

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 สมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *V. vulnificus* VVC, VVB และ *V. mimicus* ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *V. vulnificus* VVC, VVB และ *V. mimicus*

สมบัติ	<i>V. vulnificus</i> VVC	<i>V. vulnificus</i> VVB	<i>V. mimicus</i> DMST15142
สีโคโลนีบนอาหาร TSA	ครีม	ครีม	ครีม
การติดสีแกรม	แกรมลบ	แกรมลบ	แกรมลบ
รูปร่าง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
การ swarm บน TSA ผสม 2% NaCl	-	-	-
สีของโคโลนีบนอาหาร TCBS	เขียว	เขียว	เขียว
MIO การเคลื่อนที่	-	+	+
Indole production	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-

หมายเหตุ TSA = Tryptic soy agar

TCBS = Thiosulfate citrate bile salt

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางชีวเคมีของ *V. vulnificus* VVC, VVB และ *V. mimicus* โดยชุดทดสอบ API 20E (BioMérieux, France)

สมบัติ (API 20 E)	<i>V. vulnificus</i> VVC	<i>V. vulnificus</i> VVB	<i>V. mimicus</i> DMST 15142
β-galactosidase(ONPG)	+	+	+
Arginine dihydrolase(ADH)	-	-	-
Lysine decarboxylase (LDC)	+	-	+
Ornithine decarboxylase (ODC)	-	-	+
Citrate utilization	-	-	-
H ₂ S production (H ₂ S)	-	-	-
Urease (URE)	-	-	-
Tryptophane deaminase (TDA)	-	-	-
Indole production (IND)	-	-	-
Acetoin production (VP)	-	-	-
Gelatinase (GEL)	+	+	+
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

4.2 การผลิตโมโนโคลนอลจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVC

4.2.1 ความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

เก็บแอนติซีรั่ม (พอลิโคลนอลแอนติบอดี) ของหนูขาว 3 ตัว หลังจากปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 มาดูดซับด้วย *V. harveyi* 639 แล้วนำมาตรวจสอบความจำเพาะกับ VVC โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรั่มของหนูตัวที่ 3 สามารถจับกับแถบโปรตีนของ VVC ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรั่มของหนูตัวอื่น ๆ

4.2.2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด 30 ถาด ทำการคัดเลือกชั้นที่ 1 ด้วยวิธี Dot blotting ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกชัดเจน 215 โคลน การคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามด้วย Dot blotting, Western blotting และ Immunohistochemistry (IHC) ในเนื้อเยื่อถุงกูดาค่า ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ตอบสนองดี 14 โคลน สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.2.3 ลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

กลุ่มที่ 1 (10 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 50 และ 39 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้ไม่แสดงปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.1 และ 4.2) สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVC ในเนื้อเยื่อถุงกูดาค่าด้วยวิธี IHC (รูปที่ 4.4)

กลุ่มที่ 2 (2 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. fluvialis* แต่ไม่แสดงปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่น (รูปที่ 4.1)

กลุ่มที่ 3 (2 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (รูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.3)

กลุ่มที่ 2 และ 3 ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVC ในเนื้อเยื่อถุงกูดาค่า ด้วยวิธี IHC (ตารางที่ 4.3)

4.2.4 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot blotting

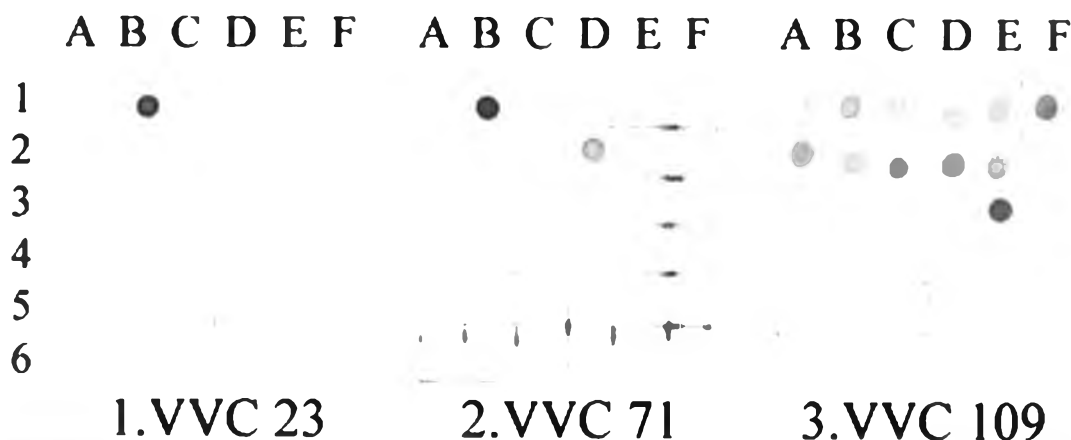
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 กลุ่ม มีความไวในการตรวจสอบ VVC ด้วยวิธี Dot blotting ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน คือ $\sim 1.6 \times 10^7$ CFU/ml หรือ $\sim 1.6 \times 10^4$ เซลล์ต่อจุด (รูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.3)

4.2.5 การตรวจจำแนก isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 กลุ่ม มี isotype และ subisotype เป็น IgG, IgG_{2a} และ IgG_{2b} (ตารางที่ 4.3)

4.2.6 การวิเคราะห์อิมูโนโพลีเมอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA

กลุ่มที่ 1 เคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วยเซลล์ VVC ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml จำแนกตามอิมูโนโพลีเมอร์ที่แตกต่างกันได้ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 VVC 23 และ 97 ชนิดที่ 2 VVC 38, 121, 118, 14, 40, 42 และ 88 ชนิดที่ 3 VVC 43 ซึ่ง VVC 23 มีสัมพรรคภาพ (affinity) สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 2 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVC ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 5×10^4 CFU/ml พบว่าเป็นอิมูโนโพลีเมอร์ชนิดเดียวกัน ซึ่ง VVC 71 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 3 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVC ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 5×10^6 CFU/ml พบว่าเป็นอิมูโนโพลีเมอร์ชนิดเดียวกัน ซึ่ง VVC 109 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน (ตารางที่ 4.4)



รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี Dot blotting โดยหยดแบคทีเรียรูปแบบคงสภาพลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปบ่มด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VVC 23, VVC 71 และ VVC 109 โดยแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

แถวที่ 1: (A) *V. vulnificus* (VVB); (B) *V. vulnificus* (VVC);

(C) *V. vulnificus* ATCC 29307 (VVA₁); (D) *V. vulnificus* ATCC 27562 (VVA₂);

(E) *V. vulnificus* M06-24/0 (VVM); (F) *V. vulnificus* BT 2-89/04/7052 (VVBT)

แถวที่ 2: (A) *V. vulnificus* MT 1506 (VVMT); (B) *V. vulnificus* (VVBS);

(C) *V. harveyi* 639 (VH); (D) *V. fluvialis* (VF);

(E) *V. alginolyticus* DMST 14800 (VA); (F) *V. penaeicida* (VPe)

แถวที่ 3: (A) *V. mimicus* DMST 15142 (VM); (B) *V. cholerae* (VC);

(C) *V. ordalii* (VO); (D) *V. anguillarum* AVL01 (VAn);

(E) *V. parahaemolyticus* (VP); (F) *Escherichia coli* ATCC 25922 (ECo)

แถวที่ 4: (A) *Aeromonas hydrophila* VMARC 1234 (AH); (B) *A. sobria* DMST 12446 (AS);

(C) *A. caviae* NICMB 13016 (AC); (D) *Plesiomonas shigelloides* (PS);

(E) *Photobacterium damsellae* ssp. *piscicida* (PD); (F) *Proteus vulgaris* (PV)

แถวที่ 5: (A) *Salmonella* Typhi (ST); (B) *Salmonella* Typhimurium (STm);

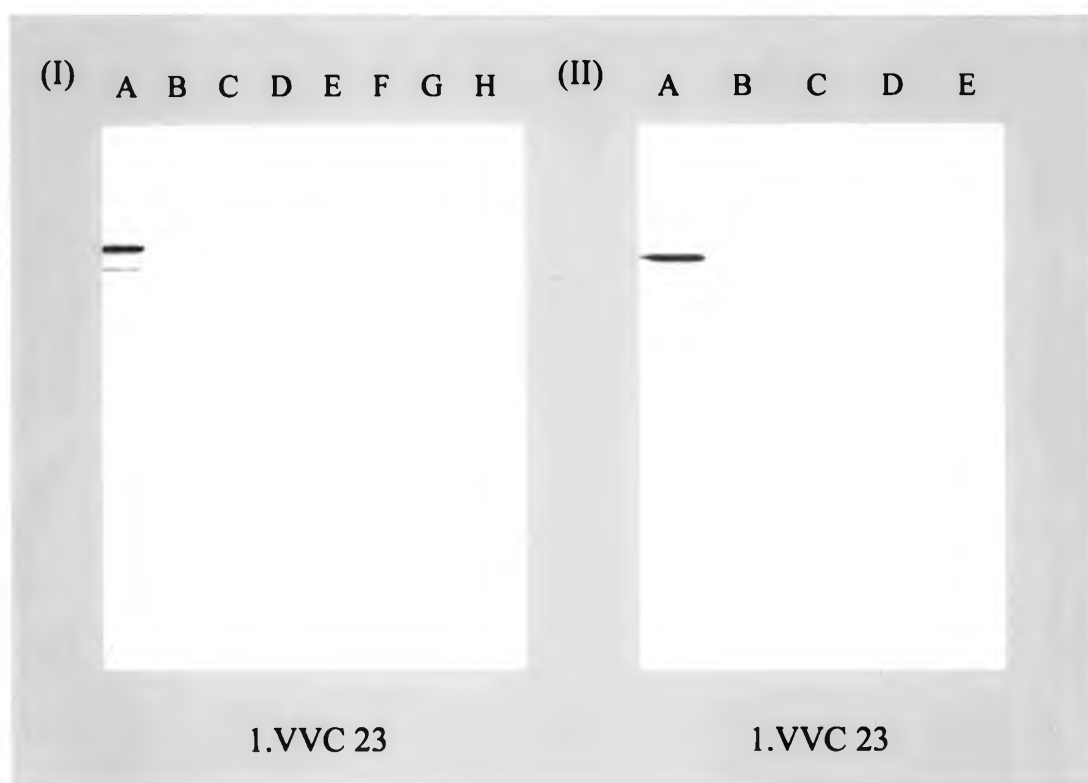
(C) *Salmonella* Enteritidis (SE); (D) *Shigella flexneri* (SF);

(E) *Edwardsiella tarda* B88308 (ET); (F) *Yersinia ruckeri* B04023 (YR)

แถวที่ 6: (A) *Enterobacter cloacae* (EC); (B) *Klebsiella pneumoniae* (KP);

(C) *Pseudomonas aeruginosa* (PA); (D) *Morganella morganii* (MM);

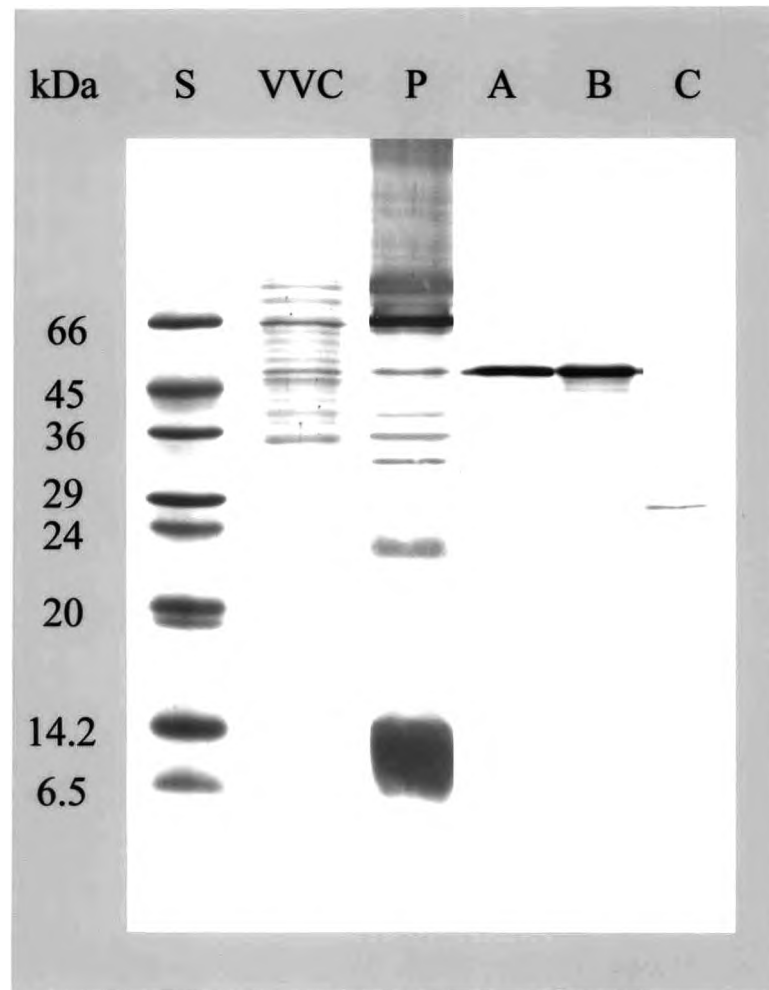
(E) *Bacillus subtilis* (BS); (F) *Enterococcus faecalis* (EF)



รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ VVC และแบคทีเรียชนิดต่างๆ มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นนำเจลมาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปปบมด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 VVC 23

(I) ประกอบด้วย VVC (A), VVB (B), *V. vulnificus* ATCC 29307 (C), *V. vulnificus* ATCC 27562 (D), *V. vulnificus* M06-24/0 (E), *V. vulnificus* BT 2-89/04/7052 (F), *V. vulnificus* MT 1506 (G) และ *V. vulnificus* VVBS (H)

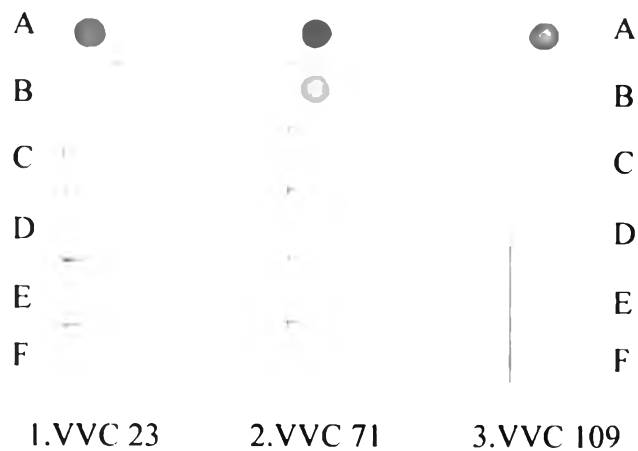
(II) ประกอบด้วย VVC (A), VVB (B), *Aeromonas hydrophila* VMARC 1234 (C), *Plesiomonas shigelloides* (D) และ *Photobacterium damsellae* ssp. *piscicida* (E)



รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ VVC มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นแบ่งเจลส่วนที่มีโปรตีนมาตรฐาน ไปย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1% และนำเจลอีกส่วนมาย้ายโปรตีนลงบน กระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปบ่มด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี (P) และตัวแทนของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VVC 23 (A), VVC 71 (B) และ VVC 109 (C)

S = โปรตีนมาตรฐาน

VVC = แถบโปรตีนของ VVC เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1%



รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี Dot blotting โดยหยด VVC ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ประมาณ 2.56×10^4 ถึง 8×10^7 CFU/ml ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปบ่มด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VVC 23 (A), VVC 71 (B) และ VVC 109 (C) ความเข้มข้นของ VVC ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

แถว A: $\sim 8 \times 10^7$ CFU/ml

แถว B: $\sim 1.6 \times 10^7$ CFU/ml

แถว C: $\sim 3.2 \times 10^6$ CFU/ml

แถว D: $\sim 6.4 \times 10^5$ CFU/ml

แถว E: $\sim 1.28 \times 10^5$ CFU/ml

แถว F: $\sim 2.56 \times 10^4$ CFU/ml

ตารางที่ 4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVC

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	Dot-blot (CFU ml ⁻¹)	Western blot (kDa)	Immuno- histo- chemistry	ปฏิกิริยาข้าม
1	VVC.23,38 (IgG ₁)	~1.6x10 ⁷	~39, 50*	+	-
	VVC.43,121,118 (IgG _{2a})				
	VVC.14,40,42,88,97 (IgG _{2b})				
2	VVC.71,90 (IgG _{2a})	~1.6x10 ⁷	~50	-	VF(++)
3	VVC.109 (IgG ₁)	~1.6x10 ⁷	~28	-	VP (+++) VVB, VVBT, VVMT, VH, VF, VA (++) VVA ₁ , VVA ₂ , VVM, VVBS, Van (+)
	VVC.98 (IgG _{2b})				

หมายเหตุ * = แถบโปรตีนหลัก

ตัวเลขพิมพ์ตัวหนา = ตัวแทนกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VVC ด้วยวิธี indirect ELISA

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	อิพิโทป
1	VVC 23*, 97	ชนิดเดียวกัน
	VVC 38, 121, 118, 14, 40, 42, 88	ชนิดเดียวกัน
	VVC 43	มีชนิดเดียว
2	VVC 71*, 90	ชนิดเดียวกัน
3	VVC 98, 109*	ชนิดเดียวกัน

หมายเหตุ * = โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน

4.3 การผลิตโมโนโคลนอลจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVB

4.3.1 ความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

เก็บแอนติซีรั่ม (พอลิโคลนอลแอนติบอดี) ของหนูขาว 4 ตัว หลังจากปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 มาดูดซับด้วย *V. harveyi* 639 แล้วนำมาตรวจสอบความจำเพาะกับ VVB โดยวิธี Western blot พบว่าแอนติซีรั่มของหนูตัวที่ 3 สามารถจับกับแถบโปรตีนของ VVB ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรั่มของหนูตัวอื่น ๆ

4.3.2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด 30 ถาด ทำการคัดเลือกชั้นที่ 1 ด้วยวิธี Dot blotting ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกชัดเจน 210 โคลน การคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามด้วย Dot blotting, Western blotting และ Immunohistochemistry (IHC) ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ตอบสนองดี 27 โคลน สามารถแบ่งเป็น 9 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.5

4.3.3 ลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

กลุ่มที่ 1 (6 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.6, 4.7 และ 4.8) ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 2 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนลักษณะเป็นสเมียร์ตั้งแต่ประมาณ 3-14 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.6, 4.7 และ 4.8) สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC (รูปที่ 4.9)

กลุ่มที่ 3 (4 โคลน) กลุ่มนี้ไม่จำเพาะต่อแถบโปรตีนในการวิเคราะห์ด้วย Western blotting แสดงปฏิกิริยากับ *V. vulnificus* สายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.6) ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 4 (3 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 39 และ 46 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 5 (5 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 39 และ 40 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอ สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 6 (3 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 7 (2 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 40 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวibriโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 8 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 5, 6 และ 15 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวibriโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC

กลุ่มที่ 9 (2 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 54, 55, 50, 46, 53 และ 58 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวibriโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VVB ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี IHC (รูปที่ 4.6, 4.8 และตารางที่ 4.5)

4.3.4 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot blotting

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 9 กลุ่ม มีความไวในการตรวจสอบ VVB ที่ระดับตั้งแต่ประมาณ 10^5 ถึง 10^8 CFU/ml (รูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.5)

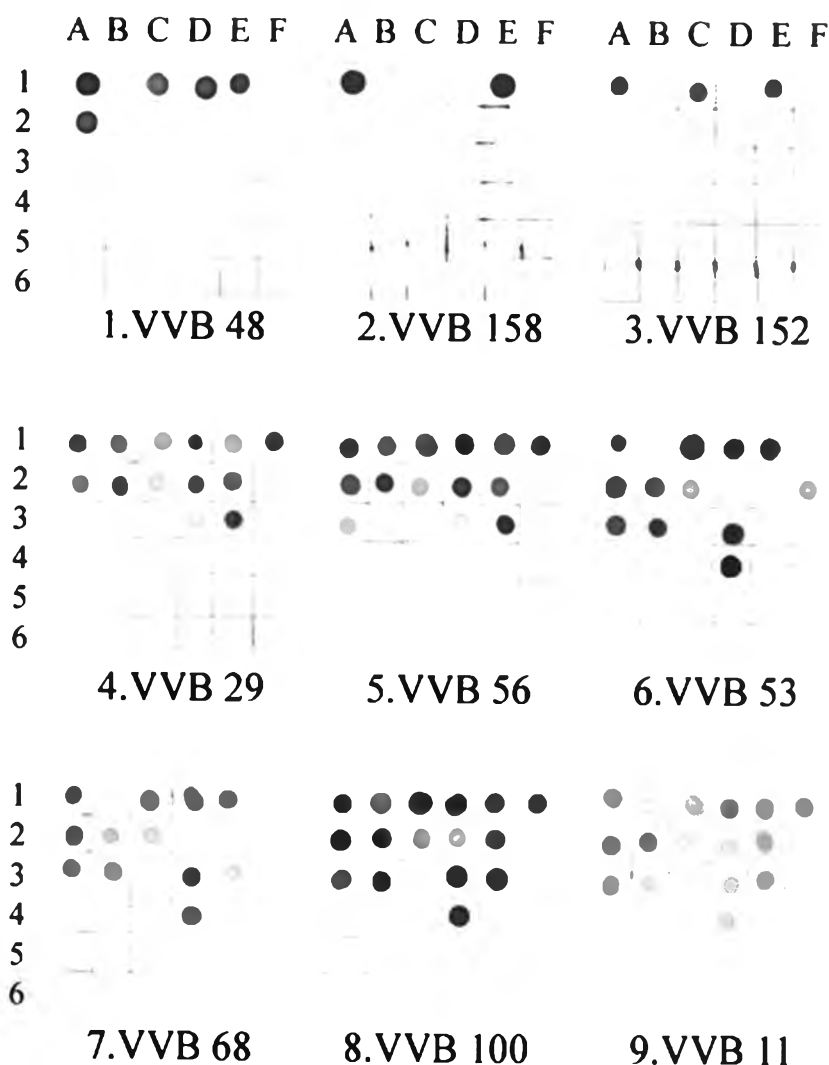
4.3.5 การตรวจจำแนก isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 9 กลุ่ม มี isotype และ subisotype เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} และ IgM (ตารางที่ 4.5)

4.3.6 การวิเคราะห์อิมูโนโพรบของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA

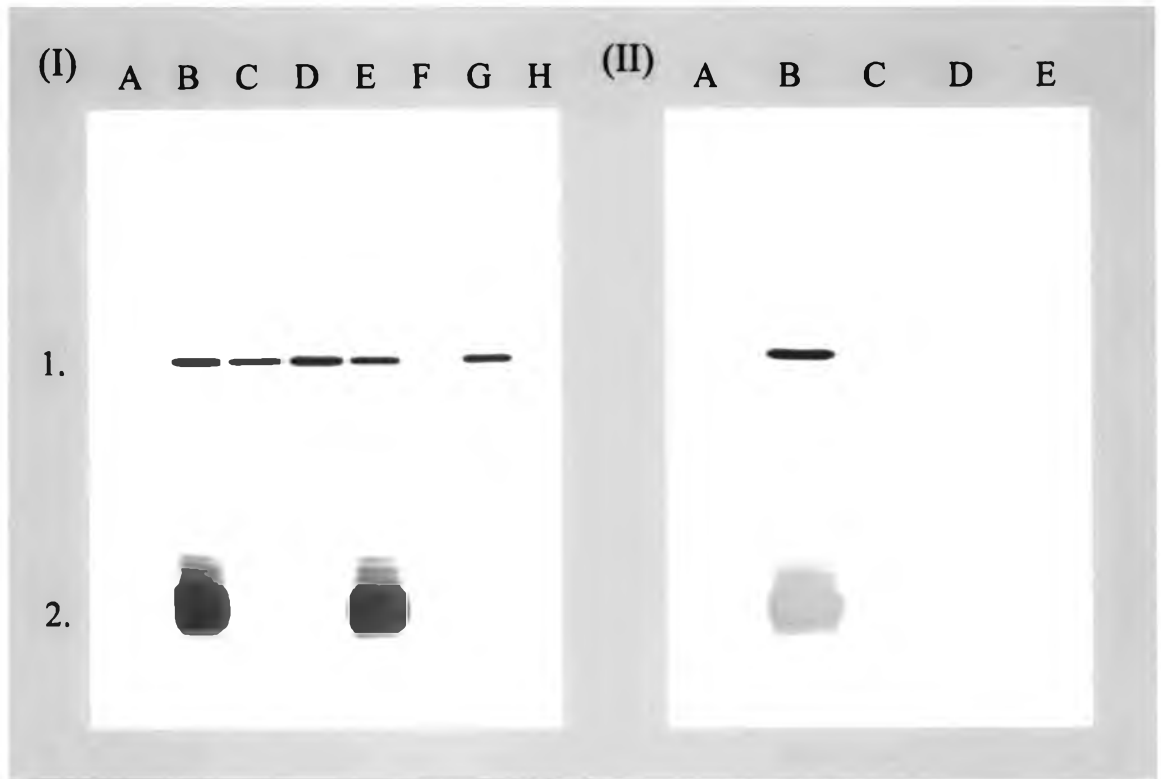
กลุ่มที่ 1 เคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วยเซลล์ VVB ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml พบว่าเป็นอิมูโนโพรบชนิดเดียวกัน ซึ่ง VVB 48 มีสัมพรรคภาพ (affinity) สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 3 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVB ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ของ VVB ความเข้มข้น 1×10^6 CFU/ml พบว่าเป็นอิมูโนโพรบชนิดเดียวกัน ซึ่ง VVB 152 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 4 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVB ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ml พบว่าเป็นอิมูโนโพรบชนิดเดียวกัน ซึ่ง VVB 29 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 5 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVB ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml จำแนกตามอิมูโนโพรบที่แตกต่างกันได้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 VVB 56, 64, 92, 172 และ 180 ชนิดที่ 2 VVB 125 ซึ่ง VVB 56 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 6 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVB ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml พบว่าเป็นอิมูโนโพรบชนิดเดียวกัน ซึ่ง VVB 53 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 7 เคลือบ microculture plate ด้วยเซลล์ VVB ที่ผ่านการทำให้แตกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 1×10^5

CFU/ml จำแนกตามอิทธิพลที่แตกต่างกันได้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 VVB 68 ชนิดที่ 2 VVB 123 ซึ่ง VVB 68 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน ในกลุ่มที่ 2, 8 และ 9 ไม่ได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลเนื่องจากกลุ่มเหล่านี้ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มละ 1 โคลน (ตารางที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี Dot blotting โดยหยดแบคทีเรียรูปแบบคงสภาพลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปป้อนด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VVB 48, VVB 158, VVB 152, VVB 29, VVB 56, VVB 53, VVB 68, VVB 100 และ VVB 11 ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

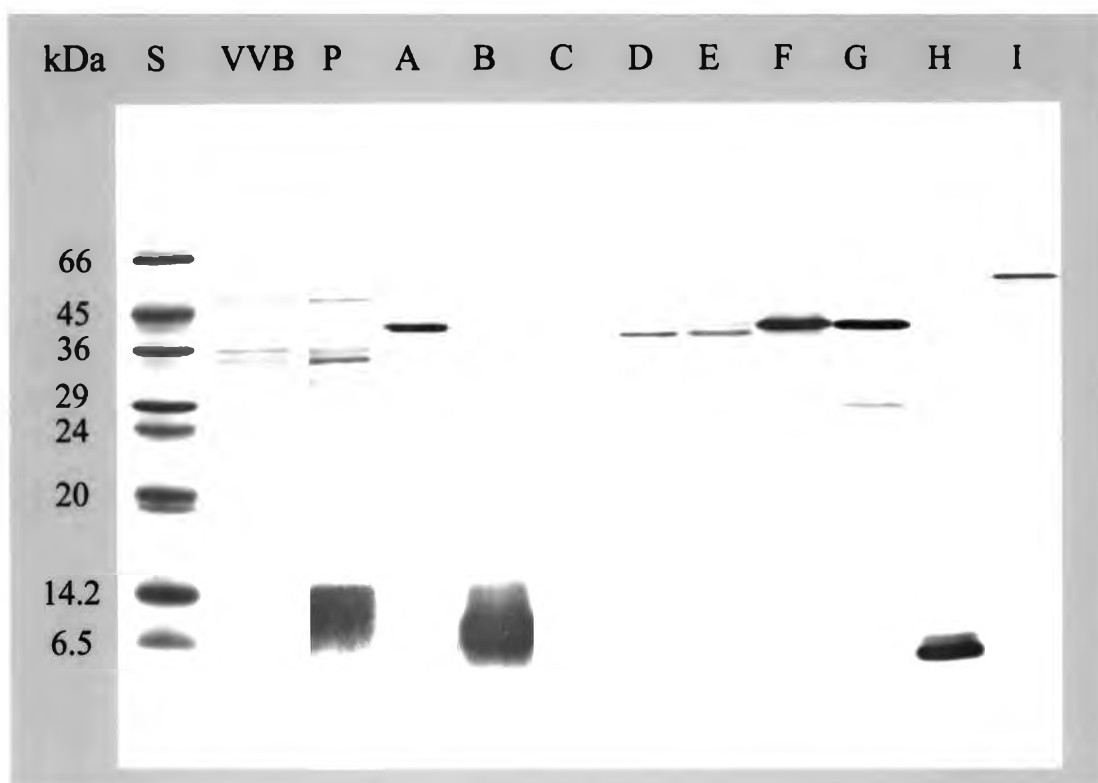
- แถวที่ 1: (A) *V. vulnificus* (VVB); (B) *V. vulnificus* (VVC);
 (C) *V. vulnificus* ATCC 29307 (VVA₁); (D) *V. vulnificus* ATCC 27562 (VVA₂);
 (E) *V. vulnificus* M06-24/0 (VVM); (F) *V. vulnificus* BT 2-89/04/7052 (VVBT)
- แถวที่ 2: (A) *V. vulnificus* MT 1506 (VVMT); (B) *V. vulnificus* (VVBS);
 (C) *V. harveyi* 639 (VH); (D) *V. fluvialis* (VF);
 (E) *V. alginolyticus* DMST 14800 (VA); (F) *V. penaeicida* (VPe)
- แถวที่ 3: (A) *V. mimicus* DMST 15142 (VM); (B) *V. cholerae* (VC);
 (C) *V. ordalii* (VO); (D) *V. anguillarum* AVL01 (VAn);
 (E) *V. parahaemolyticus* (VP); (F) *Escherichia coli* ATCC 25922 (ECo)
- แถวที่ 4: (A) *Aeromonas hydrophila* VMARC 1234 (AH); (B) *A. sobria* DMST 12446 (AS);
 (C) *A. caviae* NICMB 13016 (AC); (D) *Plesiomonas shigelloides* (PS);
 (E) *Photobacterium damsellae* ssp. *piscicida* (PD); (F) *Proteus vulgaris* (PV)
- แถวที่ 5: (A) *Salmonella* Typhi (ST); (B) *Salmonella* Typhimurium (STm);
 (C) *Salmonella* Enteritidis (SE); (D) *Shigella flexneri* (SF);
 (E) *Edwardsiella tarda* B88308 (ET); (F) *Yersinia ruckeri* B04023 (YR)
- แถวที่ 6: (A) *Enterobacter cloacae* (EC); (B) *Klebsiella pneumoniae* (KP);
 (C) *Pseudomonas aeruginosa* (PA); (D) *Morganella morganii* (MM);
 (E) *Bacillus subtilis* (BS); (F) *Enterococcus faecalis* (EF)



รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ VVB และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นำเจลมาย้ายไปรติบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 VVB 158 (2) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03% และ H_2O_2 0.006% ใน PBS และนำไปบ่มอีกครั้งด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 VVB 48 (1)

(I) ประกอบด้วย VVC (A), VVB (B), *V. vulnificus* ATCC 29307 (C), *V. vulnificus* ATCC 27562 (D), *V. vulnificus* M06-24/0 (E), *V. vulnificus* BT 2-89/04/7052 (F), *V. vulnificus* MT 1506 (G) และ *V. vulnificus* VVBS (H)

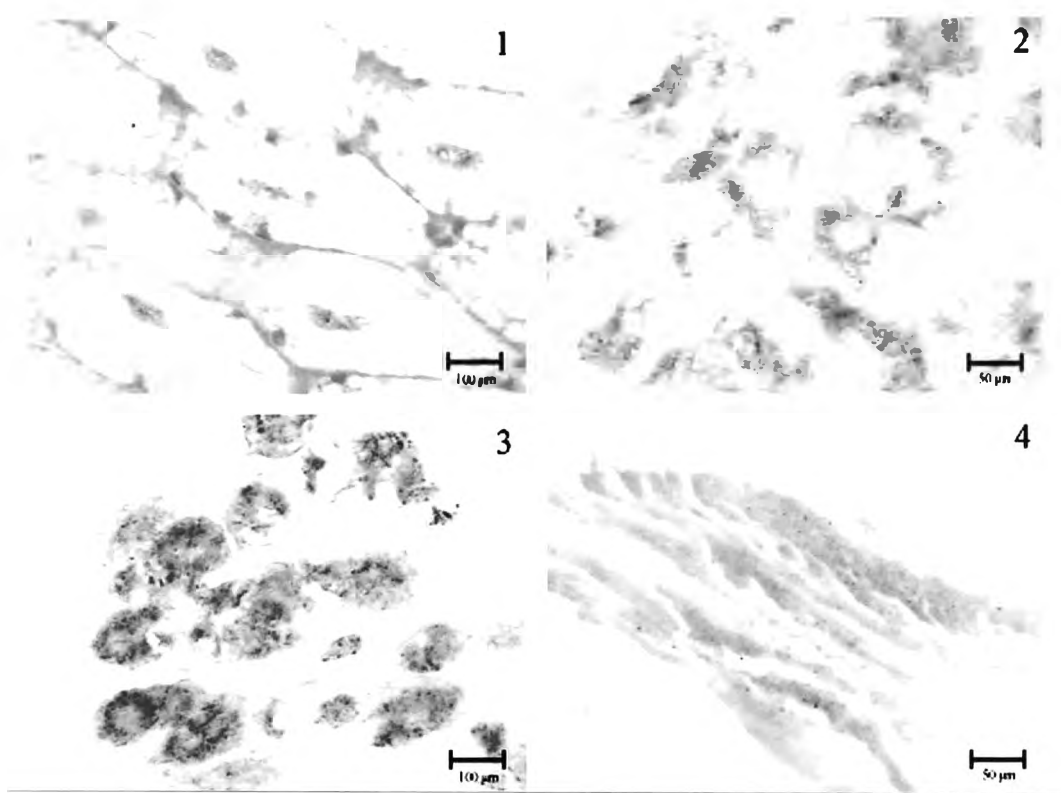
(II) ประกอบด้วย VVC (A), VVB (B), *Aeromonas hydrophila* VMARC 1234 (C), *Plesiomonas shigelloides* (D) และ *Photobacterium damsellae* ssp. *piscicida* (E)



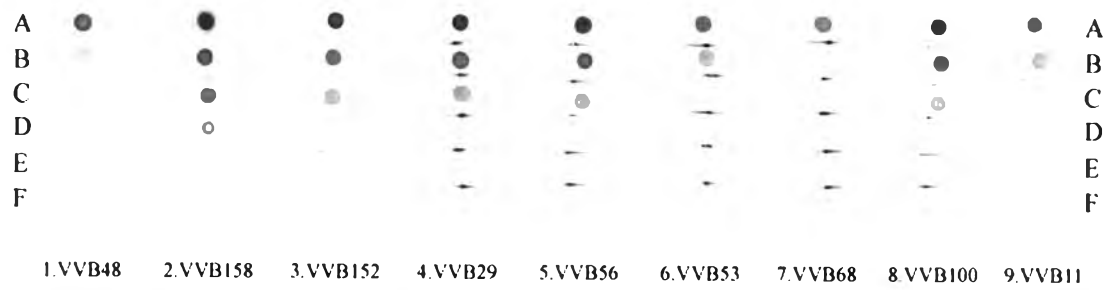
รูปที่ 4.8 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ VVB มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นแบ่งเจลส่วนที่มีโปรตีนมาตรฐานไปย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1% และนำเจลอีกส่วนมาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปบ่มด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี (P) และตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VVB 48 (A), VVB 158 (B), VVB 152 (C), VVB 29 (D), VVB 56 (E), VVB 53 (F), VVB 68 (G), VVB 100 (H) และ VVB 11 (I)

S = โปรตีนมาตรฐาน

VVB = แถบโปรตีนของ VVB เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1%



รูปที่ 4.9 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 2 (VVB 158) ด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC) ในตับ (1) ระวังค์ (2) subcuticular gland (3) และ ระวังค์ (4) ของกึ่งกลางดำซึ่งชักนำไปเกิดการติดเชื้ด้วยการฉีด โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อกึ่งกลางดำไป บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 (VVB 158) แล้วนำย้อมด้วยสีอีโอซิน



รูปที่ 4.10 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี Dot blotting โดยหยด VVB ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ประมาณ 3.3×10^4 ถึง 1×10^8 CFU/ml ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปป้อมด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VVB 48, VVB 158, VVB 152, VVB 29, VVB 56, VVB 53, VVB 68, VVB 100 และ VVB 11 ความเข้มข้นของ VVB ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

แถว A: $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml

แถว B: $\sim 2 \times 10^7$ CFU/ml

แถว C: $\sim 4 \times 10^6$ CFU/ml

แถว D: $\sim 8 \times 10^5$ CFU/ml

แถว E: $\sim 1.6 \times 10^5$ CFU/ml

แถว F: $\sim 3.3 \times 10^4$ CFU/ml

ตารางที่ 4.5 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVB

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	Dot-blot (CFU ml ⁻¹)	Western blot (kDa)	Immuno- histo- chemistry	ปฏิกิริยาข้าม
1	VVB 4,12,47,48,110,174 (IgG ₁)	~4x10 ⁶	~40	-	VVA ₁ , VVA ₂ , VVM, VWMT (++)
	VVB 163 (IgM)				
2	VVB 158 (IgG _{2b})	~1.6x10 ⁵	~3-14	+	VVM (+++)
3	VVB 34,202 (IgG _{2b})	~8x10 ⁵	-	-	VVA ₁ , VVM (+++)
	VVB 3,152 (IgG ₃)				
4	VVB 45 (IgG _{2a})	~8x10 ⁵	~39*, 46	-	VVA ₂ , VVBT, VVBS, VF, VP (+++) VVC, VWMT, VA (++)
	VVB 16,29 (IgG _{2b})				
5	VVB 56 (IgG ₁)	~8x10 ⁵	~39*, 40	+	VVA ₂ , VVBT, VVBS, VP (+++) VVC, VVA ₁ , VVM, VWMT, VF, VA (++) VH, VM (+) VPe, VC, Van (+/-)
	VVB 64,92 (IgG _{2a})				
	VVB 172,180 (IgG _{2b})				
	VVB 125 (IgM)				
6	VVB 58,63 (IgG ₁)	~4x10 ⁶	~40	+	VVA ₁ , VVA ₂ , VVM, VWMT, VVBS, VM, VC, Van, PS (++) VH (++) VF, VPe, AH, AC, (+)
	VVB 53 (IgG _{2a})				
7	VVB 68,123 (IgG _{2a})	~4x10 ⁶	~28, 40*	++	Van (+++) VVA ₁ , VVA ₂ , VVM, VWMT, VM, VC, PS (++) VVBT, VVBS, VH, VP (+) VVC, VF, VA(+/-)

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	Dot-blot (CFU ml ⁻¹)	Western blot (kDa)	Immuno- histo- chemistry	ปฏิกิริยาข้าม
8	VVB 100 (IgG _{2a})	~8x10 ⁵	~5*, 6, 15	-	VVA ₁ , VVA ₂ , VVM, VVB, VVMT, VVBS, VA (+++) VVC, VH, VF, VM, VC Van, VP, PS (++)
9	VVB 11 (IgG _{2a})	~4x10 ⁶	~46, 50, 53, 54*, 55, 58	++	VVA ₂ , VVMT, VVBS (+++) VVA ₁ , VVM, VVB, VA, VM, VP (++) VH, VF, VC, Van, PS(+)

หมายเหตุ * = แถบโปรตีนหลัก

ตัวเลขพิมพ์ตัวหนา = ตัวแทนกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของ MAb

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VVB ด้วยวิธี indirect ELISA

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	อิพิโทป
1	VVB 4, 12, 47, 48*, 110, 174, 163	ชนิดเดียวกัน
3	VVB 3, 34, 202, 152*	ชนิดเดียวกัน
4	VVB 16, 29*, 45	ชนิดเดียวกัน
5	VVB 56*, 64, 92, 172, 180	ชนิดเดียวกัน
	VVB 125	มีชนิดเดียว
6	VVB 53*, 58, 63	ชนิดเดียวกัน
7	VVB 68*	มีชนิดเดียว
	VVB 123	มีชนิดเดียว

หมายเหตุ * = โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน

4.4 การผลิตโมโนโคลนอลจำเพาะต่อ *V. mimicus* DMST 15142 (VM)

4.4.1 ความจำเพาะของแอนติซีรัม

เก็บแอนติซีรัม (พอลิโคลนอลแอนติบอดี) ของหนูขาว 4 ตัว หลังจากปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 มาดูดซับด้วย *V. harveyi* 639 แล้วนำมาตรวจสอบความจำเพาะกับ VM โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมของหนูตัวที่ 3 สามารถจับกับแถบโปรตีนของ VM ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมของหนูตัวอื่น ๆ

4.4.2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด 30 ถาด ทำการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี Dot blotting ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกชัดเจน 191 โคลน การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามด้วย Dot blotting, Western blotting และ Immunohistochemistry (IHC) ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ตอบสนองดี 12 โคลน สามารถแบ่งเป็น 7 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.7

4.4.3 ลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

กลุ่มที่ 1 (3 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนลักษณะเป็นสเมียร์ตั้งแต่ประมาณ 19-32 กิโลดาลตัน ไม่แสดงปฏิกิริยากับ *V. mimicus* ATCC 33653 และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ

กลุ่มที่ 2 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 3 และ 10 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยากับ *V. mimicus* ATCC 33653 และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.11, 4.12, 4.13 และตารางที่ 4.7)

กลุ่มที่ 3 (4 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 41 และ 55 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae

กลุ่มที่ 4 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 3 และ 10 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae

กลุ่มที่ 5 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนขนาดประมาณ 22 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae

กลุ่มที่ 6 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae

กลุ่มที่ 7 (1 โคลน) จำเพาะต่อแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนรองขนาดประมาณ 29 และ 44 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae (รูปที่ 4.11, 4.13 และตารางที่ 4.7)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ VM ในเนื้อเยื่อถึง
 กลาดำ ด้วยวิธี IHC ได้เพียงกลุ่มเดียว คือ กลุ่มที่ 3 (ตารางที่ 4.7)

4.4.4 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot blotting

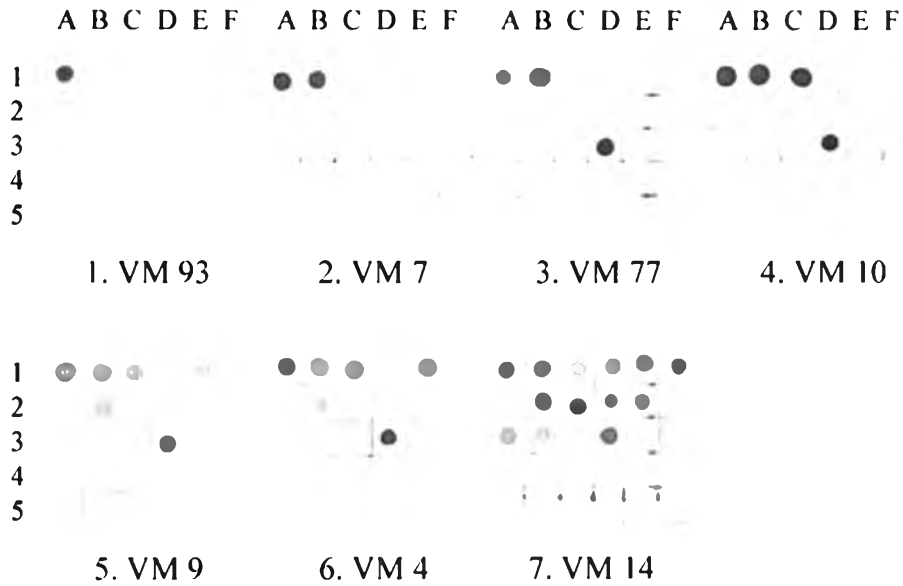
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 7 กลุ่ม มีความไวในการตรวจสอบ VM ที่ระดับตั้งแต่
 ประมาณ 10^4 ถึง 10^8 CFU/ml (รูปที่ 4.14 และตารางที่ 4.7)

4.4.5 การตรวจจำแนก isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 7 กลุ่ม มี isotype และ subisotype เป็น IgG₁,
 IgG_{2a}, IgG_{2b} และ IgM (ตารางที่ 4.7)

4.4.6 การวิเคราะห์อภิไพบของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA

กลุ่มที่ 1 เคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วยเซลล์ VM ที่ผ่านการทำให้
 แยกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ml พบว่าเป็นอภิไพบชนิดเดียวกัน ซึ่ง VM 93
 มีสัมพรรคภาพ (affinity) สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มที่ 3 เคลือบ microculture
 plate ด้วยเซลล์ VM ที่ผ่านการทำให้แยกโดยวิธี sonicate ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ml จำแนก
 ตามอภิไพบที่แตกต่างกันได้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 VM 3 และ 77 ชนิดที่ 2 VM 46 และ 79 ซึ่ง VM
 77 มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน ในกลุ่มที่ 2, 4, 5, 6 และ 7 ไม่ได้ทำการ
 วิเคราะห์อภิไพบเนื่องจากกลุ่มเหล่านี้ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มละ 1 โคลน
 (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.11 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี Dot blotting โดยหยดแบคทีเรียรูปแบบคงสภาพลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปบ่มด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VM 93, VM 7, VM 77, VM 10, VM 9, VM 4 และ VM 14 ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

แถวที่ 1: (A) *V. mimicus* DMST 15142 (VM); (B) *V. mimicus* ATCC 33653 (VMA);

(C) *V. cholerae* (VC); (D) *V. vulnificus* (VVC);

(E) *V. vulnificus* (VVB); (F) *V. parahaemolyticus* (VP)

แถวที่ 2: (A) *V. ordalii* (VO); (B) *V. anguillarum* AVL01 (VAn);

(C) *V. harveyi* 639 (VH); (D) *V. fluvialis* (VF);

(E) *V. alginolyticus* DMST 14800 (VA); (F) *V. penaeicida* (VPe)

แถวที่ 3: (A) *Aeromonas hydrophila* VMARC 1234 (AH); (B) *A. sobria* DMST 12446 (AS);

(C) *A. caviae* NICMB 13016 (AC); (D) *Plesiomonas shigelloides* (PS);

(E) *Photobacterium damsellae* ssp. *piscicida* (PD); (F) *Proteus vulgaris* (PV)

แถวที่ 4: (A) *Salmonella* Typhi (ST); (B) *Salmonella* Typhimurium (STm);

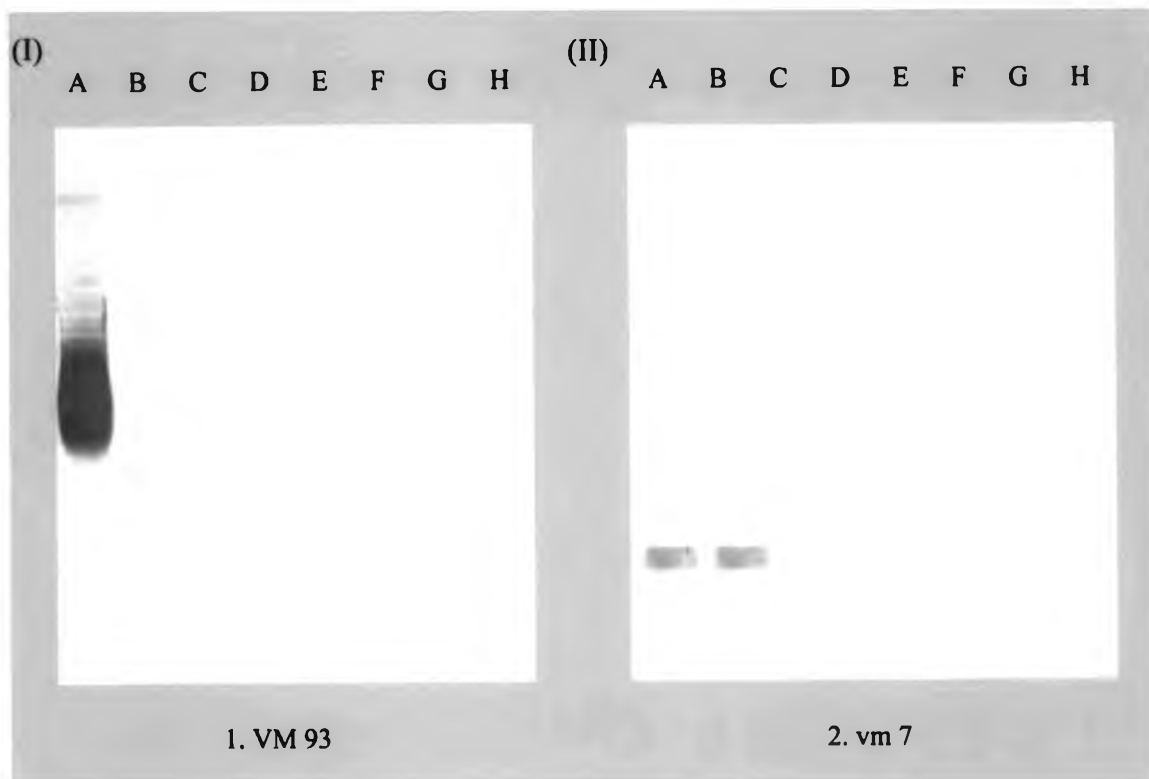
(C) *Salmonella* Enteritidis (SE); (D) *Shigella flexneri* (SF);

(E) *Edwardsiella tarda* B88308 (ET); (F) *Yersinia ruckeri* B04023 (YR)

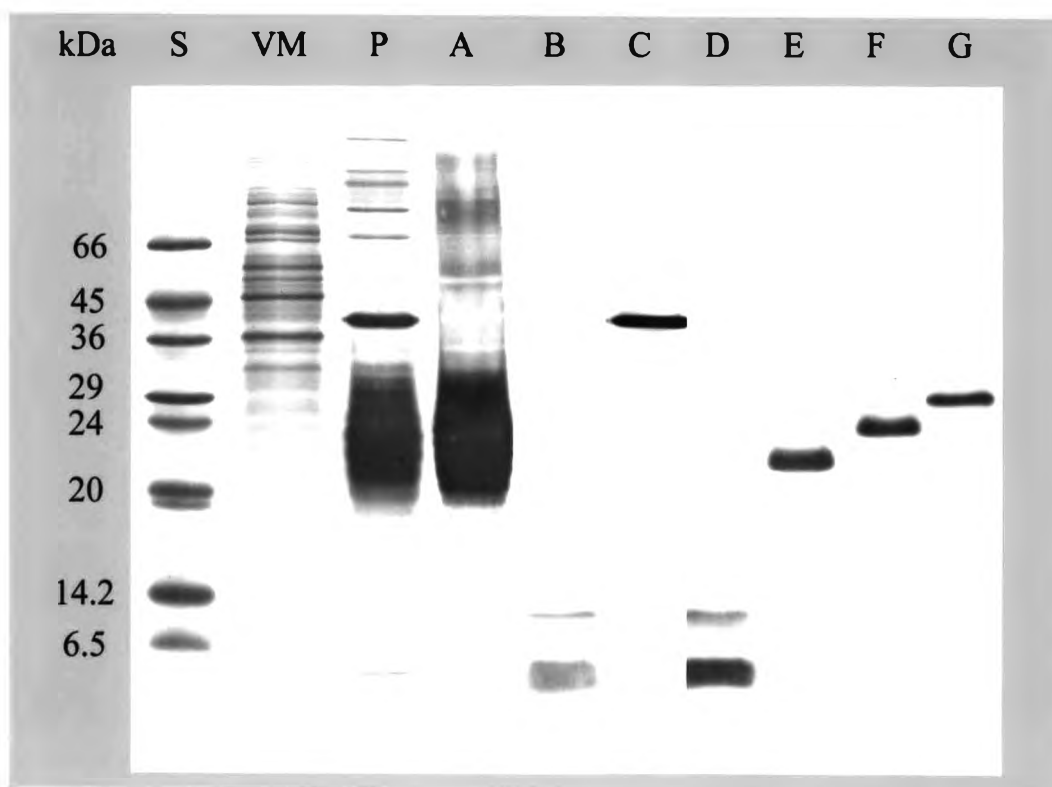
แถวที่ 5: (A) *Enterobacter cloacae* (EC); (B) *Klebsiella pneumoniae* (KP);

(C) *Pseudomonas aeruginosa* (PA); (D) *Morganella morganii* (MM);

(E) *Escherichia coli* ATCC 25922 (ECo); (F) *Enterococcus faecalis* (EF)



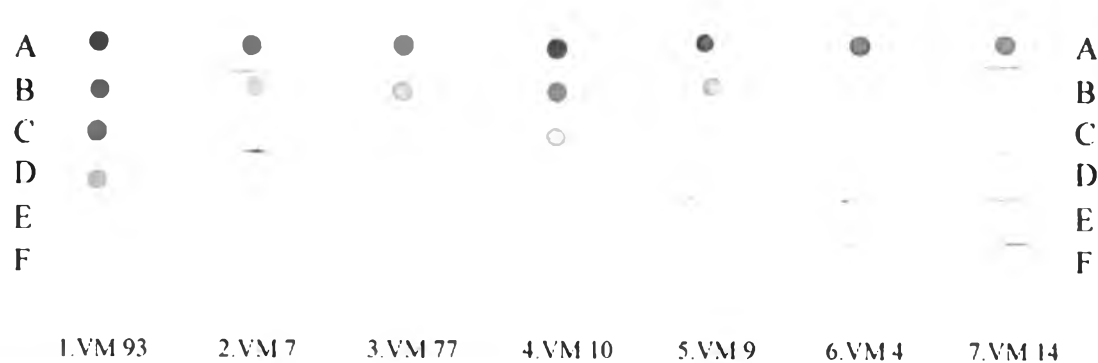
รูปที่ 4.12 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ VM และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นนำเจลมาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปบ่มด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 VM 93 (I) และกลุ่มที่ 2 VM 7 (II) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *V. mimicus* DMST 15142 (A), *V. mimicus* ATCC 33653 (B), *V. cholerae* (C), *V. vulnificus* VVC (D), *V. vulnificus* VVB (E), *Aeromonas hydrophila* VMARC 1234 (F), *Plesiomonas shigelloides* (G) และ *Photobacterium damsellae* ssp. *piscicida* (H)



รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ VM มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นแบ่งเจลส่วนที่มีโปรตีนมาตรฐานไปย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1% และนำเจลอีกส่วนมาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปบ่มด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี (P) และตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VM 93 (A), VM 7 (B), VM 77 (C), VM 10 (D), VM 9 (E), VM 4 (F) และ VM 14 (G)

S = โปรตีนมาตรฐาน

VM = แถบโปรตีนของ VM เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1%



รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี Dot blotting โดยหยด VM ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ประมาณ 3.3×10^4 ถึง 1×10^8 CFU/ml ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตรต่อจุด) และนำไปป่มด้วยตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ ได้แก่ VM 93, VM 7, VM 77, VM 10, VM 9, VM 4 และ VM 14 ความเข้มข้นของ VM ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

แถว A: $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml

แถว B: $\sim 2 \times 10^7$ CFU/ml

แถว C: $\sim 4 \times 10^6$ CFU/ml

แถว D: $\sim 8 \times 10^5$ CFU/ml

แถว E: $\sim 1.6 \times 10^5$ CFU/ml

แถว F: $\sim 3.3 \times 10^4$ CFU/ml

ตารางที่ 4.7 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. mimicus* DMST 15142 (VM)

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	Dot-blot (CFU ml ⁻¹)	Western blot (kDa)	Immuno- histo- chemistry	ปฏิกิริยาข้าม
1	VM 19 (IgG ₂ b)	~3.3x10 ⁴	19-32	-	-
	VM 5, 93 (IgM)				
2	VM 7 (IgG ₂ b)	~4x10 ⁶	3*, 10	-	VMA (+++)
3	VM 3, 46, 77, 79 (IgG ₁)	~4x10 ⁶	41*, 55	++	VMA, PS (+++)
4	VM 10 (IgG ₂ a)	~8x10 ⁵	3*, 10	-	VMA, VC, PS (+++)
5	VM 9 (IgG ₁)	~8x10 ⁵	22	-	PS (+++) VMA, VC, VVB, Van (++)
6	VM 4 (IgG ₂ a)	~4x10 ⁶	24	-	VVB, PS (+++) VVA, VC, VP, Van, VPe (++) VF (+) VVC, VA, VH (+/-)
7	VM 14 (IgG ₁)	~4x10 ⁶	29*, 44	-	VMA, VP, VA, VH(+++) VVC, VVB, VF, VA, PS (++) VC, VPe, AH, AS (+)

หมายเหตุ * = แถบโปรตีนหลัก

ตัวเลขพิมพ์ตัวหนา = ตัวแทนกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของ MAbs

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VM ด้วยวิธี indirect ELISA

กลุ่ม	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	อิพิโทป
1	VM 5, 19, 93*	ชนิดเดียวกัน
3	VM 3, 77*	ชนิดเดียวกัน
	VM 46, 79	ชนิดเดียวกัน

หมายเหตุ * = โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่มีสัมพรรคภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเดียวกัน