การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526

นายอิสระ พลจังหรีด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio harveyi* STRAIN 1526

Mr. Issara Poljungreed

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526
โดย	นายอิสระ พลจังหรีด
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อิสระ พลจังหรีด : การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526. (PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio harveyi* STRAIN 1526) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ศิวาพร ลงยันต์, 81 หน้า.

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. harveyi* 1526 และไอโซเลตอื่นโดยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วย *V. harveyi* ในรูปคงสภาพ (heat-killed) และเสียสภาพ (SDS-treated) สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำนวน 15 โคลน ซึ่งสามารถแบ่งตามความจำเพาะต่อ *V. harveyi* และแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี dot blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5 กลุ่ม มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 กลุ่ม มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอเท่านั้น และโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 กลุ่ม มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียแกรมลบสกุลอื่นที่นำมาทดสอบ การตรวจสอบเพื่อติดตาม *V. harveyi* 1526 ในเนื้อเยื่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* โดยวิธี immunohistochemistry พบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิด (VH11-6E และ VH17-1B) เท่านั้นที่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. harveyi* 1526 ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้จำแนก *V. harveyi* ออกจาก *Vibrio* spp. ต่าง ๆ และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ และอาจสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจอย่างง่ายเพื่อใช้ตรวจการติดเชื้อ *V. harveyi* ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....อิสระ พลจังหรีด.....

ปีการศึกษา...2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4872553423: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: MONOCLONAL ANTIBODIES / *Vibrio harveyi* 1526 / DOT BLOTTING / IMMUNOHISTOCHEMISTRY

ISSARA POLJUNGREED: PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio harveyi* STRAIN 1526. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SIWAPORN LONGYANT, Ph.D., 81 pp.

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to *Vibrio harveyi* 1526 and other isolates were produced from mice immunized with heat-killed and SDS-mercaptoethanol treated *V. harveyi*. There were 15 MAbs which could be divided into 10 groups according to their specificities to *V. harveyi* and other bacteria using dot blotting. Five groups of MAbs recognized specifically *V. harveyi* without any cross reactivity to *Vibrio* spp. Two groups expressed specificities to *V. harveyi* and showed cross reactivity to *Vibrio* spp. The remaining groups demonstrated cross reactivity to other *Vibrio* spp. and other Gram-negative bacteria. Only 2 MAbs (VH11-6E and VH17-1B) could localize *V. harveyi* 1526 infection in *Litopenaeus vannamei* tissue using immunohistochemistry. The MAbs produced in this study could be used to differentiate *V. harveyi* from other *Vibrio* spp. and other bacteria and furtherly developed as a convenient test kit for diagnosis of *V. harveyi* in aquaculture.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study...Biotechnology.... Student's signature....Issara Poljungreed....

Academic year...2007..... Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....S. Longyant.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้โดยความช่วยเหลือ และความเมตตาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความรู้ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงลงได้เป็นอย่างดี

ขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ แก่ข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณนายสมบัติ รักประทานพร เพื่อน และพี่น้อง ภาควิชาชีววิทยา และสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ตลอดจนเพื่อนและพี่น้อง ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา รวมถึงญาติพี่น้องของข้าพเจ้าที่คอยสนับสนุน เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผลประโยชน์อันใดที่ได้เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขออุทิศให้แด่ชีวิตทุกชีวิตของสัตว์ทดลองไม่ว่าจะเป็น หนูขาว กุ้งขาว และปลานิลที่ได้สละให้แก่การปฏิบัติงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 กุ้งกุลาดำ..... 4

2.2 โรควิบริโอซิส..... 5

2.3 *Vibrio harveyi*..... 6

2.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 18

3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 23

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง..... 23

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 24

3.3 วิธีการทดลอง..... 25

4 ผลการทดลอง..... 34

4.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์1526..... 34

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. harveyi* 34

ความจำเพาะของแอนติซีรัม..... 35

การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา..... 36

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 36

การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ด้วยวิธี indirect ELISA..... 40

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 41

4.2 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่น..... 43

ความจำเพาะของแอนติซีรัม..... 43

การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา..... 43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 44
การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ด้วยวิธี indirect ELISA..... 47
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 47
5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 50
6 สรุปผลการทดลอง..... 56
รายการอ้างอิง..... 57
ภาคผนวก..... 65
ภาคผนวก ก 66
ภาคผนวก ข..... 67
ภาคผนวก ค..... 68
ภาคผนวก ง..... 70
ภาคผนวก จ..... 74
ภาคผนวก ฉ..... 76
ภาคผนวก ช..... 77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *V. harveyi*	7
2.2	โรคของสัตว์ทะเลที่เกิดจาก *V. harveyi*	12
2.3	กลไกการก่อโรคของ *V. harveyi*	13
3.1	แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง.....	26
3.2	การอ่านผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E.....	28
3.3	ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน *V. harveyi* ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้.	33
4.1	สมบัติทางชีวเคมีของ VH1526 และ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นๆ โดยชุดทดสอบ API 20E	34
4.2	ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน VH1526 ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ.....	41
4.3	ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry.....	42
4.4	ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน VH47666-1 ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1.....	48
4.5	ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry	49
5.1	สรุปความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ที่ผลิตได้ทั้งหมดซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry	53
5.2	ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry	55
1ง	การเตรียม separating gel และ stacking gel.....	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	19
2.2	การสังเคราะห์ DNA โดยวิถี de novo และ วิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิถี de novo.....	21
4.1	การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ VH1526 จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot.....	36
4.2	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ในกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี dot blot ……..……	38
4.3	การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ด้วยวิธี Western blot…….....	39
4.4	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดในการตรวจหา VH1526 ด้วยวิธี dot blot.....	39
4.5	การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry …..	40
4.6	การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่น จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot.....	43
4.7	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวแทนในกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี dot blot.....	45
4.8	การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blot.....	46
4.9	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการตรวจหา *V. harveyi* สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธี dot blot.....	47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon)* หรือ Giant tiger prawn จัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยได้ค่อนข้างสูงจากการเป็นสินค้าส่งออก ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบกับปัญหาหลายด้าน ปัญหาหลักได้แก่ การระบาดของโรควิบริโอสิส (Vibriosis) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ ในปี ค.ศ. 1854 Filippo Pacini นักวิทยาศาสตร์ชาวอิตาลีเป็นผู้ค้นพบสปีชีส์แรกของ *Vibrio* ซึ่งได้แก่ *V. cholerae* (Thompson และคณะ, 2004) ที่เป็นสาเหตุโรคอหิวาตกโรคในคน ต่อมามีรายงานการระบาดโรคในกุ้งที่มีสาเหตุจาก *V. vulnificus, V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* (Gopal และคณะ, 2004)

V. harveyi จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เจริญได้ดีทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ พบทั่วไปในน้ำทะเล บนผิว อวัยวะภายในและระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล (Baumann และคณะ, 1971) *V. harveyi* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่สร้างปัญหาการระบาดในกุ้งทั่วโลก ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) 5-9 และปริมาณเกลือ (NaCl) 1-6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 0.5-7.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับความเค็ม 15-30 ส่วนในพันส่วน (ppt) ปริมาณสารอาหารในน้ำได้แก่ สารอินทรีย์ที่มีปริมาณสูง เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และสารอนินทรีย์โดยเฉพาะอิออนของโซเดียม ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นภาวะที่พบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Kiriratnikom และคณะ, 2000) สาเหตุที่ทำให้กุ้งป่วยและตายเกิดจากเมื่อปัจจัยจากภาวะแวดล้อมภายนอกมีความเหมาะสมทำให้ *V. harveyi* ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติเพิ่มจำนวนมากขึ้น สามารถเข้ายึดเกาะอยู่ตามอวัยวะภายนอกต่างๆ ของกุ้งเช่น เปลือก เหงือก ขาทุกส่วนและปะปนกับน้ำที่กุ้งรับเข้าไปโดยตรงและมีปริมาณมากในตับ เมื่อกุ้งลอกคราบ เกิดบาดแผลหรือกุ้งตัวอื่นมากินกุ้งที่กำลังติดเชื้อ *V. harveyi* อยู่ เชื้อนี้ก็จะแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว หลังจากที่ *V. harveyi* เข้ามาอยู่ในตัวกุ้งจะเพิ่มจำนวนและเข้าทำลายอวัยวะภายในบริเวณตับ เนื้อเยื่อหัวใจ ต่อมน้ำเหลือง เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทางเดินอาหาร เซลล์สืบพันธุ์และกล้ามเนื้อ ท้ายสุดจะเข้าสู่กระแสเลือดและสร้างสารพิษออกมาเป็นผลให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (Septicemia) มีผลทำให้เม็ดเลือดของกุ้งแตก กุ้งจะอ่อนแอเกิดการอักเสบเป็นลักษณะเนื้อเยื่อตาย (necrosis) ตามอวัยวะต่างๆ เช่น เหงือกอักเสบรยางค์ฉีกขาด จุดดำตามเปลือกกุ้ง ตับอักเสบและตายในที่สุด (Montero และ Austin, 1999)

การสังเกตการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งในโรงเพาะฟักและบ่อดินนั้นจะสังเกตเห็นเมื่อมีปริมาณ *V. harveyi* สูงมากในน้ำเลี้ยงกุ้งและ

เมื่อเกิดการติดเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่ตัวกุ้งแล้ว โดยจะเห็นเป็นแสงพราวในเวลากลางคืนบริเวณเหงือกและเปลือกส่วนหัว ต่อมากุ้งจะป่วย กินอาหารลดลง ตับและตับอ่อนลีบฝ่อ เกิดลักษณะเนื้อเยื่อตาย พฤติกรรมภายนอกที่เห็นคือ กุ้งจะมีอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำเกยขอบบ่อ เรืองแสงในที่มืดและมีการตายเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการติดเชื้อและในที่สุดจะตายทั้งหมดภายในเวลา 2-3 วัน ดังนั้นจึงก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงอย่างมาก เนื่องจากการใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาตรวจวิเคราะห์และจำแนกแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* นั้นจำเป็นต้องใช้เวลาประมาณ 3-4 วันหรือมากกว่า 1 สัปดาห์ จึงจะทราบผลการตรวจที่แน่นอน (Krieg และ Holt, 1984) จึงไม่สามารถแก้ปัญหาของโรคนี้ได้ทันและเทคนิคนี้ยังต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ การตรวจสอบด้วยวิธีทางโมเลกุลจึงได้มีการพัฒนาขึ้นโดยการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ออกแบบไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับ *V. harveyi* เพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรียดังกล่าว (Thaithongnum และคณะ, 2006) ซึ่งจะให้ผลที่รวดเร็วและมีความแม่นยำแต่มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญและห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นการนำเอาแอนติบอดี มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์วินิจฉัยโรคติดเชื้อโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specificity) ต่อกันสูงมาก แอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อแอนติเจนชนิดนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดเดียวกันนี้ (homologous antigen) ได้อย่างจำเพาะ แอนติบอดีจะรับรู้โครงสร้างโดยรวมของอิพิโทปบนแอนติเจนและสามารถแยกแยะความแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยที่เกิดขึ้นบนอิพิโทป เช่น ลำดับกรดอะมิโน เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1975 Köhler และ Milstein ได้คิดค้นวิธีเตรียมเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะได้ และสามารถสร้างได้จำนวนมากโดยอาศัยหลักการของการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) หรือ somatic cell hybridization ระหว่างบี-เซลล์ที่ปกติเป็นเซลล์สร้างแอนติบอดีกับ myeloma cell ที่เป็นเซลล์มะเร็ง จากการหลอมรวมก่อให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการและมีอายุยืนยาวไม่ตาย เรียกเซลล์นี้ว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) และแอนติบอดีที่ได้คือโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies) เป็นแอนติบอดีที่สร้างจากโคลน (clone) เดียวกันและมีความจำเพาะต่ออิพิโทปที่เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น ตัวอย่างการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ประโยชน์ที่สำคัญ เช่น การตรวจวิเคราะห์การตั้งครรภ์และการตรวจหมู่เลือด เป็นต้น (อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2543) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้จำเพาะ (specific marker) เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ต้องการจากแบคทีเรียชนิดอื่นและยังสามารถนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้ด้วย (Adam และคณะ, 1995) ทั้งนี้เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไว แม่นยำสูง ให้ผลรวดเร็วเมื่อนำมาเตรียมเป็นชุดสำเร็จรูปสะดวกใช้บุคคลทั่วไปและเกษตรกรสามารถนำไปใช้งานตรวจวิเคราะห์ได้เองเพราะ

สะดวก ทำได้ง่าย และปลอดภัย ต้นทุนต่ำไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง (Sithigorngul และคณะ, 2000)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคถูกผลิตออกมามากมายเช่น ***Bacillus cereus*** ซึ่งก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด Emetic และ Diarrheal ในคน (Charni และคณะ, 2000) ***V. cholera*** ก่อโรคอาหารเป็นพิษในคน (Saha และ Nair, 1997) และ ***Photobacterium damsilae*** spp. ***piscicida*** ก่อโรค Pasteurellosis ในปลา (Jung และคณะ, 2001) แต่ในปัจจุบันมีเพียงรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับ ***V. harveyi*** ซึ่งได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจได้เฉพาะ ***V. harveyi*** สายพันธุ์ 639 เท่านั้น (Phianphak และคณะ, 2005)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ ***V. harveyi*** สายพันธุ์ 1526 ต้นเหตุของโรคเรืองแสง ทั้งนี้คาดว่าจะได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถแยก ***V. harveyi*** จาก ***Vibrio*** spp. อื่นๆ และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบความจำเพาะกับเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ ***V. harveyi*** โดยวิธี immunohisto-chemistry เพื่อศึกษาบริเวณที่ ***V. harveyi*** เข้าทำลายอวัยวะภายในของกุ้งกุลาดำเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาชุดตรวจอย่างง่าย แม่นยำ และรวดเร็วในการพิสูจน์และวินิจฉัยโรคจากการติดเชื้อ ***V. harveyi***

วัตถุประสงค์

เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ ***V. harveyi*** แบคทีเรียก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำเพื่อใช้จำแนก ***V. harveyi*** จาก ***Vibrio*** spp. และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ***V. harveyi*** 1526 และไอโซเลตอื่นๆ ที่แยกได้จากกุ้งป่วยจากแหล่งต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798)

อยู่ในไฟลัมอาร์โทรโพดา (Arthropoda) คลาสครัสเตเซีย (crustacea) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius และชื่อภาษาอังกฤษคือ Giant tiger prawn (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

1. ลักษณะทั่วไป

เป็นกุ้งทะเล ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลาย และสีออกน้ำตาลเข้มข้างแถบสีขาว ด้านบนของกรีมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ สันกรียาวเกือบถึงคาราเปส มีสันตับ (Hepatic crest) ยาวตรงขนานไปกับลำตัว หนวดยาวไม่มีลายชัดเจน ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาว่ายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงิน โคนสีขาว ขาเดินคู่หน้าไม่มี exopod ขนาดยาวประมาณ 18-25 เซนติเมตร (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

2. การสืบพันธุ์

กุ้งมีอวัยวะเพศภายนอกมองเห็นได้ชัดเจน และสามารถใช้ลักษณะความแตกต่างของอวัยวะเพศในการจำแนกชนิดได้ อวัยวะเพศผู้เรียกว่า พีแตสม่า (petasma) เกิดจากการเปลี่ยนแปลง แขนงอันในของขาว่ายน้ำคู่แรกทั้ง 2 ข้างเชื่อมติดกันเพื่อทำหน้าที่เป็นอวัยวะเพศผู้ ส่วนอวัยวะเพศเมีย เรียกว่า ทีไลคัม (thelycum) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงผนังด้านท้อง (sternal plate) ของรยางค์ส่วนอก ปล้องที่ 7 และ 8 หรือตรงกับขาเดินคู่ที่ 4-5 พัฒนามาเป็นถุงสำหรับรับน้ำเชื้อ วัยเจริญพันธุ์ (maturation) หมายถึง รังไข่หรืออวัยวะที่ใช้ในการผสมพันธุ์พัฒนาเต็มที่ ในการผลิตไข่ (egg) หรือน้ำเชื้อ (sperm) พร้อมที่จะผสมพันธุ์โดยใช้อวัยวะภายนอก เมื่อลอกคราบเพื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์อวัยวะเพศทั้ง 2 เพศ เติบโตดีแล้วการผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นภายหลังจากที่ตัวเมียลอกคราบใหม่ ซึ่งแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์ส่วนใหญ่จะได้มาจากการจับจากทะเลหรือบ่อเลี้ยง (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

3. วงจรชีวิต

ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะนอเพียส (Nauplius) ภายใน 12 ชั่วโมง หลังได้รับการปฏิสนธิ ระยะนอเพียส มีขนาด 0.3-0.33 มิลลิเมตร ยังไม่กินอาหาร ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนประมาณ 2 วัน ระยะนี้จะมีการลอกคราบ 6 ครั้ง สิ้นสุดระยะนอเพลียสจะมีขนาดประมาณ 0.6 มิลลิเมตร จะเติบโตเข้าสู่ระยะโปรโตซูเอีย (Protozuea) มีขนาด 1-3.3 มิลลิเมตร กินแพลงตอนพืชเป็นอาหาร ลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลา 3-4 วัน จะเติบโตเข้าสู่ระยะไมสีส (Mysis) ขนาดประมาณ 3.3-5

เซนติเมตร กินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร ใช้เวลา 3-4 วัน จะเข้าสู่ระยะโพสลาวา (Postlarva) หรือที่นิยมเรียกว่า P1 ระยะนี้จะเรียกตามจำนวนวันที่กุ้งเติบโต เช่น P10 คือกุ้งในระยะนี้อายุ 10 วัน จนวันที่ 20 กุ้งจะมีขนาด 2-3 เซนติเมตร จะเข้าสู่ระยะจูเวนไนล์ (Juvenile) มีลักษณะต่างๆ สมบูรณ์เหมือนตัวเต็มวัย แต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ จนเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ และใช้เวลา 10 เดือน จะเป็นตัวเต็มวัย (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

4. ถิ่นอาศัย

พบได้ทั่วไปในทวีเอเชีย ในประเทศไทยพบการแพร่กระจายทั่วไป พบมากบริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งชุมพรถึงนครศรีธรรมราชและทางฝั่งอันดามันจะพบมากที่ภูเก็ต ระนอง ชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีดินเป็นทรายปนโคลนหรือทรายปนเปลือกหอยและหินประการัง สามาถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี อดทน โตเร็ว จึงนิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

5. การเพาะเลี้ยง

ประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงหลายรูปแบบ ได้แก่ แบบธรรมชาติ แบบกึ่งพัฒนา และแบบพัฒนา กุ้งกุลาดำจะเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเค็มของน้ำ 15-30 ส่วนในพันส่วน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่น้อยกว่า 3-5 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่าความเป็นกรดและด่างของน้ำ 7.5-8.5 แอมโมเนียไม่ควรเกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ไม่ควรเกิน 0.033 ส่วนในล้านส่วน มีธาตุอาหารจำพวกไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิกาไม่มากเกินไป น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงต้องปราศจากสารพิษต่างๆ ได้แก่ ยาปราบศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง และโลหะหนัก จำพวกปรอท ทองแดง สังกะสี แคดเมียม เป็นต้น และสภาพพื้นบ่อไม่ควรเน่าเสีย ป้องกันโดยการดูแลควบคุมอาหารที่ให้และควบคุมปริมาณของแพลงตอนพืชในบ่อ (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543; วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

2.2 โรควิบริโอซิส

โรควิบริโอซิสเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาการตายในการเพาะเลี้ยงกุ้ง (Austin และ Austin, 1993) และสัตว์น้ำอื่นๆ เช่น ในกุ้งมังกร (Diggles และคณะ, 2000) มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียในสกุลวิบริโอ โดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มนี้จะอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำเค็มและน้ำกร่อย มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียสกุลวิบริโอโดยทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างทั้งสัตว์และพืชในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล พบว่ามีความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ค่อนข้างมาก (Vandenberghe และคณะ, 2003) ในปีค.ศ. 1991 Ruangpan และ Kitao ทำการแยกเชื้อสกุลวิบริโอได้ถึง 205 ไอโซเลต จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ตัวอย่างของแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*

และ *V. penaeicida* (Gopal และคณะ, 2004; Aguirre-Guzmān และคณะ, 2001) ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งที่เป็นโรคชนิดนี้คือ กุ้งจะมีอาการอ่อนแอ เกิดการอักเสบเป็นลักษณะเนื้อตายตามอวัยวะต่าง ๆ เหงือกอักเสบ ตับอักเสบ รยางค์ฉีกขาด พบจุดดำตามบริเวณเปลือก ติดเชื้อในกระแสเลือด และตายในที่สุด (Chen และคณะ, 1992b; Lightner, 1996) *V. harveyi* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียสกุลนี้ที่สร้างปัญหาการระบาดในกุ้งกุลาดำ (Lee และคณะ, 1999)

2.3 *Vibrio harveyi*

1. ลักษณะของ *Vibrio harveyi*

V. harveyi จัดเป็นแบคทีเรีย แกรมลบ รูปแท่ง เจริญได้ดีทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ พบทั่วไปในน้ำทะเล บนผิว อวัยวะภายในและระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล (Baumann และคณะ, 1971) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดและด่าง 5-9 และปริมาณเกลือ 1-6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 0.5-7.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับความเค็ม 15-30 ส่วนในพันส่วน (ppt) ปริมาณสารอาหารในน้ำได้แก่ สารอินทรีย์ที่มีปริมาณสูง เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน เป็นต้น และสารอนินทรีย์โดยเฉพาะอิออนของโซเดียม ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นภาวะที่พบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Kiriratnikom และคณะ, 2000)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *V. harveyi* (Baumann และ Schubert, 1984)

สมบัติ	*V. harveyi*
Gram reaction	-
Cell morphology	r
Luminesence	d
Swarming	-
0/129 sensitivity	
10 µg	d
150 µg	+
Oxidation/fermentation	F
Decarboxylase	
Arginine	-
Lysine	+
Ornithine	+
Growth in % NaCl	
0	-
3	+
6	+
8	d
10	nd
Catalase	nd
Oxidase	+
Voges Proskauer	-
Growth at °C	
4	-
30	+
35	+
40	d
Acid from	
Glucose	nd
Arabinose	d
Salicin	d
Sucrose	d

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สมบัติ	*V. harveyi*
Enzyme production	
Alginase	d
Amylase	+
Gelatinase	+
Lipase	+
Carbon sources	
Xylose	-
Mannose	+
Arabinose	-
Cellulose	+
Glucose	+
Galactose	d
Trehalose	+
Melibiose	-
Lactose	-
Mannitol	+

หมายเหตุ + = positive reaction, - = negative reaction, F = fermentative, d = diverse, nd = no data, r = rod shape.

2. การก่อโรค

V. harveyi เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่แล้วในธรรมชาติ เมื่อปัจจัยจากภาวะแวดล้อมภายนอกมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนี้ทำให้ *V. harveyi* เพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งจะเป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งป่วยและตายได้โดยเชื้อชนิดนี้สามารถเข้ายึดเกาะอยู่ตามอวัยวะภายนอกต่างๆ ของกุ้ง เช่น เปลือก เหงือก ขาทุกส่วน และปะปนกับน้ำที่กุ้งรับเข้าไปโดยตรงและมีปริมาณมากในตับ เมื่อกุ้งลอกคราบ เกิดบาดแผลหรือกุ้งตัวอื่นมากินกุ้งที่กำลังติดเชื้อ *V. harveyi* อยู่ เชื้อนี้ก็จะแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว หลังจากที่ *V. harveyi* เข้ามาอยู่ในตัวกุ้งก็จะเพิ่มจำนวนและเข้าทำลายอวัยวะภายในบริเวณตับ เนื้อเยื่อหัวใจ ต่อมน้ำเหลือง เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทางเดินอาหาร เซลล์สืบพันธุ์และกล้ามเนื้อ ท้ายสุดจะเข้าสู่กระแสเลือดและสร้างสารพิษออกมาเป็นผลให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดมีผลทำให้เม็ดเลือดของกุ้งแตก กุ้งจะอ่อนแอเกิดการอักเสบเป็นลักษณะเนื้อเยื่อตายตามอวัยวะต่างๆ เช่น เหงือกอักเสบ รยางค์ฉีกขาด จุดดำตามเปลือกกุ้ง ตับ

อักเสบและตายในที่สุด (Montero และ Austin, 1999) ตัวอย่างของงานวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. harveyi* ได้แก่

Prayitno และ Latchford (1995) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* และ *Photobacterium phosphosporeum* ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) โดยการผสมแบคทีเรียลงในบ่อเลี้ยงกุ้ง พบว่ากุ้งจะเกิดโรคเมื่อติดเชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU/มิลลิลิตร และการระบาดของโรคเรืองแสงจะพบในฤดูฝน

Lavilla-Pitogo และคณะ (1998) ศึกษาการเกิดโรคของลูกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ในบ่อเลี้ยงจากการติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในกลุ่มวิบริโอ โดยตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียในน้ำของบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 60 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียเรืองแสงกลุ่มวิบริโอในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เกิดโรคจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 12 ถึงอาทิตย์ที่ 3 ของการเลี้ยง และจากการศึกษาทางพยาธิวิทยาทางเนื้อเยื่อ (Histopathology) พบว่าอวัยวะเป้าหมายของการติดเชื้อคือ ตับ ซึ่งจะเกิดการอักเสบอย่างรุนแรงในบริเวณ intertubular sinuses

Leaño และคณะ (1998) ศึกษาปริมาณแบคทีเรียเรืองแสงกลุ่มวิบริโอในตับ (Hepatopancreas; hp) ของลูกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ในบ่อเลี้ยงกุ้งตัวอย่าง 23 บ่อ ซึ่งมี 14 บ่อที่เกิดโรคโดยทำการนับปริมาณแบคทีเรียเรืองแสงในการเลี้ยงวันที่ 15 ได้ผลดังนี้ ในตับของกุ้งจากบ่อที่เกิดโรคมีจำนวนแบคทีเรียเรืองแสงเฉลี่ย 2.4×10^1 CFU/ตับอ่อน ขณะที่ในตับของกุ้งจากบ่อที่ไม่เป็นโรคนับปริมาณแบคทีเรียเรืองแสงเฉลี่ยได้ 0.3×10^1 CFU/ตับอ่อน และระหว่างการเกิดโรคในการเลี้ยงวันที่ 18-32 ปริมาณแบคทีเรียเรืองแสงในตับของกุ้งที่เกิดโรคสูงกว่าในตับของกุ้งปกติอย่างชัดเจนคือ 9.0×10^4 CFU/ตับอ่อน และ 7.0×10^1 CFU/ตับอ่อน ตามลำดับ

Montero และ Austin (1999) ศึกษาการสร้าง extracellular products (ECPs) ของแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* ซึ่งแยกได้จากตัวอ่อนของกุ้งขาว (*P. vannamei*) ที่เป็นโรค โดยการเลี้ยง *V. harveyi* ในอาหารเหลวทริปโตนซอย (Tryptone soy broth) ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 % พบว่าสาร ECPs มีความเป็นพิษเมื่อฉีดเข้ากุ้งในปริมาณ 4.4 ไมโครกรัม พบการเกิดปฏิกิริยาโปรทิโอไลติก (Proteolytic) ฮีโมไลติก (Haemolytic) และ ไซโททอกซิก (Cytotoxic) สาร ECPs ทนร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเมื่อนำสาร ECPs มาย่อยด้วยโปรตีเอสเค (protease K) พบว่ายังสามารถทำให้เกิดโรคในกุ้งได้เมื่อฉีดเข้ากุ้งผ่านทางกล้ามเนื้อ (intramuscular injection)

Lee และคณะ (1999) ศึกษาผลกระทบต่อการจับตัวกันเป็นก้อนของเลือดกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* รวมถึงสาร ECPs และซิสทีอีนโปรตีเอส (cysteine protease) ที่ได้จาก *V. harveyi* พบว่าเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi* สาร ECPs และซิสทีอีนโปรตีเอส

จะไม่จับตัวกันเป็นก้อน นอกจากนั้นยังไม่พบสารโคแอกูโลเจน (coagulogen) ในพลาสมา (plasma) ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi* สาร ECPs และซิสทีอีนโปรตีเอสของ *V. harveyi*

Aguirre-Guzmãn และคณะ (2001) ศึกษาความไวในการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ 4 สายพันธุ์ (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. penaeicida*) ในตัวอ่อนระยะต่างๆของกุ้งขาวอเมริกา (*Litopenaeus vannamei*) คือ nauplii, protozoea I-III, mysis I-III และ postlarvae 1 โดยทำการแช่กุ้งในแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 10^3 10^5 และ 10^7 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที พบว่าตัวอ่อนกุ้งทุกระยะที่แช่ใน *V. alginolyticus* จะมีอัตราการรอดตายเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือตัวอ่อนกุ้งที่ไม่ได้ถูกแช่ในแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน โดยกุ้งที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *V. alginolyticus* จะมีอัตราการรอดตายสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วยแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ ส่วนกุ้งที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *V. penaeicida* จะมีการตายมากที่สุดโดยกุ้งในทุกระยะจะมีอัตราการรอดตายต่ำที่สุดเมื่อติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เพียงแค่ในระดับต่ำ (10^3 CFU/มิลลิลิตร) ขณะที่กุ้งซึ่งติดเชื้อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* จะมีอัตราการตายสูงเมื่อติดเชื้อในปริมาณมาก

Alavandi และคณะ (2006) ศึกษาลักษณะไบโอไทป์ของ *V. harveyi* และการก่อโรคในตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ พบว่าไบโอไทป์ที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ (sucrose-fermenting biotype) จะก่อโรคในตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ โดยกุ้งในระยะไมซิส (mysis) ซึ่งเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุน้ำทะเลปลอดเชื้อ 1 ลิตร จะมีอัตราการตายประมาณ 34-41% เมื่อใส่เชื้อ *V. harveyi* ลงในภาชนะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ภายในเวลา 60 ชั่วโมง อัตราการตายของกุ้งเนื่องจากการติดเชื้อ *V. harveyi* จะสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีเกลือสูง (35 ppt) และอุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังพบว่า *V. harveyi* สร้างปัจจัยต่างๆที่เอื้อให้เกิดโรคมากขึ้นได้แก่ การหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ เช่น ฟอสโฟไลเพส เจลาทิเนส เคซีเนส โปรติเอส และฮีโมไลซิน

นอกจากกุ้งแล้ว *V. harveyi* ยังก่อโรคในสัตว์น้ำที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการพาณิชย์ชนิดอื่นๆอีกดังรายงานการศึกษาการก่อโรคของ *V. harveyi* ในสัตว์น้ำชนิดอื่นเช่น

Zhang และ Austin (2000) รายงานการก่อโรคจากการติดเชื้อ *V. harveyi* ในปลาแซลมอน พบว่าปลาแซลมอนมีอัตราการตายสูงถึง 100% เมื่อฉีด *V. harveyi* ปริมาณ 10^6 เซลล์ เข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal injection) พบการสร้างสาร ECPs ของ *V. harveyi* ซึ่งในสาร ECPs ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดได้แก่ โปรตีเอสชนิดเคซีเนส (caseinase) เจลาทิเนส (gelatinase) ฟอสโฟไลเพส (phospholipase) ไลเพส (lipase) และสารฮีโมไลซิน (haemolysin)

Alcaide และคณะ (2001) รายงานการเกิดโรคของม้าน้ำ (*Hippocampus sp.*) โดยมีอาการคล้ายกับโรควิบริโอซิสคือ มีเลือดออกตามผิวและตับ นอกจากนั้นยังพบการสะสมของน้ำในช่องท้องหลังจากทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างม้าน้ำที่เป็นโรค พบว่าเกิดจากการติดเชื้อ

V. harveyi เนื่องจากมีการตรวจพบ *V. harveyi* ในบริเวณผิวที่มีเลือดออก ปาก และตับของตัวอย่างที่ใกล้ตาย อัตราการตายของม้าน้ำที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* สูงถึง 90% และตายภายใน 3-5 วัน หลังจากแสดงอาการของโรค

Tendencia (2002) พบการเกิดโรคในปลา seabass (*Lates calcarifer*) โดยมีอาการดวงตาทึบแสงและยื่นออก ว่ายน้ำสะเปะสะปะ และเกิดแผลมีเลือดออกตามบริเวณผิวประมาณ 3 วันหลังจากมีอาการตายื่นออก จากการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อ เช่น ม้าม ไต ตา สมอง และบริเวณผิวที่เป็นแผลของปลาที่เป็นโรคพบว่าเกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi*

Liu และคณะ (2003) รายงานการเกิดโรคในปลา red drum (*Sciaenops ocellatus*) มีอาการลำไส้บวมเนื่องจากลำไส้และกระเพาะอักเสบรวมถึงเกิดน้ำสีเหลืองใสในโพรงเยื่อบุช่องท้อง หลังจากทำการแยกเชื้อจากไต ตับ และน้ำในโพรงเยื่อบุช่องท้อง พบว่าเป็นแบคทีเรีย *V. harveyi* มีค่า LD_{50} อยู่ที่ 2.9×10^7 CFU/กรัม ของน้ำหนักปลา

Zorrilla และคณะ (2003) รายงานการเกิดโรคในปลาลิ้นหมา (*Solea senegalensis* (Kaup)) พบว่าเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* จากการแยกเชื้อบริเวณ แผลเปื่อย ตับ ม้าม และไต โดยค่า LD_{50} ของ *V. harveyi* มีค่า 7.4×10^4 CFU/กรัม ของน้ำหนักปลา ในขณะที่ค่า LD_{50} ขอ *V. parahaemolyticus* อยู่ที่ 6.3×10^5 CFU/กรัม ของน้ำหนักปลา

Tendencia (2004) รายงานการเกิดโรคในม้าน้ำ (*Hippocampus kuda*) โดยมีอาการผิวบริเวณส่วนกลางและบนของม้าน้ำเปลี่ยนสีจากดำเป็นขาว อ่อนแอ เคลื่อนที่ช้า และไตมีสีซีด หลังการแยกเชื้อจากตัวอย่างม้าน้ำพบแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* ในบริเวณผิวและไตของตัวอย่าง

Austin และ Zhang (2006) ทำการศึกษาค้นคว้า และรายงานการก่อโรคของ *V. harveyi* ในสัตว์ทะเลทั้งในกลุ่มมีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังว่า *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญไม่ว่าจะเป็นในปลาทะเลและสัตว์กลุ่มไม่มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะกุ้ง ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 โรคของสัตว์ทะเลที่เกิดจาก *V. harveyi* (Austin และ Zhang, 2006)

Host	Name of disease	Key reference(s)
Vertebrates		
Jack crevalle (*Caranx hippos*)	Deep dermal lesions	Kraxberger-Beatty *et al*. (1990)
Various fish species	Gastro-enteritis	Lee *et al*. (2002)
Various fish species	Eye lesions	Ishimura and Muroga (1997)
Summer flounder (*Paralichthys dentatus*)	Infectious necrotizing enteritis	Soffientino *et al*. (1999) and Lee *et al*. (2002)
Sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*)	Vasculitis	Grimes *et al*. (1984b) and Colwell and Grimes (1984)
Lemon shark (*Negraprion brevirostris*)	Vasculitis	
Sandbar shark	Skin ulcer	Bertone *et al*. (1996)
Invertebrates		
Japanese abalone (*Sulculus diversicolor supertexta*)	White spot on the foot	Nishimori *et al*. (1998)
Penaeid shrimp	Luminous vibriosis	Prayitno and Latchford (1995)
Penaeid shrimp	Bolitas negricans	Robertson *et al*. (1998)
Sea cucumber (*Holothuria scabra*)	Skin ulceration	Becket *et al*. (2004)

ตารางที่ 2.3 กลไกการก่อโรคของ *V. harveyi* (Austin และ Zhang, 2006)

Pathogenicity mechanism	Key reference(s)
Extracellular products (cysteine protease, phospholipase, haemolysin)	Liu *et al*. (1996) and Soto-Rodriguez *et al*. (2003)
Lipopolysaccharide	Montero and Austin (1999)
Bacteriophage	Oakey and Owens (2000)
Bacteriocin-like substance	Prasad *et al*. (2005)
Quorum-sensing factors	Henke and Bassler (2004)
Capacity to bind iron	Owens *et al*. (1996)
Ability to attach and from biofilms	Karunasagar *et al*. (1994)

Nakayama และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษและความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *V. harveyi* 6 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้ง 3 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ผ่านการเลี้ยงเก็บไว้อีก 3 สายพันธุ์ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) พบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกสูงกว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการเลี้ยงเก็บไว้ประมาณ 2 เท่าคือ ให้อัตราการรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกอยู่ที่ 44% และ 92% ตามลำดับ สายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้งแสดงการย่อยเม็ดเลือดแดงของแกะในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการเลี้ยงเก็บไว้ไม่แสดงเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งผสมเม็ดเลือดแดงแกะ (blood agar) สายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้งมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (Kanamycin, Oxytetracyclin, Carbenicillin และ Amphicillin) สูงกว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการเลี้ยงเก็บไว้ หลังการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

3. การควบคุม

การศึกษาเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยวิธีการใช้สารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น การใช้สารต้านจุลชีพชนิด oxytetracycline หรือ chloramphenical (สุกิจ รัตนวินิจกุล และคณะ, 2531; นพดล ค้าขาย และคณะ, 2532) การใช้ยา lincomycin และ spectinomycin (บัณฑิต ลีลายนะ และคณะ, 2533) นอกจากการใช้ยาต้านจุลชีพแล้วยังมีรายงานการลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยใช้สารเคมีบางชนิด เช่น ฟอร์มาลีน ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 ส่วนในล้าน สามารถฆ่าเชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น

$3x10^7$ CFU/มิลลิลิตร ในเวลา 24 และ 12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 25 ส่วนในล้าน สามารถฆ่าเชื้อได้ 50% ในเวลา 24 ชั่วโมง (เต็มดวง พึ่งขจรบุญ, 2532) การใช้สารต้านจุลชีพมีข้อเสียคืออาจทำให้แบคทีเรียก่อโรคเกิดการดื้อยาดังตัวอย่างงานวิจัยของ Tendencia และ de la Peña (2000) ซึ่งศึกษาการต้านทานต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยทำการแยกแบคทีเรียจากน้ำ ตะกอน และกุ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 3 ลักษณะคือ บ่อที่ไม่เคยใช้สารต้านจุลชีพ บ่อที่เคยใช้สารต้านจุลชีพและบ่อที่ใช้สารต้านจุลชีพอยู่ในปัจจุบัน แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็น *V. harveyi* ความต้านทานต่อสารต้านจุลชีพพบสูงสุดในแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อที่ปัจจุบันใช้สารต้านจุลชีพอยู่ ตามด้วยบ่อที่เคยใช้สารต้านจุลชีพและบ่อที่ไม่เคยใช้ แบคทีเรียที่แยกได้มีความต้านทานต่อ Oxytetracyclin สูงสุด (4.3%) ตามด้วย Furazolidone (1.6%), Oxolinic acid (1%) และ Chloramphenicol (0.66%)

สำหรับการควบคุมปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ด้วยวิธีการทางชีวภาพนั้นได้มีผู้ทำการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย *B. subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04 *Nitrosomonas* sp. AM-11 และ *Alteromonas* sp. S9730 รวมทั้ง *V. alginolyticus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ (มณีจันทร์ เมฆธน และ กมลพร มาแสวง, 2543; ขนิษฐา แสงงาม, 2544; ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2542; ส่งศรี มหาสวัสดิ์ และคณะ 2541; ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2543) งานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการควบคุม *V. harveyi* ได้แก่

Moriarty (1998) ศึกษาการควบคุมแบคทีเรียเรืองแสงในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศอินโดนีเซียโดยการใช้แบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus*) พบว่าในฟาร์มที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรียบาซิลลัส จะพบการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในสกุลวิบริโอซึ่งทำให้กุ้งตายก่อนที่จะถึงวันที่ 80 ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่ฟาร์มที่ใช้แบคทีเรียบาซิลลัสสามารถเลี้ยงกุ้งได้มากกว่า 160 วัน โดยไม่พบปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi*

Chythanya และคณะ (2001) ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ก่อโรคในกุ้ง โดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas* พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสร้างสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุลวิบริโอซึ่งประกอบด้วย *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* และ *V. vulnificus* ได้ สารประกอบที่พบมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนร้อน ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม(chloroform) และทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ สารประกอบที่ผ่านการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มสามารถลดปริมาณ *V. harveyi* ในน้ำได้เมื่อใช้ในปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อกุ้งแม้จะใช้ปริมาณสูงถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Abrahum (2004) ศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* โดย *Altermonas sp.* ซึ่งแยกได้จากกุ้งกุลาดำ พบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์และติดอยู่บริเวณผิวด้านนอกของเซลล์หลังจากทดสอบให้

Altermonas sp. เจริญในตัวกุ้ง พบว่าสามารถยับยั้งการติดเชื้อ *V. harveyi* และลดอัตราการตายของกุ้งกุลาดำได้

Chabrillõn และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคของ *V. harveyi* ในปลาลิ้นหมา *Solea senegalensis* (Kaup) โดยใช้แบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Vibrionaceae* และ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากปลา gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) โดยศึกษาความสามารถในการจับกับผิวและเยื่อเมือกของปลาลิ้นหมา ตลอดจนผลกระทบต่อ *V. harveyi* พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากปลา gilthead sea bream มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกของลำไส้ปลาลิ้นหมาได้ดีกว่า *V. harveyi* และมีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวผสมกับอาหารให้ปลากิน พบว่าสามารถลดอัตราการตายของปลาได้ถึง 60% เมื่อทดสอบการติดเชื้อ *V. harveyi*

นอกจากแบคทีเรียแล้วยังมีการศึกษาการใช้สิ่งมีชีวิตในกลุ่มไวรัสเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งด้วย เช่น Vinod และคณะ (2005) ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรีย (Bacteriophage) เพื่อใช้ในการควบคุมแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* ไวรัสของแบคทีเรียที่ได้มีลักษณะเป็น ไวรัสที่มีดีเอ็นเอสายคู่ (Double strand DNA) จัดอยู่ในกลุ่ม *Siphoviridae* ไวรัสนี้มีผลทำให้เซลล์ของ *V. harveyi* แตกซึ่งสามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียนี้ได้

Pasharawipas และคณะ (2005) ทำการแยกไวรัสของแบคทีเรีย *V. harveyi* 1114 ที่แยกได้จากกุ้งในประเทศไทย ไวรัสที่ได้เป็นไวรัสดีเอ็นเอสายคู่ขนาดประมาณ 80 กิโลเบส รูปร่างบริเวณหัวเป็น ไอโคสะฮีดรอล (icosahedral) เส้นผ่านศูนย์กลาง 60-62 นาโนเมตร จัดอยู่ในกลุ่ม *Siphoviridae* พบว่าไวรัสนี้ทำให้เซลล์ของ *V. harveyi* เกิดการแตกได้

Karunasagar และคณะ (2007) ศึกษาการควบคุม *V. harveyi* โดยทำการแยกไวรัสของแบคทีเรียในกลุ่มที่ก่อให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียที่จำเพาะกับ *V. harveyi* ได้ 4 ไอโซเลต แบ่งเป็น 3 ไอโซเลต จากเนื้อเยื่อหอยนางรมและจากน้ำบ่อเลี้ยงกุ้ง 1 ไอโซเลต ไวรัสดังกล่าวสามารถทำลายแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ 55-70% ไวรัสนี้จัดอยู่ในกลุ่ม *Siphoviridae* ซึ่งสามารถลดจำนวน *V. harveyi* ในรูปแบบไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้ และจากการทดลองในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้ไวรัส $2x10^6$ PFU/มิลลิลิตร พบว่ากุ้งมีอัตราการรอดมากกว่า 85%

สำหรับวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษาเพื่อใช้ในการควบคุมแบคทีเรีย *V. harveyi* ตัวอย่างเช่น Lee และคณะ (1997) ศึกษาความสามารถในการเป็นภูมิคุ้มกันต่อ *V. harveyi* ของแอนติบอดีจากกระต่ายที่จำเพาะกับ ECPs ของ *V. harveyi* และแอนติบอดีที่จำเพาะกับเซลล์ของ *V. harveyi* เมื่อทำการฉีดแอนติบอดีดังกล่าวให้กุ้งเป็นเวลา 10, 17 และ 24 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับการฉีดด้วยแอนติบอดีจากกระต่ายที่จำเพาะกับ ECPs ของ

V. harveyi และแอนติบอดีที่จำเพาะกับเซลล์ของ *V. harveyi* เป็นเวลา 10 และ 17 วัน สามารถอยู่รอดได้นานถึง 2 สัปดาห์ เมื่อทดสอบการติดเชื้อ *V. harveyi*

Crosbie และ Nowak (2004) ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา barramundi (*Lates calcarifer* (Bloch)) ต่อสารแบคเทอริน (bacterin) ของ *V. harveyi* ที่ผ่านการทำลายด้วยฟอร์มาลีน ภายหลังจากการนำเข้าตัวปลา 3 วิธีคือ ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ฉีดเข้าทางทวาร (anal intubation) และการจุ่ม (immersion) พบการสร้างซีรัมจากปลาในทุกวิธี โดยพบมากที่สุดในการทดลองแบบฉีดเข้าทางช่องท้อง เมื่อนำซีรัมมาทดสอบกับ *V. harveyi* ก็พบการตอบสนองที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* สูงสุดในซีรัมที่ได้จากการฉีดสารแบคเทอริน (bacterin) ของ *V. harveyi* เข้าทางช่องท้องของปลาเช่นกัน

4. การตรวจวิเคราะห์ *V. harveyi*

การสังเกตการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งในโรงเพาะฟักและบ่อดินนั้นจะสังเกตเห็นเมื่อมีปริมาณ *V. harveyi* สูงมากในน้ำเลี้ยงกุ้งและกุ้งเกิดการติดเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่ตัวกุ้งแล้ว โดยจะเห็นเป็นแสงพราวในเวลากลางคืนบริเวณเหงือกและเปลือกส่วนหัว ต่อมากุ้งจะป่วย กินอาหารลดลง ตับและตับอ่อนลีบฝ่อ เกิดลักษณะเนื้อเยื่อตาย พฤติกรรมภายนอกที่เห็นคือ กุ้งจะมีอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำเกยขอบบ่อ เรืองแสงในที่มืดและมีการตายเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการติดเชื้อและในที่สุดจะตายทั้งหมดภายในเวลา 2-3 วัน ดังนั้นจึงก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงอย่างมาก ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหา *V. harveyi* ขึ้นหลากหลายวิธีได้แก่ การใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีตรวจวิเคราะห์และจำแนกแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* (Krieg และ Holt, 1984) โดยทั่วไปการตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้ระยะเวลานานประมาณ 3-4 วันหรือมากกว่า 1 สัปดาห์ จึงจะทราบผลการตรวจที่แน่นอน จึงทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปอย่างล่าช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธีทางโมเลกุล (Molecular method) ซึ่งได้มีการพัฒนาขึ้นโดยการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับ *V. harveyi* เพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรียดังกล่าว (Thaithongnum และคณะ, 2006) ตัวอย่างของงานวิจัยที่ใช้วิธีทางโมเลกุลในการตรวจวิเคราะห์ *V. harveyi* คือ

Oakey และคณะ (2003) ศึกษาวิธีการตรวจ *V. harveyi* โดยใช้ PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ 16s rDNA ซึ่งเป็นยีนที่มีความอนุรักษ์สูงในกลุ่มยูแบคทีเรีย (Eubacteria) และมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ มีขนาดประมาณ 1,500 เบส ประกอบด้วยบริเวณส่วนมากที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ และบริเวณแปรผันเล็กน้อย บริเวณแปรผันเป็นส่วนที่ถูกใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจ เนื่องจากมีความแตกต่างใน

แบคทีเรียแต่ละชนิด จากงานวิจัยนี้ได้ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตขนาด 413 เบส และหาอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสม พบว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด แต่ในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *V. harveyi* กับ *V. alginolyticus* จึงต้องมีการใช้วิธีทางชีวเคมีมาทดสอบเพิ่มเติมในการแยกหลังจากใช้วิธี PCR

Conejero และ Hedreyda (2003) ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจหายีน *toxR* ของ *V. harveyi* ซึ่งเป็นยีนที่ระบุรหัสการควบคุมเกี่ยวกับการส่งผ่านสารของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งยีนนี้พบทั้งใน *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fischeri*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis* และ *V. anguillarum* เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *toxR* จากวิบริโอสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีความต่างกันค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงทำการแยกยีน *toxR* โฮโมลอก (Homologue) จาก *V. harveyi* โดยใช้ดีเจเนอเรตไพรเมอร์ (Degenerate primers) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาบริเวณที่ใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจหา *V. harveyi* ได้ยีนบางส่วน (Partial *toxR* gene) ขนาด 578 เบส ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *toxR* ของ *V. parahaemolyticus* มากสุดถึง 68% หลักจากทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ให้ชิ้นส่วนยีนขนาด 390 เบส โดยมีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* และไม่พบชิ้นส่วนนี้ของยีนเมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวตรวจในวิบริโอสายพันธุ์อื่นๆ หรือแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ

Pang และคณะ (2006) ออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจวิเคราะห์ยีน *toxR* เพื่อใช้ในการแยก *V. harveyi* ได้ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตเป็นชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวขนาด 382 เบส ซึ่งไพรเมอร์นี้มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* ค่อนข้างสูง เนื่องจากสามารถใช้ในการตรวจหาชิ้นส่วนยีน *toxR* ขนาด 382 เบส ได้ใน *V. harveyi* ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่นำมาศึกษา ในขณะที่ไม่สามารถใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวในการตรวจกับ *V. parahaemolyticus* 13 สายพันธุ์ ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากยีน *toxR* ใกล้เคียงกับของ *V. harveyi* สูงสุดที่ 68% ตลอดจนไม่พบผลผลิตขนาด 382 เบส เช่นกัน เมื่อใช้ไพรเมอร์นี้ในการวิเคราะห์แบคทีเรียสกุลวิบริโออื่นอีก 23 สายพันธุ์ วิธีดังกล่าวสามารถตรวจหา *V. harveyi* ได้เมื่อมีปริมาณต่ำสุดที่ 4.0 x 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาตั้งแต่เริ่มทำการสกัด DNA จนเสร็จการทดลองอยู่ที่ 5 ชั่วโมง

นอกจากการใช้เทคนิคดังที่กล่าวมาแล้วยังมีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ *V. harveyi* โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เช่น

Gomez-Gil และคณะ (2004) ศึกษาการวิเคราะห์แบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันได้แก่ *V. harveyi*, *V. cambellii* และ *V. rotiferianus* ทั้งหมด 50 สายพันธุ์ เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการจำแนกแบคทีเรียดังกล่าว การใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านกายภาพและสรีระวิทยา (Phenotype) ไม่สามารถระบุความแตกต่างระหว่าง *V. harveyi* กับ *V. cambellii* ได้ เนื่องจากมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันถึง 100 ลักษณะ จากงานวิจัยนี้พบว่ามีแบคทีเรียถึง 39 สายพันธุ์ ที่เมื่อ

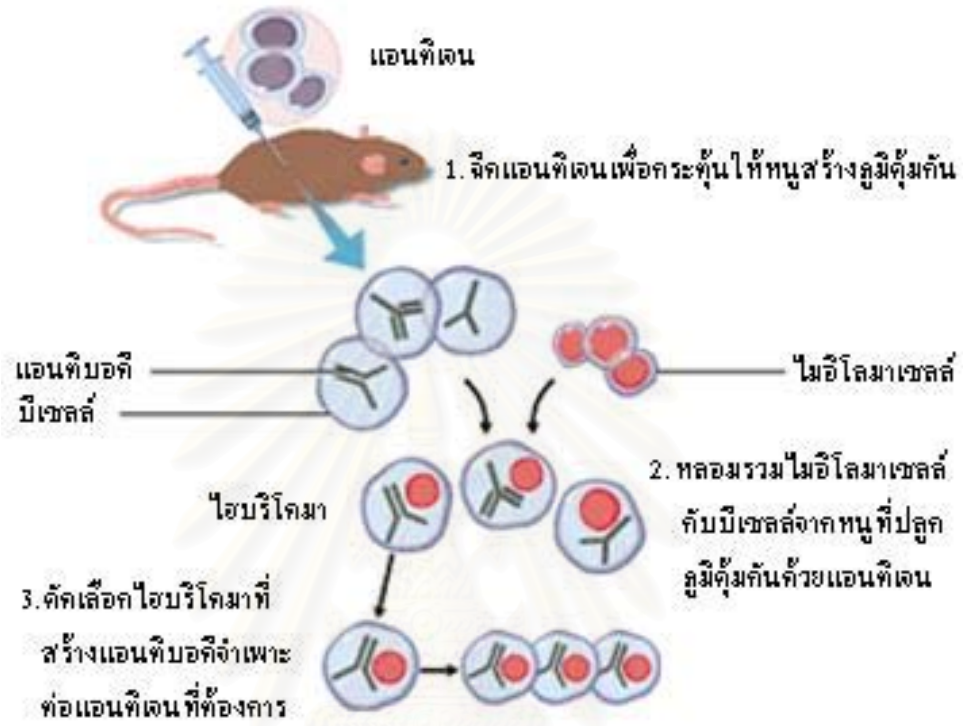
ตรวจสอบลักษณะทางด้านกายภาพและสรีรวิทยาแล้วพบว่าเป็น *V. harveyi* แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางด้านโมเลกุล (FAFLP, REP-PCR, IGS-PCR และ DNA-DNA hybridization) กลับกลายเป็น *V. cambellii* จากการใช้เทคนิคทางโมเลกุลดังกล่าวสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *V. harveyi*, *V. cambellii* และ *V. rotiferianus* โดยเทียบกับแบคทีเรียที่ทราบสายพันธุ์แล้ว (reference strains)

Kita-Tsukamoto และคณะ (2006) พัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรียเรืองแสงที่รวดเร็วขึ้น โดยใช้การวิเคราะห์รูปแบบของขนาดชิ้นส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ซึ่งประกอบด้วย *Eco*RI, *Dde*I, *Hha*I, *Hin*fI และ *Rsa*I พบว่ารูปแบบที่เกิดจากการย่อยสามารถใช้จำแนกแบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ในสกุล *Vibrio*, *Photobacterium* และ *Shewanella* ออกจากกันได้หลังจากใช้วิธีดังกล่าวในการจำแนกแบคทีเรียจากธรรมชาติ 129 ไอโซเลต (isolate) พบว่ามีถึง 127 ไอโซเลต ที่สามารถจำแนกออกมาได้เป็น 6 กลุ่ม คือ *P. angustum*, *P. leiognathi*, *P. phosphorum*, *S. woodyi*, *V. fischeri* และ *V. harveyi* ขณะที่อีก 2 ไอโซเลตให้รูปแบบหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่ชัดเจน เนื่องจากมีความคล้ายกับ *P. leiognathi* และ *P. phosphorum*

2.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางโมเลกุลแม้จะให้ผลที่รวดเร็วและแม่นยำ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของค่าใช้จ่ายที่สูง อีกทั้งยังจำเป็นต้องมีบุคลากรที่มีความชำนาญ และห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันขึ้นโดยการนำเอาแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และวินิจฉัยโรคติดเชื้ออาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specificity) ต่อกันสูงมาก แอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อแอนติเจนชนิดนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดเดียวกันนี้ (homologous antigen) ได้อย่างจำเพาะ แอนติบอดีจะรับรู้โครงสร้างโดยรวมของอิพิโทปบนแอนติเจนและสามารถแยกแยะความแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยที่เกิด ขึ้นบนอิพิโทป เช่น ลำดับกรดอะมิโน เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ

แอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่สร้างจากบี-เซลล์ 1 โคลน ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพที่ 2.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization
(ดัดแปลงจากhttp://images.encarta.msn.com/xrefmedia/aencmed/targets/illus/ilt/T059309A.gif)

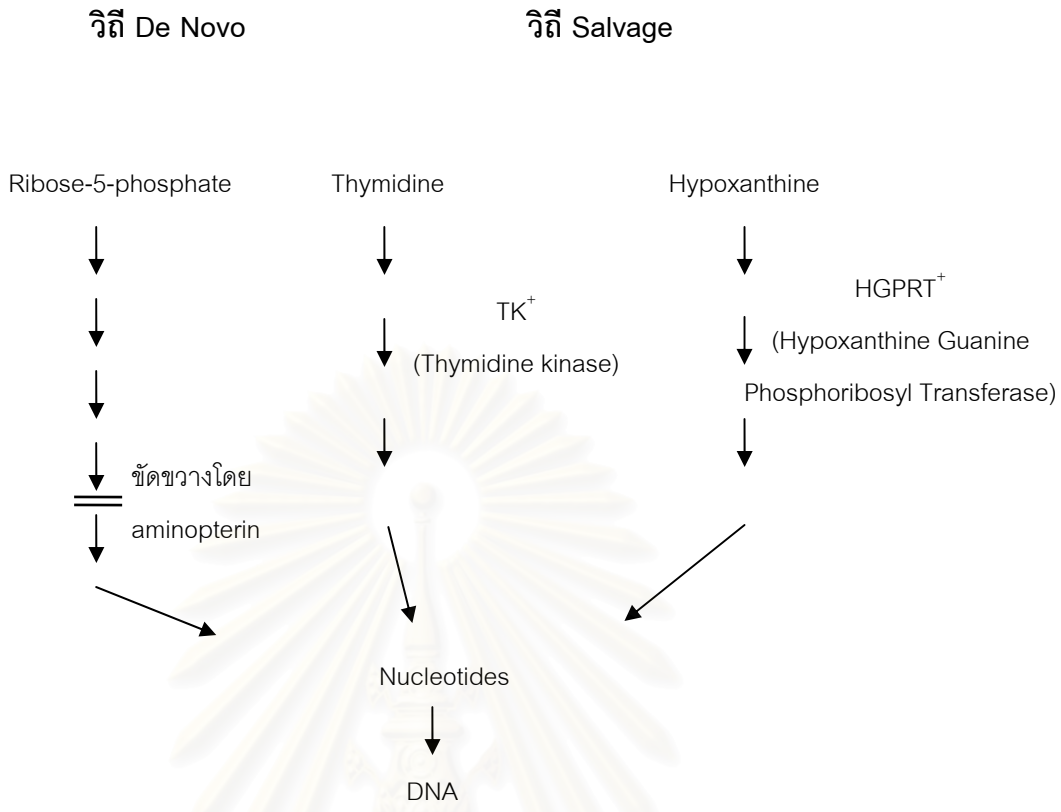
การหลอมรวมเซลล์มะเร็งกับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกันและมีเซลล์ไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่ การใช้เซลล์ไมอิโลมาที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างเซลล์ไมอิโลมากับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอดเพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากบี-เซลล์ ส่วน

บี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การคัดเลือกของ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 วิถีคือ วิถี de novo และวิถี salvage ในกรณีของวิถี de novo จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อวิถี de novo ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้วิถี salvage โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA แทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถี salvage นั้นได้แก่ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยวิถี salvage ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวางวิถี de novo ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเติบโตได้โดยใช้วิถี salvage ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเติบโตได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้วิถี salvage ในการสังเคราะห์ DNA ได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้เซลล์ไมอิโลมาที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig^-) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้ามและไมอิโลมามีหน้าที่เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น

เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่าง ๆ เช่น dot-blot, Western blot, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์ DNA โดยวิถี de novo และ วิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิถี de novo (Abbas และคณะ,1991)

ตัวอย่างการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ประโยชน์ที่สำคัญเช่น การตรวจวิเคราะห์การตั้งครรภ์และการตรวจหมู่เลือด เป็นต้น (อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2543) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้จำเพาะ (specific marker) เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ต้องการจากแบคทีเรียชนิดอื่นและยังสามารถนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้ด้วย (Adam และคณะ, 1995) อีกทั้งยังมีความไวสูง แม่นยำ ให้ผลเมื่อนำมาเตรียมเป็นชุดสำเร็จรูปสะดวกใช้บุคคลทั่วไปและเกษตรกรสามารถนำไปใช้งานตรวจวิเคราะห์ได้เองเพราะสะดวก ทำได้ง่าย และปลอดภัย ต้นทุนต่ำไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง (Sithigorngul และคณะ, 2000)

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้ถูกรายงานออกมามากมายเช่น Basta และคณะ (2004) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อสารอะนานดาไมด์ (anandamide; N-arachidonylethanolamine, AEA) เพื่อใช้ตรวจสารดังกล่าวซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งจากของเหลวในร่างกาย (body fluid) Winotaphan และคณะ (2005) ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำโดยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

(immunization) หนูขาว Swiss mice ด้วยเม็ดเลือดกุ้ง 2 รูปแบบคือ SDS-treated และ formalin-fixed ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 4 ครั้ง เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal route) จากนั้นหลอมรวมเซลล์ม้ามหนูเข้ากับเซลล์มะเร็ง (P3X) โดยใช้พอลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) สำหรับตัวอย่างรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรียมีดังนี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Bacillus cereus* ซึ่งก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิด Emetic และ Diarrheal ในคน (Charni และคณะ, 2000) โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. cholera* แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษในคน (Saha และ Nair, 1997) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Photobacterium damsilae* spp. *piscicida* ก่อโรค Pasteurellosis ในปลา (Jung และคณะ, 2001) Prior และ Titball (2002) รายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไลโพพอลิแซคคาไรด์ของ *Yersinia pestis* แบคทีเรียที่ก่อโรคกาฬโรค โดยการฉีดแอนติเจนผิวเซลล์ของแบคทีเรียกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาว 3 ครั้ง แบ่งเป็นครั้งแรกฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) ครั้งที่ 2 ฉีดเข้าทางช่องท้องและก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน ฉีดกระตุ้นอีกครั้งเข้าทางเส้นเลือดดำ (intravenous route) หลอมรวมเซลล์ม้ามที่ได้จากหนูเข้ากับเซลล์มะเร็ง (P3-X63-Ag8-clone-6.5.3) Hall และคณะ (2003) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน MSCRAMM โปรตีนบนผิวเซลล์ที่เดี่ยวข้องกับการยึดเกาะของ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคติดเชื้อได้ในมนุษย์ ทำการโคลนยีนที่ระบุรหัสของโปรตีนดังกล่าวเข้าแบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูขาว BALB/c เพศเมีย 2 ครั้งเข้าทางใต้ผิวหนังและทางเส้นเลือดดำตามลำดับ 3 วันหลังจากนั้น ทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูเข้ากับเซลล์มะเร็ง (SP2/0-Ag14) โดยใช้พอลีเอธิลีนไกลคอลช่วยในการหลอมรวม สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* นั้นในปัจจุบันได้มีเพียงรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะกับ *V. harveyi* ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวตรวจได้เฉพาะ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เท่านั้น (Phianphak และคณะ, 2005)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง

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

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA

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

4. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius, Germany.

5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA

6. เครื่องเขย่า (Incubator shaker)

7. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท LEICA

8. แท่นอุ่นสไลด์ (Slide warmer) ของบริษัท Medax

9. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

10. ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัท Sanyo

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

12. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO_2 Incubator) รุ่น NU-2500V ของบริษัท NUAIRE

13. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น NU-201-330E ของบริษัท NUAIRE

14. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo

15. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo

16. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.

17. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA

18. ชุด transblot apparatus ของบริษัท Bio-Rad

19. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70 ของบริษัท Olympus

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

2. อาหาร Mueller Hinton Broth ของบริษัท Difco Laboratories, USA

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

4. ชุดจัดจำแนกเชื้อสำเร็จรูป API20E ของบริษัท Biomerieux, France

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท Gibco BRL, USA

6. Fetal bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

7. Calf bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

8. D-glucose ของบริษัท Sigma

9. L-glutamine ของบริษัท Sigma

10. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) ของบริษัท Sigma

11. $NaHCO_3$

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

13. HT supplement ของบริษัท Gibco BRL, USA

14. Aminopterin ของบริษัท Sigma

15. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma

16. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD

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

18. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท BIO-RAD

19. SDS (sodium dodecyl sulfate) ของบริษัท BIO-RAD

20. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD

21. SDS molecular weight markers ของบริษัท Sigma

22. ชุดตรวจสอบ Hybridoma sub-isotyping, mouse ของบริษัท Zymed

23. เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 70%, 80%, 90%, 95% ของบริษัท BDH

24. N-butyl alcohol ของบริษัท Univar

25. ไซลีน (Xylene) ของบริษัท Carlo Erba

26. Formaldehyde ของบริษัท Carlo Erba

27. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) 0.15 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

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

29. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) ของบริษัท Sigma

30. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) 30% ของบริษัท Sigma

31. อีโอซีน (Eosin Y) 0.02% ใน เอทิลแอลกอฮอล์ 95% ของบริษัท Harleco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ช)

32. ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข) ของบริษัท Harleco

33. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) ของบริษัท Sherwood

34. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) ของบริษัท Difco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ช)

35. Davidson's fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

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

37. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl) ของบริษัท Merck

38. Permount ของบริษัท Ficther Scientific

39. GAM-HRP (goat anti-mouse Ig heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ของบริษัท BioRad

3.3 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ

นำแบคทีเรีย *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกจากกุ้งป่วยจากแหล่งต่างๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 มายืนยันชนิดโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุลวิบริโอในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอยที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ชุดตรวจ API 20E โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ 18-24 ชั่วโมง 1 โคโลนีเดี่ยว มาแขวนลอยในน้ำเกลือ 0.85% ที่ปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันดี แล้วปิเปตลงในชุดทดสอบ หลุมที่ทดสอบ arginine dihydrolase (ADH), lysine decarboxylase (LDC), ornithine decarboxylase (ODC), H_2S production (H_2S) และ urease (URE) จะปิเปตทับด้วยพาราฟิน เพื่อให้อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน จากนั้นนำชุดทดสอบใส่ในถาดที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปิดฝาและบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดสอบดังตารางที่ 3.2

เก็บรักษาแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยที่เติมกลีเซอรอล 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยที่เติมเฉพาะกลีเซอรอล 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอยลักษณะเดียวกับข้างต้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์โดยการแขวนลอยด้วย 0.15 โมลาร์ phosphate buffered saline (PBS) เพื่อใช้ในการเตรียมแอนติเจน

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา
Vibrio harveyi 1526 (VH1526) *V. harveyi* 639 (VH639) *V. harveyi* 1114 (VH1114)	หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง มหาวิทยาลัยมหิดล
V. harveyi 47666-1 (VH47666-1)	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาบูรพา
V. harveyi H1 (VHH1) *V. harveyi* H2 (VHH2) *V. harveyi* H3 (VHH3) *V. harveyi* H4 (VHH4) *V. harveyi* H5 (VHH5)	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)
V. harveyi (VHSurat)	จังหวัดสุราษฎร์ธานี
V. ordalii *V. anguillarum*	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
V. alginolyticus 22082 *V. fluvialis* 22087 *V. mimicus* 22090 *V. parahaemolyticus* 22092	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
V. vulnificus *V. penaeicida* *V. cholerae*	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา
V. shilonii	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
V. campbellii	ประเทศเบลเยี่ยม
Aeromonas cavia 22103 *A. hydrophila* 22097 *A. sorbia* 22099 *A. jandaei* 22156 *A. veronii* 22155	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
Plesiomonas shigelloides 22109	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
Photobacterium damselae Subsp. *damselae*	มหาวิทยาลัยบูรพา
Esherichia coli	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)
Klebsiella pneumoniae *Proteus vulgaris* *Pseudomonas aeruginosa* *Salmonella* Thyphimurium *Shigella flexneri*	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 การอ่านผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E (BioMérieux, France)

การทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	ผลลบ	ผลบวก
β-galactosidase(ONPG)	ไม่มีสี	เหลือง
Arginine dihydrolase(ADH)	เหลือง	แดง/ส้ม
Lysine decarboxylase (LDC)	เหลือง	แดง/ส้ม
Ornithine decarboxylase (ODC)	เหลือง	แดง/ส้ม
Citrate utilization	เขียวอ่อน/เหลือง	เขียวแกมน้ำเงิน/น้ำเงิน
H_2S production (H_2S)	ไม่มีสี/สีเทา	ดำ
Urease (URE)	เหลือง	แดง/ส้ม
Trytophane deaminase (TDA)	เติม TDA reagent สังเกตผลทันที	
	เหลือง	น้ำตาลค่อนข้างแดง
Indole production (IND)	เติม JAMES reagent สังเกตผลทันที	
	ไม่มีสี/เขียวอ่อน/เหลือง	ชมพู
Acetoin production (VP)	เติม VP1 และ VP2 บ่ม 10 นาที	
	ไม่มีสี	ชมพู/แดง
Gelatinase (GEL)	ไม่มีการแพร่ของเม็ดสีดำ	มีการแพร่ของเม็ดสีดำ
Glucose (GLU)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง/เหลืองเทา
Mannitol (MAN)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Inositol (INO)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Sorbitol (SOR)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Rhamnose (RHA)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Sucrose (SAC)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Melibiose (MEL)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Amygdalin (AMY)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
Arabinose (ARA)	น้ำเงิน/เขียวแกมน้ำเงิน	เหลือง
NO_2 production	เติม NIT1 และ NIT2 ในหลุม glucose บ่ม 2-5 นาที	
	เหลือง	แดง

2. การเตรียมแอนติเจน

นำ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ซึ่งแยกได้จากกุ้งป่วยจากแหล่งต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงตามวิธีข้างต้นมาฆ่าด้วยความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งการเตรียมแอนติเจนออกเป็น 2 รูปแบบ คือ รูปแบบคงสภาพ (heat-killed) โดยการนำแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าด้วยความร้อนมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ 1.0 โดยใช้ PBS และรูปแบบเสียสภาพ (SDS-mercaptoethanol treated) โดยนำแอนติเจนรูปแบบคงสภาพมาเติม SDS-mercaptoethanol อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ต้มในน้ำเดือด 90 วินาที ไดแอลิซีส (Dialysis) ในน้ำกลั่นเพื่อกำจัด SDS-mercaptoethanol เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sithigorngul *et al*., 2002) สำหรับแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบแอนติบอดีจะเตรียมในรูปแบบคงสภาพเท่านั้น

3. การปลูกภูมิคุ้มกัน (immunization) ในหนูขาว

นำส่วนผสมแอนติเจนของ VH1526 และไอโซเลตอื่นๆ ทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) มาฉีดเข้าที่ช่องท้องของหนูขาว (swiss mice) จำนวน 4 ตัว ฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง โดยเว้นระยะห่างการฉีดแต่ละครั้ง 1 สัปดาห์ ด้วยส่วนผสมของ *V. harveyi* ทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้น 1 สัปดาห์ หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดหนูแต่ละตัวมาตรวจหาพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* โดยวิธี Western blot เลือกหนูตัวที่ให้แถบโปรตีนชัดเจนมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (Sithigorngul *et al*., 2002)

4. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

นำเซลล์ม้ามของหนูขาวมาผสมกับเซลล์มัยอิโลมา P3X ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย polyethylene glycol (PEG) 1 มิลลิลิตร ใช้นิ้วตีก้นหลอดให้เซลล์ผสมกับ PEG เป็นเวลา 1 นาที ค่อยๆ เติม RPMI ปริมาตร 39 มิลลิลิตร ลงข้างหลอดช้าๆ บ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ผสมด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ใน HAT medium (RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, เม็ดเลือดแดง 0.5%, hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) และดูดใส่ใน microculture plate 30 ถาด (96 หลุมต่อถาด) บ่มใน CO_2 incubator ประมาณ 10-12 วัน ตรวจดูการเติบโตของเซลล์ในหลุมต่างๆ ภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน

5. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

5.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blot (Sithigorngul *et al*., 2002)

นำ *V. harveyi* ผสมทั้งรูปคงสภาพและเสียสภาพอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส แช่ใน 5% blotto (nonfat dry milk ที่ละลายใน PBS) ตัดและใส่ลงใน microculture plate ที่มี 1% blotto 75 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 3 ชั่วโมง ใน goat anti-mouse immunoglobulin heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP; BioRad) ที่เจือจาง 1:1,500 ใน 1% blotto และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายผสม 0.03% DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma), 0.006% H_2O_2 (hydrogen peroxide) และ 0.05% $CoCl_2$ (cobalt chloride) ใน PBS เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* จะเกิดเป็นจุดสีดำ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกไปคัดเลือกในขั้นที่ 2

5.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2

5.2.1 การตรวจสอบด้วยวิธี Western blot (Sithigorngul *et al*., 2002)

นำ *V. harveyi* ในรูปคงสภาพมาแยกใน 15% SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ แล้วนำเจลที่ได้มาย้ายแถบโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transport apparatus (BioRad) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน 5% blotto ตัดแบ่งลงใน microculture plate ที่มี 1% blotto นำไปบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ผล dot blot เป็นบวกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 3 ชั่วโมง ใน GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1,500 ใน 1% blotto และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายผสม 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS ตรวจสอบผลโดยเปรียบเทียบกับผลของพอลิโคลนอลแอนติบอดี

5.2.2 การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blot

นำ *V. harveyi* และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ในรูปคงสภาพมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยอบใน 60 องศาเซลเซียส แช่ใน 5% blotto แล้วนำไปใส่ใน microculture plate ที่มี 1% blotto และเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ผล dot blot เป็นบวก บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมง นำไปผ่านกระบวนการเหมือนข้อ 5.1 ตรวจสอบผลบวกจากจุดสีดำที่เกิดขึ้น

5.2.3 การตรวจสอบด้วยวิธี Immunohistochemistry

เลี้ยงกุ้งกุลาดำน้ำหนักตัวประมาณ 20 กรัม ในถังพลาสติกสี่เหลี่ยมที่บรรจุน้ำความเค็มประมาณ 20 ppt จากนั้นฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อตัว ทิ้งไว้จนกุ้งใกล้ตายจากนั้นนำตัวอย่างกุ้งมาผ่านขั้นตอนการทำ paraffin sectioning และ immunoperoxidase ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ เก็บกุ้งมาสลบในน้ำเย็นจัดและตัดหัวในน้ำยา Davidson's fixative นำมาล้างน้ำและผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซนต์ต่างๆและไซลีน (xylene) และฝังในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโทมและติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ ล้างพาราฟินออกโดยใช้ไซลีนและผ่านกระบวนการเติมน้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซนต์ต่างๆ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลิน 10% ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และเติม P_1^+ (10% calf bovine serum ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ผล dot blot เป็นบวกมาหยดคลุมเนื้อเยื่อบนสไลด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 ใน P_1^+ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และเติมสารละลายผสม 0.03% DAB และ 0.006% H_2O_2 ใน PBS ย้อมสีด้วย Eosin Y ผ่านกระบวนการการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซนต์ต่างๆ และไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์และนำไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกจะติดสีน้ำตาล (ภาคผนวก ช)

6. การโคลนด้วยวิธี limited dilution (ดัดแปลงจาก Spinger, 1986)

นำเซลล์ที่คัดเลือกแล้วมากระจายในหลุมโดยใช้ปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง หยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 ไมโครลิตร ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ โดยนำไปตรวจดูภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นเติม medium (RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, เม็ดเลือดแดง 0.5%) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน microculture plate (96 หลุมต่อถาด) 48 หลุมแรก (แถว 1-6) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม medium เพิ่มในจานเลี้ยงเชื้ออีก 2.5 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ลงใน 48 หลุมหลัง (แถว 7-12) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มใน CO_2 incubator ประมาณ 10-12 วัน ตรวจสอบหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นคัดเลือกโดยวิธี dot blot และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์

7. การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum กระจายและดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอด ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป จากนั้นเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12% (DMSO) ใน RPMI 1640 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์

แขวนลอยลงในหลอดสำหรับเซลล์แช่แข็ง (cryopreservation tube) เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

8. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

8.1 การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blot

นำแบคทีเรียมาเจือจางแบบ serial dilution ใน PBS มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยอบที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาบ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบโดยเจือจาง 1:200 ใน 1% blotto แล้วนำมาผ่านกระบวนการเหมือนข้อ 5.1 ตรวจสอบจุดสีดำที่เกิดขึ้น โดยความเข้มข้นของแอนติเจนน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดจุดสีดำจะเป็นค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้วิเคราะห์

8.2 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึง *V. harveyi* ที่ถูกทำให้เสียสภาพโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/มิลลิลิตร ลงที่ก้นหลุมของถาด 96 หลุม (ELISA microtiter plate) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วย สารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมสารละลาย 5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่างๆ ของถาด 96 หลุมดังตัวอย่างตามตารางที่ 3.3 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม GAM–HRP เจือจาง 1:1500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006% H_2O_2 ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที บันทึกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

8.3 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mono Ab ID kit (HRP) (Zymed Laboratories) (ดูวิธีทำในภาคผนวก จ)

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน *V. harveyi* ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้ (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

MAbs	1	2	3	4
1	1+1	1+2	1+3	1+4
2		2+2	2+3	2+4
3			3+3	3+4
4				4+4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. harveyi* ไอโซเลตต่าง ๆ

จากการตรวจสอบสมบัติทางสัณฐานวิทยาของ VH1526 และ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นๆ พบว่าโคโลนีมีสีครีม ลักษณะกลม เล็ก เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร TCBS โคโลนีจะมีสีเขียว สามารถเรืองแสงได้ทุกชนิด แต่ไม่พบการ swarm บนอาหาร TSA ที่ผสม 2% NaCl

V. harveyi ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างแท่งโค้ง และสมบัติทางชีวเคมีของ *V. harveyi* ทุกไอโซเลต ทดสอบโดย API 20E สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางชีวเคมีของ VH1526 และ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นๆ โดยชุดทดสอบ API 20E (BioMérieux, France)

สมบัติ (API 20 E)	ไอโซเลตของ *V. harveyi*								
	VH1526	VH639	VH47666-1	VHSurat	VHH1	VHH2	VHH3	VHH4	VHH5
β-galactosidase(ONPG)	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Arginine dihydrolase(ADH)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lysine decarboxylase (LDC)	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ornithine decarboxylase (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S production (H_2S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease (URE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trytophane deaminase (TDA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production (IND)	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Acetoin production (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase (GEL)	+	+	+	+	-	-	-	-	-

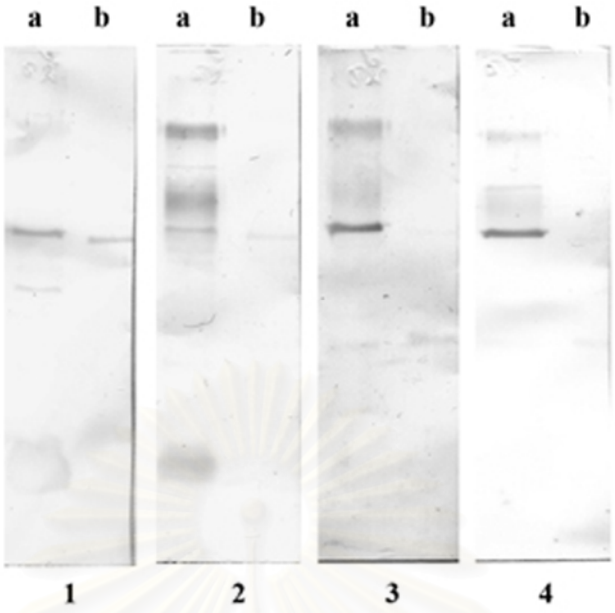
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สมบัติ (API 20 E)	ไอโซเลตของ *V. harveyi*								
	VH1526	VH639	VH47666-1	VHSurat	VHH1	VHH2	VHH3	VHH4	VHH5
Fermentation/Oxidation									
Glucose (GLU)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Inositol (INO)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose (RHA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose (SAC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose (MEL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin (AMY)	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Arabinose (ARA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome-oxidase (Ox)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO_2 production	+	+	-	+	-	-	-	-	-
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

หมายเหตุ + = ผลบวก, - = ผลลบ

2. ความจำเพาะของแอนติซีรัม

จากการเก็บแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย VH1526 มาทำการทดสอบความจำเพาะต่อ VH1526 โดยใช้วิธี Western blot พบว่าแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัว มีความจำเพาะต่อ VH1526 ค่อนข้างสูงโดยแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ 2 มีความจำเพาะต่อ VH1526 ดีที่สุด ซึ่งพบจำนวนแถบโปรตีนมากและมีความชัดเจนมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และเมื่อทดสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blot พบว่าแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ 2 แสดงความจำเพาะต่อ *V. harveyi* ทุกไอโซเลตและยังแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio spp.* อื่นๆ ด้วย (ภาพที่ 4.2 E) จึงใช้หนูขาวตัวที่ 2 มาผลิตเซลล์ไฮบริโดมา



ภาพที่ 4.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ VH1526 จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot โดยนำ VH1526 (a) และ *V. parahaemolyticus* (b) มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 15% SDS-PAGE นำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสแล้วนำไปบ่มกับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ VH1526 จากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)

3. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาและคัดเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ VH1526 ขั้นที่ 1 พบว่าจากเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดใน microculture plates ประมาณ 1,000 หลุม ซึ่งในแต่ละหลุมมีเซลล์อยู่ ประมาณ 1-5 โคโลนี มีเซลล์ไฮบริโดมาที่แสดงความจำเพาะต่อ VH1526 จำนวนทั้งหมด 52 หลุม และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยใช้วิธี Western blot และ immunohistochemistry ได้เซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดจำนวน 6 โคลน ที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 4.3

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

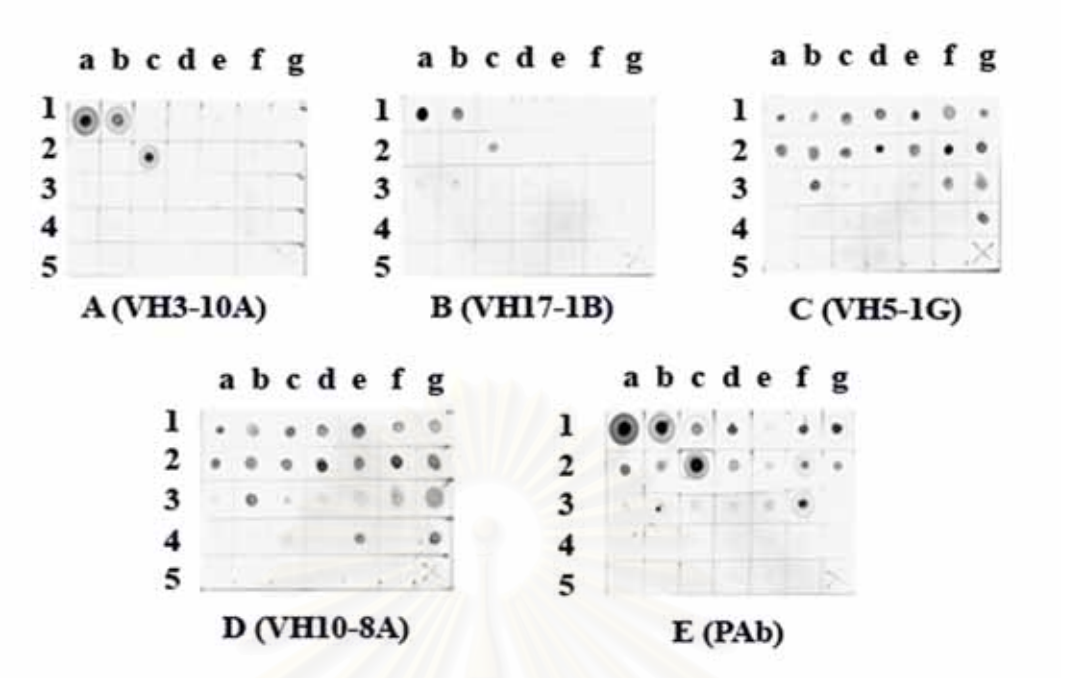
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VH1526 ที่ผลิตได้สามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม ดังนี้คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 2 โคลน คือ VH3-10A และ VH15-6F และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย VH11-6E และ VH17-1B ซึ่งแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่ม จำเพาะต่อ VH1526, VH639 และ VHSurat โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่น ตลอดจนแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโออื่นๆ และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 4.2-A

และ B) แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 สามารถตรวจ VH1526 ในเนื้อเยื่อกุ้งด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพที่ 4.5) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 (VH5-1G) และ 4 (VH10-8A) มีความจำเพาะต่อวิบริโอเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น *V. mimicus*, *V. penaeicida*, *V.* ordalii และ *V. cholerae* และยังสามารถแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Photobacterium damselae* สำหรับแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 ยังแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Aeromonas jandaei* ด้วย (ภาพที่ 4.2-C และ D)

จากการทดสอบโดยวิธี Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ได้แก่ VH3-10A จับกับแถบโปรตีนของ VH1526 ขนาดประมาณ 32, 43 และ 58 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.3 -1) และ VH15-6F จับกับแถบโปรตีนของ VH1526 ขนาดประมาณ 39, 48 และ 53 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.3-2) แอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 (VH11-6E และ VH17-1B) จับกับแถบโปรตีนของ VH1526 ขนาดประมาณ 12.5-44 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.3-3) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 และ 4 จับกับแถบโปรตีนของ VH1526 ในลักษณะเดียวกันคือ ขนาดประมาณ 21.5 และ 39 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.3-4 และ 5)

สำหรับการทดสอบความไว (Sensitivity) ในการจับ VH1526 ของแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มโดยวิธี dot blot พบว่าแอนติบอดีจากกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถตรวจจับกับแอนติเจนของ VH1526 ได้ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4 -1, 2, 3 และ 4) ในขณะที่แอนติบอดีกลุ่มที่ 3 และ 4 มีความไวในการตรวจแอนติเจนของ VH1526 ได้ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4 -5 และ 6)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ในกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ กัน ได้แก่ (A) VH3-10A, (B) VH17-1B, (C) VH5-1G, (D) VH10-8A และ (E) โพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

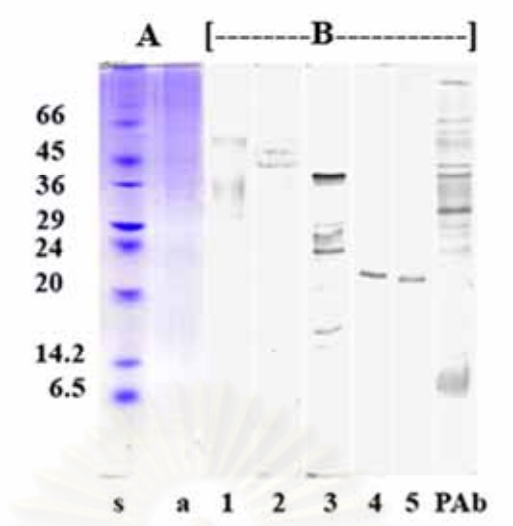
แถวที่ 1. (a) VH1526, (b) VH639, (c) VH1114, (d) VHH1, (e) VHH2, (f) VHH3, (g) VHH4

แถวที่ 2. (a) VHH5, (b) VH47666-1, (c) VHSurat, (d) *V. vulnificus*, (e) *V. fluvialis*, (f) *V. alginolyticus*, (g) *V. parahaemolyticus*

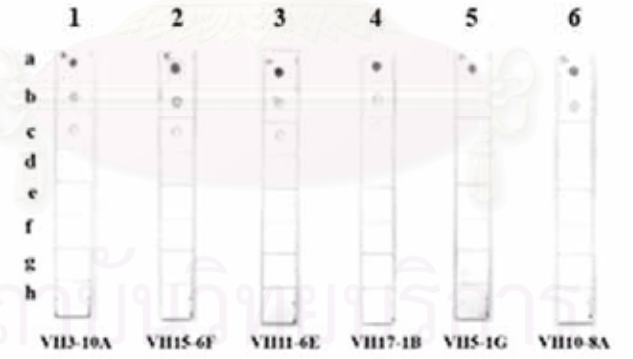
แถวที่ 3. (a) *V. mimicus*, (b) *V. anguillarum*, (c) *V. penaeicida*, (d) *V. ordalii*, (e) *V. cholerae*, (f) *V. campbelli*, (g) *V. shilonii*

แถวที่ 4. (a) *Aeromonas hydrophila*, (b) *A. sorbia*, (c) *A. caviae*, (d) *A. veronii*, (e) *A. jandaei*, (f) *Plesiomonas shigelloides*, (g) *Photobacterium damselae*

แถวที่ 5. (a) *Salmonella* Typhimurium, (b) *Pseudomonas aeruginosa*, (c) *Escherichia coli*, (d) *Klebsiella pneumoniae*, (e) *Shigella flexneri*, (f) *Proteus vulgaris*

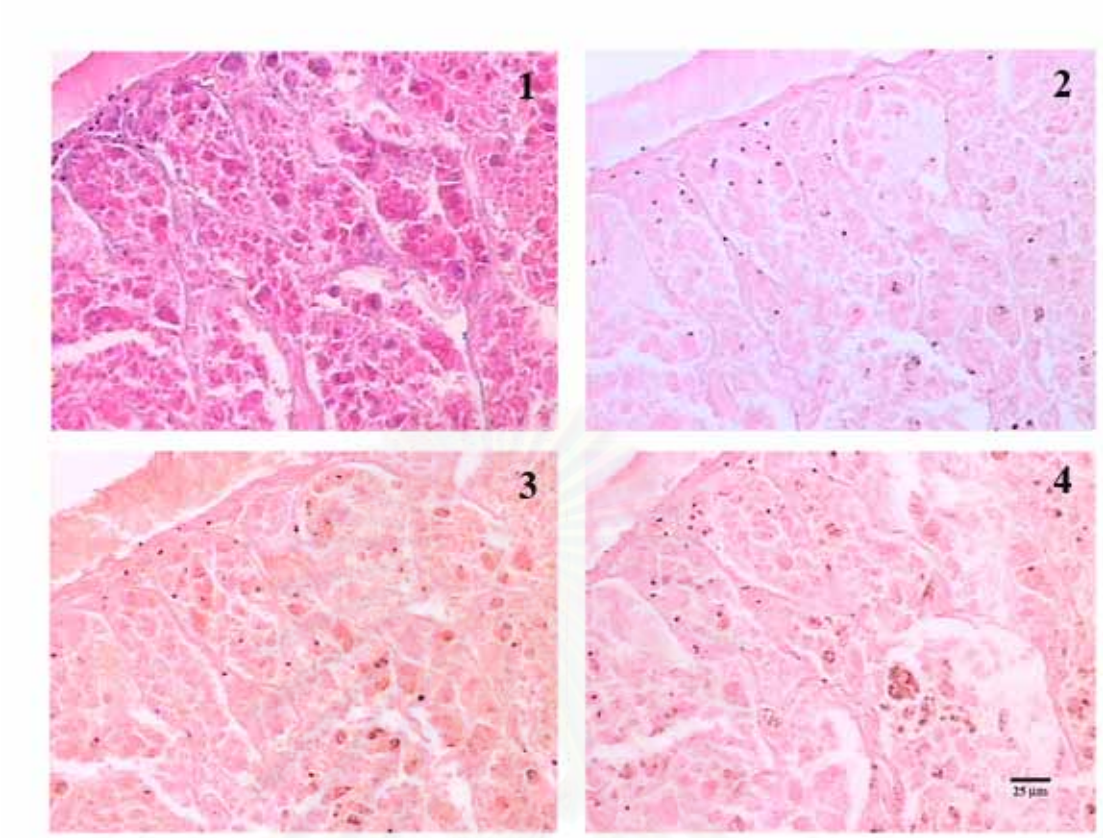


ภาพที่ 4.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ด้วยวิธี Western blot โดยนำ VH1526 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R–250 (A) หรือนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ (B), (1) = VH3-10A, (2) = VH15-6F, (3) = VH17-1B, (4) = VH5-1G, (5) = VH10-8A และโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ที่จำเพาะต่อ VH1526 S = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ a = VH1526



ภาพที่ 4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดในการตรวจหา VH1526 ด้วยวิธี dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ประมาณ 10^9 ถึงประมาณ 10^2 CFU/มิลลิลิตร ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว a : 10^9 CFU/มิลลิลิตร, แถว b : 10^8 CFU/มิลลิลิตร, แถว c : 10^7 CFU/มิลลิลิตร, แถว d : 10^6 CFU/มิลลิลิตร, แถว e : 10^5 CFU/มิลลิลิตร, แถว f : 10^4 CFU/มิลลิลิตร, แถว g : 10^3 CFU/มิลลิลิตร และ แถว h : 10^2 CFU/มิลลิลิตร



ภาพที่ 4.5 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohisto-chemistry โดยใช้เนื้อเยื่อตับของกุ้งซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ VH1526 ด้วยวิธีการฉีด (1) เนื้อเยื่อตับที่ติดเชื้อ VH1526 ย้อม Haematoxylin และ Eosin และตัวอย่างเนื้อเยื่อตับที่นำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (2) กลุ่มที่ 1 VH3-10A และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ (3) VH11-6E และ (4) VH17-1B แล้วย้อมทับด้วยสี Eosin สีน้ำตาลเป็นบริเวณที่มีการติดเชื้อ VH1526

5. การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน VH1526 ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* สามสายพันธุ์เหมือนกันคือ VH1526, VH639 และ VHSurat พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับอิพิโทปของแอนติเจน VH1526 ในตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกันสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เมื่อนำแอนติบอดีแต่ละชนิดมาผสมรวมกันแล้วนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ VH1526 พบว่าไม่มีความแตกต่างกับค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากแอนติบอดีที่ไม่ได้นำมาผสมรวมกัน โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มที่ 2 (VH11-6E และ VH17-1B) ให้

ค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มที่ 1 (VH3-10A และ VH15-6F) (ตารางที่ 4.2)

6. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 4 กลุ่ม พบว่ามี class เป็น IgG_1, IgG_2a, IgG_2b และ IgM และ subclass เป็น **κ** ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน VH1526 ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ

[----- กลุ่มที่ 1------] [----- กลุ่มที่ 2 ------]

MAbs	1 VH3-10A	2 VH15-6F	3 VH11-6E	4 VH17-1B
1 VH3-10A	0.232	0.175	0.720	0.742
2 VH15-6F		0.183	0.720	0.745
3 VH11-6E			0.723	0.748
4 VH17-1B				0.754

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry

Group	MAbs (Isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected Antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
1	VH 3-10A (IgG_2b) VH 15-6F (IgG_1)	10^7	58, 43, 32 53, 48, 39	-	VH1526, VH639, VH Surat
2	VH 11-6E VH 17-1B (IgG_2a)	10^7	44-12.5	+	VH1526, VH639, VH Surat
3	VH 5-1G (IgM)	10^8	39- 21.5	-	All VH and *Vibrio* spp. except VM, VO and VC, PD
4	VH 10-8A (IgM)	10^8	39- 21.5	-	All VH and *Vibrio* spp. except VM, VO and VC, PD, AJ

หมายเหตุ VC = *V. cholerae*, VM = *V. mimicus*, VO = *V. ordalii*, PD = *Photobacterium damselae* และ AJ = *Aeromonas jandaei*. IHC = immunohistochemistry.

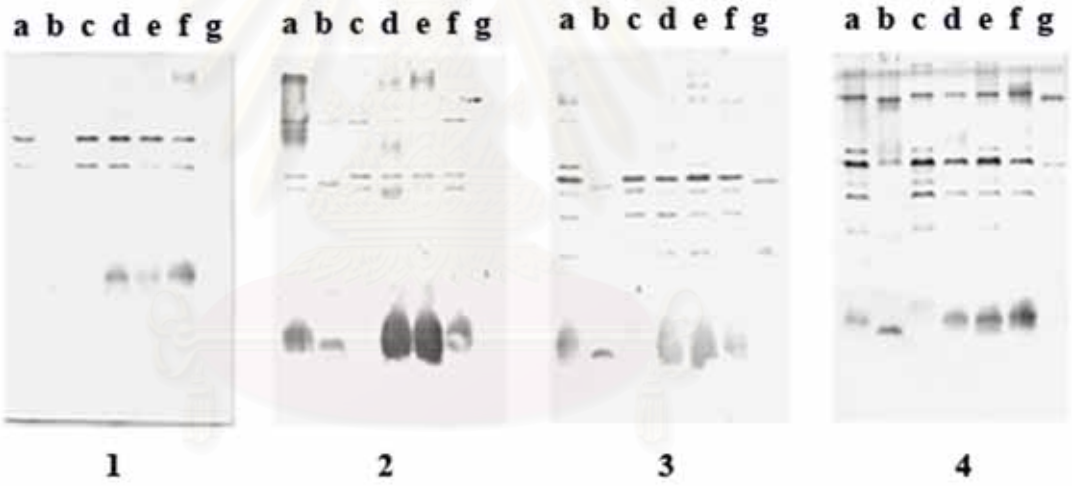
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi* ไอโซเลตอื่น

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VH1526 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 639 และไอโซเลตจากสุราษฎร์ธานีเท่านั้นโดยยังไม่สามารถใช้ในการตรวจจับ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นๆ คือ VHH1, VHH2, VHH3, VHH4, VHH5 และ VH47666-1 ได้ จึงได้ทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีกครั้งซึ่งได้ผลดังนี้

1. **ความจำเพาะของแอนติซีรัม**

หลังทำการเก็บแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ที่ผ่านการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนรวมของ *V. harveyi* ทุกไอโซเลตที่เหลือและทดสอบความจำเพาะต่อ *V. harveyi* โดยวิธี Western blot พบว่าหนูขาวตัวที่ 4 ให้ผลการตอบสนองต่อ *V. harveyi* ทุกไอโซเลตได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.6) และเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blot พบว่าแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ 4 มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* อีกทั้งยังแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio spp.* (ภาพที่ 4.7 G) จึงได้นำหนูตัวที่ 4 มาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา



ภาพที่ 4.6 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่น จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot โดยนำ VHH1 (a), VHH2 (b), VHH3 (c), VHH4 (d), VHH5 (e), VH47666-1 (f) และ *V. parahaemolyticus* (g) มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* จากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)

2. **การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา**

จากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาและคัดเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* ขั้นที่ 1 พบว่าจากเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดใน microculture plates ประมาณ 1,500 หลุม ซึ่งในแต่ละหลุม

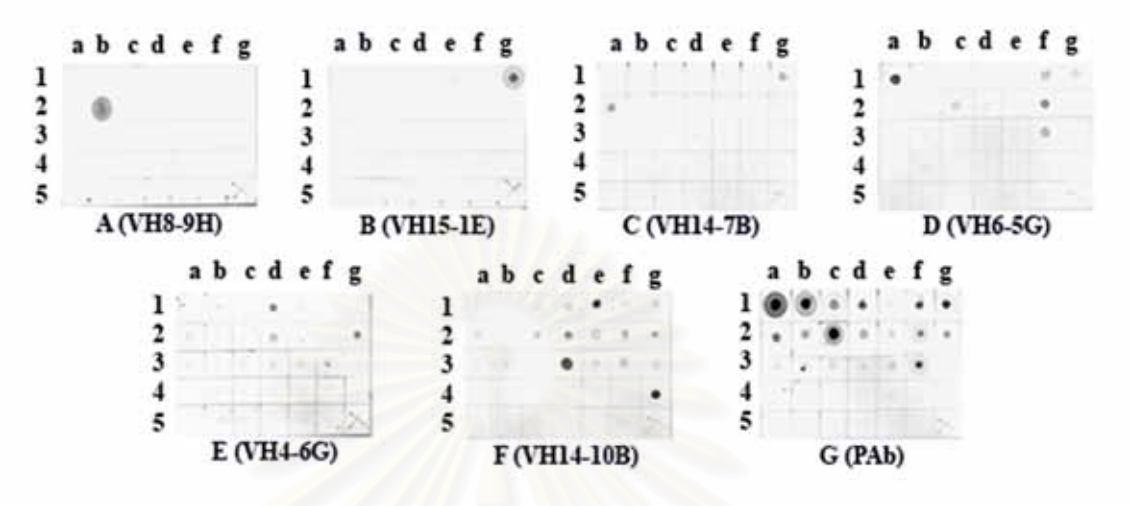
มีเซลล์อยู่ ประมาณ 1-5 โคโลนี มีเซลล์ไฮบริโดมาที่แสดงความจำเพาะต่อ *V. harveyi* จำนวนทั้งหมด 55 หลุม และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยใช้วิธี Western blot และ immunohistochemistry ได้เซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดจำนวน 9 โคลน ที่มีความจำเพาะค่อนข้างดี และมีบางโคลนสามารถแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (ตารางที่ 4.5)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้งหมด 9 โคลน พบว่ามีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามความจำเพาะได้ 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C และ VH23-6D ซึ่งมีความจำเพาะต่อ VH47666-1 (ภาพที่ 4.7-A) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH15-1E จำเพาะต่อ VHH4 (ภาพที่ 4.7-B) และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH14-7B จำเพาะต่อ VHH4 และ VHH5 (ภาพที่ 4.7- C) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่กล่าวมาทั้ง 3 กลุ่ม (6 โคลน) ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นเลย (ตารางที่ 4.5) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหลืออีก 3 กลุ่ม จะแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH6-5G (กลุ่มที่ 4) แสดงความจำเพาะต่อ VH1526, VHH3, VHH4, VHH5, VH47666-1 และ VHSurat และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. alginolyticus* และ *V. campbellii* (ภาพที่ 4.7-D) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH4-6G (กลุ่มที่ 5) จำเพาะต่อ VHH1 และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus* และ *V. campbellii* เล็กน้อย (ภาพที่ 4.7-E) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH14-10B (กลุ่มที่ 6) จำเพาะต่อ VHH2 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่นหลายชนิดที่เห็นชัดเจนได้แก่ *V. ordalii* และ *Photobacterium damselae* และยังแสดงปฏิกิริยาข้ามจางๆ กับแบคทีเรียสกุลวิบริโอชนิดอื่นๆ ยกเว้น *V. mimicus*, *V. anguillarum* และ *V. penaeicida* (ภาพที่ 4.7-F)

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในกลุ่มที่ 1 (VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C และ VH23-6D) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ VH47666-1 เช่นเดียวกันแต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่ามีลักษณะการจับแถบโปรตีนของ VH47666-1 ต่างกันคือ VH8-9H จับแถบโปรตีนขนาดประมาณ 65 และ 86 กิโลดาลตัน VH12-6G จับแถบโปรตีนขนาดประมาณ 9, 65 และ 86 กิโลดาลตัน VH 23-6D จับแถบโปรตีนขนาดประมาณ 46, 65 และ 86 กิโลดาลตัน และ VH21-3C จับแถบโปรตีนขนาดประมาณ 9, 46, 65 และ 86 กิโลดาลตัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH15-1E (กลุ่มที่ 2) จับแถบโปรตีนของ VHH4 ขนาดประมาณ 86 กิโลดาลตัน VH14-7B (กลุ่มที่ 3) จับแถบโปรตีนของ VHH5 ขนาดประมาณ 9, 41 - 68 และ 86 กิโลดาลตัน VH6-5G (กลุ่มที่ 4) จับแถบโปรตีนของ VHH3 ขนาดประมาณ 21.5 และ 42 กิโลดาลตัน VH4-6G (กลุ่มที่ 5) จับแถบ

โปรตีนของ VHH1 ขนาดประมาณ 44 และ 48 กิโลดาลตัน และ VH14-10B (กลุ่มที่ 6) จับแถบโปรตีนของ VHH2 ขนาดประมาณ 20, 33 และ 39 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวแทนในกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ กันได้แก่ (A) VH8-9H, (B) VH15-1E, (C) VH14-7B, (D) VH6-5G, (E) VH4-6G, (F) VH14-10B และ (G) โพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

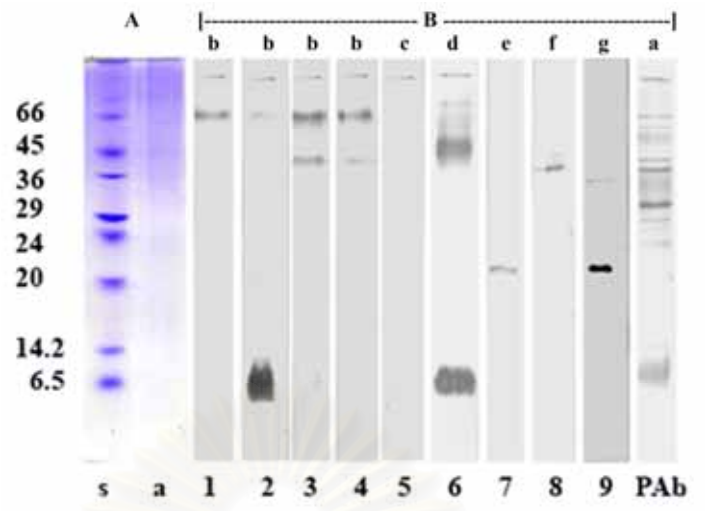
แถวที่ 1. (a) VH1526, (b) VH639, (c) VH1114, (d) VHH1, (e) VHH2, (f) VHH3, (g) VHH4

แถวที่ 2. (a) VHH5, (b) VH47666-1, (c) VHSurat, (d) *V. vulnificus*, (e) *V. fluvialis*, (f) *V. alginolyticus*, (g) *V. parahaemolyticus*

แถวที่ 3. (a) *V. mimicus*, (b) *V. anguillarum*, (c) *V. penaeicida*, (d) *V. ordalii*, (e) *V. cholerae*, (f) *V. campbelli*, (g) *V. shilonii*

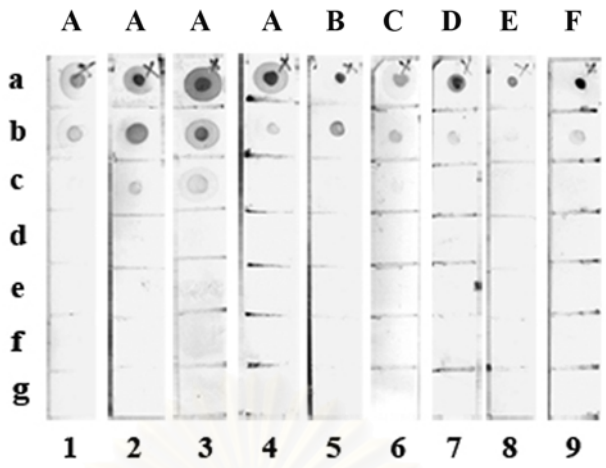
แถวที่ 4. (a) *Aeromonas hydrophila*, (b) *A. sorbia*, (c) *A. caviae*, (d) *A. veronii*, (e) *A. jandaei*, (f) *Plesiomonas shigelloides*, (g) *Photobacterium damselae*

แถวที่ 5. (a) *Salmonella* Typhimurium, (b) *Pseudomonas aeruginosa*, (c) *Escherichia coli*, (d) *Klebsiella pneumoniae*, (e) *Shigella flexneri*, (f) *Proteus vulgaris*



ภาพที่ 4.8 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blot โดยนำ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำเจลส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R–250 (A) เจลส่วนที่เหลือนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส (B) นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) = VH8-9H, (2) = VH12-6G, (3) = VH21-3C, (4) = VH23-6D, (5) = VH15-1E, (6) = VH14-7B, (7) = VH6-5G, (8) = VH4-6G, (9) = VH14-10B และโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ของหนูต่อ *V. harveyi* S = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ a = *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ b = VH47666-1, c = VHH4, d = VHH5, e = VHH3, f = VHH1 และ g = VHH2

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 9 โคลน ในการตรวจจับแอนติเจนของ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 (VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C และ VH23-6D) สามารถตรวจจับแอนติเจน VH47666-1 ได้ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 (VH 15-1E) ตรวจจับแอนติเจน VHH4 ได้ที่ความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 (VH14-7B) ตรวจแอนติเจน VHH5 ได้ที่ความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 (VH6-5G) ตรวจแอนติเจนของ VHH3 ได้ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มที่ 5 และ 6 สำหรับการตรวจจับแอนติเจนของ VHH1 และ VHH2 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.9, ตารางที่ 4.5) และจากการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดที่ผลิตได้ไม่สามารถตรวจ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ในเนื้อเยื่อกุ้งได้



รูปที่ 4.9 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการตรวจหา *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ด้วยวิธี dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ประมาณ 10^9 ถึงประมาณ 10^2 CFU/มิลลิลิตร ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) = VH8-9H, (2) = VH12-6G, (3) = VH21-3C, (4) = VH23-6D, (5) = VH15-1E, (6) = VH14-7B, (7) = VH6-5G, (8) = VH4-6G และ (9) = VH14-10B ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว a : 10^9 CFU/มิลลิลิตร, แถว b : 10^8 CFU/มิลลิลิตร, แถว c : 10^7 CFU/มิลลิลิตร, แถว d : 10^6 CFU/มิลลิลิตร, แถว e : 10^5 CFU/มิลลิลิตร, แถว f : 10^4 CFU/มิลลิลิตร, แถว g : 10^3 CFU/มิลลิลิตร และ แถว h : 10^2 CFU/มิลลิลิตร, A = VH47666-1, B = VHH4, C = VHH5, D = VHH3, E = VHH1 และ F = VHH2

4. การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจการจับอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VH47666-1 (กลุ่มที่ 1) ทั้งหมด 4 โคลน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับอิพิโทปของแอนติเจน VH47666-1 ในตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน ทั้งนี้สังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงเมื่อนำแอนติบอดีแต่ละชนิดมาผสมกันในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจน VH47666-1 จะให้ค่าต่ำกว่าค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสม (ตารางที่ 4.4)

5. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 6 กลุ่ม พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่มี class เป็น IgM และที่เหลือเป็น IgG_2a และ IgG_2b และ subclass เป็น **κ** ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน VH47666-1 ที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1

MAbs	1 VH8-9H	2 VH12-6G	3 VH21-3C	4 VH23-6D
1 VH8-9H	0.399	0.509	0.472	0.625
2 VH12-6G		0.526	0.538	0.664
3 VH21-3C			0.489	0.618
4 VH23-6D				0.670

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry

Group	MAbs (Isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected Antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
1	VH8-9H (IgM)	10^7	86, 65	-	VH47666-1
	VH12-6G (IgM)	10^6	86, 65, 9		
	VH21-3C (IgM)	10^7	86, 65, 46, 9		
	VH23-6D (IgM)	10^7	86, 65, 46		
2	VH15-1E (IgM)	10^7	86	-	VHH4
3	VH14-7B (IgM)	10^7	68-41, 9	-	VHH4, VHH5
4	VH6-5G (IgG_2b)	10^8	42, 21.5	-	VH1526, VHH3, VHH4, VHH5, VH47666-1, VHSurat, VA, VCamp
5	VH4-6G (IgM)	10^8	48, 44	-	VHH1, VP, VV, VCamp
6	VH14-10B (IgG_2a)	10^8	39, 33, 20	-	VHH2, all *Vibrio* spp. except VM, VAng and VPen, PD

หมายเหตุ VA = *V. alginolyticus*, VAng = *V. anguillarum*, VCamp = *V. campbellii*, VM = *V. mimicus*, VO = *V. ordalii* , VP = *V. parahaemolyticus*, VPen = *V. penaeicida*, VV = *V. vulnificus*, PD = *Photobacterium damselae* และ AJ = *Aeromonas jandaei*. IHC = immunohistochemistry.

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวต่อ VH1526 และไอโซเลตอื่นๆ โดยหนูขาวได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนผสมระหว่างรูปแบบเซลล์คงสภาพ (heat killed) และเซลล์ที่เสียสภาพ (SDS-mercaptoethanol treated) ซึ่งการใช้แอนติเจนในรูปแบบเซลล์คงสภาพและเซลล์ที่เสียสภาพนี้ช่วยกระตุ้นการตอบสนองต่อแอนติเจนของหนูขาว โดยแอนติซีรัมจากหนูให้การตอบสนองต่อแถบโปรตีนที่แตกต่างกัน เนื่องจากแอนติเจนของ *V. harveyi* ที่ใช้ในการฉีดนั้นมีอิพิโทปอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูขาวจึงมีการตอบสนองต่ออิพิโทปเหล่านั้นและทำให้ได้แอนติบอดีที่จำเพาะกับอิพิโทปต่างๆ ของ *V. harveyi* ปะปนกันในแอนติซีรัม นอกจากนี้ยังพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus* อาจเป็นเพราะ *V. parahaemolyticus* กับ *V. harveyi* มีความใกล้ชิดกันค่อนข้างมากเมื่อสังเกตจากลำดับกรดอะมิโนของผลผลิตจากยีน *toxR* (Conejero และ Hedreyda, 2003) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาข้ามที่เกิดขึ้นนั้นมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นซึ่งถ้าสังเกตจากแถบโปรตีนที่จำเพาะกับแอนติซีรัมจะพบว่ายังมีแถบโปรตีนที่จำเพาะกับ *V. harveyi* อื่นที่ไม่ตรงกับของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสิ่งที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้งสองได้ เมื่อตรวจดูปฏิกิริยาของแอนติซีรัมจากหนูขาวกับแถบโปรตีนของ VH1526 พบว่าแอนติซีรัมจากหนูขาวตัวที่ 2 ให้การตอบสนองที่ดีที่สุด โดยสังเกตจากความเข้มและจำนวนแถบโปรตีนของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมากที่สุด เช่นเดียวกันกับกรณีของแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ 4 ซึ่งทำการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นๆ จะพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนของ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ได้จำนวนมากเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำหนูขาวตัวดังกล่าวมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 15 โคลน แบ่งออกได้เป็น 10 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อแบคทีเรียในการทดสอบด้วยวิธี dot blot (ตารางที่ 5.1) โดยสามารถแบ่งแอนติบอดีได้ 3 แบบ คือ แบบที่ 1 จำเพาะกับ *V. harveyi* เท่านั้นโดยมีทั้งหมด 4 ลักษณะตามไอโซเลตของ *V. harveyi* ที่แอนติบอดีจับคือ VH3-10A, VH15-6F, VH11-6E และ VH17-1B จำเพาะกับ VH1526, VH639 และ VHSurat โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่น จากลักษณะความจำเพาะของแอนติบอดีดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันของ *V. harveyi* ทั้ง 3 ไอโซเลต และความแตกต่างของ *V. harveyi* ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้กับ *V. harveyi* ไอโซเลตอื่นๆ เช่น VH47666-1, VHH1, VHH2, VHH3, VHH4 และ VHH5 ซึ่งได้มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน ในขณะที่ VH8-9H, VH12-6G,

VH21-3C และ VH23-6D แสดงความจำเพาะกับ VH47666-1 เท่านั้น กรณีของ VH15-1E จำเพาะต่อ VHH4 เท่านั้นเช่นกัน และ VH14-7B จำเพาะต่อ VHH4 และ VHH5 การที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะกับ *V. harveyi* ไอโซเลตต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีนี้จำเพาะต่อแอนติเจนที่มีเฉพาะใน *V. harveyi* ไอโซเลตนั้นๆ เท่านั้น แบบที่ 2 เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอเท่านั้นได้แก่ VH6-5G จำเพาะต่อ VH1526, VHH3, VHH4, VHH5, VH47666-1, VHSurat และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. alginolyticus* และ *V. campbellii* และโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH4-6G จำเพาะต่อ VHH1 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. campbellii* การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในลักษณะนี้มีความเป็นไปได้ว่า แอนติบอดีดังกล่าวจำเพาะกับแอนติเจนซึ่งมีอยู่ร่วมกันในแบคทีเรียเหล่านั้น แบบที่ 3 คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นด้วยได้แก่ VH5-1G, VH10-8A และ VH14-10B โดยแบคทีเรียชนิดอื่นที่เกิดปฏิกิริยาข้ามคือ *Photobacterium demselae* และ *Aeromonas jandaei* แต่จากผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี dot blot พบว่าแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 2 ตัว ที่ใช้ในการผลิตเซลล์ไอบริโดมาไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *P. demselae* และ *A. jandaei* อาจเกิดเนื่องจากแอนติบอดีที่แสดงความจำเพาะลักษณะนี้ถูกสร้างขึ้นมาในปริมาณน้อยในแอนติซีรัม เมื่อเทียบกับปริมาณแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ทำให้มีความไวในการตรวจแบคทีเรียดังกล่าวต่ำ แต่เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีดังกล่าวหลอมรวมเข้ากับเซลล์ myeloma แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นจึงมีเพียงชนิดเดียวทำให้แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *P. demselae* และ *A. jandaei* ได้ชัดเจน ปฏิกิริยาข้ามที่เกิดขึ้นดังกล่าวทั้งกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถเกิดขึ้นได้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังในการทดลองของ Takeda และคณะ (1990) ซึ่งได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ heat stable enterotoxin ของ *V. cholerae* และพบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มไปทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนจาก *V. mimicus* และ *Yersinia enterocolitica* เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cytotoxin ของ *V. cholerae* ซึ่งทำการผลิตโดย Saha และ Nair (1997) ไปทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนของ *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas* spp. และ *Shigella* spp. และจากการทดลองของ Phianphak และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ก็พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มที่ผลิตได้ไปทำปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ได้ด้วยเช่นกัน

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH11-6E และ VH17-1B เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มเดียวกันที่มีความสามารถในการตรวจการติดเชื้อ VH1526 ในเนื้อเยื่อกุ้งได้โดยวิธี immuno-

histochemistry ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้มาใช้ตรวจติดตามการติดเชื้อ VH1526 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ ดังเช่นในการทดลองของ Jung และคณะ (2001) ซึ่งได้นำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ตรวจการติดเชื้อ *P. damselae* spp. *piscicida* ในเนื้อเยื่อไต ม้าม และตับของปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*)

การตรวจสอบการจับอิพิโทปของ VH1526 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกัน แสดงถึงการจับอิพิโทปของ VH1526 ที่คล้ายกันหรือใกล้เคียงกัน ในกรณีของ VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C และ VH23-6D ซึ่งจำเพาะต่อ VH47666-1 เหมือนกันและจากการทดสอบการจับอิพิโทปพบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีความแตกต่างกันไม่มากซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองด้วยวิธี Western blot คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน มีลักษณะการจับแถบโปรตีนที่ต่างกันเล็กน้อยโดยมีทั้งแถบโปรตีนที่เหมือนกันและต่างกัน แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน จับอิพิโทปในตำแหน่งที่ใกล้เคียงหรือคาบเกี่ยวกัน (ตารางที่ 5.1)

การทดสอบความไวในการตรวจจับ *V. harveyi* ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี dot blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวในการตรวจ *V. harveyi* อยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^7-10^8 CFU/ml หรือประมาณ 10^4 เซลล์ต่อจุด โดยใช้แอนติบอดีที่ผ่านการเจือจาง 250 เท่า ในขณะที่ class ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เป็น IgG_1, IgG_2a, IgG_2b และ IgM (ตารางที่ 5.1)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ (VH3-10A, VH15-6F, VH11-6E, VH17-1B, VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C, VH23-6D, VH15-1E และ VH14-7B) มีความจำเพาะต่อไอโซเลตของ *V. harveyi* ที่หลากหลายขึ้น อีกทั้งยังจับอิพิโทปของ *V. harveyi* แตกต่างกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากงานวิจัยของ Phianphak และคณะ (2005) เมื่อสังเกตจากขนาดของแถบโปรตีนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot (ตารางที่ 5.2) และความไวในการตรวจจับ *V. harveyi* มีค่าประมาณ 10^4 เซลล์ต่อจุดเท่านั้น แต่ก็อาจสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากงานวิจัยนี้ไปใช้ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากงานวิจัยของ Phianphak และคณะ (2005) ในการตรวจ *V. harveyi* ได้เนื่องจากมีความแตกต่างกันในด้านความจำเพาะต่อไอโซเลตของ *V. harveyi* ที่หลากหลายขึ้นและจับกับอิพิโทปของ *V. harveyi* ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5.1 สรุปความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ที่ผลิตได้ทั้งหมดซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry

Group	MAbs (Isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected Antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
1	VH 3-10A (IgG$_2$b) VH 15-6F (IgG$_1$)	10^7	58, 43, 32 53, 48, 39	-	VH1526, VH639, VHSurat
2	VH 11-6E VH 17-1B (IgG$_2$a)	10^7	44-12.5	+	VH1526, VH639, VH Surat
3	VH8-9H (IgM) VH12-6G (IgM) VH21-3C (IgM) VH23-6D (IgM)	10^7 10^6 10^7 10^7	86, 65 86, 65, 9 86, 65, 46, 9 86, 65, 46	-	VH47666-1
4	VH15-1E (IgM)	10^7	86	-	VHH4
5	VH14-7B (IgM)	10^7	68-41, 9	-	VHH4, VHH5
6	VH6-5G (IgG$_2$b)	10^8	42, 21.5	-	VH1526, VHH3, VHH4, VHH5, VH47666-1, VHSurat, VA, VCamp
7	VH4-6G (IgM)	10^8	48, 44	-	VHH1, VP, VV, VCamp

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

Group	MAbs (Isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected Antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
8	VH14-10B (IgG_2a)	10^8	39, 33, 20	-	VHH2, all *Vibrio* spp. except VM, VAng and VPen, PD
9	VH 5-1G (IgM)	10^8	39, 21.5	-	All VH and *Vibrio* spp. except VM, VO and VC, PD
10	VH 10-8A (IgM)	10^8	39, 21.5	-	All VH and *Vibrio* spp. except VM, VO and VC, PD AJ

หมายเหตุ VA = *V. alginolyticus*, VAng = *V. anguillarum*, VC = *V. cholerae*, VCamp = *V. campbellii*, VM = *V. mimicus*, VO = *V. ordalii* , VP = *V. parahaemolyticus*, VPen = *V. penaeicida*, VV = *V. vulnificus*, PD = *Photobacterium damselae* และ AJ = *Aeromonas jandaei*, IHC = immunohistochemistry.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blot, Western blot และ immunohistochemistry (Phianphak และคณะ, 2005)

Group	MAbs	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detect Antigen by Western blotting (kDa)	IHC
1	VH13-4D (IgG_1)	~$5x10^5$	49	-
2	VH3-3H (IgG_2a)	~$5x10^5$	37, 32	+
3	VH16-2A (IgG_2a)	~$1x10^8$	37, 32	+
4	VH39-4E (IgG_2b)	~$1x10^6$	22	-
5	VH24-8H (IgG_2a)	~$5x10^5$	8	-
6	VH29-6D (IgG_1)	~$1x10^4$	~8	-

หมายเหตุ IHC = immunohistochemistry.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 15 โคลน แบ่งออกได้เป็น 10 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 5.1) โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5 กลุ่ม แสดงความจำเพาะต่อ *V. harveyi* โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียสกุลอื่นที่นำมาทดสอบได้แก่ กลุ่มที่ 1 (VH3-10A, VH15-6F) และ 2 (VH11-6E และ VH17-1B) มีความจำเพาะต่อ VH1526, VH639 และ VHSurat กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 โคลน ได้แก่ VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C และ VH23-6D มีความจำเพาะต่อ VH47666-1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 (VH15-1E) มีความจำเพาะต่อ VHH4 และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 (VH14-7B) มีความจำเพาะต่อ VHH4 และ VHH5 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อไอโซเลตของ *V. harveyi* ที่หลากหลายขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากงานวิจัยของ Phianphak และคณะ, 2005 (ตารางที่ 5.2) จึงน่าที่จะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากงานวิจัยของ Phianphak และคณะ, 2005 ในการตรวจวิเคราะห์ *V. harveyi* ได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 (VH6-5G) และ 7 (VH4-6G) มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอเท่านั้น ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 (VH5-1G), 9 (VH8-10A) และ 10 (VH14-10B) มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลอื่นที่นำมาทดสอบ

ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย VH1526 ในเนื้อเยื่อกุ้งด้วยวิธี immunohisto-chemistry (IHC) นั้นพบว่ามีเพียงโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 (VH11-6E และ VH17-1B) เท่านั้นที่สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อนี้ได้

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 (VH8-9H, VH12-6G, VH21-3C และ VH23-6D) และ 4 (VH15-1E) มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นคือ VH47666-1 และ VHH4 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ไปใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. harveyi* ได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ขนิษฐา แสงงาม. 2544. การใช้แบคทีเรีย *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วิทยาศาสตรปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์.

ณัฏฐา วิศิษฎ์วิทยากร. 2543. การศึกษาประสิทธิภาพของ Lactoperoxidase ในการควบคุมแบคทีเรียสกุลวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. วิทยาศาสตรปริญญามหาบัณฑิต. สาขาประมง สายวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เต็มดวง พึ่งขจรบุญ. 2532. การศึกษาผลของฟอร์มาลินต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่แยกได้จากลูกกุ้งเรืองแสง. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2532 18-20 กันยายน 2532: 286-290.

นพดล ค้าขาย, ครรชิต เพ็ชรจำรัส และ ณพพร ก่ำทองหลาง. 2532. ศึกษาการป้องกันโรคที่เกิดกับลูกกุ้งกุลาดำโดยใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 15/2532. สถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง. กรมประมง.

บัณฑิต ลีลายนะ, ธัชชัย แสงกูล และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2533. การใช้ยา Neomycin และ Lincomycin+spectinomycin ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2533. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์พิมพ์ดี.

มณีจันทร์ เมฆธน และ กมลพร มาแสวง. 2543. ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 1-4 กุมภาพันธ์ 2543: 259-268.

วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2532. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2542. การทำบริสุทธิ์สารต่อต้านจุลชีพจาก *Bacillus* S11. รายงานผลการวิจัยเงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ส่งศรี มหาสวัสดิ์, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2541. ผลของ *Lactobacillus* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปี 2541. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกิจ รัตนวินิจกุล, สรรเสริญ ช่อเจี๊ยง, ทวี โรจนสารัมภกิจ และ ไพฑูรย์ ชอบสะอาด. 2531. การทดลองหาแนวทางป้องกันและรักษาโรคที่เกิดกับลูกกุ้งทะเลระยะ P2-P15 ในบ่ออนุบาล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2531. สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดนครศรีธรรมราช กรมประมง.

อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. 2543. วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิค. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pober J.S. 1991. Cellular and Immunology : 417. London : W.B. Saunders

Abraham T. J. 2004. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. NAGA, WorldFish Center Quarterly Vol. 27.

Adams, A., Thompson, K. D., Morris, D., Farias, C. and Chen, S. C. 1995. Development and use of monoclonal antibody probes for immunohistochemistry, ELISA and IFAT to detect bacterial and parasitic fish pathogen. Fish and Shellfish Immunology 5: 537-547.

Aguirre-Guzmãn G., Vãzquez-Juãrez R. and Ascencio F. 2001. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* species. Journal of Invertebrate Pathology 78: 215-219.

Alavandi S. V., Manoranjita V., Vijayan K. K., Kalaimani N. and Santiago T. C. 2006. Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae: Original article. Microbiology 43: 566-570.

Alcaide E., Gil-Sanz C., Sanjuan E., Esteve D., Amaro C. and Silveira L. 2001. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus sp*: Short communication. Journal of Fish Diseases 24: 311-313.

Austin B. and Austin D. A. 1993. Bacterial fish pathogen. 2nd edn. Chichester: Ellis Horwood.

Austin B. and Zhang X. H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates: under the microscope. Applied Microbiology 43: 119-124.

Baumann P. S. and Schubert R. H. W. 1984. The family II Vibrionaceae Veron. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 1. Baltimore, MD, USA: Williams and Williams.

Baumann P., Baumann L. and Mandel M. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the Genus Beneckea. Journal of Bacteriology 107: 268-294.

Basta P. V., Adcock A. F., Tallent C. R., Fleming D. N., Seltzman H. H., Whisnant C. C. and Cook C. E. 2004. Preparation of monoclonal antibodies reactive to the endogenous small molecule, anandamide. Journal of Immunological Methods 285: 181-195.

Chabrillõn M., Rico R. M., Arijo S., Diaz-Rosales P., Balebona M. C. and Moriñigo M. A. 2005. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases 28: 531-537.

Charni, N., Perissol, C., Petit, J. L. and Rugani, N. 2000. Production and Characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 66: 2278-2281.

Chen, S. N., Huang, S. L. and Kou, G. H. 1992b. Studies on the epizootics and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon* in Taiwan. In: Fulks, W. and Main, K. L. (Eds.), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Oceanic Institute Hawaii: 195-205.

Chythanya R., Karunasagar I. and Karunasagar I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture 208: 1-10.

Conjenero M. J. U. and Hedreyda C. T. 2003. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-target PCR primers for species detection. Applied Microbiology 95: 602-611.

Crosbie P. B. B. and Nowak B. F. 2004. Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. Journal of Fish Diseases 27: 623-632.

Diggles B. K., Moss G. A., Carson J. and Anderson C. D. 2000. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. Diseases of Aquatic Organisms 43: 127-137.

Gomez-Gil B., Soto-Rodríguez S., García-Gasca A., Rogue A., Vazquez-Juarez R., Thompson F. L. and Swings J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology 150: 1769-1777.

Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar I. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. International Journal of Food Microbiology 102: 151-159.

Hall A. E., Domanski P. J., Patel P. R., Vernachio J. H., Syribeys P. J., Gorovits E. L., Johnson M. J., Ross J. M. and Hutchins P. J. 2003. Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A. Infection and Immunity 71: 6864-6870.

Jung, T. S., Thompson, K. D., Morris, D. J., Adams, A. and Sneddon, K. 2001. The production and characterization of monoclonal antibodies against *Photobacterium damselae* spp. *piscicida* and initial observations using immunohistochemistry. Journal of Fish Diseases 24: 67-77.

Karunasagar I., Shivu M. M., Girisha S. K., Krohne G. and Karunasagar I. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. Aquaculture 268: 288-292.

Kiriratnikom, J., Rvangsri, J., Wanadet, M., Songpradit, A., Suanyuk, N., Thapuksorn, W. and Supamattaya, K. 2000. The abiotic factors influencing the growth of luminescent bacteria, *Vibrio harveyi* in seawater. Songklanakarin Journal of Science Technology 22: 697-705.

Kita-Tsukamoto K., Yao K., Kamiya A., Yoshizawa S., Uchiyama N., Kogure K. and Wada M. 2006. Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. Federation of European Microbiological Societies 256: 298-303.

Köhler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.

Köhler, G. and Milstein, C. 1976. Derivation of specitic antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. European Journal of Immunology 6: 511-519.

Krieg, N. R. and Holt, J. D. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol 1. Baltimore, London: William and Wilkins.

Lavilla-Pitogo C. R., Leaño E. M. and Paner M. G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. Aquaculture 164: 337-349.

Leaño E. M., Lavilla-Pitogo C. R. and Paner M. G. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. Aquaculture 164: 367-374.

Lee K. K., Chen Y. L. and Liu P. C. 1999. Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* Affected by *Vibrio harveyi*, Extracellular Products and a Toxic Cysteine Protease. Blood Cells, Molecules and Diseases 25: 180-192.

Lee K. K., Liu P. C., Kou G. H. and Chen S. N. 1997. Passive immunization of the tiger prawn, *Penaeus monodon*, using rabbit antisera to *Vibrio harveyi*. Applied Microbiology 25: 34-37.

Lightner, D. V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, LA: World aquaculture society: 236.

Liu P. C., Chuang W. H. and Lee K. K. 2003. Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*: Short communication. Journal of Applied Ichthyology 19: 59-61.

Montero, A.B. and Austin, B. 1999. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recoverd from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). Journal of Fish Diseases 22: 377-386.

Moriarty D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaied aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.

Nakayama T., Ito E., Nomura N., Nomura N. and Matsumura M. 2006. Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. Federation of European Microbiological Societies 258: 194-199.

Oakey H. J., Levy N., Bourne D. G., Cullen B. and Thomas A. 2003. The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. Applied Microbiology 95: 1293-1303.

Pang L., Zhang X. H., Zhong Y., Chen J., Li Y. and Austin B. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene: Original article. Applied Microbiology 43: 249-255.

Pasharawipas T., Thaikua S., Sriurairatana S., Ruangpan L., Direkbusarakum S., Manopvisetcharean J. and Flegel T. W. 2005. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand: Article inpress. Virus Research.

Phianphak, W., Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Sithigorngul, P. 2005. Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi.* Diseases of Aquatic Organisms 63: 161-168.

Prayitno S. B. and Latchford J. W. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. Aquaculture 132: 105-112.

Prior J. L. and Titball R. W. 2002. Monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* lipopolysaccharide detect bacteria cultured at 28 °C or 37 °C. Molecular and Cellular Probes 16: 251-256.

Ruangpan L. and Kitao T. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Journal of Fish Diseases 14: 383-388.

Saha, P.K. and Nair, G.B. 1997. Production of monoclonal antibodies to the Non-Membrane-Damaging Cytotoxin (NMDCY) purified from *Vibrio cholerae* O26 and distribution of NMDCY among strains of *Vibrio cholerae* and other enteric

bacteria determined by monoclonal-polyclonal sandwich Enzyme-linked immunosorbent Assay. Infection and Immunity 65: 801-805.

Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 42: 27-34.

Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon.* Diseases of Aquatic Organisms 49: 71-76.

Spinger, P. A. (edit). 1985. Hybridoma Technology in Biosciences and Medicine. Plenum Press, New York, 602 p.

Takeda, T., Nair, G.B., Suzuki, K. and Shimonishi, Y. 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.

Tendencia E. A. and de la Peña L. D. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 195: 193-204.

Tendencia E. A. 2002. *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines: Short communication. Aquaculture Research 33: 455-458.

Tendencia E. A. 2004. The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines: Short communication. Aquaculture Research 35: 1292-1294.

Thaithongnum, S., Ratanama, P., Weeradechapol, K., Sukhoom, A. and Vuddhakul, V. 2006. Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. Aquaculture (in press)

Thompson, F.L., Iida, T. and Swings, J. 2004. Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 403-431.

Vandenberghe J., Thompson F. L., Gomez-Gil B. and Swings J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture 219: 9-20.

Vinod M. G., Shivu M. M., Umesha K. R., Rajeeva B. C., Krohne G., Karunasagar I. and Karunasagar I. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. Aquaculture 255: 117-124.

Winotaphan P., Sithigornkul P., Muenpol O., Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Sithigornkul W., Petsom A. and Menasveta P. 2005. Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology 18: 189-198.

Yongjuan X., Weiquan H., Baocheng H., Xiaohang J. and Rongqing Z. 2002. Production and characterization of monoclonal anti-idiotype antibody to *Vibrio anguillarum*. Fish and Shellfish Immunology 12: 273-281.

Zhang X. H. and Austin B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. Journal of Fish Diseases 23: 93-102.

Zorrilla I., Arijo S., Chabrillon M., Diaz P., Martinez-Manzanares E., Balebona M. C. and Moriñigo M. A. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. Journal of Fish Diseases 26: 103-108.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.3±0.2

2. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.3±0.2

3. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 8.6 ± 0.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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	มล.

2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

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

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โรซอล (Thimerosal) (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหาร RPMI

RMPI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005	กรัม
$NaHCO_3$	2.0160	กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.9525	กรัม
น้ำ (Meri Q water)	1000.0	มล.

สุดท้ายเติมสารละลาย penicillin G, streptomycin และ kanamycin ความเข้มข้น 20,000 ยูนิต, 200 มก. และ 200 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน millipore membrane (ขนาด 0.22 ไมโครเมตร) และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหาร RPMI เสริมด้วยซีรั่ม

อาหาร RPMI (1)	80.0	มล.
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.0	มล.
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)		
100 X HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มล.
-10 มิลลิโมลาร์ Sodium hypoxanthine		
-1.6 มิลลิโมลาร์ Thymidine		

3. Hybridoma selective medium (HAT medium)

อาหาร RPMI (1)	80.0	มล.
FCS	20.0	มล.
100 X HT supplement	1.0	มล.
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มล
เม็ดเลือกแดงของหนูขาว 1%		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. สารละลายสำหรับ fusion (polyethylene glycol 40%)

Polyethylene glycol (PEG)	4.0	กรัม

ละลาย polyethylene glycol 2 กรัม ลงในอาหาร RPMI (1) 3 มล. บ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้

5. น้ำยาแช่แข็ง (DMSO12%)

Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)	12.0	มล.
อาหาร RPMI (1)	88.0	มล.

เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blot

1. Stock solution

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

Acrylamide (BIO-RAD)	58.4	กรัม
Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide, BIO-RAD)	1.6	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	200.0	มล.

เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ในขวดป้องกันแสง

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

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	200.0	มล.

ปรับ pH ด้วย HCl

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

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	50.0	มล.

ปรับ pH ด้วย HCl

1.4 SDS 10%

SDS (sodium dodecyl sulfate, BIO-RAD)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	500.0	มล.

1.5 Ammonium persulfate 10%

Ammonium persulfate (BIO-RAD)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มล.

1.6 Running gel overlay (0.375 โมลาร์ tris-Cl pH 8.8, SDS 0.1 %)

1.5 โมลาร์ Tris (1.2)	25.0	มล.
SDS 10% (1.4)	1.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	100.0	มล.

1.7 2 X Treatment buffer (0.125 โมลาร์ tris-Cl pH 6.8, SDS 4%, glycerol 20%, 2-mercaptoethanol 10%)

0.5 โมลาร์ Tris (1.3)	2.5	มล.

SDS 10% (1.4)	4.0	มล.
Glycerol	2.0	มล.
2-Mercaptoethanol	1.0	มล.
น้ำกลั่น	0.5	มล.

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

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

Monomer solution (1.1)	15.0	มล.
1.5 โมลาร์ tris-Cl (1.2)	7.5	มล.
SDS 10% (1.4)	0.3	มล.
น้ำกลั่น	6.75	มล.
Ammonium persulfate 10% (1.5)	150.0	µl
TEMED	20.0	µl

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

Monomer solution (1.1)	2.66	มล.
1.5 โมลาร์ tris-Cl pH 6.8 (1.3)	5.0	มล.
SDS 10% (1.4)	0.2	มล.
น้ำกลั่น	12.2	มล.
Ammonium persulfate 10% (1.5)	100.0	µl
TEMED	10.0	µl

3. Running buffer (SDS-PAGE Tank buffer (0.025 โมลาร์ tris pH 8.3, 0.192 โมลาร์ glycine, SDS 0.1%))

Tris	12.0	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
SDS 10% (1.4)	40.0	มล.
น้ำกลั่น	4000.0	มล.

4. Staining และ destaining solution

4.1 Staining solution สำหรับ (Coomassie blue)

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

Coomassie blue R-250 1%	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

4.1.2 Stain (Coomassie blue R-250 0.1%, methanol 50%,

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

acetic acid 10%)

Stain stock (4.1.1)	50.0	มล.
Methanol	250.0	มล.
Acetic acid	50.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	500.0	มล.

4.2 Destaining solution for Coomassie blue

4.2.1 Destain I (methanol 50%, acetic acid 10%)

Methanol	500.0	มล.
Acetic acid	100.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

4.2.2 Destain II (methanol 5%, acetic acid 7%)

Methanol	50.0	มล.
Acetic acid	70.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

ตารางที่ 1 ง การเตรียม separating gel และ stacking gel

	Separating gel	Stacking gel
	T 15% C_{BIS} 2.7% (สำหรับ SDS-PAGE)	T 4% C_{BIS} 2.7% (สำหรับ SDS-PAGE)
T 30% CBIS 2.7%	15.0 มล.	2.66 มล.
1.5 โมลาร์ tris-Cl pH 8.8(1.2)	7.5 มล.	-
0.5 โมลาร์ tris-Cl 6.8 (1.3)	-	5.0 มล.
SDS 10%	0.3 มล.	0.2 มล.
น้ำกลั่น	6.75 มล.	12.2 มล.
ผสมและดูดอากาศออกโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ		
Ammonium persulfate 10% (1.5)	150 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl
ผสมและเทอย่างรวดเร็ว		

วิธีย้อมสีโปรตีนในเจล

แช่เจลใน Staining solution (4.1.2) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ล้างใน destian I เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 1-1½ ชั่วโมง จนเห็นแถบโปรตีน จากนั้นแช่เจลใน destain II จนกระทั่งพื้นเจลใสปราศจากสีของ Coomassie blue ล้างเจลในน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วประกบเจลทั้ง 2 ด้านด้วยกระดาษแก้วใส (cellophane) ที่ชุ่มน้ำ ขึงกระดาษแก้วให้ตึงด้วย gel dryer set ตากให้แห้งในตู้อบ

5. SDS molecular weight markers (Sigma) ประกอบด้วย

- Albumin, bovine serum	66.0	kDa
- Ovalbumin, chicken egg	45.0	kDa
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36.0	kDa
- Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29.0	kDa
- Trypsinogen, bovine pancreas	24.0	kDa
- Trypsin inhibitor, soybean	20.0	kDa
- α -Lactalbumin, bovine milk	14.2	kDa
- Aprotinin, bovine lung	6.5	kDa

6. Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blot

(25 มิลลิโมลาร์ tris, 192 มิลลิโมลาร์ glycine, methanol 20%)

Tris	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

ก่อนใช้บัฟเฟอร์ต้องแช่เย็นจัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

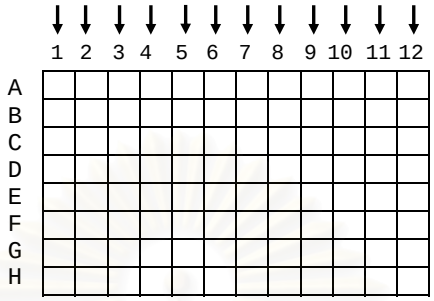
1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ1 chain specific)
2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ2a chain specific)
3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ2b chain specific)
4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ3 chain specific)
5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
9) Normal Rabbit Serum (Negative Control)
10) Positive Control Monoclonal Mouse IgG1 (Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
11) Substrate Buffer, Concentration (10X) (1M 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) HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
15) HRP-Goat anti-Mouse IgG, Concentrated (50X) (0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
16) 50% Tween 20

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subsotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

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

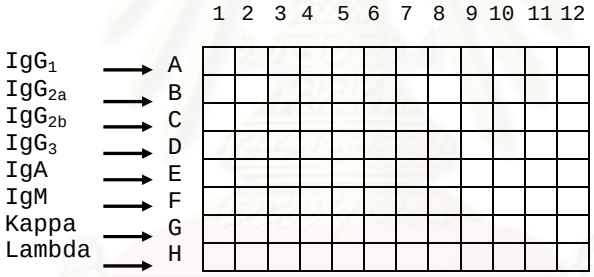
2. สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

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



4. ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ 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 ครั้ง ๆ 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 ครั้ง ๆ 10 นาที

9. เติมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย O-phenylenediamine (OPD) 1 มก./มล. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H2O2) เข้มข้น 0.006% ใน citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด H2SO4 เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม

10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก ฉ

บัฟเฟอร์และสารละลายสำหรับ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. สารละลาย Blotto 5% (Johnson และคณะ, 1984)

นมพร่องมันเนย	5.0	กรัม
PBS 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มล.
Merthiolate 1% (Sigma)	1.0	มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มล.

2. Washing solution (Blotto 0.5%)

สารละลาย Blotto 5% (1)	50.0	มล.
PBS 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มล.

3. 0.1 M Citrate Buffer pH 4.5

Sodium citrate	29.41	กรัม
Merthiolate 1%	10.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

ปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย 0.1 โมลาร์ HCl

4. 1 นอร์มัล H_2SO_4

H_2SO_4	27.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล

5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ

สารเคมีและสารละลายสำหรับ Immunohistochemistry (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Gelatin	1.0	กรัม
Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

2. Davidson's fixative

Ethanol 95%	30.0	มล.
Formalin 100%	20.0	มล.
Glacial acetic acid	10.0	มล.
น้ำกลั่น	30.0	มล.

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

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1.15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

4. Calf serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10.0	มล.
PBS	100.0	มล.

5. Enrilich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8.0	กรัม
ethanol 95%	400.0	มล.
Aluminium potassium sulphate	8.0	กรัม
Distilled water	400.0	มล.
Glycerine	400.0	มล.
Glacial acetic acid	400.0	มล.

6. Eosin Y 0.2% ใน ethanol 95%

Eosin Y	0.2	กรัม
ethanol 95%	100.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจการติดเชื้อ *V. harveyi* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี indirect immunoperoxidase (Sithigorngul และคณะ, 2000; 2002)

1. วิธี Immunohistochemistry (IHC)

1.1 ตัดส่วนหัว (cephalothoraxes) ของกุ้งขาวที่เกิดการติดเชื้อ *V. harveyi* แล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับดังนี้

1.3.1 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.2 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง

1.3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.5 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.6 แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.8 แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที

1.4 นำเนื้อเยื่อของกุ้งที่อินฟิลเตรทด้วยพาราพลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราพลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

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

1.6 นำเซคชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซคชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซคชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยืดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกซับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 นำสไลด์ที่มีเซคชันมาละลายเอาพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparafinization) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันดังนี้

1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ๆ 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 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที

1.7.9 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.7.10 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ 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 *V. harveyi*)

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเซคชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ 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 ครั้ง ๆ 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 ครั้ง ๆ 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 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการผนึกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางผนึก (permount)

นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอิสระ พลจังหรีด เกิดวันที่ 25 มีนาคม 2525 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และสำเร็จการศึกษาในภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2550

ผลงานทางวิชาการ

Issara Poljungreed, Siwaporn Longyant, Sombat Rukpratanporn and Sirirat Rengpipat. Production of Monoclonal Antibodies against *Vibrio harveyi* 1526. The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 33), 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand. P. 1

ทุนวิจัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย