

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*



นายอภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN : 974-14-2291-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio alginolyticus*



Mr. Apirak Tansirisittikun

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 2005

ISBN : 974-14-2291-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*

โดย

นายอภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สัทธีกรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สัทธีกรกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

อภีรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*

(PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio alginolyticus*)

อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล,

82 หน้า. ISBN 974-14-2291-1.

ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 14800, Y16 และ BY2 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์เป็นแอนติเจน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี 27 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 13 กลุ่มตามความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและโปรตีนต่าง ๆ ในช่วง 7-300 กิโลดาลตัน แอนติบอดี 2 กลุ่มแรกเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ โดยมีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 14800 หรือ Y16 เพียงอย่างเดียวแต่ไม่จับกับ *V. alginolyticus* สายพันธุ์อื่น แอนติบอดี 2 กลุ่มนี้จับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 12-25 กิโลดาลตัน หรือ 135 กิโลดาลตัน แอนติบอดีกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะกว้างกว่าแอนติบอดีใน 2 กลุ่มแรก โดยมีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 และจับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 7-15 กิโลดาลตัน แอนติบอดีกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสปีชีส์ โดยมีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และจับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กับ 20 และ 300 กิโลดาลตันตามลำดับ แอนติบอดีกลุ่มที่ 6 เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสกุล โดยมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุลวibriโอทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ และจับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 7 กลุ่มที่ผลิตได้แสดงปฏิกิริยาข้ามต่อ *Vibrio* spp. อื่นที่ใช้ในการทดสอบแตกต่างกันออกไป โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 4 5 และ 6 สามารถตรวจติดตามการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ และสามารถ ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 2 3 4 และ 5 จำแนกหรือแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *V. alginolyticus* ด้วยวิธี Dot blot ได้ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ทำให้ได้วิธีทางอิมมูโนวิทยาที่ไม่เพียงแต่จำแนก *V. alginolyticus* เท่านั้นแต่ยังสามารถพิสูจน์ทราบสายพันธุ์ของ *V. alginolyticus* ได้อีกด้วย และคาดว่าจะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปเตรียมเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปสะดวกใช้ซึ่งมีความไวสูงเพื่อใช้วินิจฉัย *V. alginolyticus* ต่อไป

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา...2548.....

ลายมือชื่อนิสิต..... อภีรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ไพศาล สิทธิกรกุล.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์.....

4672492623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: DOT BLOT/ IMMUNOHISTOCHEMISTRY/ WESTERN BLOT/
MONOCLONAL ANTIBODY/ *Vibrio alginolyticus*

APIRAK TANSIRISITTIKUN : PRODUCTION OF MONOCLONAL
ANTIBODIES AGAINST *Vibrio alginolyticus*.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D.,

THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D.,
82 pp. ISBN 974-14-2291-1.

Twenty-sixth monoclonal antibodies (MAbs) against *Vibrio alginolyticus* 14800, Y16 and BY2 were generated using whole cell of bacteria for immunization. They were divided into 13 groups according to their specificities and ability to bind the antigen ranging from 7-300 kDa. The first two groups of MAbs were species-specific MAbs, they bound to only one strain of *V. alginolyticus*; 14800 or Y16 but did not bind to the other *V. alginolyticus* strain, they bound to a smear band of antigen at molecular mass ranging from 12 to 25 kDa or 135 kDa antigens. The third group of MAbs demonstrated broader specificity, they bound to both *V. alginolyticus* Y16 and BY2, and bound to a smear band of antigen at molecular mass ranging from 7-15 kDa. The fourth and fifth groups of MAbs were species-specific MAbs, they recognized all three *V. alginolyticus* strains and they bound to two different band of antigens at molecular mass of 10 and 20 kDa, 300 kDa antigens, respectively. The antibodies in the sixth group were genus-specific MAbs, they bound to all *Vibrio* spp. tested and bound to an antigen at molecular mass of 50 kDa. The other 7 groups of monoclonal antibodies showed different cross-reactivity pattern to various *Vibrio* spp. tested. MAbs in the first, fourth, fifth and sixth group could be used to detect *V. alginolyticus* infection in tissues by immunohistochemistry. MAbs in the first, second, third, fourth and fifth group can be used to identify or differentiate *V. alginolyticus* by dot blot assay. Therefore, this study provided an immunological tool for specific identification not only to *V. alginolyticus* species but also to differentiate some strains among this bacteria as well. Further development of highly specific assay and convenient kit using these monoclonal antibodies for detection of *V. alginolyticus* are in progress.

Field of study...Biotechnology.... Student's signature... *A. Tansirisittikun*.....
Academic year...2005..... Advisor's signature... *Sirirat Rengpipat*.....
Co-advisor's signature... *Paisarn Sithigorngul*.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สัทธกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้คอยซักถาม สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำวิทยานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศิวพร ลงยันต์ และคุณสมบัติ รักประทานพร ที่ได้ให้ความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

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

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุทธี ภูศิริฤทธิ์ คุณฝน ดันสกุล คุณเพียงจันทร์ โพธิ์ย้อย รวมถึง พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สำหรับน้ำใจอันมีค่าอย่างยิ่งทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุน และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอแนะนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง กุ้งขาว และปลานิลทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
กุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	4
โรคในกุ้ง.....	5
ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง.....	6
ไวรัสโอชิส.....	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>	7
โมนโคลนอลแอนติบอดี.....	14
3. การผลิตโมนโคลนอลแอนติบอดีต่อ <i>Vibrio alginolyticus</i>	
การผลิตโมนโคลนอลแอนติบอดีต่อ <i>V. alginolyticus</i> 14800	
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	19
ผลการทดลอง.....	26
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	37
การผลิตโมนโคลนอลแอนติบอดีต่อ <i>V. alginolyticus</i> Y16 และ BY2	
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	40
ผลการทดลอง.....	42
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	52
4. สรุปผลการทดลอง.....	55

รายการอ้างอิง.....57

ภาคผนวก

 ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....66

 ภาคผนวก ข บัฟเฟอร์และสารเคมี.....67

 ภาคผนวก ค สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา.....68

 ภาคผนวก ง บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ SDS-PAGE และ Western blot analysis.....70

 ภาคผนวก จ สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ isotype และ subisotype ของ
 โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....75

 ภาคผนวก ฉ บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....77

 ภาคผนวก ช บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Immunohistochemistry.....78

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>V. alginolyticus</i>	9
2.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ.....	18
3.1 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง.....	20
3.2 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL โคลนต่าง ๆ.....	25
3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>V. alginolyticus</i> 14800, Y16 และ BY2.....	29
3.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>V. alginolyticus</i> 14800, Y16 และ BY2 เมื่อทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E.....	29
3.5 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL โคลนต่าง ๆ.....	35
3.6 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL โคลนต่าง ๆ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Dot blot, Western blot และ Immunohistochemistry.....	36
4.1 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA โคลนต่าง ๆ.....	41
4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA โคลนต่าง ๆ.....	50
4.3 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA โคลนต่าง ๆ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Dot blot, Western blot และ Immunohistochemistry.....	51
4.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ <i>V. alginolyticus</i> ซึ่งผลิตได้ในการทดลองครั้งนี้และความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี Dot blot, Western blot และ Immunohistochemistry.....	56
1ง การเตรียม separating gel และ stacking gel.....	71

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	4
2.2 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรค กกับการเกิดโรคในกุ้ง.....	5
2.3 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	15
2.4 การสังเคราะห์ DNA โดยวิธี de novo และ วิธี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิธี de novo.....	17
3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ <i>V. alginolyticus</i> 14800 จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot.....	30
3.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของตัวแทน โมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL ในกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot blot.....	31
3.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL ด้วยวิธี Western blot.....	32
3.4 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL ด้วยวิธี Immunohistochemistry.....	33
3.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL ในการตรวจหา <i>V. alginolyticus</i> 14800 ด้วยวิธี Dot blot.....	34
4.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ <i>V. alginolyticus</i> Y16 และ BY2 จากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot.....	45
4.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของตัวแทน โมโนโคลนอลแอนติบอดี VA ในกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot blot.....	46
4.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA ด้วยวิธี Western blot.....	47
4.4 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA ด้วยวิธี Immunohistochemistry.....	48
4.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA ในการตรวจหา <i>V. alginolyticus</i> Y16 ด้วยวิธี Dot blot.....	49

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
CFU/ml	=	โคโลนีต่อมิลลิลิตร
kDa	=	กิโลดาลตัน
MAbs	=	โมโคลนอลแอนติบอดี
μm	=	ไมโครเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นับเป็นอุตสาหกรรมที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงซึ่งทำรายได้อีกกับประเทศผู้ส่งกุ้งกุลาดำเป็นสินค้าออกอย่างมากมาขมหาศาล เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูง จึงยังคงทำให้มีการขยายตัวของพื้นที่เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นมาโดยตลอด อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปีต่าง ๆ ที่ผ่านมานั้นไม่ได้เป็นไปด้วยความราบรื่น สืบเนื่องมาจากการระบาดของรุนแรงของเชื้อไวรัส (Flegel, 1997) และแบคทีเรีย (Ruangpan และ Kitao, 1998) ซึ่งทำให้กุ้งเกิดการตายไปเป็นจำนวนมากภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเกษตรกรไม่สามารถตั้งตัวรับมือหรือหาหนทางป้องกันและแก้ไขได้อย่างทันท่วงที

เนื่องจากธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทยกำลังประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคไวรัสและแบคทีเรียอย่างหนัก จึงทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบความเสียหาย ดังนั้นจึงได้มีการนำเข้ากุ้งขาว หรือ Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) จากประเทศในแถบละตินอเมริกาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 เป็นต้นมา (Briggs และคณะ, 2004) เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้แก่เกษตรกรนอกเหนือจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แต่ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวก็ประสบปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* โดยเฉพาะ *Vibrio alginolyticus* (Liu และคณะ, 2004b) ไม่ต่างไปจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

แบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในที่ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แหล่งพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งและตามอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งเช่น เปลือก เหงือก และทางเดินอาหาร (Ota และคณะ, 1999) ได้มีรายงานถึงการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้จากกุ้งที่เป็นโรคในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ ใต้หวัน อินเดีย และเอกวาดอร์ (Lee และคณะ, 1996a; Selvin และ Lipton, 2003; Mohny และคณะ, 1994) โดยกุ้งที่เป็นโรคมักมีลักษณะอาการคือ อ่อนแอ กินอาหารได้น้อยลง ว่ายน้ำไม่มีทิศทาง ลำตัวมีสีแดง กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น ดับถูกทำลาย (Esteve และ Herrera, 2000) แบคทีเรียชนิดนี้ถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสซึ่งทำให้กุ้งเกิดการตายเมื่ออยู่ในภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่น ระดับความเค็มของน้ำลดลง ระดับอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีการเปลี่ยนแปลง ปริมาณของแอมโมเนีย ไนไตรต์ คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งไม่เหมาะสมซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอ่อนแอลง (Wang และ Chen, 2005; Cheng และคณะ, 2005; Liu และ Chen, 2004; Tseng และ Chen, 2004; Yeh และคณะ, 2004) นอกจากจะทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งได้แล้ว *V. alginolyticus* ยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์น้ำประเภทอื่น ๆ ได้อีกด้วยเช่น ปลาน้ำจืด หอยแครง หอย

เป่าสี และปลาหมึก เป็นต้น (Balebona และคณะ, 1998; Rikelme และคณะ, 1996; Liu และคณะ, 2001; Sangster และ Smolowitz, 2003) อีกทั้งยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในคนได้โดยผ่านทางบาดแผล หรือการรับประทานอาหารทะเลที่เกิดการปนเปื้อน ซึ่งจะทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) ติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) แม้แต่ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ด้วยเช่นกัน (Aggarwal และคณะ, 1996; Hlady และ Klontz, 1996; Janda และคณะ, 1986)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาวิธีที่ใช้ในการตรวจหา *V. alginolyticus* ขึ้นมาหลายวิธี ได้แก่ วิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional method) ซึ่งใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์ จำแนก และพิสูจน์ทราบชนิด (Kourany, 1983; Alsina และ Blanch, 1994) โดยทั่วไปการตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ช้าช้อน และใช้ระยะเวลาในการตรวจ จึงทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้ค่อนข้างล่าช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ให้ผลการตรวจที่ไม่แน่นอน (Hara และคณะ, 2003) ส่วนวิธีทางโมเลกุล (Molecular method) โดยการใช้เทคนิค PCR (Sudheesh และคณะ, 2002; Pinto และคณะ, 2005; Goarant และคณะ, 1999) มีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นาน แต่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง อย่างไรก็ตามเนื่องจาก *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* นั้นเป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันมาก (Sakazaki และ Balows, 1981) จึงทำให้ในบางกรณีเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะให้ผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกับการตรวจโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี (Robert-Pillot และคณะ, 2002)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies) เป็นแอนติบอดีที่สร้างจากเซลล์ที่มาจากโคลนเดียวกัน และมีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อแอนติเจนชนิดนั้นสามารถทำปฏิกริยากับแอนติเจนชนิดเดียวกันนี้ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน โดยอาศัยปฏิกริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนี้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) นอกจากนี้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันดังกล่าวยังมีความไวและความแม่นยำสูง อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Sithigomgul และคณะ, 2002) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียต่าง ๆ ในสกุล *Vibrio* นั้น ได้มีรายงานการผลิตต่อ *Vibrio* spp. (Chen และคณะ, 1992a) *V. parahaemolyticus* (Honda และคณะ, 1989) *V. vulnificus* (Parker และ Lewis, 1995) *V. cholerae* (Saha และ Nair, 1997) และ *V. harveyi* (Phianphak และคณะ, 2005) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอล

แอนติบอดีต่อ *V. alginolyticus* ดังนั้นจึงควรที่จะพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. alginolyticus* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจำแนก *Vibrio alginolyticus* จาก *Vibrio* spp. ต่าง ๆ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเบื้องต้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio alginolyticus*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งสามารถจำแนก *Vibrio alginolyticus* จาก *Vibrio* spp. ต่าง ๆ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจ *V. alginolyticus* เบื้องต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กุ้งขาว *Penaeus vannamei*

1.1 ลักษณะโดยทั่วไป

กุ้งขาว *Penaeus vannamei* ลำตัวมีสีขาวยาวมี 8 ปล้อง ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรืออยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัว สันกริสสูง ปลายกริแคบ กริมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กริด้านบนมี 8 ฟัน กริด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกริมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวมีสีขาวยอมชมพูถึงแดง มีขาเดินสีขาวยาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น มีหนวดสีแดง 2 เส้นยาว ตามีสีแดงเข้ม เปลือกตัวมีสีขาวยอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง มีขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวยาวข้างใน ที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบและ 1 กริหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งสายพันธุ์นี้มีขนาดที่เล็กกว่ากุ้งกุลาดำ โดยมีความยาวจากกริหัวถึงปลายกริหาง 230 มิลลิเมตร หากินทุกระดับความลึกของน้ำ เคลื่อนไหวเร็ว ลอกคราบเร็วทุก ๆ สัปดาห์ ไม่หมกตัวตามผิวน้ำดิน (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545)

1.2 วงจรชีวิต

ในธรรมชาติ กุ้งแม่พันธุ์จะมีอายุประมาณเกือบ 36 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 เมตรใกล้พื้นทราย ปกติแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000-250,000 ฟอง ส่วนแม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะวางไข่ประมาณไม่เกิน 100,000 ฟอง โดยจะวางไข่ในตอนกลางคืนบนพื้น แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มออกไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้า ๆ ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีลักษณะกลม มีเมือกห่อหุ้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร ปกติไข่กุ้งจะฟักเป็นตัวในบริเวณที่วางไข่ จากนั้นลูกกุ้งวัยอ่อนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่งในย่านน้ำกร่อย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวเองอยู่บริเวณนี้จนโตถึงขั้นพ่อแม่พันธุ์จึงค่อยอพยพสู่ทะเลลึกเพื่อทำการสืบพันธุ์และวางไข่ต่อไป (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545)



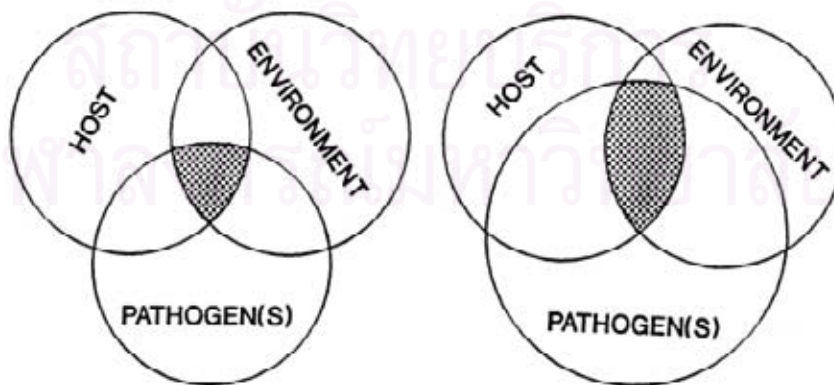
รูปที่ 2.1 กุ้งขาว *Penaeus vannamei*

1.3 การเพาะเลี้ยง

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งระบบธรรมชาติ และระบบกึ่งหนาแน่น ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะนิสัยภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้เช่น สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็มที่ 5-35 ส่วนในพันส่วน และระดับความเค็มต่ำ 0-5 ส่วน แต่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ส่วนในพันส่วน ส่วนอุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 26-29 องศาเซลเซียส แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมีค่า 4-9 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับค่าความเป็นกรดและด่างควรอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง หรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ กุ้งชนิดนี้ชอบน้ำกระด้างที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งชนิดนี้เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่นสหรัฐอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิการากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ เปรู กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทานจึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้างไกล ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกถึงเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้ที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตรหรือ 235 ฟุต มีพื้นที่ท้องทะเลเป็นเหมือนโคลนที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ประเทศเอกวาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งพ่อ-แม่พันธุ์ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545)

2. โรคในกุ้ง

โรคที่เกิดกับกุ้ง เป็นผลของความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรค ดังแสดงในภาพที่ 2.2 จากภาพเมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิพลเพิ่มมากขึ้น เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค การปรากฏของเชื้อก่อโรคหลาย ๆ ชนิด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง หรือภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสม ก็จะส่งผลทำให้การก่อเกิดหรือความรุนแรงของโรค (แสดงในบริเวณที่ซ้อนทับกัน) ขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Snieszko, 1973)



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างกุ้ง (host) สภาพแวดล้อม (environment) และเชื้อก่อโรค (pathogen(s)) กกับการเกิดโรคในกุ้ง (Snieszko, 1973)

โรคส่วนใหญ่ที่เกิดกับกุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ (1) โรคไม่ติดเชื้อ และ (2) โรคติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (Bachere, 2000) ส่วนโรคติดเชื้อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner และ Redman, 1998) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel และคณะ, 1992) เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้แก่ (1) ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus; YHV) (2) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) (3) ไวรัสเฮปาทิก (Hepatopancreatic parvo virus; HPV) (4) ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon baculovirus; MBV) (5) ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) และ (6) ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (Infectious hypodermal haematopoietic necrosis virus; IHHNV) (Loh และคณะ, 1997) นอกจากนี้เชื้อไวรัสแล้ว แบคทีเรียก็เป็นอีกหนึ่งในเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่ทำให้กุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยงเกิดการตาย โดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบ่อเลี้ยงกุ้งมักจะประพศิตัวเป็นจุลินทรีย์ฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) ซึ่งเข้าทำลายกุ้งในยามที่ภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือกุ้งอยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอ แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ถูกรับว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคนั้นคือแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ซึ่งทำให้เกิดโรค *Vibrio* ไซส (Anderson, 1988)

3. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเซียเป็นระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิด มีความสำคัญเกี่ยวข้องโดยตรงกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำหน้าที่ในการกำจัดจุลินทรีย์แปลกปลอมโดยการกลืนทำลาย (phagocytosis) การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และหน้าที่ในการย่อยสลายเซลล์แปลกปลอม (Johansson และ Soderhall, 1989) เม็ดเลือดของครัสตาเซียแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ และแกรนูลาร์เซลล์ (Johansson และคณะ, 2000) เซลล์เม็ดเลือดเหล่านี้ไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องับกระบวนการกลืนทำลายเท่านั้นแต่ยังเกี่ยวข้องกับการผลิตเม็ดสีเมลานินโดยระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase; proPO) อีกด้วย (Soderhall และ Cerenius, 1998) ระบบโพรฟีนอลออกซิเดสเป็นระบบซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน ระบบนี้ถูกกระตุ้นด้วยสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) หรือเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) จากแบคทีเรีย และเบต้า-1,3-กลูแคน (β -1,3-glucan) จากเชื้อรา ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นแล้วเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดสจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอสในรูปที่ทำงานได้ (active serine proteases) ให้เป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสนี้จะไปเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของโมโนฟีนอลให้กลายเป็นโอ-ไดฟีนอลหลังจากนั้นก็เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโอ-ไดฟีนอลกลายเป็นโอ-ควิโนนโดยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หลังจากนั้นโอ-ควิโนนจะเกิดการเรียงตัวใหม่กลายเป็นโดพาโครมเกาะตัวรวมกันเป็นเม็ดสีเมลานิน (Sritunyalucksana, 1999) เม็ดสีเมลานินที่เกิดขึ้นนี้สามารถสังเกตเห็นได้เป็นจุดสีดำ

ลักษณะคล้ายเส้นแตรอยู่ตามกล้ามเนื้อของกุ้ง ซึ่งมักจะพบได้ในกรณีที่เกิดการติดเชื้อ *Vibrio* spp. (ชลอ ลิม สุวรรณ, 2543)

หน้าที่ที่สำคัญของเม็ดเลือดที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันอีกประการหนึ่งคือการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่ร่างกายโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมมาเกาะบนผิวของเซลล์เม็ดเลือด เซลล์เม็ดเลือดจะทำการยื่นไซโทพลาสซึมเข้าไปล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมนั้น ซึ่งทำให้เซลล์เม็ดเลือดมีการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้น (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวส์เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ NADPH oxidase จากนั้น O_2^- จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยเอนไซม์ superoxide dismutase ซึ่ง O_2^- และ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นนี้มีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกกลืนทำลายโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (Klein, 1982; Pick และ Keisari, 1980)

4. วับริโอซิส

วับริโอซิส (Vibriosis) เป็นโรคติดเชื้อซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียสกุลวับริโอ แบคทีเรียสกุลวับริโอ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือแท่งโค้ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา เจริญได้ทั้งในที่ ๆ มีอากาศและไม่มีอากาศ (Baumann และคณะ, 1984) พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำโดยเฉพาะในน้ำทะเล (Colwell, 1984) และเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคนิปลา หอย และกุ้งในสกุลพีนีส (Austin และ Austin, 1987; de la Pena และคณะ, 1993; Muroga, 1995) ได้มีรายงานถึงการตรวจพบแบคทีเรียในสกุลวับริโอต่าง ๆ จากกุ้งที่เป็นโรคนี *Vibrio harveyi* (Liu และคณะ, 1996) *V. vulnificus* (Song และคณะ, 1990) *V. damsela* (Song และคณะ, 1993) *V. splendidus* (Lavilla-Pitogo และคณะ, 1990) *V. anguillarum* (Lightner, 1988) ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งที่เป็นโรคนีคือกุ้งจะมีอาการอ่อนแอ เกิดการอักเสบเป็นลักษณะเนื้อตายตามอวัยวะต่าง ๆ เหงือกอักเสบ ตับอักเสบ ระวังค้ำกักขาด พบจุดดำตามบริเวณเปลือก ติดเชื้อในกระแสเลือด และตายในที่สุด (Chen และคณะ, 1992b; Lightner, 1996) แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ก็เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควับริโอซิส (Lee และคณะ, 1996a) โดยพบว่ากุ้งที่เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* จะมีลักษณะอาการคือ อ่อนแอ กินอาหารได้น้อยลง ว่ายน้ำไม่มีทิศทาง ลำตัวมีสีแดง กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น ตับถูกทำลาย (Esteve และ Herrera, 2000)

5. *Vibrio alginolyticus*

5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, สรีรวิทยา และชีวเคมี

แบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในที่ ๆ มีอากาศและไม่มีอากาศ ให้โคโลนีที่มีลักษณะสีเหลืองเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Lee และคณะ, 1996a) สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลบวกกับการทดสอบคาตาเลส (catalase) การออกซิโดสและการหมัก (oxidation-fermentation) การสร้างเอนไซม์คีคาร์บอกซิเลสในการย่อยสลายไลซีน (lysine decarboxylase) การทดสอบย่อยสลายเจลาติน และการทดสอบออกซิเดส (cytochrome oxidase) (Liu และคณะ, 2004a)

มีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้แก่ chloramphenical, ciprofloxacin, doxycyclin hydrochloride, nalidixic acid, oxolinic acid และ oxytetracyclin แต่คือต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, novobiocin, penicillin G, sulfisoxazol และ sulfonamide (Lee และคณะ, 1996b) *V. alginolyticus* สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แหล่งพื้นที่ ๆ มีการเพาะเลี้ยงกุ้ง และตามอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้ง

Sung และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียในสกุลวิบริโอ ที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและในตับของกุ้งที่มีสุขภาพดีและกุ้งที่เป็นโรคพบว่า ในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรควิบริโอชนิดอื่นนั้นความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในสกุลวิบริโอที่มีอยู่ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีความหลากหลายลดลง และตรวจพบ *V. harveyi* หรือ *V. carchariae* เป็นปริมาณสูงในตับของกุ้งที่เป็นโรค นอกจากนี้ยังตรวจพบแบคทีเรียวิบริโอชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. damsela* ในปริมาณรองลงมา

Gopal และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษากการมีอยู่ของแบคทีเรียวิบริโอชนิดต่าง ๆ ในน้ำ, ตะกอน, และในตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในฝั่งตะวันออกและตะวันตกของประเทศอินเดียพบว่า ฟาร์มเลี้ยงกุ้งในฝั่งตะวันตกมีแบคทีเรียวิบริโออยู่ในปริมาณ 10^4 CFU/มล. ซึ่งสูงกว่าฟาร์มเลี้ยงกุ้งในฝั่งตะวันออกซึ่งปริมาณแบคทีเรียอยู่ที่ 10^2 CFU/มล. และตรวจพบแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในปริมาณ 3-19%, *V. parahaemolyticus* 2-13%, *V. harveyi* 1-7% และ *V. vulnificus* ในปริมาณ 1-4% ของปริมาณแบคทีเรียที่พบทั้งหมด

ได้มีรายงานถึงการตรวจพบแบคทีเรีย *V. alginolyticus* จากกุ้งที่เป็นโรคในประเทศต่าง ๆ ดังนี้

Lee และคณะ (1996a) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากตับของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus japonicus*) ที่เกิดการตายในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรคจุดขาวในปี 1993 ในประเทศไต้หวัน และนำไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นคือ *V. alginolyticus* แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่แยกได้นี้สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งในกุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาดำโดยมีค่า LD_{50} ที่ 4.43×10^4 และ 1.57×10^5 CFU/น้ำหนักตัวกุ้ง 1 กรัม ตามลำดับ

Lee และคณะ (1996b) ได้รายงานถึงการแพร่ระบาดของโรคจุดขาวในกุ้งกุลาดำที่ทำการเพาะเลี้ยงในประเทศไต้หวันในปี 1994 ซึ่งเมื่อนำกุ้งที่ตายไปทำการแยกเชื้อแบคทีเรียพบว่า สามารถแยกแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้จากเลือดของกุ้งที่เกิดการตายนั้น แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่แยกได้นี้สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งในกุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาดำโดยมีค่า LD_{50} ที่ 1.13×10^5 และ 2.46×10^5 CFU/น้ำหนักตัวกุ้ง 1 กรัม ตามลำดับ และโปรตีนนอกเซลล์ที่สร้างจาก *V. alginolyticus* นี้ยังสามารถทำให้กุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาดำเกิดการตายได้เช่นเดียวกัน

Selvin และ Lipton (2003) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากกุ้งกุลาดำที่เกิดการตายในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรคจุดขาวในประเทศอินเดีย และจากการพิสูจน์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้นั้นคือ *V. alginolyticus*

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. alginolyticus* (Sakazaki และ Balows, 1981)

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>V. alginolyticus</i>
Arginine hydrolase	-
Luminescence	-
Gas from D-glucose	-
Production of acetoin and / or diacetyl	+
Growth at 4 °C	-
Growth at 35 °C	+
Growth at 40 °C	+
Amylase	+
Lipase	+
Gelatinase	+
Alginase	-
D-Xylose	-
L-Arabinose	-
D-Galactose	5
Sucrose	+
Maltose	+
Cellobiose	1
D-Gluconate	+
D-Glucuronate	-
Acetate	+
Propionate	+
Butyrate	+
Heptanoate	29
Polorgonate	+
DL-Lactate	+
α -ketoglutarate	+
Sorbitol	-
Inositol	-
Ethanol	17
<i>p</i> -Hydroxybenzoate	-
Glycine	29
D- α -Alanine	+
L-serine	+
L-Leucine	+
L-Glutamate	+
L-Arginine	30
L-Citrullin	-
γ -Aminobutyrate	-
δ -Aminovalerate	-
L-Proline	+
Putrescine	26
Sarcosine	-

+ = เกิดปฏิกิริยา, - = ไม่เกิดปฏิกิริยา

ตัวเลขแสดงถึงจำนวนสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบจากทั้งหมด 31 สายพันธุ์

แบคทีเรีย *V. alginolyticus* และแบคทีเรียอื่นในสกุลวิบริโอถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสซึ่งทำให้กุ้งเกิดการตายเมื่ออยู่ในภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีปัจจัยหลายประการด้วยกันที่ส่งผลให้สภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้ง ซึ่งได้มีผู้ที่ทำการศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันไว้ดังนี้

Yeh และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลของคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความไวต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ของกุ้งขาว โดยการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* เข้าสู่กุ้งในปริมาณ 3×10^5 CFU/กุ้ง 1 ตัว จากนั้นจึงได้นำกุ้งไปเลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 0 (กลุ่มควบคุม), 1, 5, 10 และ 20 มก./ลิตร พบว่าในช่วงเวลา 24-96 ชั่วโมง กุ้งที่นำไปเลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 5, 10 และ 20 มก./ลิตร เกิดการตายสูงกว่ากุ้งที่นำไปเลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่ 0 และ 1 มก./ลิตร นอกจากนี้ยังได้ทำการวัดค่าดัชนีชี้วัดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอันได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count; THC), แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, ค่าการปล่อย superoxide anion, แอคติวิตีของกระบวนการฟาโกไซโทซิส และประสิทธิภาพในการกำจัด *V. alginolyticus* ของกุ้งในทุกกลุ่มการทดลอง พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงค่าดัชนีชี้วัดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Cu^{2+} 1, 5, 10 และ 20 มก./ลิตร มีค่าลดลง และค่าการปล่อย superoxide anion ของกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Cu^{2+} 20 มก./ลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ว่าในน้ำที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Cu^{2+} สูงกว่า 1 มก./ลิตร จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวลดลงและทำให้กุ้งมีความไวต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* เพิ่มมากขึ้น

Tseng และ Chen (2004) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวและความไวต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ภายใต้ภาวะที่มีไนโตรเจนอยู่ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยได้ทำการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* เข้าสู่กุ้งในปริมาณ 1×10^6 CFU/กุ้ง 1 ตัว และนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีไนโตรเจนในปริมาณ 0 (กลุ่มควบคุม), 1.12, 5.15, 11.06 และ 21.40 มก./ลิตร พบว่าในช่วงเวลา 48-168 ชั่วโมง กุ้งที่นำไปเลี้ยงในบ่อที่มีไนโตรเจนในปริมาณ 5.15, 11.06 และ 21.40 มก./ลิตร เกิดการตายสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม และได้ทำการวัดค่าปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (THC), แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และการปล่อย superoxide anion ที่เวลา 0, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง พบว่าค่า THC และแอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าลดลงเมื่อมีปริมาณของไนโตรเจนที่ 4.94, 9.87 และ 19.99 มก./ลิตร และที่เวลา 96 ชั่วโมงค่าการปล่อย superoxide anion ของกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณไนโตรเจน 9.87 และ 19.99 มก./ลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถชี้บ่งได้ว่าไนโตรเจนที่มีอยู่ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นสาเหตุให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวอ่อนแอลง ซึ่งทำให้ไวต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* รวมไปถึงการปล่อย superoxide anion ที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้เป็นพิษต่อกุ้ง

Liu และ Chen (2004a) ได้ทำการศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวและความไวต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ของกุ้งขาวโดยทำการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ปริมาณ 1×10^6 CFU เข้าสู่กุ้ง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 0.01 (กลุ่มควบคุม), 1.10, 5.24, 11.10 และ 21.60

มก./ลิตร พบว่าในช่วงเวลา 48-168 ชั่วโมง กุ้งที่นำไปเลี้ยงในน้ำที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 5.24, 11.10 และ 21.60 มก./ลิตร เกิดการตายสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม และได้ทำการวัดปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (THC), แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, การปล่อย superoxide anion, แอคติวิตีของเอนไซม์ superoxide dismutase, แอคติวิตีของกระบวนการฟาโกไซโทซิส และประสิทธิภาพในการกำจัด *V. alginolyticus* ของกุ้งทดลองในกลุ่มต่าง ๆ ที่เวลา 168 ชั่วโมง พบว่า กุ้งทดลองทุกกลุ่มมีปริมาณเม็ดเลือดทั้งแกรนูลาร์เซลล์ และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ ไม่แตกต่างกัน แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 5.24, 11.10 และ 21.60 มก./ลิตร มีค่าลดลง การปล่อย superoxide anion ของกุ้งนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 21.60 มก./ลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ superoxide dismutase มีค่าลดลง และกุ้งที่นำไปเลี้ยงในน้ำที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 11.21 และ 21.22 มก./ลิตร เป็นเวลา 168 ชั่วโมงมีการลดลงของแอคติวิตีของกระบวนการฟาโกไซโทซิสและประสิทธิภาพในการกำจัด *V. alginolyticus* อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า แอมโมเนียที่มีอยู่ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นสาเหตุให้กุ้งมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่ลดลงและเกิดการตายจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* เพิ่มขึ้น

ในปี 2005 Wang และ Chen ได้ทำการศึกษาผลของความเค็มของน้ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความไวต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ของกุ้งขาวโดยทำการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* เข้าสู่กุ้งปริมาณ 1×10^6 CFU/กุ้ง 1 ตัว และนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5, 15, 25 (กลุ่มควบคุม) และ 35‰ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5 และ 15‰ เกิดการตายสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 25 และ 35‰ โดยกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5‰ เกิดการตายสูงสุด และได้ทำการวัดค่าปริมาณเม็ดเลือด, แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, การปล่อย superoxide anion, แอคติวิตีของเอนไซม์ superoxide dismutase, กิจกรรมฟาโกไซโทซิส และประสิทธิภาพในการกำจัด *V. alginolyticus* ของกุ้งที่ย้ายไปเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5, 15, 25 (กลุ่มควบคุม) และ 35‰ พบว่าค่าดังกล่าวมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำกุ้งไปเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5 และ 15‰ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถสรุปได้ว่าเมื่อย้ายกุ้งจากน้ำที่มีความเค็ม 25‰ ไปเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มต่ำกว่า (5 และ 15‰) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอ่อนแอและความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ลดลง

Cheng และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิของน้ำต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ *V. alginolyticus* ของกุ้งขาวโดยทำการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* เข้าสู่กุ้งที่เลี้ยงอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิ 27 หรือ 28 องศาเซลเซียสในปริมาณ 1×10^4 CFU/กุ้ง 1 ตัว แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 20-34 องศาเซลเซียสพบว่า กุ้งที่นำไปเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 34 หรือ 32 องศาเซลเซียสเกิดการตายสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และได้ทำการวัดค่าตัวแปรทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ของกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสแล้วย้ายไปเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 20-34 องศาเซลเซียสพบว่า มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของแอคติวิตีของกระบวนการฟาโกไซโทซิสและประสิทธิภาพในการกำจัด *V. alginolyticus* ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากย้ายกุ้งไปเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส จึงสามารถสรุปได้ว่าการย้ายกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 27 หรือ 28 องศาเซลเซียสไปเลี้ยง

ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่า (32 และ 34 องศาเซลเซียส) ทำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ลดลง

แบคทีเรีย *V. alginolyticus* นี้ นอกจากจะทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งได้แล้วยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์น้ำประเภทอื่นได้ด้วยเช่นกัน

Liu และคณะ (2004c) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากปลา *Rachycentron canadum* L. ที่ทำการเพาะเลี้ยงในประเทศไต้หวันซึ่งเกิดการตาย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้จากส่วนหัว, ไต และน้ำในบริเวณช่องท้องของปลาเป็นจำนวน 15 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีปรากฏว่าแบคทีเรียทั้ง 15 สายพันธุ์นั้นคือ *V. alginolyticus* และเมื่อนำแบคทีเรียตัวแทนจากทั้ง 15 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการก่อโรคในปลา พบว่ามีค่า LD_{50} ที่ 3.28×10^4 CFU/น้ำหนักตัวปลา 1 กรัม และปลาที่เกิดการตายทั้งหมดนั้นปรากฏลักษณะอาการคือ เชื่องซึม, ผิวหนังมีสีคล้ำลง และพบของเหลวสะสม (ascite) อยู่ภายในบริเวณช่องท้อง เช่นเดียวกับปลาที่เกิดการตายในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรค จึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *V. alginolyticus* เป็นสาเหตุของโรคไวรัสโรซิดที่เกิดในปลา *Rachycentron canadum* L. นี้

Sangster และ Smolowitz (2003) ได้ทำการศึกษาถึงสาเหตุการป่วยและการตายของปลาหมึกที่เพาะเลี้ยงไว้ โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างปลาหมึกที่เกิดการตายจำนวน 53 ตัวอย่าง แล้วทำการคัดแยกเชื้อจาก digestive gland, kidney sac หรือ gonad พบว่าการตายของปลาหมึกนั้นเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *V. alginolyticus* (33 ตัวอย่างจาก 53 ตัวอย่าง) และจากการศึกษาทาง histology ของตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ *V. alginolyticus* นั้นพบว่าเนื้อเยื่อที่มักจะเกิดการติดเชื้อคือ ไต, เหงือก, หัวใจ และระยางค์ และเนื้อเยื่อที่เกิดการติดเชื้อมากที่สุดคืออวัยวะสืบพันธุ์

Liu และคณะ (2001) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากเลือดของหอยเป่าสี (*Haliotis diversicolor supertexta*) ที่ทำการเพาะเลี้ยงในประเทศไต้หวันซึ่งเกิดการตาย จากการพิสูจน์คุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นคือ *V. alginolyticus* และเมื่อนำ *V. alginolyticus* และโปรตีนนอกเซลล์ (extracellular products) ที่สร้างจากแบคทีเรียนี้ไปทดสอบความสามารถในการก่อโรคในหอยเป่าสีพบว่า มีค่า LD_{50} ที่ 3.6×10^5 CFU และ 2.96 ไมโครกรัม โปรตีน/น้ำหนักตัว 1 กรัม ตามลำดับ

นอกจากจะทำให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์น้ำประเภทอื่น ๆ ได้แล้วยังพบว่า *V. alginolyticus* สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้อีกด้วยโดยกว่า 70% พบว่าเป็นการติดเชื้อผ่านทางบาดแผล (Hlady และ Klontz, 1996) นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้โดยผ่านทางรับประทานอาหารทะเลที่เกิดการปนเปื้อน ซึ่งจะทำให้เกิดการอักเสบของกระเพาะอาหารและลำไส้ (gastroenteritis) (Aggarwal และคณะ, 1996) ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* นี้ได้ด้วยเช่นกัน (Janda และคณะ, 1986)

5.2 พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

กลไกในการก่อโรคของ *V. alginolyticus* และแบคทีเรียอื่นในสกุลไวรัสโรซิดนั้นยังไม่มีการศึกษาจนเข้าใจอย่างถ่องแท้ ปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการก่อโรคได้แก่ความสามารถในการยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่

เซลล์เยื่อ (Alam และคณะ, 1996; Miliotis และคณะ, 1995) รวมถึงการสร้างสารพิษ (Chowdhury และคณะ, 1987)

Baffone และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความรุนแรงของแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากน้ำทะเล โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ แอคติวิตีของเอนไซม์ (enzymatic activity) ยูรีเอส ไลเปส เจลาติเนส และ ฮีโมไลซิน และแอคติวิตีทางชีวภาพ (biological activity) ในการยึดเกาะผิวเซลล์ (adhesiveness), ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และความเป็นพิษต่อทางเดินอาหารของหนูทดลอง (enterotoxigenicity) พบว่าจากแบคทีเรียทั้งหมด 52 สายพันธุ์ (*V. alginolyticus* 20 สายพันธุ์, *V. parahaemolyticus* 10 สายพันธุ์, *V. cholera* 5 สายพันธุ์, *V. vulnificus* 5 สายพันธุ์, *V. fluvialis* 5 สายพันธุ์, *V. furnissii* 5 สายพันธุ์ และ *V. metshnikovii* 2 สายพันธุ์) แบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ (คิดเป็น 100%) สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสและเจลาติเนส 19.2% ของแบคทีเรียทั้งหมดสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และเพียง 7.2% ของแบคทีเรียทั้งหมดสามารถสร้างฮีโมไลซินได้ จากการตรวจสอบความสามารถในการยึดเกาะกับผิวเซลล์, ความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารของหนูทดลองพบว่า 63% ของแบคทีเรียทั้งหมดมีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวเซลล์ 57.6% ของแบคทีเรียทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ และ 23% ของแบคทีเรียทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารของหนูทดลอง แบคทีเรียที่ให้ผลบวกกับการทดสอบในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) นี้ถูกพบว่ามีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงมากกว่า 1 ปัจจัยและความรุนแรงที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลจากปัจจัยต่าง ๆ ร่วมกัน

ได้มีผู้ที่ทำการศึกษาดังปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. alginolyticus* ไว้ดังนี้ Balebona และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ *V. alginolyticus* ในปลาน้ำจืด (gilt-head sea bream) พบว่าปริมาณของเชื้อที่ทำให้ปลาเกิดการตายไปครั้งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 5.4×10^4 ถึง 1.0×10^6 CFU/น้ำหนักตัวของปลา 1 กรัม และแบคทีเรียนี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวหนัง, เหงือก, เยื่อเมือก (intestinal mucus) ของปลา และ embryo cell line ของปลาแซลมอน และพบว่าโปรตีนนอกเซลล์ (extracellular protein) ที่สร้างจาก *V. alginolyticus* สามารถย่อยสลายเยื่อเมือกและเนื้อเยื่อของปลาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *V. alginolyticus* มีความเป็นพิษต่อ cell line ของปลา และทำให้ปลาเกิดการตาย

Lee และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาผลของโปรตีนนอกเซลล์ (extracellular product; ECP) แบบหยาบ (crude) และโปรตีนที่สร้างจาก *V. alginolyticus* ซึ่งทำบริสุทธิ์บางส่วนที่มีต่อพลาสมาของกุ้งกุลาดำ และกุ้งกุลาดำ พบว่าโคแอกกูโลเจนที่พบเป็นองค์ประกอบอยู่ในพลาสมาไม่มีปรากฏอยู่หลังจากที่บ่มพลาสมาด้วย ECP ในขณะที่ฮีโมไซยานินมีปริมาณลดลง และเมื่อนำโคแอกกูโลเจนและองค์ประกอบที่ไม่ทราบชนิดที่พบอยู่ในพลาสมาไปบ่มกับโปรตีนที่สร้างจากบริสุทธิ์บางส่วนพบว่าโคแอกกูโลเจนและองค์ประกอบดังกล่าวมีอัตราการเคลื่อนที่ (migration rate) เพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่พบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ต่อฮีโมไซยานิน จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ นั่นอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนนอกเซลล์และเอนไซม์โปรตีนที่ช่วยทำให้ *V. alginolyticus* ก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้

Chen และคณะ (1999) ได้ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะบางส่วนของเซรินโปรตีเอส (serine protease) ที่เป็นพิษซึ่งสร้างโดย *V. alginolyticus* พบว่าเซรินโปรตีเอสนี้ถูกยับยั้งการทำงานโดย phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานมีค่าอยู่ในช่วง 8 ถึง 11 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์แล้วนี้สามารถทำให้กุ้งครุมาเกิดการตายได้โดยมีค่า LD₅₀ ที่ 0.29 มก. โปรตีน/น้ำหนักตัวกุ้ง 1 กรัม และพบว่าเลือดของกุ้งที่เกิดการตายจากการฉีดโปรตีเอสที่เป็นพิษนี้ไม่สามารถแข็งตัวได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโคแอกกูโลเจนที่พบในพลาสมาของกุ้งครุมานั้นมีอัตราการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นหลังจากที่นำไปบ่มกับเซรินโปรตีเอส และสีของพลาสมาเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีชมพู การเติม PMSF สามารถยับยั้งความเป็นพิษของโปรตีเอสนี้ได้อย่างสมบูรณ์ จึงสามารถสรุปได้ว่าเซรินโปรตีเอสนี้เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดการตายที่สร้างโดย *V. alginolyticus*

5.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *V. alginolyticus*

ได้มีการพัฒนาวิธีที่ใช้ในการตรวจหา *V. alginolyticus* ขึ้นมาหลายวิธี ได้แก่ วิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional method) ซึ่งใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์จำแนก และพิสูจน์ทราบชนิด (Kourany, 1983; Alsina และ Blanch, 1994) โดยทั่วไปการตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ช้า และใช้ระยะเวลาในการตรวจ จึงทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้ช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ให้ผลการตรวจที่ไม่แน่นอน (Hara และคณะ, 2003) ส่วนวิธีทางโมเลกุล (Molecular method) โดยการใช้เทคนิค PCR (Sudheesh และคณะ, 2002; Pinto และคณะ, 2005; Goarant และคณะ, 1999) มีข้อดีคือ ใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นาน แต่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง เนื่องจาก *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* นั้นเป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันมาก (Sakazaki และ Balows, 1981) จึงทำให้ในบางกรณีเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะให้ผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกับการตรวจโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี (Robert-Pillot และคณะ, 2002)

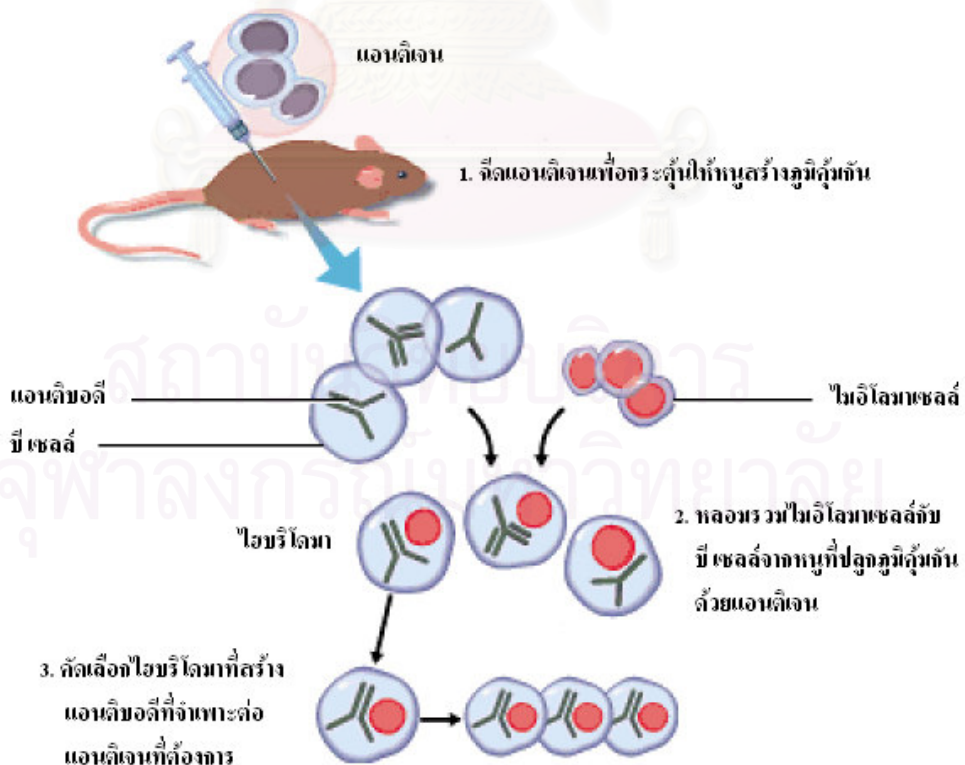
6. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น (สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, 2537)

เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่าง ๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลาย

ชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ในปี ค.ศ. 1975 Kohler และ Milestein สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้เป็นผลสำเร็จ โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือบี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่ไม่สามารถมีชีวิตยาวนานในภาวะ *in vitro* และไมอีโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ตลอดในภาวะ *in vitro* ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตในภาวะ *in vitro* ได้ไม่สิ้นสุด เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 หลักการผลิต โมโน โคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

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

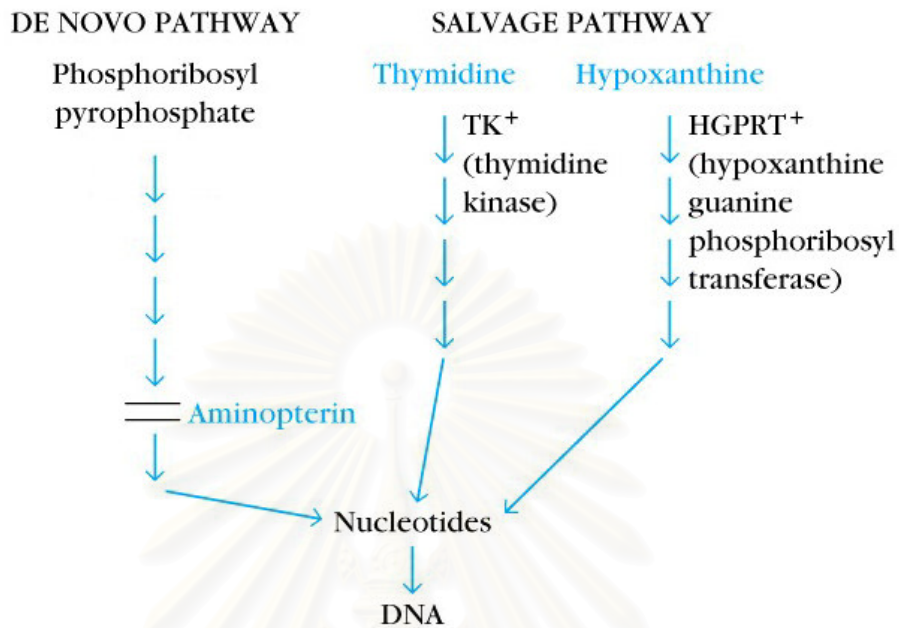
การหลอมรวมไมอิลอมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการใส่พอลิเอทิลีนไกลคอล ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่ การใช้ไมอิลอมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอิลอมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอิลอมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การคัดเลือกของ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 วิธีคือ วิธี de novo และวิธี salvage ในกรณีของวิธี de novo (รูปที่ 2.4) จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อวิธี de novo ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้วิธี salvage โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA แทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถี salvage นั้นได้แก่ เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยวิถี salvage ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวางวิถี de novo ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้วิถี salvage ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้วิถี salvage ในการสังเคราะห์ DNA ได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมอิลอมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT (HGPRT⁻) และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้า และไมอิลอมาเพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น

เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่าง ๆ เช่น Dot-blot, Western blot, Immunohistochemistry และอื่น ๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้น

กำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดี่ยวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธีกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์ DNA โดยวิธี de novo และ วิธี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิธี de novo (ที่มา: <http://immuneweb.xxmc.edu.cn/images/figure04-21.jpg>)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้านได้แก่ (1) ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (2) ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการรักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธีกรกุล, 2548)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ได้มีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอลต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรีย	แอนติเจนที่ใช้	วิธีที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas hydrophila</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB, IFA	Faude and Höfle, 1997
<i>Bacillus cereus</i>	vegetative cells	ELISA, WB	Charni et al., 2000
<i>Campylobacter jejuni</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Lu et al., 1997
<i>Escherichia coli</i>	แฟลกเจลลา	ELISA, WB	He et al., 1996
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>piscicida</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB, IHC	Jung et al., 2001
<i>Vibrio</i> spp.	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Chen et al., 1992
<i>Vibrio cholerae</i>	heat stable enterotoxin	ELISA, amino acid sequence	Takeda et al., 1990
<i>Vibrio vulnificus</i>	hemolysin	ELISA, WB	Parker and Lewis, 1991
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	thermostable direct hemolysin	ELISA	Honda et al., 1989
<i>Vibrio harveyi</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Phianphak et al., 2005

IHC= Immunohistochemistry, IFA= Immunofluorescence assay, WB= Western blot,

ELISA= Enzyme-linked immunosorbent assay

บทที่ 3

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus* 14800

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

แบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 14800 ที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีครั้งนี้ ได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 มาเลี้ยงชนิดโดยการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปทดสอบทางชีวเคมีพื้นฐานโดยใช้ชุดตรวจ API จากนั้นนำไปเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติกชอยที่เติมกลีเซอรอล 20% เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* และแบคทีเรียอื่นในสกุล *Vibrio* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกชอยซึ่งเติม NaCl เข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติกชอยที่ไม่ได้เติม NaCl เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2 และทำการปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเติม PBS จะได้สารแขวนลอยเซลล์ นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางสารแขวนลอยเซลล์ด้วย PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 4×10^8 CFU/มล.

1.2 การเตรียมแอนติเจน

นำแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 14800 ที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 1.1 มาทำให้ตายด้วยความร้อน (heat-killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการแบ่ง *V. alginolyticus* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนแล้วเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำมาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (แอนติเจนในรูปแบบ heat-killed) อีกส่วนหนึ่งนำมาทำให้เสียสภาพ (denature) โดยการเติม SDS และ mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (แอนติเจนในรูปแบบเสียสภาพ) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไป dialysis เพื่อนำไปใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว (Phianphak และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา
<i>Vibrio alginolyticus</i> 14800	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
<i>Vibrio alginolyticus</i> Y16 <i>Vibrio alginolyticus</i> BY2	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
<i>V. parahaemolyticus</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>V. harveyi</i> 639	
<i>V. fluvialis</i>	
<i>V. cholera</i>	
<i>V. vulnificus</i>	
<i>V. penaeicida</i>	
<i>V. mimicus</i> 15142	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
<i>Aeromonas sobria</i> 12446	
<i>Aeromonas hydrophila</i> 1234	ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Aeromonas caviae</i> 13016	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
<i>Enterobacter cloacae</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Morganella morganii</i>	
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Salmonella</i> Typhi	
<i>Shigella flexneri</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
<i>Salmonella</i> Enteritidis 7108	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 1408	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	

1.3 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

นำแอนติเจนที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 1.2 มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จำนวน 4 ตัว ฉีดกระตุ้น 3 ครั้งด้วยแอนติเจนทั้งในรูปแบบ heat-killed และในรูปแบบเสียสภาพผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 ทำการเก็บซีรัม แล้วนำไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *V. alginolyticus* 14800 โดยวิธี Western blot เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาทำการฉีดด้วยแบคทีเรียในรูปแบบสภาพผสมกับแบคทีเรียในรูปแบบเสียสภาพในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ลูกผสม 3 วัน (Phianphak และคณะ, 2005)

2. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดัดแปลงจากวิธีการซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein (1975; 1976) และ Mosmann และคณะ (1979) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. alginolyticus* 14800 ที่ตอบสนองดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลเข้มข้น 40% กระจายเซลล์ออกเลี้ยงใน 96 wells microculture plate จำนวน 30 เพลต ทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 14800 โดยวิธี Dot blot, Western blot และ Immunohistochemistry ตามวิธีการที่อธิบายในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี Dot blot

นำ *V. alginolyticus* 14800 เข้มข้น 10^8 CFU/มล. ทั้งในรูปแบบ heat-killed และในรูปแบบที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วย SDS และ mercaptoethanol มาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แชนในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย diaminobenzidine (DAB) 0.03%, hydrogen peroxide 0.006%, cobalt chloride 0.05% ละลายใน PBS (Phianphak และคณะ, 2005) เลือกไฮบริโดมาโคลนที่ให้ผลบวกต่อ *V. alginolyticus* 14800 แล้วนำไปคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2

3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2

3.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Western blot

นำ *V. alginolyticus* 14800 มาแยกบน 15% SDS-PAGE โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างส่วนหนึ่งในเจลมาเชื่อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus (BioRad) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto ตัดแบ่งแล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี Dot blot แล้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย diaminobenzidine (DAB) 0.03%, hydrogen peroxide 0.006%, cobalt chloride 0.05% ละลายใน PBS (Phianphak และคณะ, 2005) ตรวจสอบแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

3.2.2 การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

นำ *V. alginolyticus* และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 มาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี Dot blot แล้วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย diaminobenzidine (DAB) 0.03%, hydrogen peroxide 0.006%, cobalt chloride 0.05% ละลายใน PBS (Phianphak และคณะ, 2005) เลือกลีไฮบริโดมาโคลนที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ หรือแสดงปฏิกิริยากับข้ามแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก

3.2.2 การคัดเลือกโดยวิธี Immunohistochemistry

นำกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 15 กรัมมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร ด้วยน้ำซึ่งมีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน จืด *V. alginolyticus* เข้มข้น 10^8 CFU/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ตัว เข้าตรงบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 เก็บตัวอย่างส่วนหัวของกุ้งที่ตายแช่ลงในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และไซลีน นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่องไมโครโทมให้ได้ความหนา 8 ไมครอน ตัดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน จากนั้นล้างพาราฟินออกด้วยไซลีน และนำน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ตรงเนื้อเยื่อด้วยฟอर्मาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วย PBS และ block ด้วย P_1^+ (calf bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง เติม horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,000 ใน P_1^+ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย diaminobenzidine (DAB) 0.03%, hydrogen peroxide 0.006% ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมด้วยสลิโอโอซิน แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Phianphak และคณะ, 2005) เนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

นำเซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 มา reclone โดยวิธี limiting dilution (Eshhar, 1985) ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์และนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการ reclone เซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือก และยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 และตรวจสอบขนาดของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 เรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA ตรวจสอบชนิดของ heavy chain และ light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหา *V. alginolyticus* ด้วยวิธี Dot blot ตามวิธีการที่อธิบายไว้ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบอิมูโนโกลบูลินของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึง *V. alginolyticus* 14800 เข้มข้น 4×10^6 CFU/มล. ซึ่งถูกทำให้เสียสภาพโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ลงที่ก้นหลุมของถาด 96 หลุม (ELISA microtiter plate) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ที่ไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วย สารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เสร็จแล้วเติมสารละลาย blotto เข้มข้น 5% ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย blotto เข้มข้น 5%) ลงในหลุมต่าง ๆ ของถาด 96 หลุม (ตารางที่ 3.2) ที่ไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1:1500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตซึ่งประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มก./มล., H_2O_2 0.006% ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่ไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ที่ไว้เป็นเวลา 5 นาที บันทึกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

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

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. alginolyticus* โดยวิธี Dot blot

นำ *V. alginolyticus* 14800 เข้มข้น 4×10^8 CFU/มล. มาทำเจือจางแบบ serial dilution ด้วย PBS แล้วนำไปหยดลงบนมาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แฉในสารละลาย 5% blotto นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละไฮบริโดมาโคลนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 5%

ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. alginolyticus* 14800, Y16 และ BY2

เมื่อได้นำ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการจืดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS แล้วสังเกตลักษณะการเจริญ ลักษณะของโคโลนี และการติดสีย้อมแกรม พบว่า *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งโค้ง ให้ลักษณะโคโลนีที่มีสีขาวครีมเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และสีเหลืองเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E (BioMerieux, France) ให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.4

2. ความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

หลังจากทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 ได้ทำการเก็บแอนติซีรั่มจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวแล้วนำมาทดสอบความจำเพาะกับ *Vibrio alginolyticus* 14800 โดยวิธี Western blot พบว่าแอนติซีรั่มจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวสามารถจับกับแถบโปรตีนของ *V. alginolyticus* 14800 ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งหนูขาวตัวที่ 1 ให้การตอบสนองดีที่สุด โดยพบแถบโปรตีนเป็นจำนวนมากและชัดเจนกว่าหนูขาวตัวอื่น ๆ (รูปที่ 3.1) ดังนั้นจึงได้นำหนูขาวตัวที่ 1 นี้มาทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

3. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกพบว่ามี microculture well ประมาณ 170 หลุม จากประมาณ 2,800 หลุม ให้ผลบวกกับคัดเลือกในขั้นแรกโดยวิธี Dot blot และในแต่ละหลุมของ microculture well นั้นมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blot, Immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่ามีไฮบริโดมาโคลนจำนวน 10 โคลนซึ่งสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก โดยสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 6 กลุ่มตามความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 3.6

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ประกอบแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน แอนติบอดีเหล่านี้มีความจำเพาะกับ *V. alginolyticus* 14800 แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. alginolyticus* อื่นอีก 2 สายพันธุ์ (Y16 และ BY2) และแบคทีเรียอื่นซึ่งใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 3.2) โมโนโคลนอล

แอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่างประมาณ 10 ถึง 25 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.3)

โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลนซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์แต่ไม่จำเพาะกับแบคทีเรียอื่นซึ่งใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 3.2) โมนโคลอนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้จับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 และ 20 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.3)

โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลนซึ่งจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบเช่นเดียวกันกับโมนโคลอนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 ถึงอย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาของโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่จับกับ *V. alginolyticus* BY2 อ่อนกว่าปฏิกิริยาที่จับกับ *V. alginolyticus* 14800 และ Y16 (รูปที่ 3.2) โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.3) โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (รูปที่ 3.4)

โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลนซึ่งจับกับ *V. alginolyticus* 14800 และแสดงปฏิกิริยาข้ามอย่างอ่อนกับ *V. harveyi* (รูปที่ 3.2) แอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่จับกับแถบโปรตีนใด ๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blot

โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลนซึ่งจับกับ *V. alginolyticus* ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ และแบคทีเรียอื่นในสกุล *Vibrio* หลายชนิดได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* (รูปที่ 3.2) โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จำเพาะกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.3)

โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลนซึ่งจำเพาะกับ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแบคทีเรียอื่นในสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. cholera* และ *V. vulnificus* และแบคทีเรีย *Plesiomonas shigelloides* (รูปที่ 3.2) โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 และ 20 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.3) โมนโคลอนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 นี้ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

5. การตรวจสอบอิมูโนโพรตีนของแอนติเจนที่จับโดยโมนโคลอนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิมูโนโพรตีนของแอนติเจนที่จับโดยโมนโคลอนอลแอนติบอดีพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 (VAL83 และ VAL13) และกลุ่มที่ 2 (VAL165, VAL40 และ VAL59) ซึ่งนำแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) ไม่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งไม่ได้

แอนติบอดีอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (ตารางที่ 3.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันนี้นั้นจับกับอพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 (VAL176, VAL98 และ VAL62) นั้นเมื่อเทียบในระหว่างกลุ่มเดียวกันแล้วพบว่าแอนติบอดีโคลน VAL176 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าแอนติบอดีโคลน VAL98 และ VAL62 และเมื่อนำแอนติบอดีโคลน VAL176 มาผสมรวมกับแอนติบอดีโคลน VAL98 หรือ VAL62 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 3.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีโคลน VAL176 นี้จับกับอพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างจากการจับโดยแอนติบอดีโคลน VAL98 และ VAL62

5. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 กลุ่มที่ผลิตได้มี class และ subclass เป็น IgG_{2a} และ IgG_{2b} ดังแสดงในตารางที่ 3.6

6. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. alginolyticus* โดยวิธี Dot blot

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหา *V. alginolyticus* โดยวิธี Dot blot ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10^6 ถึง 10^7 CFU/มล. ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 มีความไวในการตรวจหา *V. alginolyticus* สูงที่สุด (ตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.5)

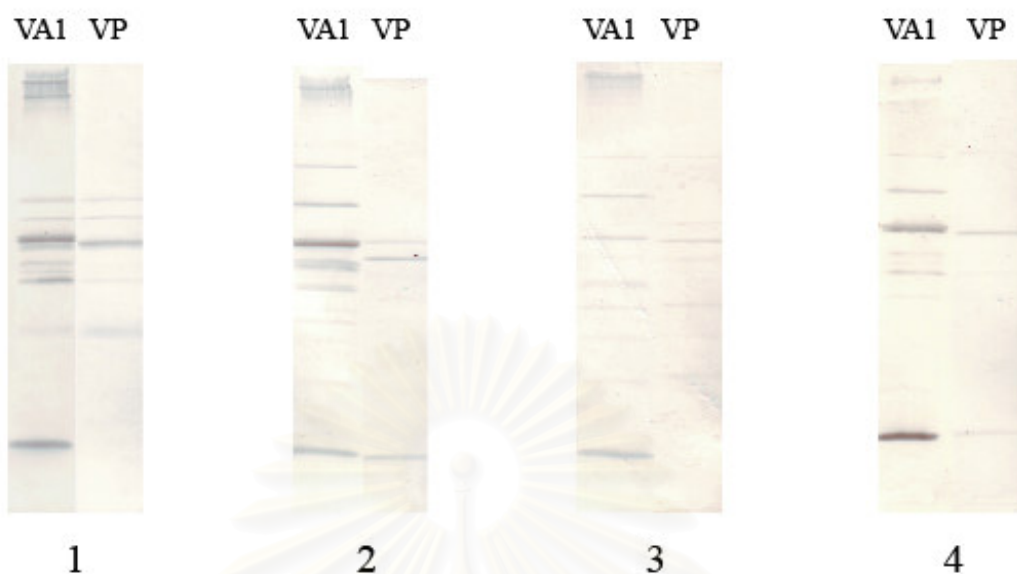
ตารางที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *V. alginolyticus* 14800, Y16 และ BY2

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>V. alginolyticus</i> 14800	<i>V. alginolyticus</i> Y16	<i>V. alginolyticus</i> BY2
ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ทริปติกชอย	สีขาวครีมขนาดใหญ่ กลม มั่น นูน ขอบเรียบ ทึบแสง	สีขาวครีมขนาดใหญ่ กลม มั่น นูน ขอบเรียบ ทึบแสง	สีขาวครีมขนาดใหญ่ กลม มั่น นูน ขอบเรียบ ทึบแสง
ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS	สีเหลืองขนาดใหญ่ กลม มั่น นูน ขอบเรียบ ทึบแสง	สีเหลืองขนาดใหญ่ กลม มั่น นูน ขอบเรียบ ทึบแสง	สีเหลืองขนาดใหญ่ กลม มั่น นูน ขอบเรียบ ทึบแสง
การติดสีแกรม (Gram's stain) และรูปร่าง	แกรมลบ ลักษณะเป็น แท่งโค้ง	แกรมลบ ลักษณะเป็น แท่งโค้ง	แกรมลบ ลักษณะเป็น แท่งโค้ง

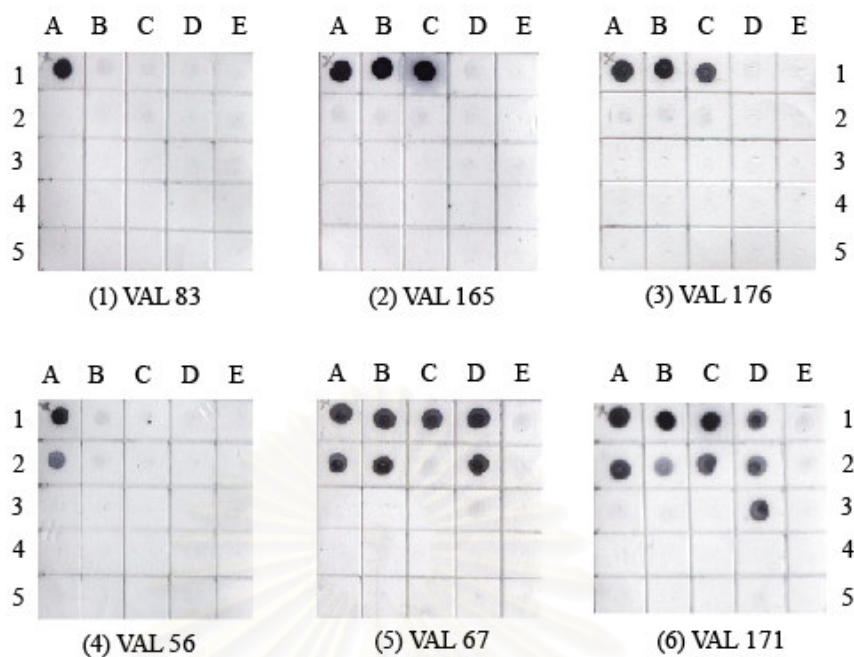
ตารางที่ 3.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. alginolyticus* 14800, Y16 และ BY2 เมื่อทดสอบโดยใช้ชุด
ทดสอบ API 20 E (BioMerieux, France)

การทดสอบ	<i>V. alginolyticus</i> 14800	<i>V. alginolyticus</i> Y16	<i>V. alginolyticus</i> BY2
β – galactosidase (ONPG)	-	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-	-
Lysine decarboxylase (LDC)	+	+	+
Ornithine decarboxylase (ODC)	+	+	+
Citrate utilization (CIT)	+	+	+
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)	-	-	-

+ = ผลบวก, - = ผลลบ



รูปที่ 3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot โดยนำ *V. alginolyticus* 14800 (VA1) และ *V. parahaemolyticus* (VP) มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับ mouse-anti *V. alginolyticus* 14800 antiserum จากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)



รูปที่ 3.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปป่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ กันได้แก่ VAL83, VAL165, VAL176, VAL56, VAL67 และ VAL171 ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

แถวที่ 1. (A) *Vibrio alginolyticus* 14800; (B) *Vibrio alginolyticus* Y16;

(C) *Vibrio alginolyticus* BY2; (D) *Vibrio parahaemolyticus*; (E) *Vibrio mimicus*

แถวที่ 2.(A) *Vibrio harveyi*; (B) *Vibrio fluvialis*; (C) *Vibrio cholerae*;

(D) *Vibrio vulnificus*; (E) *Vibrio penaeicida*

แถวที่ 3.(A) *Aeromonas hydrophila*; (B) *Aeromonas sobria*; (C) *Aeromonas caviae*;

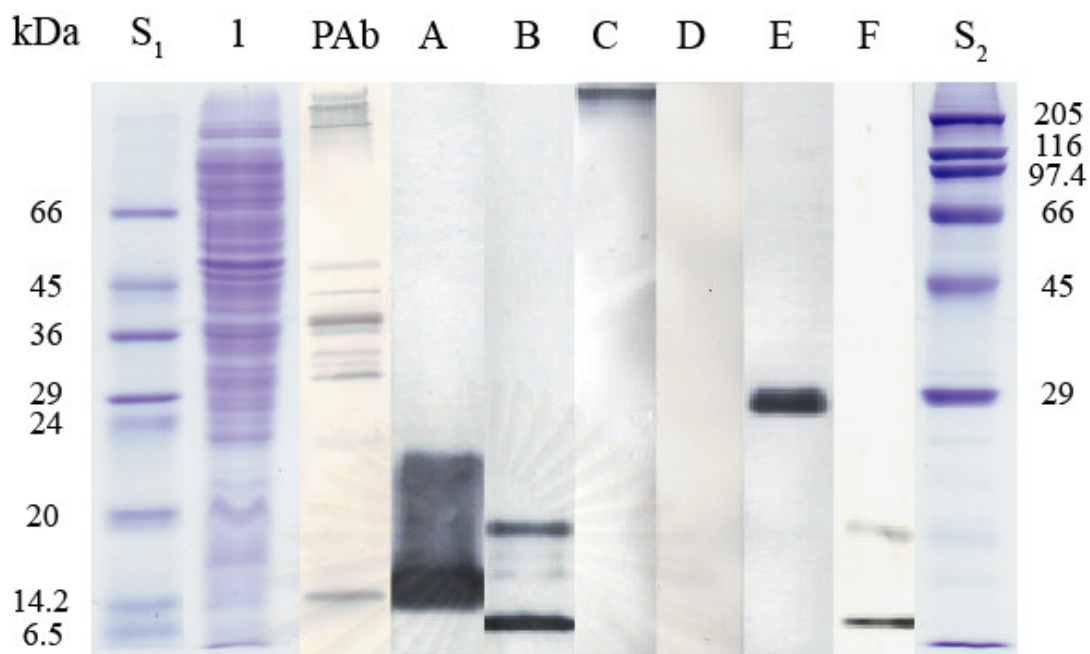
(D) *Plesiomonas shigelloides*; (E) *Escherichia coli*

แถวที่ 4.(A) *Salmonella* Typhi; (B) *Salmonella* Typhimurium; (C) *Salmonella* Enteritidis;

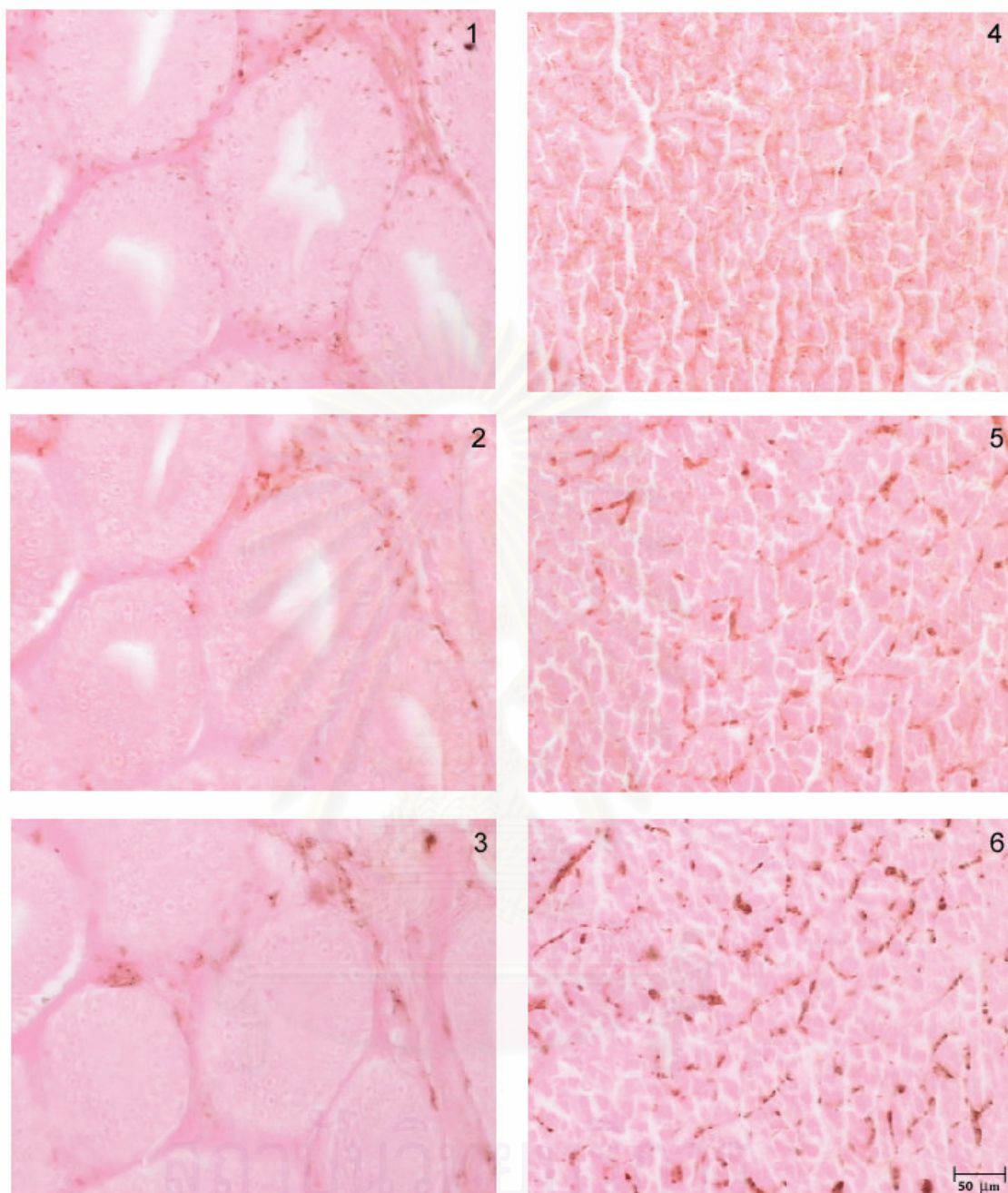
(D) *Shigella flexneri*; (E) *Morganella morganii*

แถวที่ 5.(A) *Enterobacter cloacae*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Proteus vulgaris*;

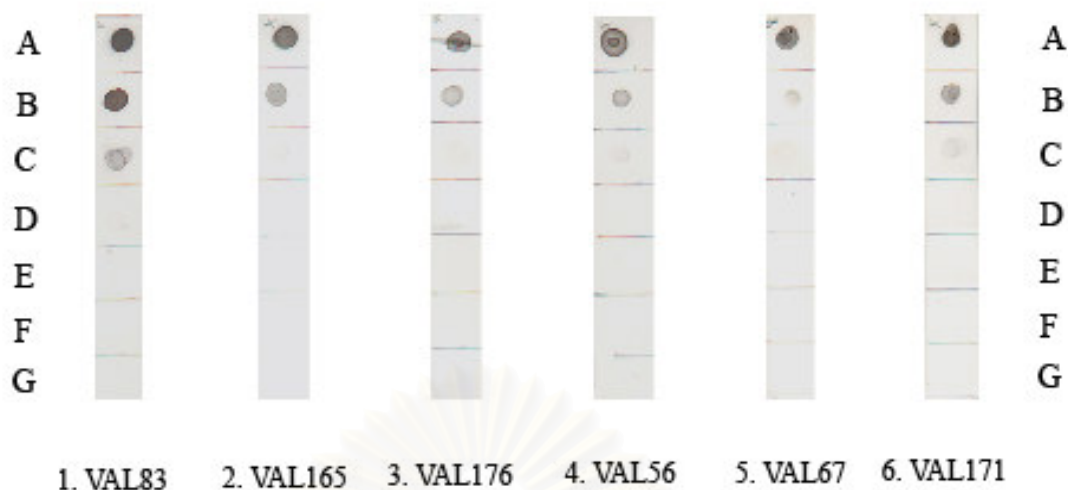
(D) *Pseudomonas aeruginosa*; (E) *Enterococcus faecalis*



รูปที่ 3.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot โดยนำ *V. alginolyticus* 14800 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 (1) หรือนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปป้อมกับ ตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ VAL83 (A), VAL165 (B), VAL176 (C), VAL56 (D), VAL67 (E), VAL171 (F) หรือ mouse-anti *V. alginolyticus* 14800 antiserum (PAb) S₁ = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ S₂ = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง



รูปที่ 3.4 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อตับ (1, 2 และ 3) และกล้ามเนื้อ (4, 5 และ 6) ของกุ้งขาวซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* 14800 ด้วยวิธีการฉีด โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน VAL83 (1 และ 4) หรือ VAL165 (2 และ 5) หรือ VAL176 (3 และ 6) และนำไปย้อมทับด้วยสีอีโอซิน



รูปที่ 3.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. alginolyticus* 14800 ด้วยวิธี Dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 4×10^8 ถึง 2.56×10^4 CFU/มล. ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปปฏิกิริยากับตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มต่าง ๆ ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว A : 4×10^8 CFU/มล.

แถว B : 8×10^7 CFU/มล.

แถว C : 1.6×10^7 CFU/มล.

แถว D : 3.2×10^6 CFU/มล.

แถว E : 6.4×10^5 CFU/มล.

แถว F : 1.28×10^5 CFU/มล.

แถว G : 2.56×10^4 CFU/มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.5 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VAL โคลนต่าง ๆ

MAbs	กลุ่มที่1		กลุ่มที่2			กลุ่มที่3			กลุ่มที่4	กลุ่มที่5	กลุ่มที่6
	1 VAL83	2 VAL13	3 VAL165	4 VAL40	5 VAL59	6 VAL176	7 VAL98	8 VAL62	9 VAL56	10 VAL67	11 VAL171
1 VAL83	1.540	1.547	1.854	1.645	1.665	1.937	1.751	1.634	1.385	1.474	1.713
2 VAL13		1.563	1.672	1.618	1.707	1.932	1.702	1.689	1.505	1.432	1.705
3 VAL165			0.993	1.005	1.064	1.461	1.712	1.389	1.259	1.120	1.089
4 VAL40				0.953	1.029	1.613	1.403	1.213	1.209	1.009	1.103
5 VAL59					1.035	1.320	1.306	1.136	1.241	1.048	1.049
6 VAL176						1.063	1.225	1.205	1.362	1.104	1.469
7 VAL98							0.882	0.826	1.197	0.820	1.156
8 VAL62								0.788	0.983	0.635	0.971
9 VAL56									0.704	0.791	0.946
10 VAL67										0.139	0.653
11 VAL171											0.671

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.6 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี Dot blot, Western blot และ immunohistochemistry โคลนที่ขีดเส้นใต้เป็นตัวแทนโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละกลุ่มซึ่งใช้ในการทดสอบต่าง ๆ IHC = immunohistochemistry, VA-1 = *V. alginolyticus* 14800, VA-Y16 = *V. alginolyticus* Y16, VA-BY2 = *V. alginolyticus* BY2, VC = *V. cholerae*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi* VP = *V. parahaemolyticus*, VV = *V. vulnificus*, PS = *Plesiomonas shigelloides*.

Group	MAbs (isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial Immunoreactivity (Dot blotting)
1	<u>VAL83</u> , VAL13 (IgG ₂ b)	3.2×10^6	~12 – 25	+++	VA-1 (+++)
2	<u>VAL165</u> , VAL40, VAL59 (IgG ₂ a)	1.6×10^7	~10, 20	+++	VA-1, VA-Y16, VA-BY2 (+++)
3	<u>VAL176</u> , VAL98 (IgG ₂ a), VAL62 (IgG ₂ b)	1.6×10^7	~300	+++	VA-1, VA-Y16 (+++), VA-BY2 (++)
4	<u>VAL56</u> (IgG ₂ b)	1.6×10^7	-	-	VA-1 (+++), VH (+)
5	<u>VAL67</u> (IgG ₂ b)	1.6×10^7	~25	-	VA-1, VA-Y16, VA-BY2, VP, VF, VV (+++), VH (+)
6	<u>VAL171</u> (IgG ₂ b)	1.6×10^7	~10, 20	-	VA-1, VA-Y16, VA-BY2 (+++), VH (++) , VP, VF, VC, VV, PS (+)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่เก็บได้จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวพบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวนั้นให้การตอบสนองต่อแอนติเจน (*V. alginolyticus* 14800) แตกต่างกันไป เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนั้นนั้นมีอิพิโทปเป็นจำนวนมาก จึงทำให้บี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจน และเป็นผลให้มีการกระตุ้นการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม ซึ่งซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวนั้นสามารถจับกับอิพิโทปของแอนติเจนได้หลากหลายดังจะเห็นได้จากผลการทดลองในรูปที่ 3.1 นอกจากนี้จะเห็นว่าแอนติซีรัมนั้นไปทำปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus* ทั้งนี้เนื่องจาก *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* นั้นเป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (Sakazaki และ Balows, 1981) ดังนั้นแอนติซีรัมที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วย *V. alginolyticus* จึงสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus* ได้ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blot นี้ สามารถสังเกตเห็นได้ว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยาได้กับแถบโปรตีนบางแถบของ *V. alginolyticus* แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนของ *V. parahaemolyticus* ที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ซึ่งเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่าง *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* และเมื่อตรวจดูปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมและแถบโปรตีนต่าง ๆ ของทั้ง *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวพบว่า หนูขาวตัวที่ 1 นั้นให้การตอบสนองที่ดีที่สุดเนื่องจากมีความเข้มของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมากที่สุดในบรรดาหนูขาวทั้ง 4 ตัว และมีปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus* ไม่มาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำหนูขาวตัวที่ 1 มาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาซึ่งคาดว่าจะทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถแยก *V. alginolyticus* ออกจาก *V. parahaemolyticus* ได้

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 10 โคลน และสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มตามความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 3.6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 14800 เท่านั้น แต่ไม่จับกับ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 3.2) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *V. alginolyticus* 14800 นั้นมีความแตกต่างจาก *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 นี้สามารถแยกความแตกต่างของ *V. alginolyticus* นี้ได้ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติบอดีกลุ่มนี้ไปใช้ในการจำแนก *V. alginolyticus* 14800 ออกจาก *V. alginolyticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ และแบคทีเรียชนิดอื่น โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 และ 3 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบโดยที่ไม่แสดงปฏิกิริยากับแบคทีเรียอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 3.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้จำเพาะต่อแอนติเจนซึ่งมีอยู่ร่วมกันเฉพาะใน *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus*

14800 แต่แสดงปฏิกิริยาข้ามอย่างอ่อนกับ *V. harveyi* (รูปที่ 3.2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 และ 6 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่นในกลุ่มวิบริโอ (รูปที่ 3.2) ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ดังกล่าวนี้นั้น เป็นปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันจึงเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 นี้ไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งมีอยู่ร่วมกันในแบคทีเรียเหล่านี้ ปฏิกิริยาข้ามนี้สามารถเกิดขึ้นได้ ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังในการทดลองของ Takeda และคณะ (1990) ซึ่งได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ heat stable enterotoxin ของ *V. cholerae* และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มไปทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนจาก *V. mimicus* และ *Yersinia enterocolitica* เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cytotoxin ของ *V. cholerae* ซึ่งทำการผลิตโดย Saha และ Nair (1997) ไปทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนจาก *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas* spp. และ *Shigella* spp. และจากการทดลองของ Phianphak และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ก็พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มที่ผลิตได้ไปทำปฏิกิริยาข้ามกับ *Aeromonas hydrophila* ได้ด้วยเช่นกัน

ถึงแม้ว่าในการทดลองครั้งนี้จะไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่าแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มนั้นจำเพาะต่อองค์ประกอบใดของแอนติเจน เนื่องจากได้ใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูขาว แต่จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 และ 2 ด้วยวิธี Western blot (รูปที่ 3.3) คาดว่าแถบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่างประมาณ 10 ถึง 25 กิโลดาลตัน น่าจะเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับส่วนที่เป็น lipopolysaccharide (LPS) ของแอนติเจน ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Jung และคณะ (2001) ซึ่งได้ทำการผลิตและพิสูจน์เอกลักษณ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 โคลนทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเชื่อว่าเป็น LPS เช่นกัน จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 และ 6 ด้วยวิธี Western blot จะเห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้จับกับโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกันคือที่ประมาณ 10 ถึง 20 กิโลดาลตัน แต่เมื่อตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้แล้วพบว่าแอนติบอดีสองกลุ่มนี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างกัน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อนำแอนติบอดีจากทั้งสองกลุ่มนี้มาผสมกันมีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3.5) จึงเป็นผลทำให้แอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้จับกับแบคทีเรียต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบได้แตกต่างกัน โดยแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 นั้นจับได้เฉพาะแต่ *V. alginolyticus* ในขณะที่แอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 จับได้ทั้ง *V. alginolyticus* และแบคทีเรียอื่นในกลุ่มวิบริโอ (รูปที่ 3.3)

เป็นที่น่าสังเกตว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 นี้สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (รูปที่ 3.4) ดังนั้นจึงสามารถนำโม

โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้มาใช้ตรวจติดตามการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ ดังเช่นในการทดลองของ Jung และคณะ (2001) ซึ่งได้นำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ตรวจการติดเชื้อ *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* ในเนื้อเยื่อไต, ม้าม และตับของปลากระพง (*Dicentrarchus labrax*)

จากการตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลในการตรวจหา *V. alginolyticus* โดยวิธี Dot blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 มีความไวในการตรวจสูงที่สุด (3.2×10^6 CFU/มล.) ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจ *V. alginolyticus* ซึ่งมีความไวสูงต่อไปในอนาคต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus* Y16 และ BY2

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. alginolyticus* 14800 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (กลุ่มที่ 1, 2 และ 3) สามารถใช้แยก *V. alginolyticus* จาก *V. parahaemolyticus* ได้ และแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 นั้นสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. alginolyticus* 14800 จาก *V. alginolyticus* อื่นอีก 2 สายพันธุ์ (Y16 และ BY2) ได้ ดังนั้นจึงควรผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. alginolyticus* Y16 และ *V. alginolyticus* BY2 โดยทำการผสม *V. alginolyticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์แล้วนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว ซึ่งคาดว่าจะทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16 หรือ *V. alginolyticus* BY2 หรือทั้ง 2 สายพันธุ์

แบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* Y16 และ BY2 ที่นำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในครั้งนี้ทำการคัดแยกมาจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งจากจังหวัดตราด โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังที่ได้ระบุไว้ในการทดลองแรกยกเว้นแต่การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว ทำโดยนำแบคทีเรีย *V. alginolyticus* Y16 และ *V. alginolyticus* BY2 ที่เตรียมได้ทั้งในรูปแบบ heat-killed และในรูปเสียสภาพมาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นที่ 1 โดยวิธี Dot blot ใช้ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

การคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Immunohistochemistry ใช้ปลานิล (*Tilapia nilotica*) และกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) มาเตรียมเป็นตัวอย่าง โดยทำการฉีด *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 เข้าทางช่องท้องของปลานิล และตรงบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 สำหรับกุ้งขาว

การตรวจสอบอิมูโนโอบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA มีส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA โคลนต่าง ๆ

MAbs	1 VA4	2 VA34	3 VA128	4 VA104	5 VA45	6 VA70	7 VA189	8 VA31	9 VA105	10 VA57	11 VA58	12 VA64
1 VA4	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6	1+7	1+8	1+9	1+10	1+11	1+12
2 VA34		2+2	2+3	2+4	2+5	2+6	2+7	2+8	2+9	2+10	2+11	2+12
3 VA128			3+3	3+4	3+5	3+6	3+7	3+8	3+9	3+10	3+11	3+12
4 VA104				4+4	4+5	4+6	4+7	4+8	4+9	4+10	4+11	4+12
5 VA45					5+5	5+6	5+7	5+8	5+9	5+10	5+11	5+12
6 VA70						6+6	6+7	6+8	6+9	6+10	6+11	6+12
7 VA189							7+7	7+8	7+9	7+10	7+11	7+12
8 VA31								8+8	8+9	8+10	8+11	8+12
9 VA105									9+9	9+10	9+11	9+12
10 VA57										10+10	10+11	10+12
11 VA58											11+11	11+12
12 VA64												12+12

MAbs	13 VA68	14 VA151	15 VA90	16 VA194
13 VA68	13+13	13+14	13+15	13+16
14 VA151		14+14	14+15	14+16
15 VA90			15+15	15+16
16 VA194				16+16

ผลการทดลอง

1. ความจำเพาะของแอนติซีรัม

จากการวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัวโดยวิธี Western blot พบว่าแอนติซีรัมทั้งหมดสามารถจับกับแถบโปรตีนของ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งหนูขาวตัวที่ 1 ให้การตอบสนองที่ดีที่สุด (รูปที่ 4.1) ดังนั้นจึงได้นำหนูขาวตัวที่ 1 นี้มาทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

2. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี Dot blot พบว่ามี microculture well ประมาณ 200 หลุมจากทั้งหมดประมาณ 2,800 หลุม ให้ผลบวกกับการคัดเลือกในขั้นแรกนี้ และในแต่ละหลุมของ microculture well นั้นมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blot, Immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่ามีไฮบริโดมาโคลนจำนวน 16 โคลนซึ่งสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก โดยสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 7 กลุ่มตามความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 4.3

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน แอนติบอดีเหล่านี้มีความจำเพาะกับ *V. alginolyticus* Y16 แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. alginolyticus* อื่นอีก 2 สายพันธุ์ (14800 และ BY2) และแบคทีเรียอื่นซึ่งใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 4.2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.3)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลนซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 แต่ไม่จำเพาะกับแบคทีเรียอื่นซึ่งใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 4.2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแถบเข็มและแถบจาง ๆ ของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 7 ถึง 15 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.3)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลนซึ่งจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบและแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับ *V. alginolyticus* BY2 อ่อนกว่าปฏิกิริยาที่จับกับ *V. alginolyticus* 14800 และ Y16 (รูปที่ 4.2) แอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่จับกับแถบโปรตีนใด ๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blot (รูปที่ 4.3)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลนซึ่งจับกับ *V. alginolyticus* 14800, Y16, BY2 และแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (รูปที่ 4.2) แอนติบอดีกลุ่มนี้จำเพาะกับแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.3)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลนซึ่งจับกับ *V. alginolyticus* ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ และแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 4.2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จำเพาะกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.3) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้เป็นแอนติบอดีเพียงกลุ่มเดียวที่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี Immunohistochemistry ได้ (รูปที่ 4.4)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลนซึ่งจำเพาะกับ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแบคทีเรียอื่นในสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* (รูปที่ 4.2)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลนซึ่งจำเพาะกับ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแบคทีเรียอื่นในสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* เช่นเดียวกันกับแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับ *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* อ่อนกว่าปฏิกิริยาที่จับโดยแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 (รูปที่ 4.2) แอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.3)

4. การตรวจสอบอิมูโนโพลีเมอร์ของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิมูโนโพลีเมอร์ของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 (VA45, VA70 และ VA189) กลุ่มที่ 4 (VA31 และ VA105) กลุ่มที่ 5 (VA57, VA58 และ VA64) กลุ่มที่ 6 (VA68 และ VA151) และกลุ่มที่ 7 (VA90 และ VA194) ซึ่งนำแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) ไม่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งไม่ได้นำแอนติบอดีอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันนี้นั้นจับกับอิมูโนโพลีเมอร์ของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 (VA4, VA34 และ VA128) นั้นเมื่อเทียบในระหว่างกลุ่มเดียวกันแล้วพบว่าแอนติบอดีโคลน VA4 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่ต่างจากแอนติบอดีโคลน VA34 และ VA128 มากนักแต่เมื่อนำแอนติบอดีโคลน VA4 มาผสมรวมกับแอนติบอดีโคลน VA34 หรือ VA128 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่ม

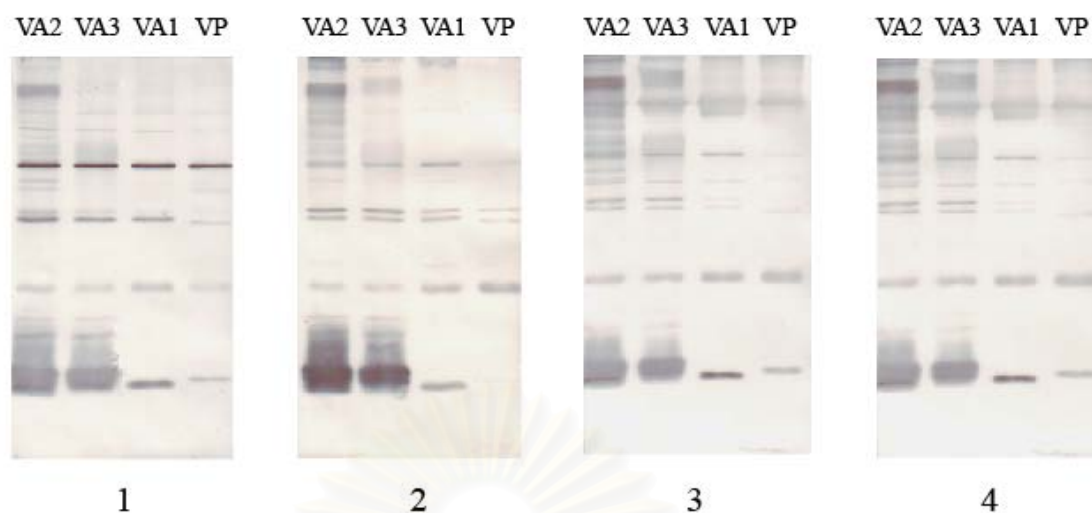
สูงขึ้น (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีโคลน VA4 นี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างจากการจับโดยแอนติบอดีโคลน VA34 และ VA128 เล็กน้อย

5. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

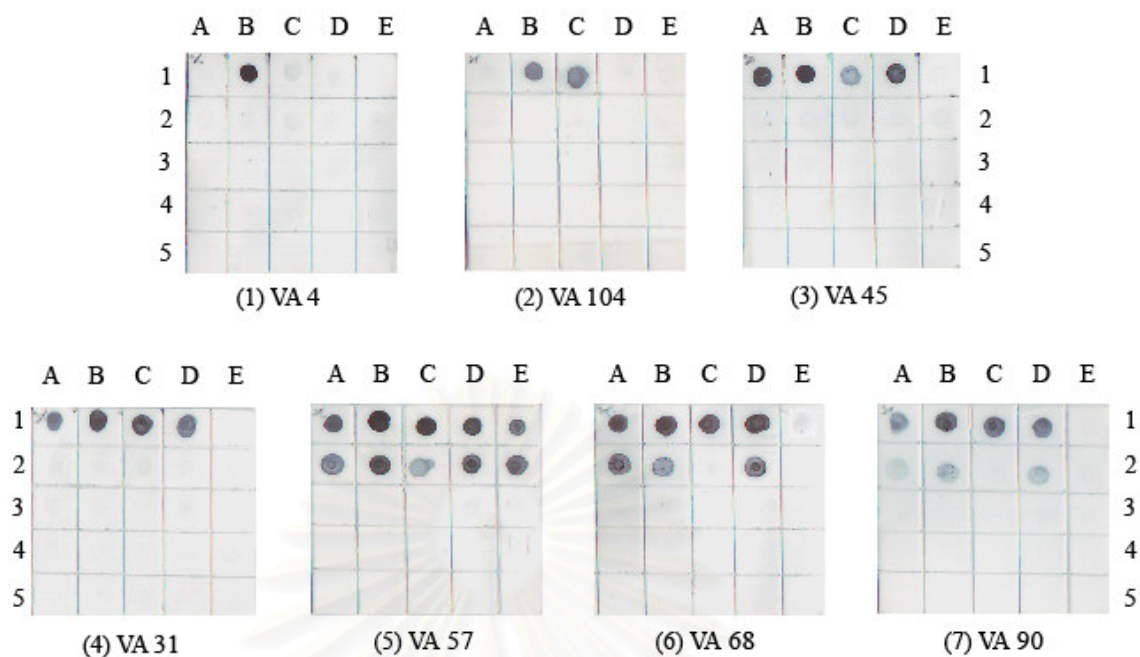
โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 กลุ่มที่ผลิตได้มี class และ subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a} และ IgG_{2b} ดังแสดงในตารางที่ 4.3

6. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. alginolyticus* โดยวิธี Dot blot

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหา *V. alginolyticus* โดยวิธี Dot blot ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10⁴ ถึง 10⁶ CFU/มล. (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.5)

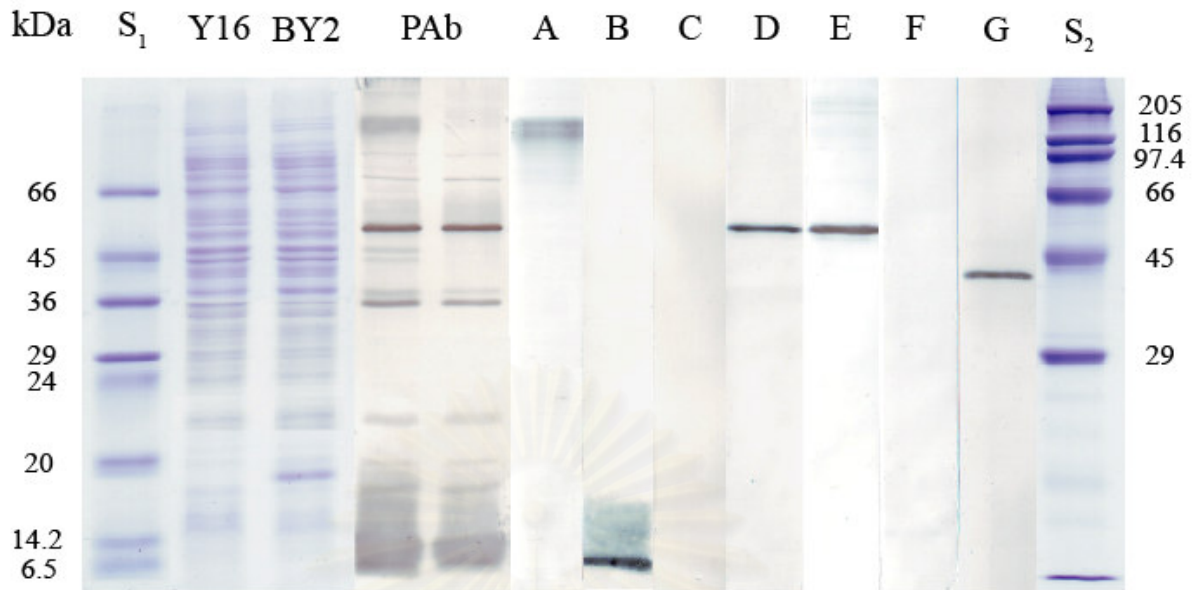


รูปที่ 4.1 แสดงการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blot โดยนำ *V. alginolyticus* 14800 (VA1), *V. alginolyticus* Y16 (VA2), *V. alginolyticus* BY2 (VA3) และ *V. parahaemolyticus* (VP) มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปปฏิกิริยากับ mouse-anti *V. alginolyticus* antiserum จากหนูขาวแต่ละตัว (1-4)

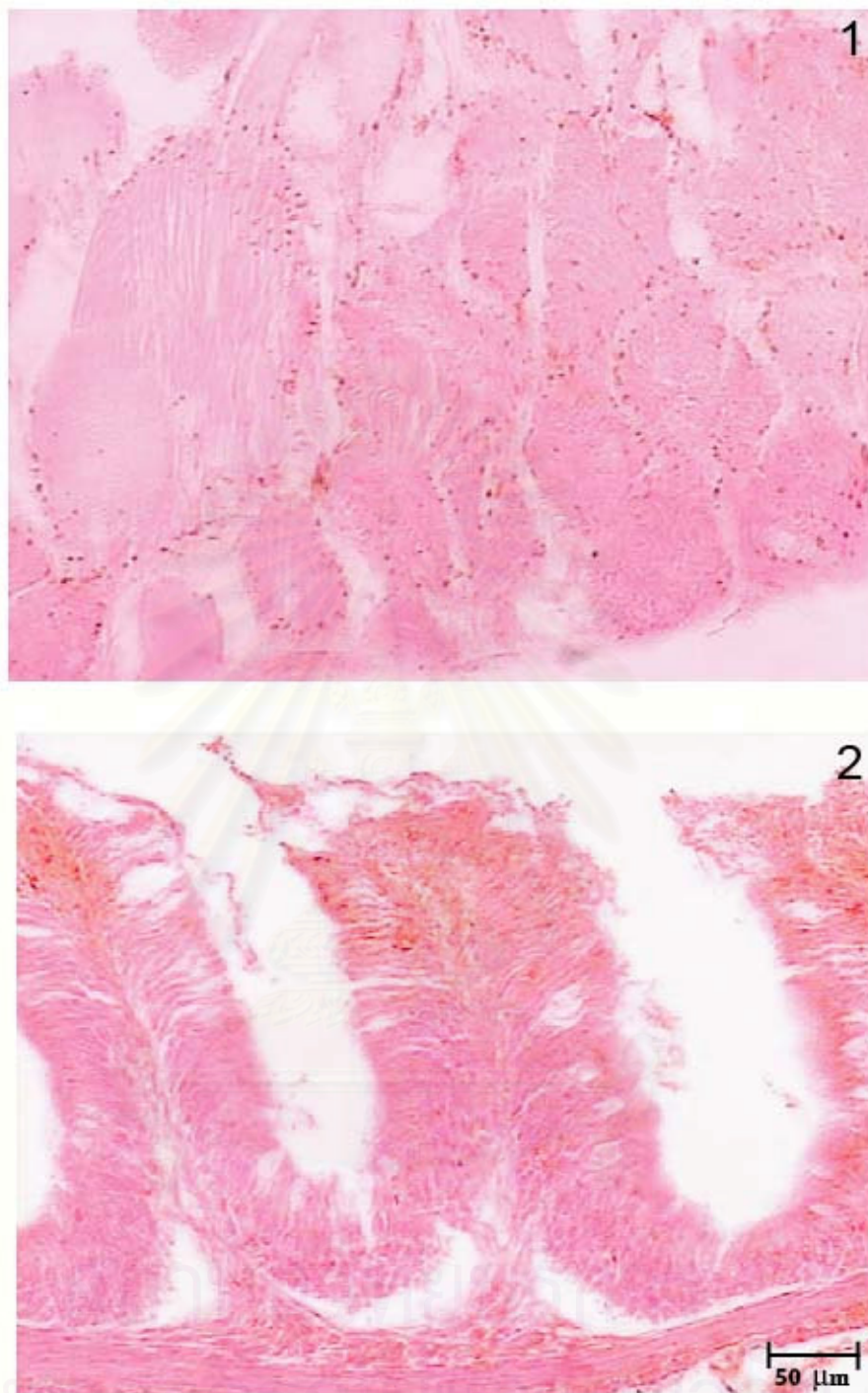


รูปที่ 4.2 แสดงการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปปรมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ กัน ได้แก่ VA4, VA104, VA45, VA31, VA57, VA68 และ VA90 ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

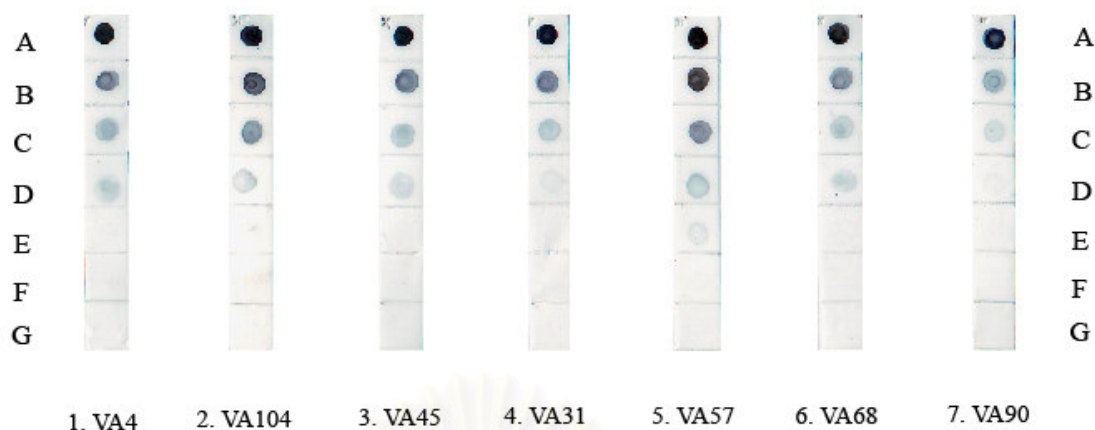
- แถวที่ 1. (A) *Vibrio alginolyticus* 14800; (B) *Vibrio alginolyticus* Y16;
 (C) *Vibrio alginolyticus* BY2; (D) *Vibrio parahaemolyticus*; (E) *Vibrio mimicus*
- แถวที่ 2. (A) *Vibrio harveyi*; (B) *Vibrio fluvialis*; (C) *Vibrio cholerae*;
 (D) *Vibrio vulnificus*; (E) *Vibrio penaeicida*
- แถวที่ 3. (A) *Aeromonas hydrophila*; (B) *Aeromonas sobria*; (C) *Aeromonas caviae*;
 (D) *Plesiomonas shigelloides*; (E) *Escherichia coli*
- แถวที่ 4. (A) *Salmonella* Typhi; (B) *Salmonella* Typhimurium; (C) *Salmonella* Enteritidis;
 (D) *Shigella flexneri*; (E) *Morganella morganii*
- แถวที่ 5. (A) *Enterobacter cloacae*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Proteus vulgaris*;
 (D) *Pseudomonas aeruginosa*; (E) *Enterococcus faecalis*



รูปที่ 4.3 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot โดยนำ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 (Y16 และ BY2) หรือนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปป่มกับตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ VA4 (A), VA104 (B), VA45 (C), VA31 (D), VA57 (E), VA68 (F), VA90 (G) หรือ mouse-anti *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 antiserum (PAb) S₁ = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ S₂ = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง



รูปที่ 4.4 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Immunohistochemistry ในกล้ามเนื้อของกุ้งขาว (1) และลำไส้ของปลานิล (2) ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* Y16 ด้วยวิธีการฉีด โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน VA57 และนำไปย้อมทับด้วยสีอีโอซิน



รูปที่ 4.5 แสดงความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. alginolyticus* Y16 ด้วยวิธี Dot blot โดยหยดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 4×10^7 ถึง 2.56×10^3 CFU/มล. ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปป่มกับตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มต่าง ๆ ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว A : 4×10^7 CFU/มล.

แถว B : 8×10^6 CFU/มล.

แถว C : 1.6×10^6 CFU/มล.

แถว D : 3.2×10^5 CFU/มล.

แถว E : 6.4×10^4 CFU/มล.

แถว F : 1.28×10^4 CFU/มล.

แถว G : 2.56×10^3 CFU/มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA โคลนต่าง ๆ

MAbs	กลุ่มที่1			กลุ่มที่2		กลุ่มที่3		กลุ่มที่4		กลุ่มที่5		
	1 VA4	2 VA34	3 VA128	4 VA104	5 VA45	6 VA70	7 VA189	8 VA31	9 VA105	10 VA57	11 VA58	12 VA64
1 VA4	0.723	0.954	0.848	1.108	1.137	0.795	0.854	1.399	1.375	2.269	2.063	1.984
2 VA34		0.841	0.819	1.025	1.137	0.856	0.926	1.135	1.174	2.179	1.970	1.852
3 VA128			0.799	1.125	1.139	0.929	0.965	1.148	1.209	2.212	1.933	1.983
4 VA104				1.012	1.112	0.683	0.719	1.167	1.160	2.271	1.979	1.943
5 VA45					0.803	0.785	0.796	1.211	1.177	2.173	1.966	1.920
6 VA70						0.141	0.140	0.893	0.884	2.013	1.789	1.541
7 VA189							0.149	0.935	0.929	2.104	1.741	1.703
8 VA31								0.810	0.804	2.057	1.809	1.757
9 VA105									0.810	2.082	1.755	1.749
10 VA57										2.147	1.757	1.733
11 VA58											1.692	1.740
12 VA64												1.350

MAbs	กลุ่มที่6		กลุ่มที่7	
	13 VA68	14 VA151	15 VA90	16 VA194
13 VA68	0.892	0.760	1.025	0.935
14 VA151		0.712	1.063	0.902
15 VA90			0.494	0.498
16 VA194				0.461

ตารางที่ 4.3 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี Dot blot, Western blot และ Immunohistochemistry โคลนที่ขีดเส้นใต้เป็นตัวแทนโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละกลุ่มซึ่งใช้ในการทดสอบต่าง ๆ IHC = Immunohistochemistry, VA-1 = *V. alginolyticus* 14800, VA-Y16 = *V. alginolyticus* Y16, VA-BY2 = *V. alginolyticus* BY2, VC = *V. cholerae*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi*, VM = *V. mimicus*, VP = *V. parahaemolyticus*, VPN = *V. penaeicida*, VV = *V. vulnificus*, PS = *Plesiomonas shigelloides*.

Group	MAbs (isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial Immunoreactivity (Dot blotting)
1	<u>VA4</u> (IgG ₁), VA34, VA128 (IgG _{2b})	3.2 x 10 ⁵	~135	-	VA-Y16 (+++)
2	<u>VA104</u> (IgG _{2a})	6.4 x 10 ⁴	~7 - 15	-	VA-Y16, VA-BY2 (+++)
3	<u>VA45</u> (IgG _{2b}), VA70, VA189 (IgG ₁)	3.2 x 10 ⁵	-	-	VA-1, VA-Y16, VP (+++), VA-BY2 (++)
4	<u>VA31</u> , VA105 (IgG _{2b})	3.2 x 10 ⁵	~50	-	VA-1, VA-Y16, VA-BY2, VP (+++)
5	<u>VA57</u> , VA58, VA64 (IgG _{2a})	6.4 x 10 ⁴	~50	+++	VA-1, VA-Y16, VA-BY2, VP, VM, VH, , VF, VV, VPN (+++), VC (++)
6	<u>VA68</u> , VA151 (IgG ₁)	3.2 x 10 ⁵	-	-	VA-1, VA-Y16, VA-BY2, VP, VH, VF, VV (+++)
7	<u>VA90</u> , VA194 (IgG ₁)	3.2 x 10 ⁵	~40	-	VA-1, VA-Y16, VA-BY2, VP (+++), VH, VF, VV (++)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่เก็บได้จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวโดยวิธี Western blot พบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวให้การตอบสนองต่อแอนติเจน (*V. alginolyticus* Y16 และ BY2) แตกต่างกันไป ซึ่งหนูขาวตัวที่ 1 ให้การตอบสนองดีที่สุดโดยพบแถบโปรตีนเป็นจำนวนมาก และชัดเจนกว่าหนูขาวตัวอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งมีปรากฏให้เห็นแต่ใน *V. alginolyticus* Y16 หรือใน *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 เท่านั้น โดยที่ไม่มีปรากฏให้เห็นใน *V. alginolyticus* 14800 และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่าง *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 กับ *V. alginolyticus* 14800 และ *V. parahaemolyticus* ดังนั้นจึงได้นำหนูตัวที่ 1 มาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในครั้งนี้โดยคาดว่าจะทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจำแนก *V. alginolyticus* Y16 หรือ *V. alginolyticus* BY2 ออกจาก *V. alginolyticus* 14800 และแบคทีเรียอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสังเกตพบแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งมีปรากฏให้เห็นทั้งใน *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันเหล่านี้มีแอนติเจนชนิดเดียวกันร่วมกันอยู่

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 16 โคลน และสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่มตามความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16 เท่านั้น แต่ไม่จำเพาะกับ *V. alginolyticus* BY2 และ 14800 และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *V. alginolyticus* Y16 นั้นมีความแตกต่างจาก *V. alginolyticus* BY2 และ 14800 และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถแยกความแตกต่างนั้นได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 นี้จับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 กิโลดาลตัน ซึ่งแถบของแอนติเจนดังกล่าวนี้ นั้นตรงกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีปรากฏให้เห็นแต่ใน *V. alginolyticus* Y16 เท่านั้น ในการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blot (รูปที่ 4.1 และ 4.3) จึงทำให้แอนติบอดีในกลุ่มนี้จำเพาะเพียงแต่ *V. alginolyticus* Y16 เท่านั้น

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2 แต่ไม่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 14800 และแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 7 ถึง 15 กิโลดาลตัน และคาดว่าเป็นส่วนที่เป็น LPS ของแอนติเจน ซึ่งแถบลักษณะนี้นั้นตรงกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีปรากฏให้เห็นแต่ใน *V. alginolyticus* Y16 และ *V. alginolyticus* BY2 เท่านั้น (รูปที่ 4.1 และ 4.3) จึงทำให้แอนติบอดีในกลุ่มนี้จำเพาะเพียงแต่ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 และ 4 จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และ *V. parahaemolyticus* (รูปที่ 4.2) แต่แอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 นั้นไม่จับกับแถบของแอนติเจนใด ๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blot ในขณะที่แอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 นั้นจับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.3) เมื่อทำการตรวจสอบอิมูโนโบลอตของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้แล้วพบว่าแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้จับกับอิมูโนโบลอตของแอนติเจนที่แตกต่างกัน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อนำแอนติบอดีจากทั้งสองกลุ่มนี้มาผสมกันดังแสดงในตารางที่ 4.2 อาจเป็นไปได้ว่าอิมูโนโบลอตที่แตกต่างกันนี้นั้นมีอยู่ทั้งใน *V. alginolyticus* Y16, BY2, 14800 และ *V. parahaemolyticus* แต่ไม่มีอยู่ในแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ จึงทำให้แอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 และ 4 นี้จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และ *V. parahaemolyticus* คาดว่าแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตันที่จับโดยแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 นั้นคือ H antigen ซึ่งมีอยู่บนแฟลกเจลลาของทั้ง *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ตามงานวิจัยของ Chen และคณะ (1992) ซึ่งได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio* spp. พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* นั้นทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 52 กิโลดาลตัน และจากการตรวจสอบพบว่าแอนติเจนนั้นคือ H antigen ซึ่ง H antigen นี้ถูกพบว่าเป็นแอนติเจนที่มีอยู่ร่วมกันใน *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* (Baumann และคณะ, 1984)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 เป็นแอนติบอดีซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตันเช่นเดียวกับแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 (รูปที่ 4.3) แต่จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่าแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 นี้มีความจำเพาะต่างจากแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 โดยจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 4.2) จากการตรวจสอบอิมูโนโบลอตของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้แล้วพบว่าแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้จับกับอิมูโนโบลอตของแอนติเจนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2) เป็นไปได้ว่าอิมูโนโบลอตของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 นี้เป็นอิมูโนโบลอตที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ดังนั้นเมื่อนำแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้ไปทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จึงให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้จะจับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเดียวกันก็ตาม

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 และ 7 จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งปฏิกิริยาข้ามดังกล่าวนี้นั้นเหมือนกับปฏิกิริยาข้ามที่เกิดในโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ในการทดลองแรก (รูปที่ 3.2) แต่จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot พบว่าแอนติบอดีในกลุ่มที่ 6 นั้นไม่จับกับแถบแอนติเจนใด ๆ ในขณะที่แอนติบอดีในกลุ่มที่ 7 จับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโล

คาลตัน (รูปที่ 4.3) ส่วนแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ที่ได้จากการทดลองแรกจับกับแถบของแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลคาลตัน (รูปที่ 3.3) เมื่อทำการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 และ 7 แล้วพบว่าแอนติบอดีสองกลุ่มนี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างกัน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อนำแอนติบอดีจากทั้งสองกลุ่มนี้มาผสมกันดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอิพิโทปที่แตกต่างกันนี้นั้นมีอยู่ใน *V. alginolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และใน *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus*

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *V. alginolyticus* ด้วยวิธี Dot blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 และ 5 มีความไวในการตรวจสูงที่สุด (3.2×10^5 CFU/มล.)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 27 โคลน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 13 กลุ่มตามความจำเพาะ
2. โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 14800
3. โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16
4. โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* Y16 และ BY2
5. โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* 14800, Y16 และ BY2
6. โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ
7. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 และ 2 ไปใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. alginolyticus*
8. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 และ 5 ไปใช้แยก *V. alginolyticus* ออกจาก *Vibrio* spp. ต่าง ๆ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ
9. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 ไปใช้แยก *Vibrio* spp. ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ
10. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 4 5 และ 6 ไปใช้ตรวจหาตำแหน่งของการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี Immunohistochemistry

ตารางที่ 4.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ซึ่งผลิตได้ในการทดลองครั้งนี้ และความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี Dot blot, Western blot และ Immunohistochemistry โคลนที่จัดเส้นได้เป็นตัวแทนโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละกลุ่มซึ่งใช้ในการทดสอบต่าง ๆ IHC = Immunohistochemistry, VA-1 = *V. alginolyticus* 14800, VA-Y16 = *V. alginolyticus* Y16, VA-BY2 = *V. alginolyticus* BY2, VC = *V. cholerae*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi*, VM = *V. mimicus*, VP = *V. parahaemolyticus*, VPN = *V. penaeicida*, VV = *V. vulnificus*

Group	MAbs (isotype)	Sensitivity of Dot blotting (CFU/ml)	Detected antigen by Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial Immunoreactivity (Dot blotting)
1	VAL83, VAL13 (IgG ₂ b)	3.2×10^6	~12 – 25	+++	VA-1 (+++)
2	VA4 (IgG ₁), VA34, VA128 (IgG ₂ b)	3.2×10^5	~135	-	VA-Y16 (+++)
3	VA104 (IgG ₂ a)	6.4×10^4	~7 - 15	-	VA-Y16, VA-BY2 (+++)
4	VAL165, VAL40, VAL59 (IgG ₂ a)	1.6×10^7	~10, 20	+++	VA-1, VA-Y16, VA-BY2 (+++)
5	VAL176, VAL98 (IgG ₂ a), VAL62 (IgG ₂ b)	1.6×10^7	~300	+++	VA-1, VA-Y16 (+++), VA-BY2 (++)
6	VA57, VA58, VA64 (IgG ₂ a)	6.4×10^4	~50	+++	VA-1, VA-Y16, VA-BY2, VP, VM, VH, VF, VV, VPN (+++), VC (++)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. อาการผิดปกติของกุ้งกุลาดำในบ่อ. ใน กุ้งไทย 2000, หน้า 160-161. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์.
- สิริฤกษ์ ทรงศิริไฉ และธารารักษ์ ธารากุล. 2537. โมโคลอนอลแอนติบอดี. ใน สุทธิพันธ์ สารสมบัติ (บรรณาธิการ), อิมมูโนวิทยา, หน้า 365-369. กรุงเทพมหานคร: เค.พี. พรินต์ติ้ง จำกัด.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545. ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 2). วารสารสัตว์น้ำ 160: 121-124.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. แอนติบอดี. ใน วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย, หน้า 90-100. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

ภาษาอังกฤษ

- Aggarwal, P., Singh, M. and Kumary, S. 1996. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from two patients with acute gastroenteritis. Journal of Diarrhoeal Diseases Research. 4 : 30.
- Alam, M., Miyoshi, S. I., Yamamoto, S., Tomochika, K. I. and Shinoda, S. 1996. Expression of virulence related properties by an intestinal adhesiveness of *Vibrio mimicus* strains isolated from aquatic environments. Applied and Environmental Microbiology. 62 : 3871-3874.
- Alsina, M. and Blanch, A. R. 1994. A set of a keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. Journal of Applied Bacteriology. 76 : 79-85.
- Anderson, I.G., Shamsudin, M.N., Shariff, M. and Nash, G. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackish water ponds. Asian Fishery Science 2 : 93-108.
- Austin, B. and Austin, D.A. 1993. Bacterial fish pathogen. 2nd edn. Chichester : Ellis Horwood. 265-307.
- Bachere, E. 2000. Introduction shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191 : 3-11.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Pianetti, A., Campana, R. and Bruscolini, F. 2001. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. Food Microbiology. 18 : 479-488.

- Balebona, M. C., Andreu, M. J., Bordas, M. A., Zorrilla, I., Morinigo, M. A. and Borrego, J. J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Applied and Environmental Microbiology. 64 : 4269-4275.
- Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. 1984. Section 5 facultatively anaerobic gram-negative rods genus I *Vibrio pacini* 1954, 411^{AL}. In Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 518-538. Baltimore : Williams and Wilkins.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. 2004. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nation
- 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, P., Hanna, P.J., Altmann, K., Smith, A., Moon, P. and Hammond, L.S. 1992a. Development of monoclonal antibodies the identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. Applied and Environmental Microbiology. 58 : 3694-3700.
- 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.
- Chen, F. R., Liu, P. C. and Lee, K. K. 1999. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. Microbios. 98 : 95-111.
- Cheng, W., Wang, L. U. and Chen, J. C. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture. 250 : 592-601.
- Chowdhury, M. A. R., Aziz, K. M. S., Bradford, A. K. and Rahim, Z. 1987. Toxin production in *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology. 25 : 2200-2203.
- Colwell, R. R. 1984. Vibrios in the environment. Wiley, New York. 634 pp.
- de la Pena, L.D., Tamaki, T., Monoyama, K., Nakai, T and Muroga, K. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 115 : 1-12.

- Eshhar, Z. 1985. Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer (ed), Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine, 1-42. New York : Plenum Press.
- Esteve, M. and Herrera, F. C. 2000. Hepatopancreatic alteration in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. Journal of Invertebrate Pathology. 76 : 1-5.
- Faude, U.C and Höfle, M.G. 1997. Development and application of monoclonal antibodies for *in situ* detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. Applied and Environmental Microbiology. 63 : 4534-4542.
- Flegel, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantana-chookin, C., Vickers, J.E., Macdonald, O.D., 1992. In: Fulks, W., Main, K.L. (Eds.), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, HI, pp. 57-112.
- Flegel, T. W. 1997. Special topic review : major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 13 : 433-442.
- Goarant, C., Merien, F., Berthe, F., Mermoud, I. and Perolat, P. 1999. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. Applied and Environmental Microbiology. 6 : 1145-1151.
- 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.
- Hara, C. M., Sowers, E. G., Bopp, C. A., Duba, S. B. and Strockbine, N. A. 2003. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family vibrionaceae. Journal of Clinical Microbiology. 41 : 5654-5659.
- He, Y., Keen, J.E., Westerman, R.B., Littledike, E.T. and Kwang, J. 1996. Monoclonal antibodies for detection of the H:7 Antigen of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 62 : 3325-3332.
- Hlady, W. G. and Klontz, K. C. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. Journal of Infectious Diseases. 173 : 1176-1183.
- Honda, T., Ni, Y., Yoh, M. and Miwatani, T. 1989. Production of monoclonal antibodies against thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* and application of the antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay. Medical Microbiology and Immunology. 178 : 245-253.

- Janda, J. M., Brenden, R., DeBenedetti, J. A., Constantino, M. O. and Robin, T. 1986. *Vibrio alginolyticus* bacteremia in an immunocompromised patient. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 5 : 337-340.
- Johansson, M. W. and Soderhall, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today. 5 : 171-176.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture. 191 : 45-52.
- Jung, T.S., Thompson, K.D., Morris, D.J., Adams, A. and Sneddon, K. 2001. The production and characterization of monoclonal antibodies against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and initial observations using immunohistochemistry. Journal of Fish Diseases. 24 : 67-77.
- Klein, J. 1982. Immunology: The science of self-nonsel self discrimination. USA : A Wiley-Interscience publication.
- 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 specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. European Journal of Immunology. 6 : 511-519.
- Kourany, M. 1983. Medium for isolation and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. Applied and Environmental Microbiology. 45 : 310-312.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lazerda, E. K. and de la Pena, L. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in Philippines. Aquaculture. 91 : 1-19.
- Lee, K. K., Yu, S. R., Yang, T. I., Liu, P. C. and Chen, F. R. 1996a. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Letters in Applied Microbiology. 22 : 111-114.
- Lee, K. K., Yu, S. R., Chen, F. R., Yang, T. I and Liu, P. C. 1996b. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Current Microbiology. 32 : 229-231.
- Lee, K. K., Chen, F. R., Yu, S. R., Yang, T. I. and Liu, P. C. 1997. Effect of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* on penaeid prawn plasma components. Letters in Applied Microbiology. 24 : 98-100.

- Lightner, D. V. 1988. *Vibrio* disease. In : Sindermann, C. J. and Lightner, D. V. (Eds.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, 2nd ed., Elsevier, New York, pp. 42-47.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, LA : World aquaculture society, 236.
- Lightner, D. V. and Redman, R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164 : 201-220.
- Liu, P. C., Lee, K. K., Yui, K. C., Kou, G. H. and Chen, S.N. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Current Microbiology. 33 : 129-132.
- Liu, P. C., Chen, Y. C. and Lee, K. K. 2001. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). Microbios. 104 : 71-77.
- Liu, C. H. and Chen, J. C. 2004a. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. 16 : 321-334.
- Liu, C. H., Cheng, W., Hsu, J. P. and Chen, J. C. 2004b. *Vibrio alginolyticus* infection in white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16s rDNA sequencing. Diseases of Aquatic Organisms. 61 : 169-174.
- Liu, P. C., Lin, J. Y., Hsiao, P. T. and Lee, K. K. 2004c. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. 44 : 23-28.
- Loh, P. C., Tapay, L. M., Lu, Y. and Nadala, E. C. B. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. Advances in Virus Research. 48 : 263-312.
- Lu, P., Brooks, B.W., Robertson, R.H., Nielsen, K.H. and Garcia, M.M. 1997. Characterization of monoclonal antibodies for the rapid detection of foodborne *Campylobacters*. International Journal of Food Microbiology. 37 : 87-91.
- Miliotis, M. D., Tall, B. D. and Gray, R. T. 1995. Adherence to and invasion of tissue culture cells by *Vibrio hollisae*. Infection and Immunity. 63 : 4959-4963.
- Mohney, L. L., Lightner, D. V. and Bell, T. A. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacean: Decapoda). Journal of the World Aquaculture Society. 25 : 116-125.
- Mosmann, T.R., Bauman, R. and Williamson, A.R. 1979. Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. European Journal of Immunology. 9 : 511-516.

- Muroga, K. 1995. Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. Fish Pathology. 30 : 71-85.
- Otta, S. K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. Journal of Aquaculture in Tropics. 14 : 309-318.
- Parker, R. W. and Lewis, D. H. 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *V. vulnificus* in environmental specimens. Applied and Environmental Microbiology. 61 : 476-480.
- Phianphak, W., Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Sithigorngul, P. 2005. Production of monoclonal antibodies against *Vibrio harveyi* 639. Diseases of Aquatic Organisms. 63 : 161-168.
- Pick, E. and Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. Journal of Immunological Methods. 38 : 161-170.
- Pinto, A. D., Ciccarese, G., Tantillo, G., Catalano, D. and Forte, V. T. 2005. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholera*, and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Protection. 68 : 150-153.
- Rikelme, C., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Vergara, N. and Araya, R. 1996. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). Journal of Invertebrate Pathology. 67 : 213-218.
- Robert-Pillot, A., Guenole, A. and Fournier, J. M. 2002. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. FEMS Microbiology Letters. 215 : 1-6.
- 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.
- Sakazaki, R. and Balows, A. 1981. The genera *Vibrio*, *Plesiomonas* and *Aeromonas*. In : Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. (Eds.), The Prokaryotes Springer-Verlag, Berlin. 1272-1301.

- Sangster, C. R. and Smolowitz, R. M. 2003. Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. The Biological Bulletin. 205 : 233-234.
- Selvin, J. and Lipton, A. P. 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. 57 : 147-150.
- 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.
- Snieszko, S. F. 1973. Diseases of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report, pp. 55-56. London : Jansen. cited in Lightner, D. V. and Redman, R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164 : 201-220.
- Soderhall, K., and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology. 10 : 23-28.
- Song, Y. L., Chang, W., Shen, C. H., Ou, Y. C. and Sung, H. H. 1990. Occurrence of *Vibrio vulnificus* infections in cultured shrimp and eel in Taiwan. Proceeding: ROC-JAPAN Symposium Fish Disease, pp. 172-179.
- Song, Y.L., Cheng, W. and Wang, C.H. 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. Journal of Invertebrate Pathology. 61 : 24-31.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. and Soderhall, K. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology. 23 : 179-186.
- Sung, H. H., Li, H. C., Tsai, F. M., Ting, Y. Y. and Chao, W. L. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 236 : 261-271.
- Sudheesh, P. S., Jie, K. and Xu, H. S. 2002. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from cultured shrimps. Aquaculture. 207 : 11-17.
- 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.

- Tseng, I. T. and Chen, J. C. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. Fish and Shellfish Immunology. 17 : 325-333.
- Wang, L. U. and Chen, J. C. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish and Shellfish Immunology. 18 : 269-278.
- Yeh, S. T., Liu, C. H. and Chen, J. C. 2004. Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 17 : 437-46.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกชอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เด็คซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2		

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

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรตีโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท (HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (Na ₂ S ₂ O ₃)	10.0	กรัม
ออกซกอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส (Saccharose)	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท (C ₆ H ₅ O ₇ Fe.5H ₂ O)	1.0	กรัม
บรอมไทมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2		

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

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

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO 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.
เมอร์ไธโอไอโธเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มล.

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6	กรัม
แอล-กลูตามีน (L-glutamine) (Sigma)	0.2923	กรัม
โซเดียมไพรูเวท ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	2.0160	กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.9525	กรัม
เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200	มก.
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000.0	มล.

กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 20%

RPMI medium (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.

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เมล็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%		
ใน RPMI medium (1)	80.0	มล.
FBS	20.0	มล.
100 x HT supplement	1.0	มล.
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มล.

4. สารละลายสำหรับหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol เข้มข้น 40%)

พอลิเอธิลีน ไกลคอล (Polyethylene glycol)	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มล.

เติม RPMI (1) ลงในพอลิเอธิลีน ไกลคอลที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้ปมคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide เข้มข้น 12%)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) (Sigma)	12.0	มล.
RPMI medium (1)	88.0	มล.

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

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

1. Stock solution

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

อะคริลาไมด์ Acrylamide	58.4	กรัม
บิส-อะคริลาไมด์ (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.

เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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

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

ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N

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

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 N

1.4 SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มล.

1.5	แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)		
	แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
	น้ำกลั่น	1.0	มล.
1.6	Running gel overlay		
	Tris เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (1.2)	25.0	มล.
	SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	1.0	มล.
	น้ำกลั่น	100.0	มล.
1.7	2 X Treatment buffer		
	Tris เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5	มล.
	SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	4.0	มล.
	กลีเซอรอล	2.0	มล.
	2-Mercaptoethanol	1.0	มล.
	น้ำกลั่น	0.5	มล.

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

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

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

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

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66	มล.
tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0	มล.
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	0.2	มล.
น้ำกลั่น	12.2	มล.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

ตารางที่ 1ง ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

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

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

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

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

4.1.2 Stain

Stain stock (4.1.1)	50.0	มล.
เมธานอล	250.0	มล.
กรดอะซีติก	50.0	มล.
น้ำกลั่น	500.0	มล.

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

เมธานอล	500.0	มล.
กรดอะซีติก	100.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

เมธานอล	50.0	มล.
กรดอะซีติก	70.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

วิธีการย้อมและล้างเจล

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

5. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma)

-Myosin, rabbit muscle	205	กิโลดาลตัน
-β-Galactosidase, <i>Escherichia coli</i>	116	กิโลดาลตัน
-Phosphorylase b, rabbit muscle	97	กิโลดาลตัน
-Fructose-6-phosphate kinase, rabbit muscle	84	กิโลดาลตัน
-Albumin, bovine serum	66	กิโลดาลตัน
-Glutamic dehydrogenase, bovine liver	55	กิโลดาลตัน
-Ovalbumin, chicken egg	45	กิโลดาลตัน
-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36	กิโลดาลตัน
-Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29	กิโลดาลตัน
-Trypsinogen, bovine pancreas	24	กิโลดาลตัน
-Trypsin inhibitor, soybean	20	กิโลดาลตัน
-α-Lactalbumin, bovine milk	14.2	กิโลดาลตัน
-Aprotinin, bovine lung	6.5	กิโลดาลตัน

6. Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blot

Tris	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมทานอล	200.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ 3 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)
(1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03 % H_2O_2)
- 12) ABTS Substrate, Concentrated (50X)
(2,2 – azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
- 13) Blocking Solution, Concentration (50X)
(25% BSA in PBS and 0.05% NaN_3)
- 14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
- 15) Goat anti-Mouse IgGAM, Concentrated (50X)
(0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
- 16) 50% Tween 20

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subsotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธีกรกุล, 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. สกัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 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

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

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

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

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 ละ 10 นาที
9. เติมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย O-phenelenediamine (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 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก ฉ
 บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

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

2. สารละลาย 0.5% Blotto

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

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

โซเดียมซิเตรท	29.41	กรัม
Merthiolate เข้มข้น 1%	10.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น)	27.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)

ภาคผนวก ช
 บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
 IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

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

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	30.0	มล.
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์	20.0	มล.
Glacial acetic acid	10.0	มล.
น้ำกลั่น	30.0	มล.

2. 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.

4. สารละลาย Calf serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10.0	มล.
PBS	100.0	มล.

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

สี Hematoxylin	8.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	400.0	มล.
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มล.
กลีเซอริน (Glycerine)	400.0	มล.
Glacial acetic acid	400.0	มล.

6. สี Eosin Y 0.2% ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	100.0	มล.

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

1. วิธี Immunohistochemistry (IHC)

- 1.1 ตัดส่วนหัว (cephalothoraxes) ของกุ้งขาวที่เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* 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 นำเนื้อเยื่อของกึ่งที่อินฟิลเตรทด้วยพาราพลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราพลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม
 - 1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโทมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซกชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิน (ribbon)
 - 1.6 นำเซกชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซกชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแห้งจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว คุณนำออกซิปให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรงอยู่บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 1.7 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (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 แช่ในสารละลายฟอร์มอลินเข้มข้น 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^+ ให้คลุมแต่ละเซกชันด้วยไมโครปิเปต
 - 2.1.2 บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
 - 2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก
 - 2.2.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก

- 2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละเชกชัน (แอนติบอดีตัวแรกคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus*)
- 2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- 2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเชกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- 2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง
 - 2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละเชกชันออก
 - 2.3.2 หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุกเชกชัน
 - 2.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
 - 2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเชกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
 - 2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 2.4 นำเชกชันมาทำปฏิกิริยากับ 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที
- 2.5 ล้างเชกชันด้วยน้ำประปา 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)
 - 3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอภิรักษ์ ต้นศิริสิทธิกุล เกิดเมื่อวันที่ 7 ตุลาคม 2525 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และสำเร็จการศึกษาในภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2548

ผลงานทางวิชาการ

Tansirisittikul, A., Rengpipat, S., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W., Chaivisuthangkura, P. and Sithigorngul, P. 2005. Generation of monoclonal antibodies specific to *Vibrio alginolyticus*. Proceedings In: The International Conference on Shrimp Biotechnology, BioThailand 2005. November 4 – 5, 2005, The Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. pp. 109-113.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย