 39 กิโลดาลตัน (VM-OMPHA) Hemagglutinin ทั้ง 3 ชนิดจะทำงานร่วมกันในการเกาะกับชั้นเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก (Alam; et al. 1997: 3662-3665)

1.3.4 Lipopolysacharide และ Outer membrane protein

V. mimicus จะเกาะกับชั้นเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก และตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้ VM-LPSHA และ VM-OMPHA ซึ่งจะถูกยับยั้งการทำงานโดยไกลโคโปรตีน เช่น mucin fetuin และ asialofetuin (Alam; et al. 1997: 3662-3665)

1.3.5 เมทเทลโลโปรติเอส (metalloprotease)

เป็นเอนไซม์สำคัญในการเพิ่มการซึมผ่านระบบท่อลำเลียง (vascular permeability) ที่ผิวหนัง และเพิ่มการสะสมของเหลวภายในลำไส้เล็กของกระต่าย*V. mimicus* จะผลิต metalloprotease 2 ชนิด คือ VMP มีขนาด 31 กิโลดาลตัน และ VMC มีขนาด 61 กิโลดาลตัน VMP จะมีแอคติวิตีคล้ายกับ hemagglutinin/protease (Hap) ของ *V. cholerae* (Honda; et al.1989: 245-253) ซึ่ง Hap มีหน้าที่ช่วยในการส่งเสริมการออกฤทธิ์ของ CTX โดยจะไปทำลายเยื่อบุผิวลำไส้โดยช่วยให้แบคทีเรียสามารถบุกรุกเข้าไปเกาะติดกับลำไส้ (Crowther; et al. 1987: 393-402) และสลายโปรตีนที่สำคัญของเจ้าบ้าน เช่น lactoferrin fibrinonectin และ mucin (Lee; et al. 2005: 2507-2513) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆของสัตว์ชั้นสูงจะมี collagen fiber เป็น extracellular matrix อยู่มากมาย ซึ่งการบุกรุกของเชื้อนั้นจะเกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อที่มีคลอลาเจนไฟเบอร์ ซึ่ง metalloprotease ที่ผลิตจาก *V. mimicus* มีคุณสมบัติของ collagenase activity และพบว่าทางบริเวณปลาย C มีความสำคัญต่อคุณสมบัตินี้ โดยพบว่าเมื่อตัดกรดอะมิโนทางปลาย C ออก ไป 100 ตัว ทำให้คุณสมบัติของ collagenase activity หมดไป (Lee; et al. 2005: 2507-2513)

1.3.6 Phospholipase

phospholipase (PhlA) ที่สร้างจาก *V. mimicus* มีขนาดเท่ากับ 53 กิโลดาลตัน และยีนที่กำหนดรหัส คือ *phl*A (Kang; et al. 1998: 85-89) มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ lecithinase ของ *V. cholerae* โปรตีนลูกผสมของ PhlA (rPhlA) ที่เป็นผลผลิตของยีน *phlA* เมื่อแยกให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติพบว่า สามารถสลาย phospholipid ด้วยกระบวนการ hydrolysis ซึ่งเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 8-9 นอกจากนี้ยังพบว่า rPhlA สามารถทำลายเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา (CHSE-214) หลังจากเติม rPhlA ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง (Lee; et al. 2002: 269-276)

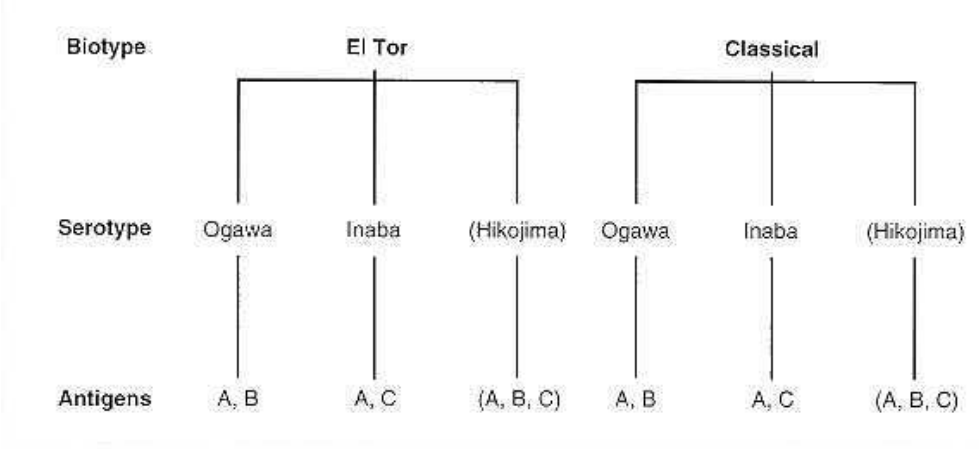
2. ภูมิหลัง *Vibrio cholerae*

V. cholerae มีรูปร่างเป็นเป็นท่อนโค้ง สั้น ขนาด 0.5 ไมโครเมตร ×1.5 - 3.0 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลาร์ที่ปลาย 1 เส้น เคลื่อนไหวได้รวดเร็ว ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่ทนต่อความแห้งแล้งและความเป็นกรด เชื้อถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และยาฆ่าเชื้อ ถ้าหยดเชื้อไว้บนสไลด์เชื้อจะตายภายใน 2 ชั่วโมง *V. cholerae* สามารถทนต่อความร้อน ความชื้นได้ เช่นที่ผิวของผักและผลไม้เป็นเวลา 4-7 วัน เชื้อชนิดนี้เจริญได้ดีที่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ตั้งแต่ 16 - 42 องศาเซลเซียส สามารถเลี้ยงได้ในสภาพที่ pH 9.6 และชอบเจริญที่ pH เป็นเบส คือ 7.8-8.8 มีเอนไซม์ oxidase สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแมนนิทอลได้ ให้ผลลบต่อไลซีนและการทดสอบออร์นิทีนคาร์บอกซิเลส เชื้อ *V. cholerae* ขณะอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะอยู่ในระยะพักมีรูปร่างกลม เมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสมจะปรับตัวเป็น active form รูปร่างยาว เชื้อนี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา และเจริญได้ดีบนอาหารคัดเลือกที่มีสารยับยั้งเช่น เกลือน้ำดี บิสมัธซัลไฟต์ และเทลลูไรต์ โดยเชื้อจะให้โคโลนีสีเหลืองบนอาหาร TCBS และให้โคโลนีจุดสีดำตรงกลางบนอาหาร Taurocholic-tellurite-gelatin agar (TTGA) แต่รอบๆ ขุ่นเพราะมีเจลลาติเนส เชื้อสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ซึ่งทดลองได้โดยเติมกรดกำมะถันในอาหาร nitrate peptone broth ที่มีเชื้อนี้เจริญอยู่ ถ้าได้สีแดงแสดงว่าเกิดการรีดิวส์ไนเตรตการทดสอบนี้เรียกว่า Cholara red test เชื้อนี้ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาออกซิเดส ไลซีนคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) และออร์-นิธีนคาร์บอกซิเลส (ornithine decarboxylase) สามารถแสดงปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *V. cholerae* เปรียบเทียบกับสปีชีส์ต่าง ๆ ได้ (Morris and Black.1985: 343-350)

การแบ่งกลุ่มของเชื้อโดยใช้ O antigen สามารถแบ่งกลุ่มต่างๆได้มากกว่า 200 ซีโรไทป์ ซีโรไทป์ O1 และ O139 เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญทำให้เกิดการระบาดได้ ส่วนซีโรไทป์อื่น non-O1, non-O139 อาจทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงได้แต่ไม่พบว่าทำให้เกิดการระบาดของโรค

V. cholerae แบ่งออกเป็น 2 ไบโอไทป์ ได้แก่ อหิวาต์แท้ (Classical *Vibrio*) และอหิวาต์เทียม (El Tor *Vibrio*) El Tor *Vibrio* มีความทนทานต่อสารเคมี และทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า classical *Vibrio* ทั้ง 2 ไบโอไทป์ มีรูปร่างลักษณะเหมือนกัน แต่ El Tor *Vibrio* มีสมบัติทางชีวเคมีต่างจาก classical *Vibrio* คือ มีความทนทานต่อสารเคมี และทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า El Tor *Vibrio* สามารถสร้างเอนไซม์ฮีโมไลซิน ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแกะได้ ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเป็นแบบบีตาฮีโมไลซิส ทนทานต่อเฟจไทป์ IV เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่ ให้ผลบวกกับการทดสอบ Voges – Proskauer และ ดื้อต่อ polymyxin 50 unit (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 132-133; Morris and Black. 1985: 343-350)

ที่ตัวเชื้อมีโซมาติกแอนติเจน หรือ O antigen ส่วนที่แฟลกเจลลามีแฟลกเจลลาแอนติเจน หรือ H antigen O antigen เป็นสารที่ทนความร้อน ส่วน H antigen ไม่ทนความร้อน พบว่า Classical และ El Tor *Vibrio* จัดเป็น O antigen กรุ๊ป 1 ปัจจุบันจึงเรียกว่า *Vibrio cholerae* O1 O antigen ที่มีความสำคัญมี 3 ชนิด คือ A, B, และ C โดยที่ A เป็น กรุ๊ปสเปซิฟิกโอแอนติเจน ซึ่งพบใน *V. cholerae* กรุ๊ป 1 ทุกตัว ส่วน B และ C เป็นไทป์สเปซิฟิกโอแอนติเจน



ภาพประกอบ 1 รูปแสดงการจำแนกชนิดของ *Vibrio cholerae*

ที่มา : http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch024.htm

2.1 การแพร่ระบาด (Outbreak)

อหิวาตกโรคเป็นโรคประจำท้องถิ่นในบริเวณชายทะเลที่มีน้ำกร่อยได้แก่บริเวณใกล้ปากแม่น้ำที่มีประชากรอาศัยอยู่หนาแน่นและสุขอนามัยไม่ดี อหิวาตกโรคเกิดการระบาดทั่วโลก (pandemic) รวม 7 ครั้ง โดย 6 ครั้งแรกเกิดในช่วง ค.ศ. 1899-1923 ทุกครั้งเกิดจาก *V . cholerae* O1 ไบโอไทป์ classical จุดเริ่มต้นการระบาดเกิดที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำคงคา แล้วแพร่กระจายไปทั่วโลก และไม่พบโรคนี้ในที่อื่นๆ นอกจากสามเหลี่ยมปากแม่น้ำคงคาซึ่งเป็นโรคประจำท้องถิ่น การระบาดครั้งที่ 7 เกิดใน ค.ศ.1947 การระบาดครั้งนั้นต่างจากครั้งก่อนๆ โดยเกิดจาก *V. cholerae* O1 ไบโอไทป์ El Tor เริ่มต้นที่อินโดนีเซียกระจายไปแอฟริกา ยุโรปตอนใต้ อเมริกาใต้ และยังมีเชื้อนี้ระบาดอยู่เป็นช่วงๆ จนถึงปัจจุบัน (Faruque; Albert; and Mekalanos.1998: 1301-1314)

ในปี ค.ศ. 1992 พบว่ามีการระบาดของโรคอหิวาตกโรคในประเทศอินเดียและบังคลาเทศจากเชื้อซีโรไทป์ใหม่ที่ไม่ใช่ซีโรไทป์ O1 และมี O antigen ของเชื้อเป็นอันดับที่ 139 จึงให้ชื่อตามสถานที่พบครั้งแรกบริเวณอ่าวเบงกอลว่า *Vibrio cholerae* O139 Bengal เชื้อนี้พบใน 11 ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย มาเลเซีย ปากีสถานและเนปาล ต่อมาปี ค.ศ. 2001 มีรายงานอหิวาตกโรคใน 58 ประเทศ มีผู้ป่วย 184,311 ราย และมีผู้เสียชีวิต 2,728 ราย (Faruque; Albert; and Mekalanos.1998: 1301-1314)

สำหรับรายงานสถานการณ์ปัจจุบันของอหิวาตกโรคในประเทศไทย จากสำนักระบาดวิทยากรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่า ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ถึง 25 ธันวาคม 2550 มีรายงานผู้ป่วยอหิวาตกโรค ที่เข้ารับการรักษาในสถานบริการสาธารณสุขทุกระดับ รวมสะสมจาก 50 จังหวัดจำนวน 982 ราย เสียชีวิต 7 ราย เป็นชาวไทย 856 ราย ชาวต่างชาติ (ส่วนใหญ่เป็นแรงงานชาวพม่า) 126 ราย พบมากที่สุดกลุ่มอายุ 25-34 ปี รองลงมา 15-24 ปี ส่วนเชื้อที่พบ คือ *V. cholerae* El Tor Ogawa จำนวน 835 ราย *V. cholerae* El Tor Inaba จำนวน 141 ราย *V. cholerae* O139 จำนวน 5 ราย และ *Vibrio cholerae* El Tor Hikojima จำนวน 1 ราย (ที่จังหวัดขอนแก่น) ปัญหาสำคัญสำหรับการเกิดอหิวาตกโรคส่วนหนึ่งมาจากแรงงานต่างด้าวที่ลักลอบเข้ามาทำงานและย้ายถิ่นเป็นประจำ มีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีนัก จากการติดตามโรคพบว่ามีความสัมพันธ์กับการรับประทานอาหารที่ปรุงไม่สุก เช่น หอยแครง เนื้อหมู และการขับถ่ายที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะแพร่ระบาดไปในหลายจังหวัดของภาคต่าง ๆ (รายงานการเฝ้าระวังโรค เดือนธันวาคม 2550)

2.2 การก่อโรค (Pathogenicity)

ในธรรมชาติพบว่า *V. cholerae* สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในน้ำกร่อย โดยดำรงชีพด้วยการสร้างพลังงานน้อย ๆ พอมีชีวิตอยู่ได้ การขยายพันธุ์สัมพันธ์กับจำนวนแพลงตอนสัตว์ หรือแพลงตอนพืช เมื่อสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมเชื้อจะสร้าง biofilm เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมไม่แบ่งตัวและเพาะเชื้อไม่ขึ้น (Colwell; 2000: 121-125) การสำรวจและการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อในสิ่งแวดล้อมจึงทำได้ยาก การก่อโรคสัมพันธ์กับยีนก่อโรค (virulent gene) หลายชนิดเช่น ยีนที่ควบคุมการสร้าง TCP และยีนที่ควบคุมการสร้าง CTX ยีน TCP อยู่ในโครโมโซมของ *V. cholerae* ส่วนที่เรียกว่า *Vibrio* pathogenicity island เป็นส่วนที่ช่วยให้เชื้อสามารถเกาะบนผิวเยื่อบุลำไส้ และเพิ่มจำนวน ส่วน CTX ปกติจะเป็นยีนของ lysogenic bacteriophage และสามารถถ่ายทอดไปสู่ *V. cholerae* อื่นได้โดยกระบวนการ transduction สามารถชักนำ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงเปลี่ยนแปลงเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงได้ CTX สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการอุจจาระร่วง เชื้อ *V. cholerae* O1 และ O139 ที่ก่อโรคมีทั้งยีนควบคุมการสร้าง TCP และ CTX ในขณะที่ non-O1 และ non-O139 ไม่มียีนเหล่านี้ (Faruque; et al. 2004: 2123-2128)

มนุษย์เมื่อรับเชื้อที่มียีนก่อโรคเข้าไป เชื้อจะเพิ่มจำนวนและถูกขับออกทางอุจจาระ หากพฤติกรรมด้านสุขอนามัยไม่ดี ทำให้มีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้นในสิ่งแวดล้อม และเกิดการแพร่กระจายสู่ผู้อื่นต่อไป ปริมาณที่ทำให้เกิดโรค (infective dose) ในคนปกติประมาณร้อยล้านตัว (10^8 CFU/g) จากการศึกษาในคนไทยพบว่า ไบโอไทป์ El Tor จำนวนสิบล้านตัว (10^7CFU/g) สามารถทำให้ผู้รับเชื้อร้อยละ 90 เกิดโรค (Suntharasamai; et al. 1992: 502-505) ขณะที่เชื้อ *V. cholerae* O139 ในขนาดเดียวกันทำให้เกิดโรคในผู้รับเชื้อได้เพียงร้อยละ 75-80 (Pitisuttithum; et al. 2001: 920-925)

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล และคนอื่นๆ (2548) ทำการวิเคราะห์สภาพปัญหาความเสี่ยงของ *V. cholerae* ในกระบวนการผลิตกุ้งกุลาดำ สามารถตรวจพบการปนเปื้อน *V. cholerae* ชนิด non-O1/non-O139 ได้ในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำจืด และน้ำกร่อยโดยพบการปนเปื้อนในตัวอย่างจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในห่วงโซ่อาหารโดยเฉพาะน้ำใช้จากแหล่งเลี้ยงและสำหรับล้างสะพานปลา/แพซึ่งเป็นน้ำจากแม่น้ำ ลำคลองที่มีการปนเปื้อนเชื้อนี้ และพบในตัวอย่างน้ำแข็งที่สะพานปลา/แพ น้ำแข็งที่ใช้ในตลาดและน้ำแข็งที่ใช้ในโรงงาน นอกจากนี้พบการปนเปื้อน *V. cholerae* non-O1/nonO-139 จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เป็นวัตถุดิบในโรงงานกุ้งแช่เยือกแข็งซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนข้ามได้จากผู้ที่สัมผัสกุ้งกุลาดำได้

2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค (Virulence factor)

V. cholerae สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น Cholera toxin enterotoxin ชนิดที่ทนความร้อนและไม่ทนความร้อน cytotoxin, hemagglutinin และ cytolysin

2.3.1 Cholera toxin (CTX)

V. cholerae สร้างสารพิษที่เรียกว่าคอเลราทอกซิน หรือคอเลลาเจน (cholelagen) ซึ่งจัดเป็นเอนเทอโรทอกซินที่มีสมบัติไม่ทนความร้อนและกรด ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenylate cyclase *V. cholerae* ทำให้เกิดอุจจาระร่วงโดยไม่ทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยจะสร้างโปรตีน TCP ซึ่งยึดผ่านชั้นเยื่อเมือกที่ฉาบผิวเยื่อบุลำไส้ เมื่อเชื้อแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ขณะเดียวกันจะสร้าง CTX ซึ่งเป็นเอนเทอโรทอกซิน มีน้ำหนักโมเลกุล 84,000 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย หน่วยย่อย A 1 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตัน และ หน่วยย่อย B 5 หน่วย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 11.5 กิโลดาลตัน หน่วยย่อย B จะจับกับแกงกลิโอไซด์ GM1 รีเซพเตอร์ (ganglioside GM1 receptor) ของเซลล์เยื่อบุลำไส้แล้วเคลื่อนหน่วยย่อย A (หน่วยย่อย A ประกอบด้วย 2 คือ แฟรกเมนท์ A1 และ A2 แฟรกเมนท์ A2 หน้าที่เชื่อมจับกับหน่วยย่อย B และ A1 ทำหน้าที่ของความเป็นพิษ) เข้าไปในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กและแยกตัวออกเป็น A1 และ A2 หลังจากนั้น แฟรกเมนท์ A1 จะไปเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ adenylate cyclase ในเซลล์ทำให้ adenylate cyclase เปลี่ยน ATP เป็น cAMP เพิ่มขึ้น cAMP จะยับยั้งการดูดซึมโซเดียมกลับเข้าเซลล์ที่เซลล์ส่วนยอดของวิลไล และกระตุ้น crypt cell ให้หลั่งคลอไรด์เข้าสู่ลำไส้เล็ก CTX มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมของลำไส้ใหญ่ด้วย (Field; et al. 1972: 796-804) จึงทำให้น้ำและ อิเล็กโทรไลต์ จากเซลล์ลำไส้เล็กเข้าสู่ช่องว่างในลำไส้ (lumen) มากขึ้น ร่างกายจะมีการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ รวมทั้งไบคาร์บอเนตและโพแทสเซียมไอออนจากเลือด ทำให้ pH ของเลือดลดลง อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ โปรตีนและเม็ดเลือดแดงจะเข้มข้นขึ้น ทำให้เกิดการขาดเลือดและระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 136-139)

2.3.2 Enterotoxin

เป็นสารพิษจากแบคทีเรียชนิดเอกโซทอกซิน (exotoxin) ซึ่งจะมีเป้าหมายของการก่อให้เกิดพิษอยู่ที่ลำไส้ มีผลทำให้เกิดท้องร่วง และลำไส้อักเสบ (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. 2540) เช่น จากรายงานในปี ค.ศ. 1993 พบสาร accessory cholera enterotoxin (Ace) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการสะสมของของเหลวภายในลำไส้เล็กของกระต่ายได้ (Trucksis; et al. 1993: 5267–5271)

2.3.3 Cytolysin

เป็นสารพิษที่มีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง และสามารถใช้ในการบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น Zonula occludens toxin (Zot) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 44.8 กิโลดาลตัน เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของชั้นมิวโคซ่าในลำไส้เล็ก โดยมีผลต่อ tight junction นอกจากจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแตกแล้ว ยังสามารถกระตุ้นเอนไซม์ Guanylate cyclase ซึ่งช่วยเพิ่มระดับของ cyclic GMP ในเซลล์ทำให้เกิดการพองของเส้นเลือดและการบวมน้ำ (Baudry; et al.; 1992: 428–434; Fasano; et al. 1991: 5242–5246)

2.4 การรักษาโรค

การรักษาการติดเชื้อ *V. cholerae* จะมีการรักษาตามอาการโดยการทดแทนน้ำและอิเล็กโทรไลต์ที่ผู้ป่วยสูญเสียไป ในกรณีที่เกิดอาการรุนแรงจะมีการให้น้ำเกลือเข้าทางหลอดเลือดดำ (ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมไบคาร์บอเนต) ในอัตรา 2 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจากพ้นขีดอันตรายจากการช็อก การขาดน้ำและ ขาดอิเล็กโทรไลต์แล้ว จึงให้ดื่มน้ำเกลือผสมกลูโคส (ประกอบด้วย NaCl 3.5 กรัม $NaHCO_3$ 2.5 กรัม KCl 1.5 กรัม กลูโคส 20 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร) เพื่อให้ลำไส้ดูดซึมกลูโคสและดูดโซเดียมกลับคืน และมีการให้ยาปฏิชีวนะเช่น tetracycline chloramphenicol หรือ furazolidone เพื่อทำลายเชื้ออหิวาต์ในลำไส้ การให้ยาปฏิชีวนะเพื่อให้หายเร็วขึ้นแต่ไม่สามารถรักษาอาการขาดน้ำของผู้ป่วยได้โดยทั่วไปให้รับประทาน tetracycline 500 มิลลิกรัม วันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ในเด็กให้ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยแบ่งให้วันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน หรืออาจใช้ยา erythromycin 250 มิลลิกรัม วันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ในเด็กให้ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 139)

2.5 การตรวจวิเคราะห์ *V. cholerae* และ *V. mimicus*

การตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการแบบดั้งเดิม เป็นการใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์และจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้เวลานานจึงจะทราบผลการตรวจ และจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ (Macian; et al. 2000: 51-53) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบสูง นอกจากนี้ยังต้องอาศัยบุคลากรที่มี

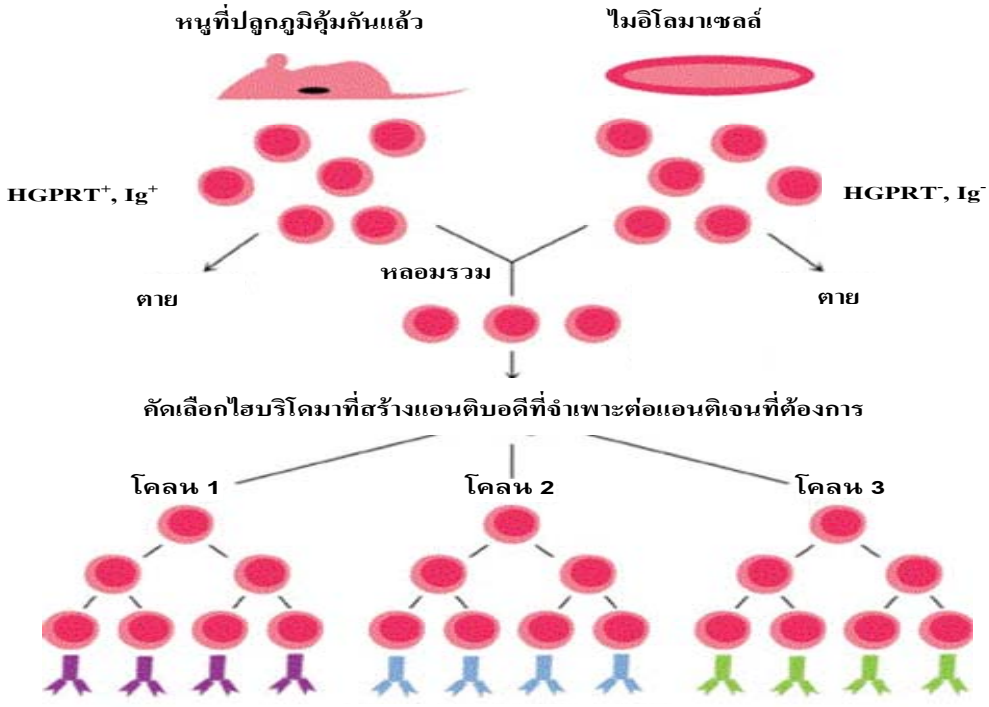
ความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง จึงส่งผลให้การศึกษาการระบาดของโรคทำได้ยาก การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางโมเลกุล (Chun; Hug and Colwell.1999: 2202-2208) เป็นอีกหนทางหนึ่งที่รวดเร็วและมีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ และห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

3. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่าง ๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

3.1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้ถูกคิดค้นเป็นผลสำเร็จโดย Köhler และ Milestein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอิโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่ไม่สามารถมีชีวิตยาวนานจึงมีอายุจำกัด ขณะที่ไมอิโลมาเซลล์จะไม่สามารถผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ตลอดให้คุณสมบัติความเป็นอมตะ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาหลอมรวมกัน ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุดซึ่งได้คุณสมบัติจากเซลล์มะเร็ง ดังภาพประกอบ 2 เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)



ภาพประกอบ 2 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

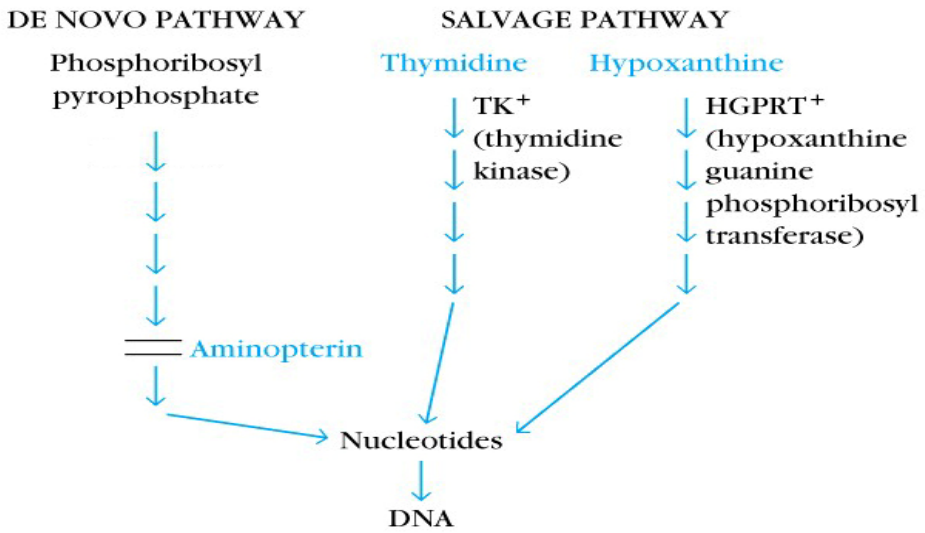
ที่มา: ดัดแปลงจากhttp://www2.hawaii.edu/…/Chap5_Ag_Ab_reactions.htm

3.2 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากที่มีการหลอมรวมไมอิโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีโดยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่จะมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ การใช้ไมอิโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในขบวนการ salvage pathway คือมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอิโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอิโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 ขบวนการ คือ *de novo* pathway และ salvage pathway ในกรณีของ *de novo* pathway (ภาพประกอบ 3) จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterine ดังนั้นเมื่อ *de novo* pathway ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้ salvage pathway โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน salvage pathway นั้นได้แก่ เอนไซม์ HGPRT และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใน salvage pathway ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวาง *de novo* pathway ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมอิโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig^-) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้าม ส่วนไมอิโลมาเซลล์เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆเช่นวิธี dot-blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)



ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิถี de novo และ วิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ aminopterine ในวิถี *de novo*

ที่มา: http://immuneweb.xxmc.edu.cn/images/figure04-21.jpg

3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค

ปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ได้แก่ (1) ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (2) ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการใช้รักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ เช่น ไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ Monodon Baculovirus (MBV) (Boonsanongchokying; et al. 2006), White Spot Syndrome Virus (WSSV) (Makesh; et al. 2006), Hepatopancreatic parvovirus (HPV) (Rukpratanporn; et al. 2005), Yellow Head Virus (YHV) (Sithigorngul; et al. 2002) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเปปไทด์ฮอร์โมนจากก้านตา (Panchan; et al. 2005) และเม็ดเลือด ของกุ้งกุลาดำ (Winotaphan; et al. 2005) นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ออกมามากมายดังแสดงไว้ในตาราง 2

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ได้มีผู้ศึกษาหลายสปีชีส์ด้วยกัน โดยส่วนใหญ่การศึกษาใน *V. cholerae* เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ

ทอกซินที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งการเกิดโรคท้องร่วงอาจเกิดจากทอกซินหลายชนิดทำให้ไม่สามารถตรวจพบทอกซินบางชนิดได้ ในปี ค.ศ.1988 Simonson และ Siebeling ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแกนของโปรตีน flagellar (H) ที่ทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *V. mimicus* พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ เกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง *V. cholerae* และ *V. mimicus* และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp.

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. mimicus* และสายพันธุ์ใกล้เคียงสำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *V. mimicus* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ และสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์สำหรับโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เพื่อที่จะสามารถแยกการติดเชื้อจาก *V. mimicus* ออกจาก *V. cholerae* และ *Vibrio* spp. อื่นๆ ได้ต่อไป

ตาราง 2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	แอนติเจนที่ใช้	วิธีที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์	เอกสารอ้างอิง
Vibrio parahaemolyticus	thermostable direct hemolysin	ELISA	Honda; et al. 1989
V. cholerae	heat stable enterotoxin	ELISA, amino acid sequence	Takeda; et al. 1990
Vibrio spp.	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Chen; et al. 1992
V. harveyi	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Phianphak; et al. 2005
V. vulnificus	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Pusiririt; et.al. 2005
V. alginolyticus	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Sithigorngul; et al. 2006
Escherichia coli	แฟลกเจลลา	ELISA, WB	He; et al. 1996
Campylobacter jejuni	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Lu; et al. 1997
Bacillus cereus	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Charni; et al. 2000
Photobacterium damselae ssp. *piscicida*	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB, IHC	Jung; et al. 2001
Bifidobacterium bifidum and *B. longum.*	Cell wall proteins	ELISA, WB	Amrouche; et al. 2006

IHC = Immunohistochemistry, WB = Western blot ,

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้มีดังนี้

1. หนูขาว (Swiss mice) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 25 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

2. กุ้งขาว *Penaeus vannamei* บ่อรังสิต คลอง 8

3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 3)

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument, Germany

2. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., Switzerland

3. เครื่องชั่ง รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius, Germany

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

5.เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท LEICA

6. แท่นอุ่นสไลด์ (Slide warmer) ของบริษัท Medax

7.หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

8. ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัท Sanyo, Thailand

9. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

10. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) รุ่น NU-2500V ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.

11. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น NU-201-330E ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.

12. ตู้แช่แข็ง -20°C ของบริษัท Sanyo, Thailand

13. ตู้แช่แข็ง -70°C ของบริษัท Sanyo, Thailand

14. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

15. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70 ของบริษัท Olympus

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A. (ภาคผนวก ก)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A. (ภาคผนวก ก)

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท GIBCO,U.S.A. (ภาคผนวก ค)

4. Fetal bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

5. Calf bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

6. D-glucose ของบริษัท GIBCO, U.S.A.

7. L-glutamine ของบริษัท GIBCO, U.S.A.

8. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

9. $NaHCO_3$ ของบริษัท AMRESCO

10. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) บริษัท AMRESCO, U.S.A.

11. HT supplement ของบริษัท GIBCO, U.S.A.

12. Aminopterin ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

13. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

14. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

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

16. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

17. SDS (sodium dodecyl sulfate) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

18. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

19. SDS molecular weight markers ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

20. ชุดตรวจสอบ Hybridoma sub-isotyping, mouse ของบริษัท Zymed, U.S.A.

21. เอทิลแอลกอฮอลล์ (ethyl alcohol) ของบริษัท BDH

22. N-butyl alcohol ของบริษัท Univar, Australia

23. ไซลีน (xylene) ของบริษัท Carlo Erba, Germany

24. Formaldehyde ของบริษัท Carlo Erba, Germany

25. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (ภาคผนวก ช)

26. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10) (ภาคผนวก ช)

27. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

28. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

29. อีโอซีน (Eosin Y) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮออล์ บริษัท Harleco, U.S.A. (ภาคผนวก ช)

30. ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) ของบริษัท Harleco, U.S.A. (ภาคผนวก ช)

31. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) ของบริษัท Sherwood, U.S.A.

32. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) ของบริษัท DIFCO, U.S.A. (ภาคผนวก ช)

33. Davidson's fixative (ภาคผนวก ช)

34. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) ของบริษัท Riedel-de Haen

35. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) ของบริษัท Merck, Germany

36. Permount ของบริษัท Ficther Scientific

37. GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

ตาราง 3 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน (*) และใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. cholerae* และ *V. mimicus*

No.	Bacteria	Institute	Source
1.	*Vibrio mimicus* 15142 (VM1)	DMSC	patient
2.	*V. mimicus* 22088 (VM2)*	DMST	food
3.	*V. mimicus* 22089 (VM3)*	DMST	food
4.	*V. mimicus* 22090 (VM4)*	DMST	food
5.	*V. mimicus* 24053 (VM5)	DMST	food
6.	*V. mimicus* 24054 (VM6)	DMST	water
7.	*V. mimicus* 24055 (VM7)	DMST	water
8.	*V. mimicus* 24056 (VM8)	DMST	food
9.	*V. mimicus* B1.4 (VM9)	SWU	*P.vannamei*
10.	*V. mimicus* 27430 (VM10)	DMST	rectal swab
11.	*V. cholerae* 4907014 nonO1,O139,141(VC1)	SWU	*P.vannamei*
12.	*V. cholerae* 22115 O1,El Tor, Inaba (VC2)*	DMST	stool
13.	*V. cholerae* 22116 O1,El Tor, Inaba (VC3)	DMST	stool
14.	*V. cholerae* 22117 O1,El Tor, Inaba (VC4)	DMST	stool
15.	*V. cholerae* 22118 O1,El Tor, Inaba (VC5)	DMST	stool
16.	*V. cholerae* 22125 O1,El Tor, Ogawa (VC6)*	DMST	rectal swab
17.	*V. cholerae* 22126 O1,El Tor, Ogawa (VC7)	DMST	rectal swab
18.	*V. cholerae* 22127 O1,El Tor, Ogawa (VC8)	DMST	rectal swab
19.	*V. cholerae* 22128 O1,El Tor, Ogawa (VC9)	DMST	rectal swab
20.	*V. cholerae* 22135 O139 (VC10)*	DMST	stool
21.	*V. cholerae* 22136 O139 (VC11)	DMST	stool
22.	*V. cholerae* 22137 O139 (VC12)	DMST	stool
23.	*V. cholerae* 22138 O139 (VC13)	DMST	stool
24.	*V. cholerae* 22413 O141 (VC14)	DMST	?
25.	*V. cholerae* 22140 non O1, O139,141 (VC15)*	DMST	food
26.	*V. cholerae* 22141 non O1, O139,141 (VC16)*	DMST	food
27.	*V. cholerae* 22142 non O1, O139, 141 (VC17)	DMST	food
28.	*V. cholerae* 22143 non O1, O139, 141 (VC18)	DMST	stool
29.	*V. cholerae* 22144 non O1, O139, 141 (VC19)	DMST	?
30.	*V. cholerae* B20 non O1, O139, 141 (VC20)	SWU	*P. vannamei*
31.	*V. cholerae* 27424 non O1, O139, 141 (VC21)	DMST	shrimp
32.	*V. cholerae* 27425 non O1, O139, 141 (VC22)	DMST	water
33.	*V. cholerae* 24087 non O1, O139, 141 (VC23)	DMST	food
34.	*V. fluvialis* 22085	DMST	rectal swab
35.	*V. fluvialis* 22086	DMST	stool
36.	*V. fluvialis* 22087	DMST	stool
37.	*V. fluvialis* 24049	DMST	stool
38.	*V. fluvialis* 24050	DMST	stool
39.	*V. fluvialis* 24051	DMST	stool
40.	*V. fluvialis* 24052	DMST	stool
41.	*V. vulnificus* (VVB)	DABU	sea bass
42.	*V. vulnificus* VVBs	DABU	sea bass
43.	*V. vulnificus* MT1506	DABU	?
44.	*V. vulnificus* 4907006	SWU	*P. vannamei*
45.	*V. vulnificus* 4907001	SWU	*P. vannamei*
46.	*V. vulnificus* 4907011	SWU	*P. vannamei*
47.	*V. vulnifucus* 27426	DMST	hemoculture
48.	*V. vulnifucus* 27427	DMST	blood
49.	*V. vulnifucus* 27428	DMST	hemoculture
50.	*V. vulnifucus* 27429	DMST	hemoculture
51.	*V. harveyi* 639	Centex	?
52.	*V. harveyi* 1526	Centex	?
53.	*V. harveyi* 114 (VHS1)	Centex	?
54.	*V. harveyi* 47666-1	DABU	?
55.	*V. harveyi*	GB	?
56.	*V. harveyi*	GB	?
57.	*V. harveyi* 22888	GB	?
58.	*V. harveyi* 22889	GB	?
59.	*V. harveyi* 22891	GB	?
60.	*V. harveyi* 22893	GB	?
61.	*V. harveyi* 22894	GB	?
62.	*V. harveyi* 22895	GB	?
63.	*V. harveyi* 120	GB	?
64.	*V. harveyi* 152	GB	?
65.	*V. harveyi* 170	GB	?
66.	*V. harveyi* 612	GB	?
67.	*V. harveyi* 886	GB	?
68.	*V. harveyi* H1	CPF	?
69.	*V. harveyi* H2	CPF	?
70.	*V. harveyi* H3	CPF	?
71.	*V. harveyi* H4	CPF	?
72.	*V. harveyi* H5	CPF	?
73.	*V. campbellii* 21361	GB	?
74.	*V. campbellii*21362	GB	?
75.	*V. campbellii* 21363	GB	?
76.	*V. alginolylticus* 22082	DMST	stool
77.	*V. alginolylticus* 22083	DMST	food
78.	*V. alginolylticus* 22084	DMST	food
79.	*V. alginolylticus* 14800	DMSC	seafood
80.	*V. alginolylticus* Y16	DBSWU	shrimp pond
81.	*V. alginolylticus* BY2	DBSWU	shrimp pond
82.	*V. alginolylticus* Y2	DBSWU	seawater
83.	*V. alginolylticus* Y3	DBSWU	seawater
84.	*V. alginolylticus* Y4	DBSWU	seawater
85.	*V. alginolylticus* 24045	DMST	food
86.	*V. alginolylticus* 24046	DMST	food
87.	*V. alginolylticus* 24047	DMST	stool
88.	*V. alginolylticus* 24048	DMST	water
89.	*V. parahaemolyticus* 22091	DMST	stool
90.	*V. parahaemolyticus* 22092	DMST	food
91.	*V. parahaemolyticus* 22093	DMST	food
92.	*V. parahaemolyticus* 22094	DMST	stool
93.	*V. parahaemolyticus* 1 (VPV)	VMARC	aquatic animals
94.	*V. parahaemolyticus* 2 (VPB)	DABU	*P. monodon*
95.	*V. parahaemolyticus* 5665	DMSC	stool
96.	*V. parahaemolyticus* 45034	CECT	stool
97.	*V. parahaemolyticus* 23794	DMST	stool
98.	*V. parahaemolyticus* 23795	DMST	stool
99.	*V. parahaemolyticus* 23796	DMST	stool
100.	*V. parahaemolyticus* 23797	DMST	stool
101.	*V. ordalii* (VIB 02	DABU	?
102.	*V. penaeicida*	DMSC	?
103.	*V. anguillarum* AVL01	DABU	?
104.	*Aeromonas hydrophila* 22097	DMST	?
105.	*A. caviae* 22106	DMST	?
106.	*A. sobria* 22100	DMST	?
107.	*A. veronii* 21255 ATCC 35624	DMST	?
108.	*A. jandaei* 21256 ATCC 49568	DMST	?
109.	*Plesiomonas shigelloides* 22107	DMST	rectal swab
110.	*Enterobacter cloacae*	DMSM	?
111.	*Escherichia coli* ATCC 25922	CPF	?
112.	*Klebsiella pneumoniae*	DMSM	?
113.	*Morganella morganii*	DMSM	?
114.	*Proteus vulgaris*	DMSM	?
115.	*Pseudomonas aeruginosa*	DMSM	?
116.	*Salmonella* Enteritidis 7108	DMST	?
117.	*Salmonella* Typhi	DMSM	?
118.	*Salmonella* Typhimurium ATCC 1408	CPF	?
119.	*Shigella flexneri*	DMSM	?

Note:
CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University.
CPF = Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd.
DABU = Department of Aquatic Science, Burapa University.
DMSC = Department of Microbiology, Faculty of Science,Chulalongkorn University.
DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University.
DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand.
SWU = Department of Biology, Srinakharinwirot University.
? = unknown

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

รวบรวมแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 3 โดยนำแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (Difco) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar ที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดเก็บเซลล์ให้อยู่ในรูปแบบสารแขวนลอยโดยใช้ 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) นำสารแขวนลอยที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารแขวนลอยด้วย PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ซึ่งจะมีแบคทีเรียประมาณ $1x10^9$ CFU/ml นำแบคทีเรียที่ได้ส่วนหนึ่งไปเตรียมแอนติเจนใช้สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนู แบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งนำไปเก็บรักษาในอาหารเลี้ยง tryptic soy broth ที่เติมกลีเซอรอล 20% เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

1.2 การเตรียมแอนติเจน

นำแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ที่เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 1.1 มาฆ่าด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาเตรียมเป็นแอนติเจน 2 รูปแบบ คือ 1. รูปแบบ heat-killed โดยเติม PBS อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ 2. รูปแบบ formalin fixed form เติม formaldehyde 40 % อัตราส่วน 1:10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำแบคทีเรียที่เตรียมได้ทั้ง 2 รูปแบบ มาแบ่งใส่ในหลอด microfuge แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูต่อไป

1.3 การปลูกภูมิคุ้มกัน

นำแบคทีเรียที่เตรียมจากข้อ 1.2 ทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ฉีดเข้าที่ช่องท้องของหนูขาว (swiss mice) โดยใช้ *V. mimicus* เป็นแอนติเจนจำนวน 4 ตัว และใช้ *V. cholerae* เป็นแอนติเจนจำนวน 4 ตัว หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นทุก 2 สัปดาห์ 3 ครั้ง ด้วยส่วนผสมของแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดหนูแต่ละตัวจากแอ่งเลือดบริเวณตา (orbital sinus) แล้วปั่นแยกซีรัมออกจากเลือดที่แข็งตัว นำซีรัมที่ได้ไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ไอโซเลตต่างๆ โดยวิธี Western blotting แล้วเลือกหนูตัวที่มีการตอบสนองดีที่สุดมาใช้สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดัดแปลงจากวิธีการซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein (1975) ดังภาพประกอบ 4 โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดกระตุ้นด้วยแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร อีกครั้ง ก่อนการผลิตเซลล์ลูกผสม 3 วัน จากนั้นผ่าตัดแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) เข้มข้น 50% เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI บ่มเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นแยกเซลล์ผสม จากนั้นกระจายเซลล์ลงเลี้ยงใน 96 wells microculture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) กับ 20% fetal bovine serum (FBS) และเม็ดเลือดแดง 0.5% จำนวน 20 ถาด บ่มเซลล์ในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 10 วัน ตรวจดูการเจริญของเซลล์ในหลุมต่างๆ ภายใต้กล้อง inverted microscope คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry นำไฮบริโดมาที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้วมาโคลนซ้ำ (reclone) โดยวิธี limited dilution เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และทดสอบด้วยวิธี dot blotting จากนั้นขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ แล้วจะเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิประมาณ (-196 องศาเซลเซียส) ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะเก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป

ฉีดแบคทีเรียรูปแบบ heat-killed และ
formalin fixative form ผสมกับ
แอดจูแวนท์ที่ช่องท้อง

เซลล์ไมอิโลมาP3X
HGPRT$^-$

ฉีดกระตุ้นด้วยแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบ
ก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา
3 วัน
ผ่าตัดม้ามหนู

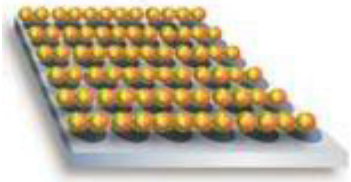
เซลล์ม้าม 10^8 เซลล์

2×10^7 เซลล์

PEG

37°C, 5%CO_2, 2 ชม.

HAT medium
37°C, 5%CO_2, 10-12 วัน



คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา
- Dot bloting
- Western blotting
- Immunohistochemistry

การโคลนด้วยวิธี limited dilution

เซลล์ไฮบริโดมา
(เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว)

น้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (MAb)

ภาพประกอบ 4 แผนภาพการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

(ดัดแปลงจาก: http://www.jpt.com/content/pep/immuno_tools/customized.htm)

3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี Dot blotting

นำแบคทีเรีย *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ทั้ง 2 รูปแบบ มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto (นมพร่องมันเนย 5% ที่ละลายใน PBS) เป็นเวลา 30 นาที ตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลส และใส่ใน microculture plate จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (เจือจาง 1:4 ใน 1% blotto) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5%blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจะเกิดเป็นจุดสีดำ นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลเป็นบวกไปคัดเลือกในขั้นที่ 2 (ภาพประกอบ 5 และ 6)

3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2

3.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting

นำแบคทีเรีย *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ในรูปแบบ heat-killed มาแยกใน 15% SDS-PAGE โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นำเจลที่ได้ส่วนหนึ่งนำไปย้อมสี Coomassie blue อีกส่วนหนึ่งนำมาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสลงใน microculture plate ที่มีสารละลาย 1% blotto บ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (เจือจาง 1:40 ใน 1% blotto) จากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5% blotto จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีการ dot blotting ตามวิธีในข้อ 3.1 ตรวจสอบผลโดยเปรียบเทียบกับผลของพอลิโคลนอลแอนติบอดี (ภาพประกอบ 6)

3.2.2 การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้ามโดยวิธี Dot blotting

นำแบคทีเรีย *V. mimicus* และ *V. cholerae* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml ในรูปแบบ heat-killed มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด อบที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นแช่ใน สารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสลงใน microculture plate ที่มีสารละลาย 1% blotto บ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (เจือจาง 1:40 ในสารละลาย 1% blotto) จากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5% blotto นำไปผ่านขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีการ dot blotting ตามวิธีในข้อ 3.1 ตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จากจุดสีดำ (ภาพประกอบ 5 และ 6)

แบคทีเรียรูปแบบ heat-killed : formalin fixed form (1:1)

หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

อบที่ 60 °C 10 นาที

แช่ใน สารละลาย 5% blotto

30 นาที

เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 5 ชั่วโมง

ล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที

เติม GAM-HRP 1 : 1500

บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 3 ชั่วโมง

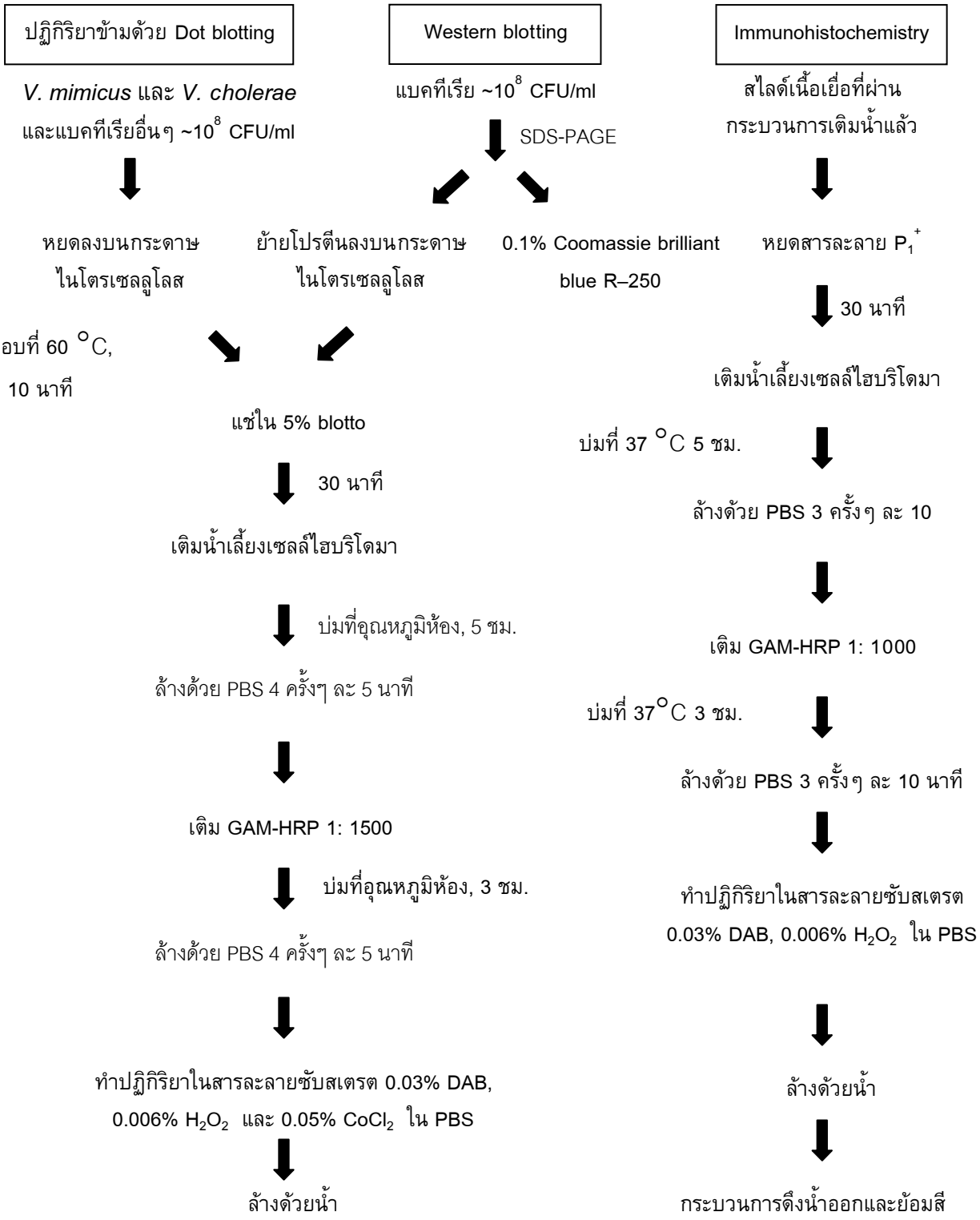
ล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS

ล้างด้วยน้ำ

ภาพประกอบ 5 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 (ข้อ 3.1) ด้วยวิธี Dot blotting

(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000)



ภาพประกอบ 6 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 2 (ข้อ 3.1 และ 3.2) ด้วยการวิเคราะห์ Western blotting ปฏิกิริยาข้ามด้วย Dot blotting และ Immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อกุ้งขาว

(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000)

3.2.3 การคัดเลือกโดยวิธี Immunohistochemistry

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างกุ้งขาว

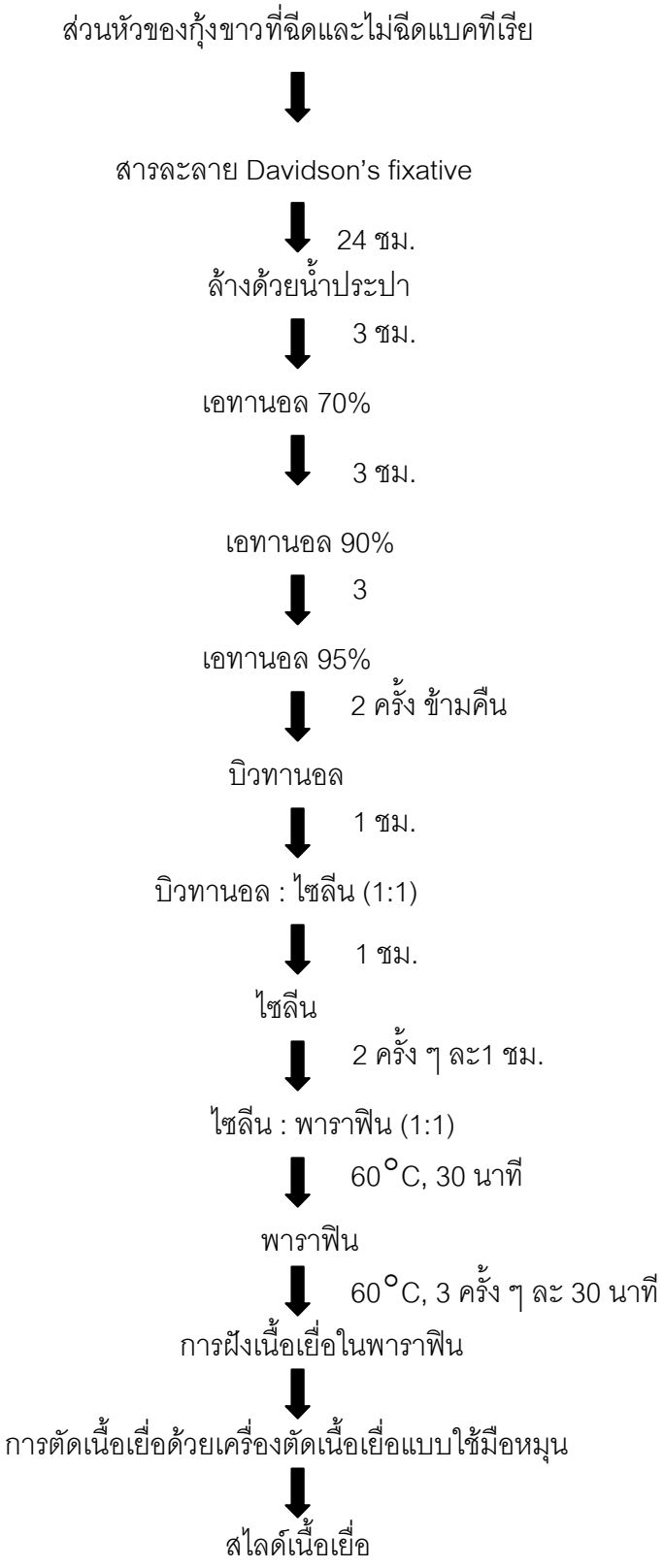
นำกุ้งขาวน้ำหนักประมาณ 20 กรัม มาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็มประมาณ 5 ส่วนในพันส่วน จากนั้นฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรีย *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ที่ยังมีชีวิตความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อตัว เก็บกุ้งขาวที่ผ่านการฉีดและไม่ฉีดแบคทีเรีย (กลุ่มควบคุม) มาสลบในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนหัวแช่ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ต่อไป

3.2.3.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

นำส่วนหัวของกุ้งขาวที่แช่ในสารละลาย Davidson's fixative มาล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างน้ำยาคงรูปออก จากนั้นผ่านกระบวนการล้างและดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ และไซลีน ตามลำดับ ฝังในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 โมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโตม ติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน แล้วนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 7)

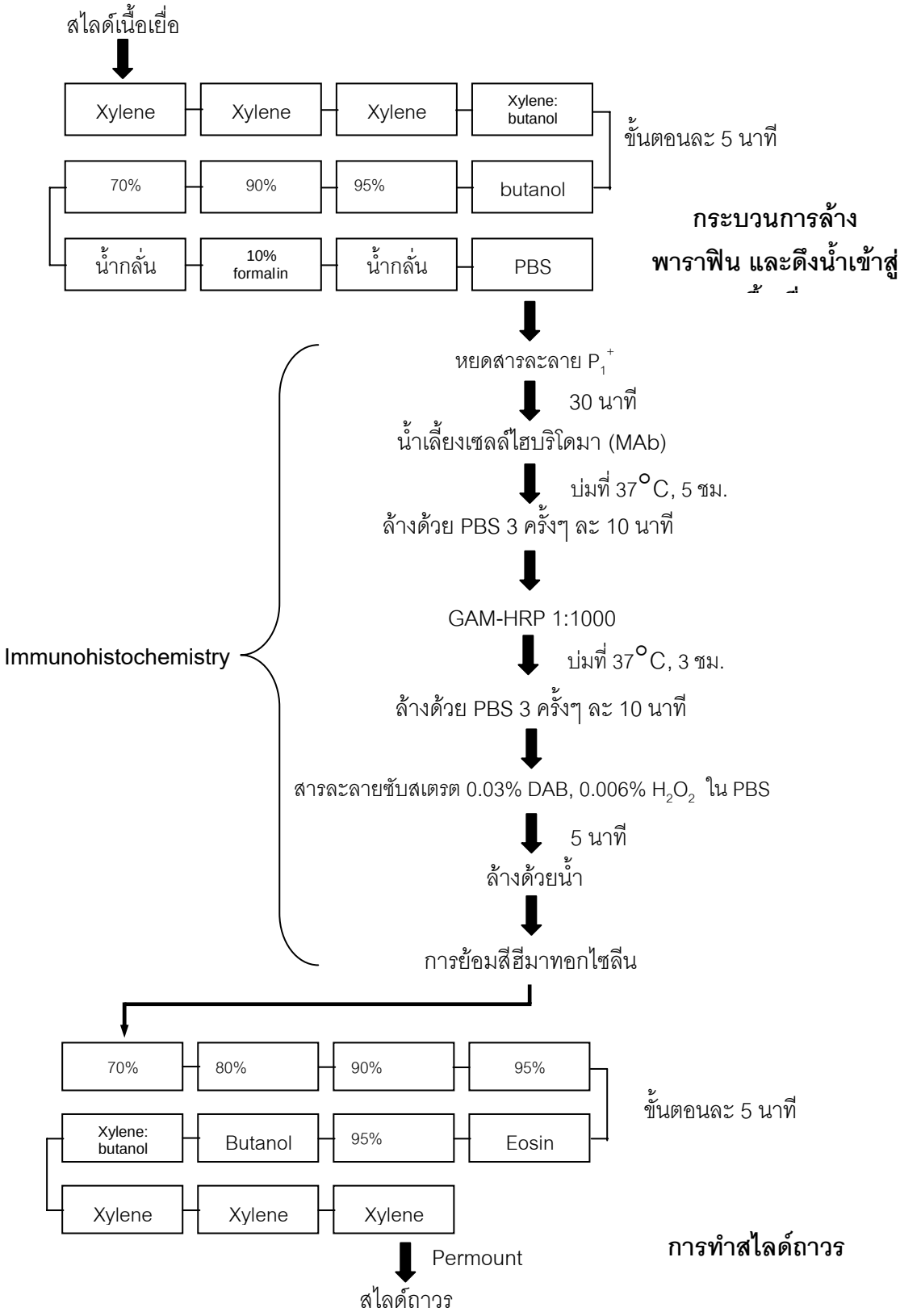
3.2.3.1.2 การวิเคราะห์ immunohistochemistry

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาล้างพาราฟินออกในไซลีน และผ่านกระบวนการเติมน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ 95, 90,80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลิน 10% ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และหยดสารละลาย P_1^+ (calf bovine serum 10% ใน PBS) คลุมเนื้อเยื่อ เก็บในกล่องเก็บความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นที่ 1 ข้อ 3.1 มาหยดคลุมเนื้อเยื่อบนสไลด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03% และ H_2O_2 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีด้วยฮีมาทอกไซลีนและอีโอซีน ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ และไซลีน ตามลำดับ หยดทับด้วย Permount และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลเป็นบวกจะติดสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 7 และ 8)



ภาพประกอบ 7 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งขาวสำหรับการวิเคราะห์ immunohistochemistry

(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000)



ภาพประกอบ 8 แผนผังการเตรียม IHC ในเนื้อเยื่อกุ้งขาว

(ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000)

3.3 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกแล้วมากระจายในหลุมโดยใช้ปิเปต ค่อยๆดูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง หยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 ไมโครลิตร ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ โดยนำไปตรวจดูภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นเติม HT medium (RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, เม็ดเลือดแดง 0.5%, hypoxanthine และ thymidine) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน microculture plate (96 หลุมต่อถาด) 48 หลุมแรก (แถว 1-6) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม HT medium เพิ่มในจานเลี้ยงเชื้ออีก 2.5 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ลงใน 48 หลุมหลัง (แถว 7-12) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มใน CO_2 incubator 5% CO_2 37 องศาเซลเซียสประมาณ 10-12 วัน ตรวจสอบหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบ dot blotting และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์

3.4 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

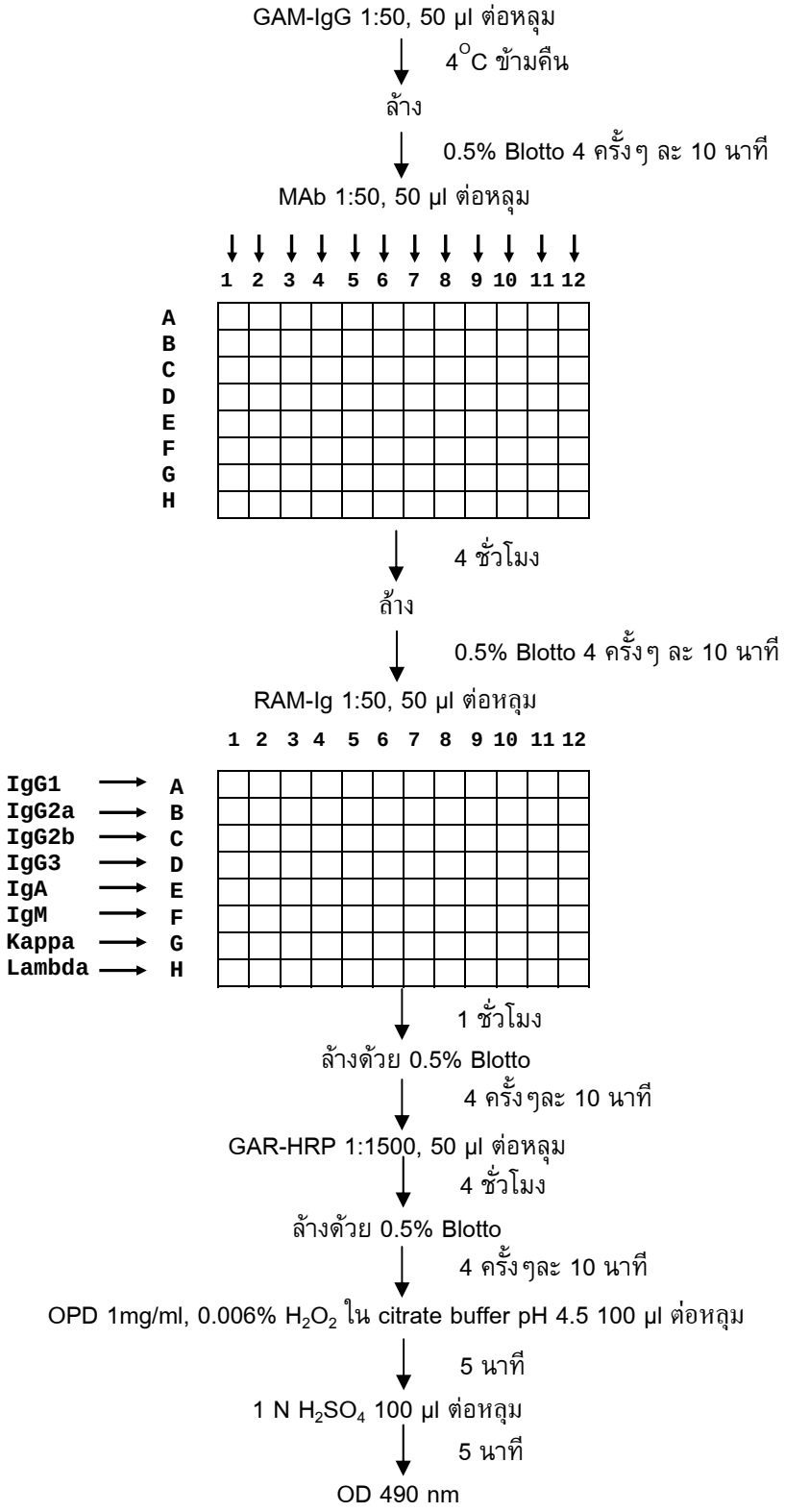
เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum กระจายและดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอด ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกจากเซลล์ไฮบริโดมาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป จากนั้นเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12% (DMSO) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดสำหรับเซลล์แช่แข็ง (cryopreservation tube) เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

4. การศึกษาสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากการ reclone เซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือก จะยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ได้โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 และตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาจำแนก class และ subclass ด้วยวิธี sandwich ELISA และตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหา *V. mimicus* และ *V. cholerae* ด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีการดังต่อไปนี้

4.1 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี sandwich ELISA โดยใช้ sub-isotyping kit จาก Zymed Laboratories ทำโดยเคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วย GAM-IgG (goat anti-mouse IgG) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมสารละลาย 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:50 ในสารละลาย 5% blotto แถวละ 1 ชนิด (1-12) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติม rabbit anti-isotype antibodies (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, λ และ κ) เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto แถวละ 1 ชนิด (A-H) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม GAR-HRP (goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.006% H_2O_2 ใน 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 นอร์มอล กรดซัลฟูริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลโดยสังเกตสีที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม หรืออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจะให้สีเข้ม 1 หลุมตาม isotype และอีก 1 หลุมตามชนิดของโปรตีนสายสั้น (light chain) (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 วิธีการทดลองการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ดัดแปลงจาก Winotaphan. et al. 2005: 189-198)

4.2 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับอิพิโทปต่าง ๆของแบคทีเรียด้วยวิธี indirect ELISA

เคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วยแบคทีเรีย *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ที่ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonicate หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงและล้างด้วยสารละลาย 5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมสารละลาย 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:10 ในสารละลาย 5% blotto รวมหลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยเติมในแถวแนวนอนและแนวตั้ง จากซ้ายไปขวา (ตาราง 6) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต OPD 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.006% H_2O_2 ใน 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 นอร์มอล กรดซัลฟูริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

ตาราง 4 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน (MAbs = monoclonal antibodies)

MAbs	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6	1+7	1+8	1+9
2		2+2	2+3	2+4	2+5	2+6	2+7	2+8	2+9
3			3+3	3+4	3+5	3+6	3+7	3+8	3+9
4				4+4	4+5	4+6	4+7	4+8	4+9
5					5+5	5+6	5+7	5+8	5+9
6						6+6	6+7	6+8	6+9
7							7+7	7+8	7+9
8								8+8	8+9
9									9+9

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. mimicus* โดยวิธี dot blotting

นำ *V. mimicus* ทั้ง 2 รูปแบบ เข้มข้น 10^9 CFU/ml มาเจือจางแบบ ten fold serial dilution ด้วย PBS แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (เจือจาง 1:200 ใน 1% blotto) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5% blotto นำไปผ่านขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีการ dot blotting ตามวิธีในข้อ 3.1 ตรวจสอบจุดสีดำที่เกิดขึ้น โดยดูระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

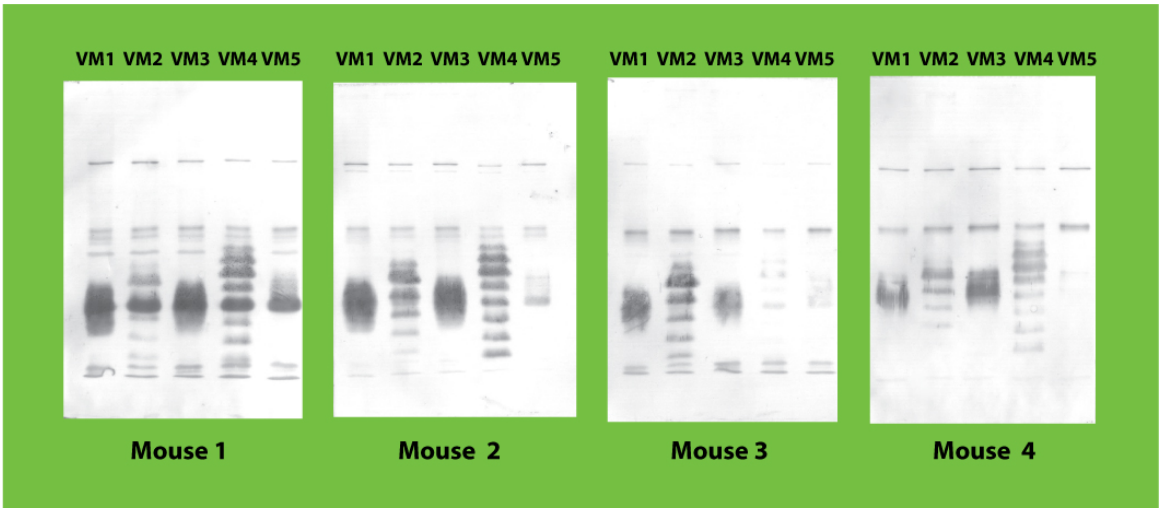
4.4 การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างอุจจาระ

นำ *V. mimicus* VM1 หรือ *V. cholerae* VC2 ที่เก็บอยู่ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มา เลี้ยงในอาหาร tryptic soy agar จากนั้นนำเชื้อมาผสมใน PBS นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางเซลล์ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 (มีแบคทีเรียประมาณ $1x10^9$ CFU/ml) นำเซลล์แขวนลอยนี้มาเจือจางแบบ ten fold serial dilution ใน alkaline peptone water (APW) ที่มีตัวอย่างอุจจาระผสมอยู่ (1:10) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7-1 CFU/ml โดยใช้หลอดที่ไม่มีการผสมเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่บ่มดังกล่าวมาทำ heat-killed ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำเชื้อที่ได้ผ่านการฆ่าด้วยความร้อนมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 นำไปผ่านขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีการ dot blotting ตามวิธีในข้อ 3.1 ตรวจสอบผลที่ได้

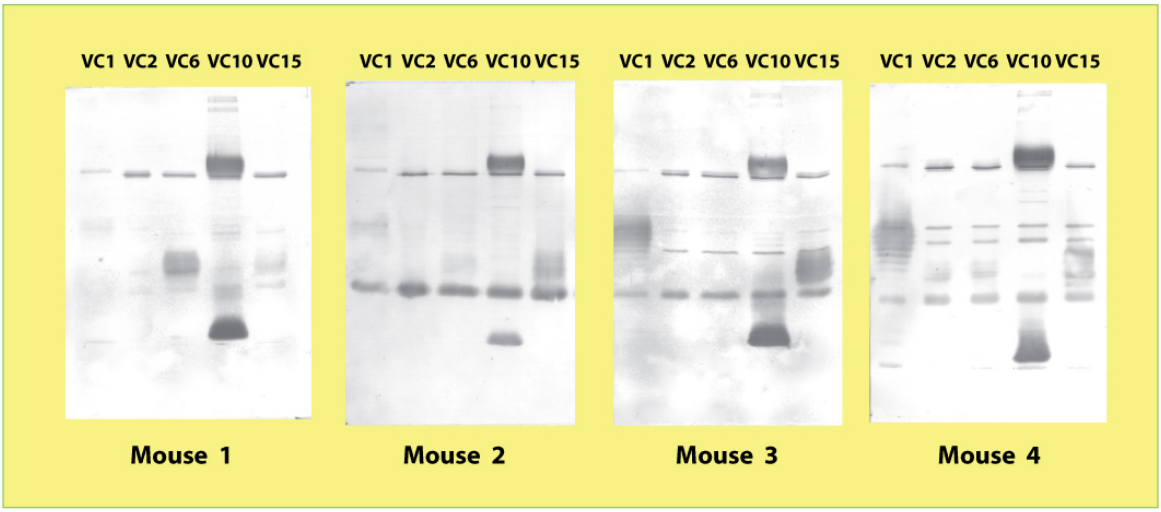
บทที่ 4
ผลของการทดลอง

1. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 แล้ว ทำการเก็บแอนติซีรัม (พอลิโคลนอลแอนติบอดี) นำมาดูดซับด้วย *A. hydrophila* DMST 22097 และนำมาทดสอบความจำเพาะกับ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* สามารถจับกับแถบแอนติเจนของ *V. mimicus* ทั้ง 5 ไอโซเลตได้เป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* สามารถจับกับแถบแอนติเจนของ *V. cholerae* ทั้ง 5 ไอโซเลตได้เป็นจำนวนมาก โดยหนูตัวที่ 1 ของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* และ หนูตัวที่ 4 ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* ให้ผลการตอบสนองดีที่สุด โดยพบแถบโปรตีนเป็นจำนวนมากและชัดเจนกว่าหนูตัวอื่นๆ (ภาพประกอบ 10 และ 11) ดังนั้นจึงได้นำหนูตัวที่ให้ผลการตอบสนองดีที่สุดนี้มาทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป



ภาพประกอบ 10 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวที่ฉีดด้วย *V. mimicus* ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *V. mimicus* VM1, VM2, VM3, VM4 และ VM5 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับ mouse-anti *V. mimicus* antiserum จากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)



ภาพประกอบ 11 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวที่ฉีดด้วย *V. cholerae* ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *V. cholerae* VC1, VC2, VC6, VC10 และ VC15 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับ mouse-anti *V. cholerae* antiserum จากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)

2. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในครั้งแรกใช้หนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* ที่มีการตอบสนองดีที่สุด ทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดประมาณ 2,000 หลุม จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่ามี culture media ประมาณ 65 หลุม ที่ให้ผลบวก โดยแต่ละหลุมมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting, immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ พบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 9 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับบางไอโซเลตต่างๆ ภายในสายพันธุ์ โดยสามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 6 กลุ่ม (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 12)

ส่วนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในครั้งที่ 2 ใช้หนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* ที่มีการตอบสนองดีที่สุด ทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดประมาณ 2,000 หลุมเช่นเดียวกัน จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่ามี culture media ประมาณ 15 หลุม ที่ให้ผลบวก โดยแต่ละหลุมมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting, immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ พบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 2 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับไอโซเลตต่างภายในสายพันธุ์ โดยสามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 2 กลุ่ม

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดลองสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* ออกเป็น 6 กลุ่ม (ตาราง 6) ดังนี้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VM-1* ซึ่งมีความจำเพาะต่อ VM2 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 12-A) สามารถจับกับแอนติเจนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ13-2A) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ VM2 ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 14)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 4 โคลน คือ *VM-2, 9, 16* และ *18* ซึ่งมีความจำเพาะต่อไอโซเลต VM1 และ VM3 เท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 12-B) โดยสามารถจับกับแถบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 18-30 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ13-2B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ VM1 และ VM3 ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 15)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VM-8* ซึ่งมีความจำเพาะต่อ VM4 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 12-C) สามารถจับกับกลุ่มแถบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 15-30 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13-2C) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ VM4 ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 16)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VM-17* มีความจำเพาะต่อ *V. mimicus* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ (VM1-10) โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพประกอบ 12-D) และสามารถจับกับแถบแอนติเจน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5 และ 14 กิโลดาลตัน และจับกับแถบแอนติเจนบางๆ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13-2D) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *V. mimicus* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VM-19* มีความจำเพาะต่อ *V. mimicus* ทุกไอโซเลต (VM1-10) และสามารจับกับ *V. cholerae* ได้ทุกไอโซเลต (VC1-23) ที่ใช้ในการทดสอบ โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพประกอบ 12-E) สามารถจับกับแถบแอนติเจน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5 และ 14 กิโลดาลตัน และจับกับแถบแอนติเจนบางๆน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13-2E) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *V. mimicus* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 17)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VM-14* มีความจำเพาะต่อ *V. mimicus* ทุกไอโซเลต (VM1-10) และ *V. cholerae* ทุกไอโซเลต (VM1-23) ที่ใช้ในการทดสอบ

เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพประกอบ 12-F) แต่สามารถจับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 และ 32 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 13-2F) และไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *V. mimicus* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 7 และ 8 เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* (ตาราง 6) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VC-11* มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* O1, El Tor, Ogawa ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ (VC6-9) โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. cholerae* O1, El Tor, Inaba, *V. cholerae* สายพันธุ์อื่น และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพประกอบ 12-G) และไม่สามารถจับกับแถบโปรตีนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 13-2G) และไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *V. cholerae* ในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธี immunohistochemistry ได้

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย 1 โคลน คือ *VC-20* มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* O1, O139 และ O141 ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยกับ VC8 โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ภาพประกอบ 12-H) และไม่สามารถจับกับแถบโปรตีนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 13-2H) และไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. cholerae* ในเนื้อเยื่อกุ้งเช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7

4. ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับอิพิโทปต่าง ๆของแบคทีเรียด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและโมโนโคลนอลแอนแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 (*VM-2, VM-9, VM-16* และ *VM-18*) ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) ไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงเมื่อผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-2, VM-16* และ *VM-18* แต่เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ผสมกับ *VM-9* พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 ชนิดนี้มาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับแอนติเจนที่ต่างกลุ่มออกไป (*VM-17* และ *VM-19*) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด (*VM-2, VM-16* และ *VM-18*) จับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกันแต่แตกต่างจาก *VM-9* ในกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 (*VM-17*) และ 5 (*VM-19*) จับกับแอนติเจนเดียวกันแต่มีความจำเพาะต่างกัน แสดงว่าจับอิพิโทปต่างกัน ดังนั้นการรวมกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น (ตาราง 5)

5. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 กลุ่มที่ผลิตได้ส่วนใหญ่สร้างแอนติบอดีที่ มี class และ subclass เป็น IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3 และ มีเพียง 4 โคลนที่สร้าง IgM (ตาราง 6)

6.การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. mimicus* และ *V. cholerae* โดยวิธี dot blotting

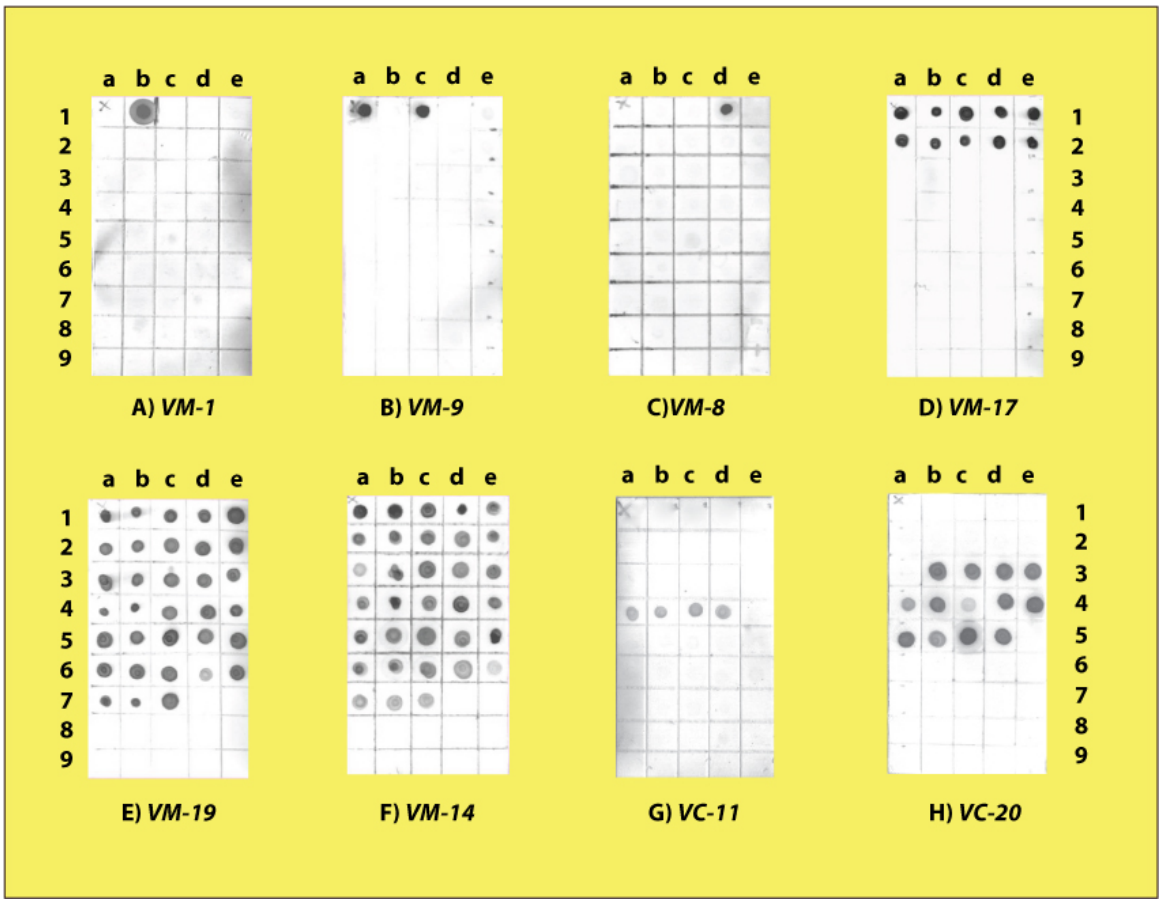
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (กลุ่มที่ 1-6) สามารถใช้ในการตรวจหา *V. mimicus* โดยวิธี dot blotting ได้ โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10^8 ถึง 10^5 CFU/ml โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 (*VM-9*) มีความไวในการตรวจสูงที่สุดคือที่ 1×10^5 CFU/ml (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 18-A-F)

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 7 และ 8 สามารถใช้ในการตรวจหา *V. cholerae* โดยวิธี dot blotting ได้เช่นเดียวกัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่ม มีความไวในการตรวจหา *V. cholerae* ประมาณ 10^8 CFU/ml (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 18-G-H)

7.การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างอุจจาระ

จากการบ่มเชื้อ *V. mimicus* (VM1) หรือ *V. cholerae* (VC2) ในตัวอย่างอุจจาระที่ละลายใน APW ที่ระยะเวลาต่างๆ (0-24 ชั่วโมง) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-17,VM-19* และ *VM-9* ตรวจสอบความไวในการตรวจเชื้อพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-17* และ *VM-19* มีความไวในการตรวจเพิ่มขึ้นเท่ากับ 10^5, 10^4 และ 1 CFU/ml หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพประกอบ 19-A และ 19-B) สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-9* มีความไวสูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิดแรกประมาณ 100 เท่า หลังจากทำการบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 19-C)

สำหรับกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-19* ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ VC2 หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันคือประมาณ 10^5 CFU/ml (ภาพประกอบ 19-D) แต่มีความไวน้อยกว่าการใช้ตรวจเชื้อ VM1 ประมาณ 10 เท่า



ภาพประกอบ 12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ (A-H) กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1×10^{9} CFU/ml ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวแทนจากกลุ่มต่างๆ ได้แก่ (A) *VM-1* (B) *VM-9* (C) *VM-8* (D) *VM-17* (E) *VM-19* (F) V*M-14* (G) *VC-11* และ (H) *VC-20* ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

แถวที่ 1: (a) VM1, (b) VM2, (c) VM3, (d) VM4, (e) VM5.

แถวที่ 2: (a) VM6, (b) VM7, (c) VM8, (d) VM9, (e) VM10.

แถวที่ 3: (a) VC1, (b) VC2, (c) VC3, (d) VC4, (e) VC5.

แถวที่ 4: (a) VC6, (b) VC7, (c) VC8, (d) VC9, (e) VC10.

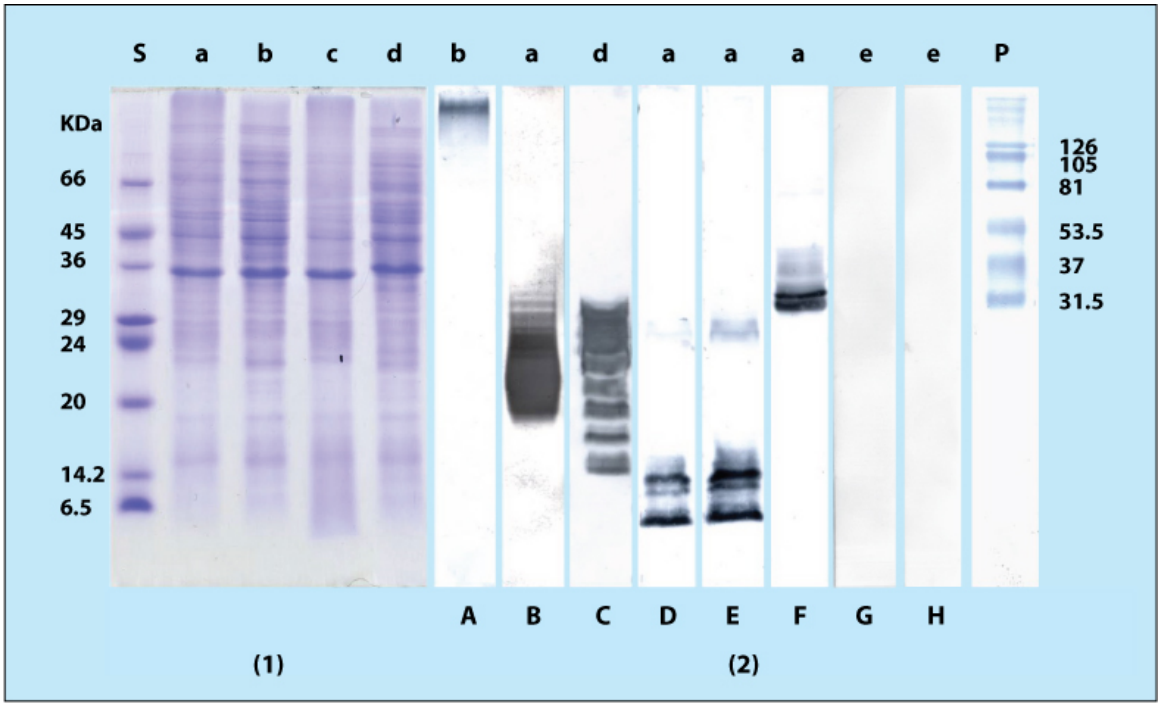
แถวที่ 5: (a) VC11, (b) VC12, (c) VC13, (d) VC14, (e) VC15.

แถวที่ 6: (a) VC16, (b) VC17, (c) VC18, (d) VC19, (e) VC20.

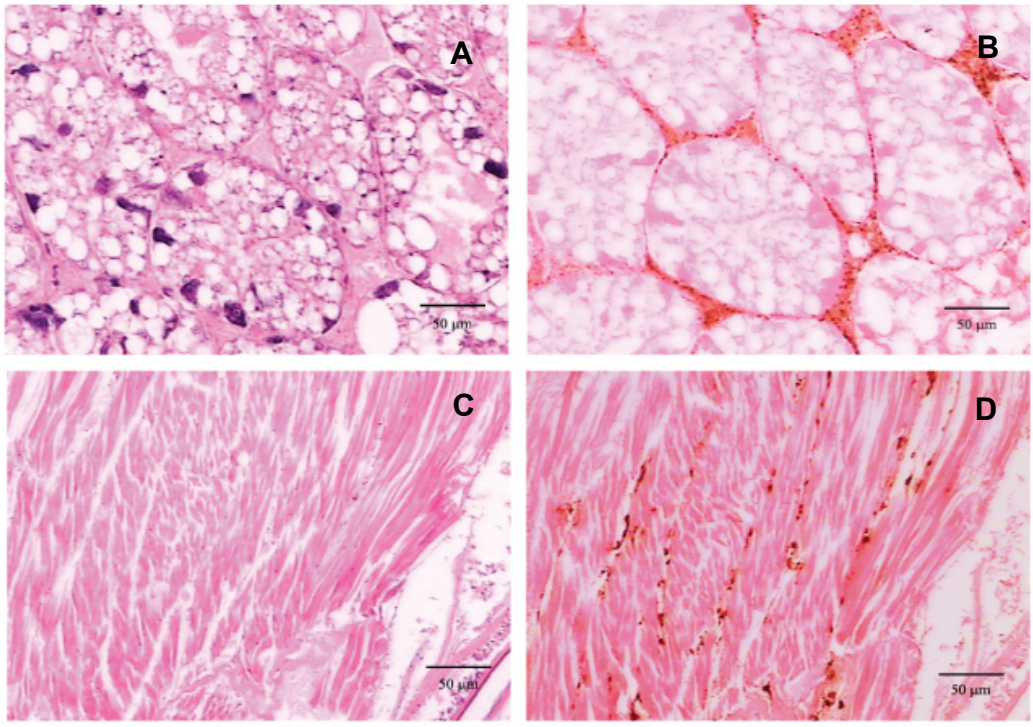
แถวที่ 7: (a) VC21, (b) VC22, (c) VC23, (d) *V. parahaemolyticus*, (e) *V. vulnificus*.

แถวที่ 8: (a) *V. harveyi*, (b) *V. fluvialis*, (c) *V. penaeicida*, (d) *V. anguillarum*, (e) *V. alginolyticus*.

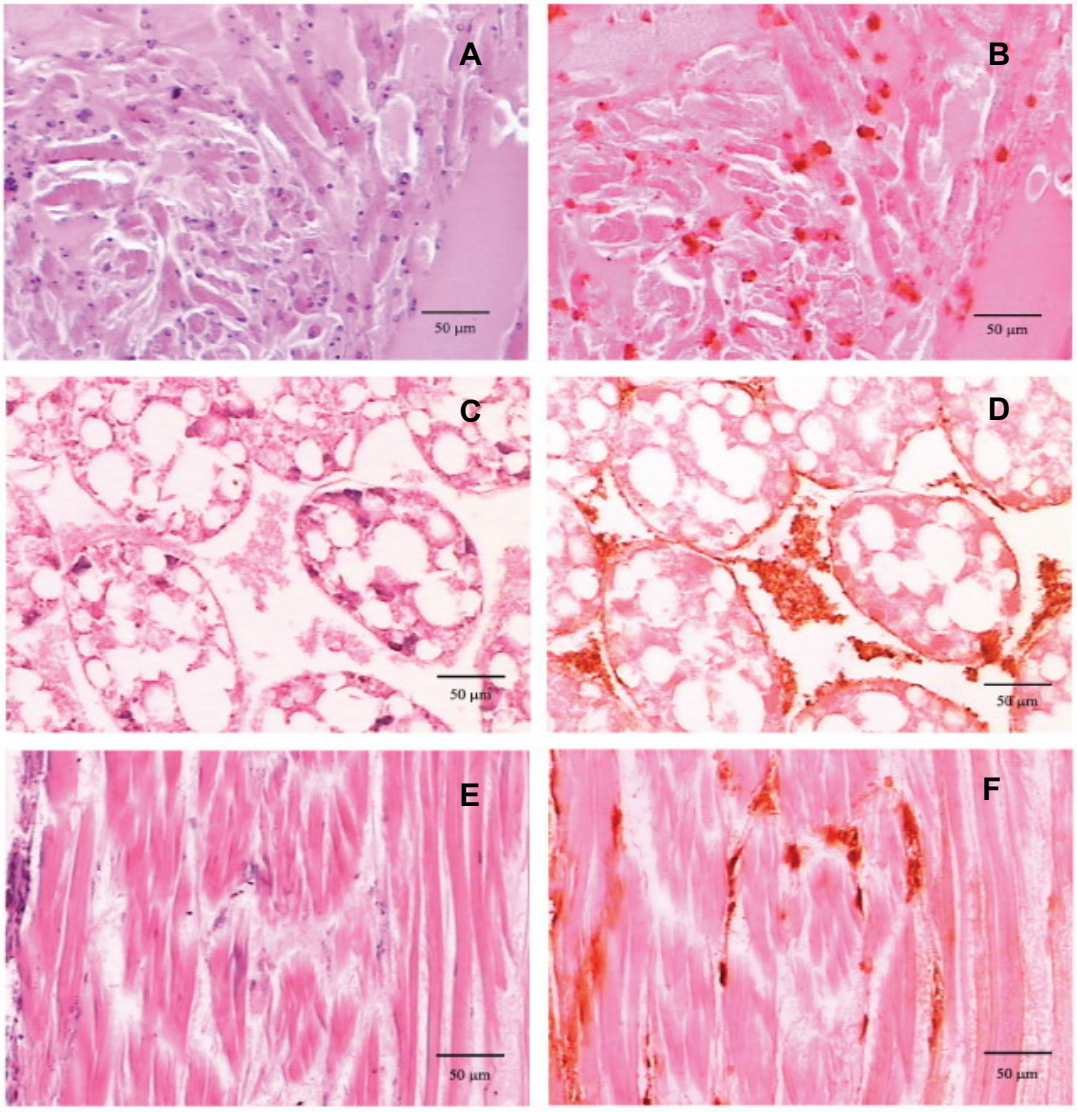
แถวที่ 9: (a) *V. ordalii*, (b) *Aeromonas hydrophila*, (c), *A. sobria*, (d) *A. caviae*, (e) *Escherichia coli*.



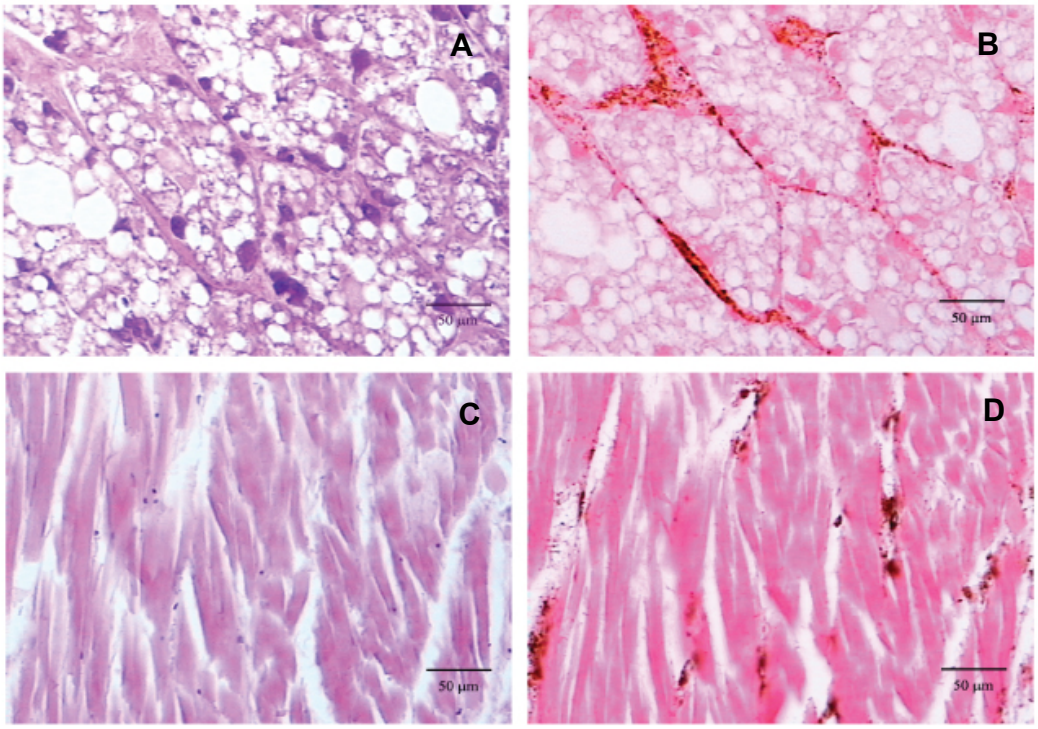
ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 กลุ่ม (A-H) ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ a = VM1, b = VM2, c = VM3, d = VM4, และ e = VC9 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue จากนั้นทำการย้ายโปรตีนอีกส่วนหนึ่งจากเจล (1) ลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสและ (2) นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ ได้แก่ (A) *VM-1* (B) *VM-9* (C) *VM-8* (D) *VM-17* (E) *VM-19* (F) *VM-14* (G) *VC-11* และ (H) *VC-20* S = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ P = prestained standard proteins



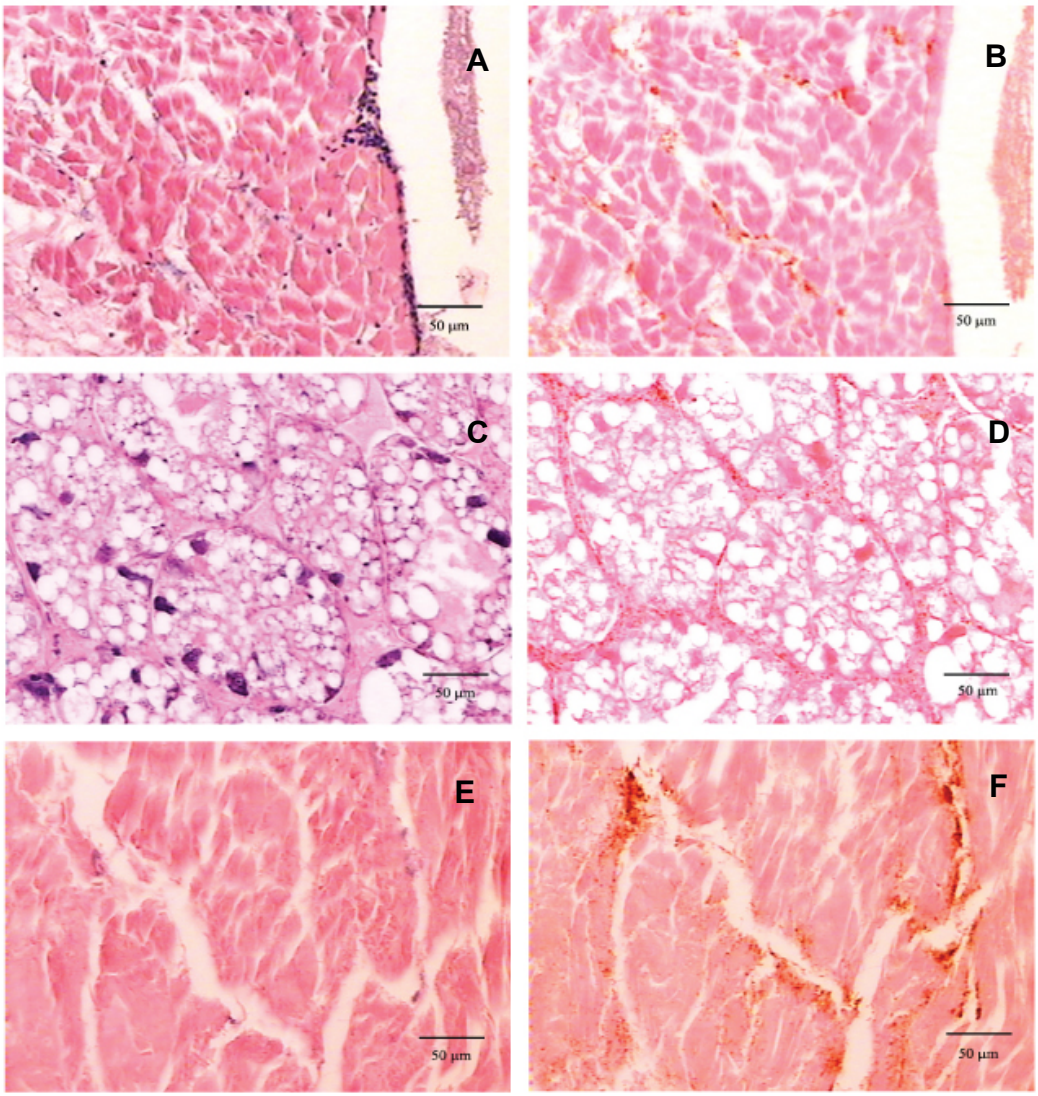
ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบการติดเชื้อ VM2 **ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกุ้งขาว** ได้แก่ hepatopancreas (A และ B) และกล้ามเนื้อ (C และ D) ที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อโดยการฉีดด้วยวิธี immunohistochemistry โดยนำเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-1* ที่จำเพาะต่อ VM2 (Bและ D) หรือไม่ได้บ่มกับแอนติบอดี (A และC) แต่ย้อมทับด้วยสี haematoxylin และ eosin



ภาพประกอบ 15 การตรวจสอบการติดเชื้อ VM3 **ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของ**กุ้งขาว ได้แก่ หัวใจ (A และ B) hepatopancreas (C และ D) และกล้ามเนื้อ (E และ F) ที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อโดยการฉีดด้วยวิธี immunohistochemistry โดยนำเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-9* ที่จำเพาะต่อ VM1 และ 3 (B, Dและ F) หรือไม่ได้บ่มกับแอนติบอดี (A, C และ E) แต่ย้อมทับด้วยสี haematoxylin และ eosin



ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบการติดเชื้อ VM4 **ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของ**กุ้งขาว ได้แก่ hepatopancreas (A และ B) และ กล้ามเนื้อ (C และ D) ที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อโดยการฉีด ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยนำเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-8* ที่จำเพาะต่อ VM4 (B และ D) หรือ ไม่ได้บ่มกับแอนติบอดี (A และ C) แต่ย้อมทับด้วยสี haematoxylin และ eosin

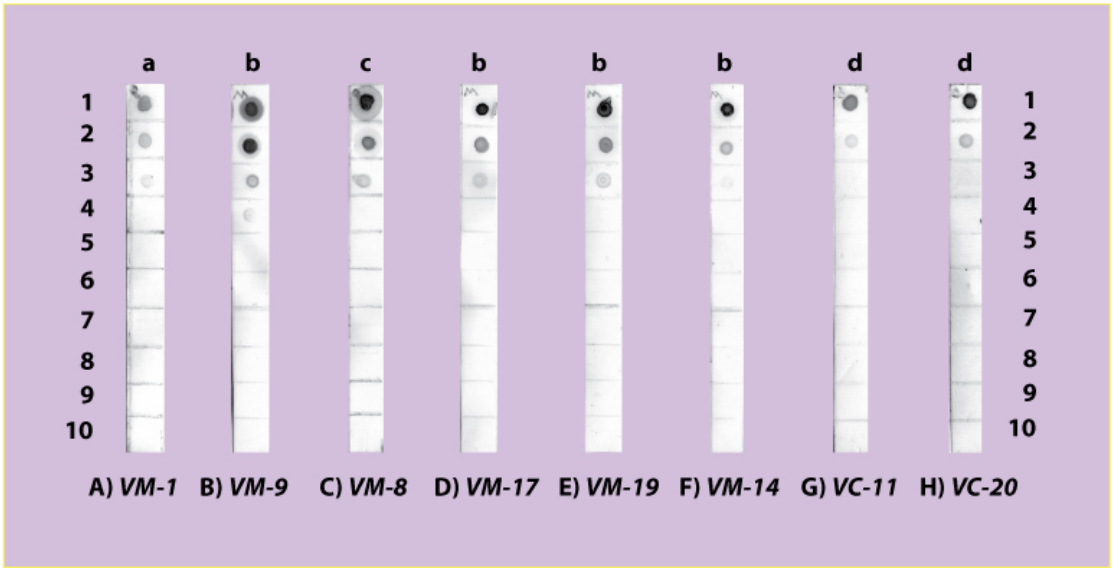


ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบการติดเชื้อ VM3 **ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของ**กุ้งขาว ได้แก่ กล้ามเนื้อ (A และ B, E และ F) hepatopancreas (C และ D) ที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อโดยการฉีด ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยนำเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-19* ที่จำเพาะต่อ *V. mimicus* ทุกไอโซเลต (B, D และ F) หรือ ไม่ได้บ่มกับแอนติบอดี (A, C และ E) แต่ย้อมทับด้วยสี haematoxylin และ eosin

ตาราง 5 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ในกลุ่มที่ 2,4, และ 5 โดยวิธี indirect ELISA

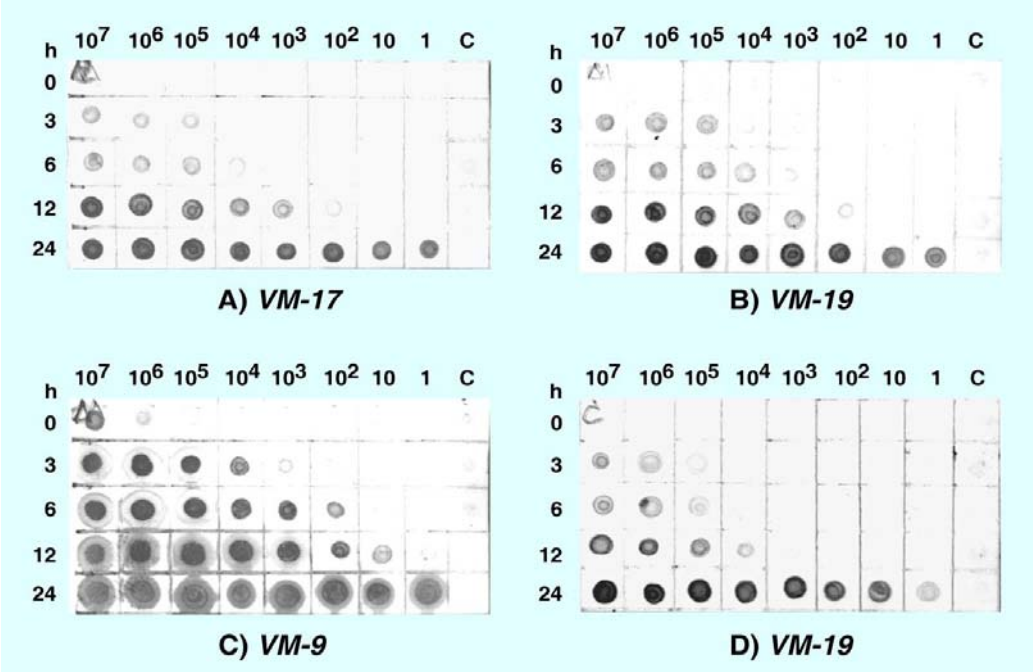
	กลุ่มที่ 2				กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5
MAbs	*VM-2*	*VM-16*	*VM-18*	*VM-9*	*VM-17*	*VM-19*
VM-2	0.599[1]	0.718	0.707	0.763	0.774	0.932
VM-16		0.751[1]	0.755	0.816	0.827	0.993
VM-18			0.724[1]	0.819	0.822	0.982
VM-9				0.750[2]	0.898	0.943
VM-17					0.605[3]	0.995
VM-19						0.782[4]

[1, 2, 3, 4] = โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันหมายถึงมีการจับกับอิพิโทปของแอนติเจนบริเวณเดียวกัน หากตัวเลขต่างกันหมายถึงมีการจับกับอิพิโทปของแอนติเจนบริเวณ ต่างกัน



ภาพประกอบ 18 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ด้วยวิธี dot blotting โดยหยด *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ a = VM2, b = VM1, c = VM4 และ d = VC9 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 1×10^{9} CFU/ml จนถึง 10 CFU/ml ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ (A-H) ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถวที่ 1 : 1×10^{9} CFU/ml
แถวที่ 2 : 1×10^{8} CFU/ml
แถวที่ 3 : 1×10^{7} CFU/ml
แถวที่ 4 : 1×10^{6} CFU/ml
แถวที่ 5 : 1×10^{5} CFU/ml
แถวที่ 6 : 1×10^{4} CFU/ml
แถวที่ 7 : 1×10^{3} CFU/ml
แถวที่ 8 : 1×10^{2} CFU/ml
แถวที่ 9 : 1×10^{1} CFU/ml
แถวที่ 10 : PBS



ภาพประกอบ 19 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting หลังจากบ่ม *V. mimicus* VM1 (A) – (C) หรือ *V. cholerae* VC2 (D) ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียสในตัวอย่างอุจจาระผสมกับ alkaline peptone water ที่เวลา (h) ต่างๆ (C = control; ไม่ได้มีการผสมเชื้อลงใน alkaline peptone water) และนำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) *VM-17*, (B) *VM-19*, (C) *VM-9* และ (D) *VM-19*

ตาราง 6 ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (IHC) VM = *V. mimicus* VC = *V. cholerae*

Group	MAb (isotype)	Sensitivity Dot Blotting (CFU / ml)	Antigen Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
1	*VM-1* (M)	10^7	~200	+++	VM2
2	*VM-2,16, 18*(G2b), *VM-9* (M)	10^7 10^5	18 -30	+++	VM1, 3
3	*VM-8* (G3)	10^7	15-30	+++	VM 4
4	*VM-17* (G2b)	10^7	5, 14	-	VM1-VM10
5	*VM-19* (G2a)	10^7	5, 14	+++	VM1-VM10, VC1-VC23
6	*VM-14* (G2a)	10^7	30, 32	-	VM1-VM10, VC1-VC23
7	*VC-11* (M)	10^8	-	-	VC6-VC9
8	*VC-20* (M)	10^8	-	-	VC2-VC14

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของหนูขาวที่ผ่านการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* ทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blotting พบว่ามีการตอบสนองต่อแอนติเจนของ *V. mimicus* แตกต่างกันออกไป เช่นเดียวกับการตรวจความจำเพาะของแอนติซีรัมของหนูขาวที่ผ่านการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* โดยจะพบจำนวนของแถบของแอนติเจนที่จับโดยแอนติบอดีและความแรงในการจับของแอนติบอดี (antibody affinity) จากหนูแต่ละตัวต่างกัน ทั้งนี้แอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนี้มีทั้งรูปแบบ heat-killed และ formalin fixed form ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยให้หนูขาวสามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่ออิพิโทปต่างๆ ของแอนติเจนได้หลากหลายมากขึ้น การที่มีอิพิโทปเป็นจำนวนมากทำให้บี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจนและเป็นผลให้มีการตอบสนองโดยการกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคลนและสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในแอนติซีรัม เมื่อตรวจดูปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวกับแถบแอนติเจนต่างๆ ของ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* จะสังเกตพบแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งปรากฏให้เห็นในแต่ละไอโซเลตเท่านั้นโดยที่ไม่มีปรากฏให้เห็นในไอโซเลตอื่น แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่าง ไอโซเลตของ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* นอกจากนี้ยังสังเกตพบแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งมีปรากฏให้เห็นใน *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ทุกไอโซเลต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันเหล่านี้มีแอนติเจนชนิดเดียวกันร่วมกันอยู่ (ภาพประกอบ 10 และ 11) โดยหนูตัวที่ 1 ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* และ หนูตัวที่ 4 ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* ให้ผลการตอบสนองดีที่สุด พบว่ามีจำนวนของแถบของแอนติเจนที่จับโดยแอนติบอดีมากที่สุดและมีแรงจับของแอนติบอดีดีที่สุด ดังนั้นจึงนำหนูดังกล่าวมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

จากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในครั้งแรกโดยใช้หนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. mimicus* พบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 9 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับบางไอโซเลตภายในสายพันธุ์เดียวกัน โดยสามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 6 กลุ่ม โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 กลุ่มแรกมีความจำเพาะเพียง 1 หรือ 2 ไอโซเลตเท่านั้น โดยไม่สามารถจับกับอีก 6 ไอโซเลตที่เหลือซึ่งไม่ได้ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันได้ ชี้ให้เห็นว่า *V. mimicus* ในแต่ละไอโซเลตที่รวบรวมมาจากแหล่งต่างๆ ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความหลากหลายสูงมาก

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 (*VM-17, VM-19* และ *VM-14*) มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ *V. mimicus* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-19* และ *VM-14* ยังสามารถจับกับ *V. cholerae* ได้ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบเช่นกัน *V. cholerae* ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งที่ก่อโรครุนแรง (O1 และ O139) และชนิดที่ไม่ก่อโรครุนแรงที่แยกได้จากอาหาร สิ่งแวดล้อม อุจจาระ และกุ้งที่เป็นโรค จากการทดสอบด้วยวิธี

Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 และ 5 (*VM-17* และ *VM-19*) สามารถจับกับแถบแอนติเจนขนาดเล็กเท่ากับ 5 และ 14 กิโลดาลตัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 (*VM-14*) สามารถจับกับแถบแอนติเจนขนาด 30 และ 32 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นแถบแอนติเจนที่พบในทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ โดยสังเกตจากการทดสอบแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blotting พบแถบแอนติเจนขนาดดังกล่าวในแบคทีเรีย *V. mimicus* ทั้ง 5 ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 10)

สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. cholerae* พบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 2 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับบางไอโซเลตภายในสายพันธุ์ สามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 (*VC-11*) มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* O1, El Tor, Ogawa ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ (VC6-9) โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 8 (*VC-20*) มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* O1, O139 และ O141 ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยกับ VC8 โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่นกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 และ 8 ไม่สามารถจับกับแถบโปรตีนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting อาจเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่สามารถจับกับแอนติเจนในรูปแบบเสียสภาพได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ outer membrane protein ของ *V. cholerae* พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้บางโคลนสามารถจับกับแบคทีเรียทั้งเซลล์ และ outer membrane protein ได้แต่ไม่สามารถจับกับแถบโปรตีนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting ทั้งนี้อาจเนื่องจาก SDS มีผลทำให้โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนเปลี่ยนไป ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถจับได้ โดยอิพิโทปบนแอนติเจนอาจฝังอยู่หรือหลุดออกจาก bilayer lipid membrane ไป (Sciortino; Yang; & Finkelstein. 1985: 122-131)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1-6 ยกเว้นกลุ่มที่ 4 สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. mimicus* ในเนื้อกุ้งได้โดยวิธี immunohistochemistry โดยตรวจพบการติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆ ของกุ้งเช่น กล้ามเนื้อ ตับอ่อน และหัวใจ เป็นต้น โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 และ 8 ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. cholerae* ในเนื้อกุ้งโดยวิธี immunohistochemistry การที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4, 7 และ 8 ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* ในเนื้อเยื่อกุ้งได้นั้นอาจเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มดังกล่าวไม่สามารถจับกับแอนติเจนในรูปแบบที่มีการผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจทำให้แอนติเจนที่อยู่ในเนื้อเยื่อเปลี่ยนโครงสร้างไป

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 และ 8 สามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *V. cholerae* O1, O139 และ O141 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้ผสมกันและทดสอบโดยวิธี dot blotting แต่ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสอง

กลุ่มยังมีค่าไม่สูงมาก ประมาณ 10^8 - 10^9 CFU/ml จึงอาจจำเป็นต้องมีการบ่มตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำมาทดสอบ

การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 (*VM-2*, *VM-16* และ *VM-18*) เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้มาผสมรวมกัน (combine) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง แต่เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ผสมกับ *VM-9* พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 ชนิดนี้มาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับแอนติเจนที่ต่างกลุ่มออกไป (*VM-17* และ *VM-19*) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด (*VM-2, VM-16* และ *VM-18*) จับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกันแต่แตกต่างจาก *VM-9* ในกรณีของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 (*VM-17*) และ 5 (*VM-19*) จับกับแอนติเจนเดียวกันแต่มีความจำเพาะต่างกัน แสดงว่าจับอิพิโทปต่างกัน ดังนั้นการรวมกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น (ตาราง 5)

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 (*VM-17, VM-19* และ *VM-14*) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. mimicus* หรือ *V. cholerae* นั้น สามารถใช้ในการตรวจสอบเพื่อแยกความแตกต่างของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ในตัวอย่างต่างๆ เช่น rectal swab อุจจาระ ตัวอย่างอาหาร หรือ กุ้งที่เป็นโรคซึ่งเต็มไปด้วยแบคทีเรียชนิดอื่นจำนวนมากได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำการแยกเชื้อและทดสอบทางชีวเคมีก่อน โดยนำตัวอย่างบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อใน APW ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-17, VM-19* และ *VM-14* แสดงว่ามีการปนเปื้อน *V. mimicus* ในขณะที่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-19* และ *VM-14* แต่ให้ผลลบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-17* แสดงว่ามีการปนเปื้อน *V. cholerae* โดยการวิเคราะห์จะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยการติดเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระอาจทำได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องทำการบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อเนื่องจาก *V. cholerae* ที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในอุจจาระผู้ป่วยมีประมาณ 3 X 10^6 ถึง 10^8 CFU/g (Pitisuttithum; et al. 2001: 920-925) ทั้งนี้ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบ *V. mimicus* และ *V. cholerae* หลังเลี้ยงเชื้อในตัวอย่างอุจจาระเป็นเวลา 6 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 10^2-10^5 CFU/ml โดยขึ้นกับแรงจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัว ความไวดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับการใช้เทคนิค one-step PCR ในการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* ซึ่งเท่ากับ 1.3 X 10^5 CFU/ml หรือการใช้เทคนิค semi-nested PCR มีค่าเท่ากับ 1.3 X 10^3 CFU/ml (Theron; et al. 2000: 539-546) แต่ในบางกรณีในตัวอย่างอาหารหรือเลือดอาจมีตัวยับยั้ง DNA polymerase หรือปัจจัยรบกวนต่างๆ ดังนั้นกระบวนการแยกตัวอย่าง และเพิ่มความเข้มข้น รวมถึงขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารจึงยังคงมีความจำเป็นในการเพิ่มความไวในการตรวจสอบการติดเชื้อ (Fukushima; et al. 2007: 92-100)

ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ด้วยวิธี PCRนั้นสามารถใช้ยีนต่างๆ ที่ปรากฏบนจีโนมของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ เช่น cholera toxin enzymatic subunit (*ctx*A), zonula occludens toxin (*zot*), accessory cholera enterotoxin (*ace*), toxin-coregulated pilus (*tcp*A), outer membrane protein (*omp*U), central regulatory protein ToxR (*tox*R) และ hemolysin (*hly*A) แต่ยีนดังกล่าวไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *V. mimicus* และ *V. cholerae* ได้ (Singh; et al. 2002: 4321-4324; Karunasagar; et al. 2003: 338-343) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเช่น การใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบบริเวณยีน *dnaJ* ซึ่งเป็น housekeeping genes ถอดรหัสให้โปรตีน heat shock 40 (Nhung; et al. 2007: 271-275) เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธี dot blotting ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ง่าย สะดวก และสามารถใช้แยกความแตกต่างของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี *VM-14, VM-17* และ *VM-19* ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อได้โดยตรง และแยกความแตกต่างของ *V. mimicus* และ *V. cholerae* ได้โดยสามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบให้ใกล้เคียงกับเทคนิค PCR ด้วยการบ่มตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ซึ่งในอนาคตอาจนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดไปใช้ในการผลิตชุดตรวจอย่างง่าย (immunochromatographic strip test) เช่นเดียวกับชุดตรวจ *V. harveyi* โดยสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบเหลือเพียงประมาณ 15 นาที และมีราคาไม่สูง ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือและบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน (Sithigorngul; et al. 2007: 256-264) ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นของการเกิดโรค Vibriosis รวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในกุ้งและสัตว์น้ำอื่นๆ ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์สำหรับโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยทำให้การควบคุมการแพร่ระบาดได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

สำหรับในงานวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับแอนติเจนเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting เหมือนกับที่แอนติซีรัมสามารถจับได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มเติมเพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนร่วมระหว่าง *V. cholerae* ทุกไอโซเลตและสามารถจับกับแอนติเจนเมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting ได้ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ชัยวุฒิ สุดทองคง ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และ ลิลา เรืองแป้น. (2550). *ปรสิตและปริมาณแบคทีเรีย Vibrio spp. ในกุ้งขาวแวนาไม, Penaeus vannamei ที่เลี้ยงในบ่อดิน*. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาประมง หน้า 280-292.

นิลุบล กิจอันเจริญ; และคนอื่นๆ. (2546). *การตรวจวินิจฉัยโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามโดยการใช้เทคนิค PCR.* (Online). http://ora.kku.ac.th/res_kku/Abstract/AbstractView.asp?Qid=731560139

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2547). จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 1-400.

เพ็ญศรี บุญตามช่วย และ อรอนงค์ คงทวี. (2548). ปริมาณและชนิดเชื้อวิบริโอในตับกุ้งกุลาดำปกติและในกุ้งกุลาดำป่วยในบ่อดิน. สัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจำปี 2548. (Online). http://www.nicaonline.com/articles10/site/view_article.asp?idarticle=1194

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. หน้า 1-242.

ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. (2540). วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งอื่นๆ ในสกุล *Penaeus* : หลักการ, รายละเอียดของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและกำจัดโรค และผลของการใช้วัคซีนกับกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricus) กรุงเทพมหานคร: บางแคการพิมพ์.

รายงานการเฝ้าระวังโรคเดือนธันวาคม (2550). ขอนแก่น: งานระบาดวิทยา กลุ่มงานพัฒนายุทธศาสตร์สาธารณสุข สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดข่อนแก่น. (online). http://61.7.156.50/events/epid/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=134.

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล และคนอื่นๆ. (2548). การวิเคราะห์สภาพปัญหาความเสี่ยงของ *Vibrio cholerae* ในกระบวนการผลิตกุ้งกุลาดำ. *วารสารการประมง*. ฉบับที่ 2 เดือน มีนาคม-เมษายน หน้า 117.

Acuna, M. T.; et al. (1999). Sources of *Vibrio mimicus* contamination of turtle eggs. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 : 336-338.

Alam, M.; et al. (1997). *Vibrio mimicus* attaches to the intestinal mucosa by outer membrane hemagglutinins specific to polypeptide moieties of glycoproteins. *Infection and Immunity*. 65 : 3662-3665.

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.

Baudry, B.; et al. (1992). Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 60: 428–434.

Blake, P. A. (1983). Vibrios on the half shell : what the walrus and the carpenter didn't know. *Annals of Internal Medicine*. 99: 558-559.

Boonsanongchokying, C.; et al. (2006). Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedron of Monodon Baculovirus (MBV) from Shrimp. *ScienceAsia.* 32: 371-376.

Boyd, E. F.; et al. (2000). Infectious CTX and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infection and Immunity*. 68:1507–1513.

Campos, E., H.; et al. (1996). *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. *Applied Environmental Microbiology*. 62:1141-1144.

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 the identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3694-3700.

Chowdhury, M. A. R.; et al. (1986). Antibiotic resistance patterns of *Vibrio mimicus* isolated from human and environmental sources in Bangladesh. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 30:622-623.

Chowdhury, M. A. R.; et al. (1989). Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. *Applied Environmental Microbiology*. 55: 2073-2078.

Chun, J.; Hug, A.; and Colwell, R.R. (1999). Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*, *Applied Environmental Microbiology*. 65 2202-2208.

Colwell R. R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 6: 121-125.

Croether, R. S.; et al. (1987). *Vibrio chloerae* metalloprotease degrades intestinal musin and facilitates enterotoxin induced secretion from rat intestine. *Biochimica et Biophysica Acta.* 942: 393-402.

Davis, B. R.; et al.(1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 14 : 631-639.

Faruque, S. M.; Albert, M. J.; and Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecula r Biology Reviews.* 62(4): 1301-1314.

Faruque, S. M.; et al.(1998). Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infection and Immunity.* 66: 3752–3757.

Faruque, S. M.; et al. (1999). Lysogenic conversion of environmental *Vibrio mimicus* strains by CTXϕ. *Infection and Immunity.* 67(11): 5723-5729.

Faruque, S. M. ; et al. (2004). Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 2123-2128.

Fasano, A.; et al. (1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 5242–5246.

Field, M.; et al. (1972). Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. *Journal of Clinical Investigation.* 51: 796-804.

Fukushima, H.; et al. (2007). Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 92-100.

Gabriel, S. E.; et al. (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*. 266: 107-109

He, Y. et al. (1996). Monoclonal antibodies for detection of the H:7 Antigen of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3325-3332.

Honda, T.; et al. (1987). Purification and properties of two hemolysins produced by *Vibrio mimicus. Journal of Bacteriology*. 42: 201.

Honda, T.; et al. (1989). Purification and Characterization of protease produced by *Vibrio cholerae* non-O1 and comparison with a protease of *Vibrio cholerae* O1. *Infection and Immunity*.57: 2799-2803.

Honda, T.; et al. (1989). Production of monoclonal antibodies against thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* and application of the antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay. *Medical Microbiology and Immunology*. 178: 245-253.

Jermyn, W. S. and Boyd, E. F. (2005). Molecular evolution of Vibrio pathogenicity island-2 (VPI-2): mosaic structure among *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* natural isolates. *Applied Environmental Microbiology*. 151: 311-322.

Jung, T. S.; et al. (2001). The production and characterization of monoclonal antibodies against *Photobacterium damselae* ssp. *piscicida* and initial observations using immunohistochemistry. *Journal of Fish Diseases*. 24: 67-77.

Kang, J. H.; et al.(1998). Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1394 : 85-89.

Karunasagar, I.; et al. (2003). *omp*U genes in non-toxigenic *Vibrio cholerae* associated with aquaculture. *Journal of Clinical Microbiology*. 95, 338-343.

Köhler, G. & Milestein, C. (1975). Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*. 256: 495-497.

Lee, J. H.; et al. (2002). Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhlA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 298: 269-276.

Lee, J. H.; et al. (2005). The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen. *FEBS Letters*. 579: 2507-2513.

Li, Y.; et al. (2004). A Hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be secretory mediators. *Microbiology and Immunology*. 49(1): 73-78.

Lu, P.; et al. (1997). Characterization of monoclonal antibodies for the rapid detection of foodborne *Campylobacters*. *International Journal of Food Microbiology*. 37: 87-91.

Macian, M. C.; et al. (2000). Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural sample. *International Microbiology*. 3: 51-53.

Makesh, M.; et al. (2006). Development of monoclonal antibodies against VP28 of WSSV and its application to detect WSSV using immunocomb. *Aquaculture.* 261 : 64-71.

Miyoshi, S.I.; et al. (1997). Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. *Infection and Immunity.* 65 : 1830-1835.

Morris, J. G.; Jr.; and Black, R. E. (1985). Cholera and other Vibriosis the United states. *The New England Journal of Medicine.* 312: 343-350.

Nhung, P. H.; et al. (2007). Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease.* 59: 271-275.

Oanh, D. T. H.; Hoa, T. T. T.; and Phuong, N. T. Characterization and pathogenicity studies on *Vibrio* bacteria Isolated from freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Hatcheties (online). http://www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/pro01/D5-dtho-characterization.pdf

Panchan, N.; et al. (2005). Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia.* 31: 29-35.

Phianphak, W.; et al. (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 161-168.

Pitisuttithum, P.; et al. (2001). A human volunteer challenge model using frozen bacteria of the new epidemic serotype *V. cholerae* 0139 in the Thai volunteers. *Vaccine* 20: 920-925.

Pusiririt S.; et al. (2005) Differentiation of two isolates of *Vibrio vulnificus* with monoclonal antibody. Proceeding *The international conference on shrimp biotechnology*: *New challenges through Thai shrimp industry. 4-5 November, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.* :114-118.

Rahman, M. M.; et al. (1997). Analysis of the structural gene encoding a hemolysin in *Vibrio mimicus. Microbiology and Immunology.* 41: 169-173.

Rodkhum, C.; et al. (2001). Opportunistic Vibrios in cultured Taiwanese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine.* 31: 29-35.

Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms.* 65: 85-89.

Sciortino, C. V.; Yang, Z. S.; and Finkelstein, R. A. (1985). Monoclonal antibodies to outer membrane antigens of Vibrio cholerae. *Infection and Immunity.* 49: 122-131.

Shandera, W. X.; et al. (1983). Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. *Annals of Internal Medicine*. 99(2) :169-171.

Shinoda.; et al.(1993). Studies on hemolytic action of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. *Microbiology and Immunology*. 37:405–409.

Simonson, J. G.; and Siebeling, R.J. (1988). Coagglutination of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* with Anti-Flagellar Monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*. 26 : 1962-1966.

Singh, D. V., Isac, S.R. and Colwell, R.R. (2002). Development of hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 4321-4324.

Sithigorngul, P.; et al. (2000). Development of monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 27-34.

Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to Yellow-Head Virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms.* 49: 71-76.

Sithigorngul, W.; et al. (2006). Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus. Letters in Applied Microbiology.* 43: 436–442.

Sithigorngul, P.; et al. (2007). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. *Journal of Microbiological Methods.* 71: 256–264

Sultan, Z.; et al. (2007). Growth phase dependant activation of *Vibrio mimicus* hemolysin (Pro-VMH). *Journal of Health Science.* 53(4): 430-434.

Suntharasamai, P.; et al. (1992) Clinical and bacteriological studies of El Tor cholera after ingestion of known inocula in Thai volunteers. *Vaccine* 10: 502-505.

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.

Theron, J.; et al. (2000). Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 89, 539-546.

Trucksis, M.; et al. (1993). Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* USA. 90: 5267–5271.

Vieira, V. V.; et al. (2001). Differentiation of environmental and clinical Isolation of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2360-2364.

Winotaphan, P.; et al. (2005). Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 189-198.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.00	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.00	กรัม
เด็กซ์โตรส (Dextrose)	2.50	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.50	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.3 $\pm$ 0.2		

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตน (Tryptone)	17.00	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.00	กรัม
เด็กซ์โตรส (Dextrose)	2.50	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.50	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.3 $\pm$ 0.2		

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

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.00	กรัม
โปรตีโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.00	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.00	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.00	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.00	กรัม
แซคคาโรส (Saccharose)	20.00	กรัม

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.00	กรัม
เฟอริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.00	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.3 $\pm$ 0.2

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
เมอร์ไธโอเลท (Merthiolate) เข้มข้น 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)	10.4000	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6000	กรัม
แอล-กลูตามีน (L-glutamine) (Sigma)	0.2923	กรัม
โซเดียมไพรูเวท ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	2.0160	กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.5925	กรัม
เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200.00	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000.00	มิลลิลิตร

กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร 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 บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide เข้มข้น 12%)

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

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) และ WESTERN BLOT

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%

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น10% (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% (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 เข้นข้น 10% (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
Beta-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)	15.00	มิลลิลิตร
tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	7.50	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10%(1.4)	0.30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	150.00	ไมโครลิตร
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	20.00	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)	5.00	มิลลิลิตร.
SDS เข้มข้น 10%(1.4)	0.20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.20	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (1.5)	100.00	ไมโครลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร

ตาราง 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%	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% (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

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

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

เมธานอล	500.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

เมธานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อมและล้างเจล

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

5. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma)

-Albumin, bovine serum	66	กิโลดาลตัน
-Ovalbumin, chicken egg	45	กิโลดาลตัน
-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36	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
เมธานอล	200.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

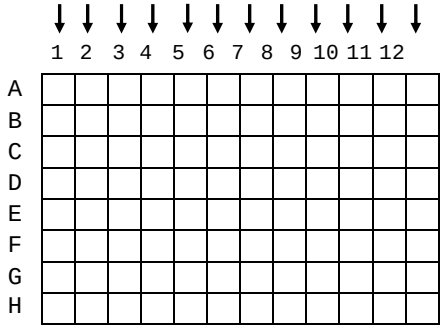
1) Rabbit anti-Mouse IgG_1 (γ1 chain specific)
2) Rabbit anti-Mouse IgG_{2a} (γ2a chain specific)
3) Rabbit anti-Mouse IgG_{2b} (γ2b chain specific)
4) Rabbit anti-Mouse IgG_3 (γ3 chain specific)
5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
9) Normal Rabbit Serum, (Negative Control)
10) Positive Control, Monoclonal Mouse IgG_1
    (Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
11) Substrate Buffer, Concentration (10X)
    (1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H_2O_2)
12) ABTS Substrate, Concentrated (50X)
    (2,2-azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
13) Blocking Solution, Concentration (50X)
    (25% BSA in PBS and 0.05% NaN_3)
14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
15) Goat anti-Mouse IgGAM, Concentrated (50X)
    (0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
16) 50% Tween 20

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 202)

1) เคลือบถาดหลุม 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

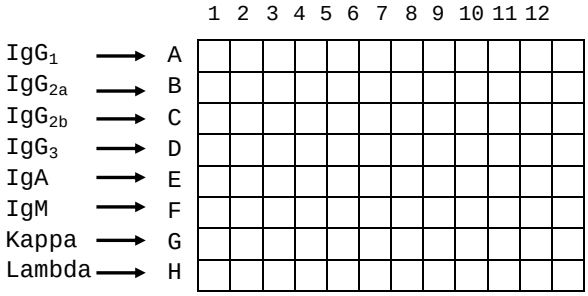
2) สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3) เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง



4) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที

5) เติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด (1-8) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ A-H



6) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที

7) เติม HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ 10 นาที

9) เติมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.006% ใน citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม

10) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก ฉ

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% (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 (OPD)

ภาคผนวก ช

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($CrK(SO_4)_2.12H_2O$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร.

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100%	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 Calf serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

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

กลีเซอรีน (Glycerine)	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร

6. สี Eosin Y 0.2% ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.2	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	100.0	มิลลิลิตร

การตรวจการติดเชื้อ *Vibrio mimicus* และ *Vibro cholerae* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี indirect immunoperoxidase

1. วิธี Immunohistochemistry (IHC)

1.1 เก็บตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้อ *V. mimicus* และ *Vibro cholerae* แล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพโดยใช้สารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ 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 ครั้งๆ 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 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง

1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.8 แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที

1.4 นำเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่อินฟิลเตรทด้วยพาราพลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราพลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องไมโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซคชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิน (ribbon)

1.6 นำเซคชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำ

แถวของเซคชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซคชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยืดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกซับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 นำสไลด์ที่มีเซคชันมาละลายเอาพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้

1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.7.2 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 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

1.7.7 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.8 แช่ในสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10% 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที

1.7.9 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.7.10 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.8 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

2. วิธี Indirect immunoperoxidase

2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking)

2.1.1 หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละเซคชันด้วยไมโครปิเปต

2.1.2 บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

2.2.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซคชันออก

2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละเซคชัน (แอนติบอดีตัวแรกคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio mimicus* หรือ *Vibrio cholerae*)

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเซคชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละเซคชันออก

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

2.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเซคชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

2.4 นำเซคชันมาทำปฏิกิริยากับ 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

2.5 ล้างเซคชันด้วยน้ำประปา 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอิโอซิน

3.1 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 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 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการผนึกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางผนึก (permount)

3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายชลินันท์ เพ็งสุข
วันเดือนปีเกิด	27 มิถุนายน 2528
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่	319/44 แขวงทุ่งสองห้อง เขตหลักสี่ ถนนวิภาวดีรังสิต จ.กรุงเทพฯ 10210
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนมัธยมสาธิตวัดพระศรี-มหาธาตุสถาบันราชภัฏพระนคร
พ.ศ. 2549	วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2552	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ