รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมศุลกากร. 2549. ส่งออกกุ้ง ม.ค.-ธ.ค. ปี 2548. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 210 : 4

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. อาการผิดปกติของกุ้งกุลาดำในบ่อ. กุ้งไทย 2000 : 161-162. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2005. แอนติบอดี. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย : 90-94. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์พิมพ์ดี.

ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. 2532. โรคแบคทีเรียในสัตว์น้ำ. โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ : 119-120. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์สหมิตร พริ้นติ้ง.

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

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

ธารารัชต์ ธารากุล และสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. 2537. โมโนโคลนอลแอนติบอดี. อิมมูโนวิทยา สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ (บรรณาธิการ) : 365-369. กรุงเทพมหานคร : เค.พี. พริ้นติ้ง.

สิริ ทุกวินาศ และชุติมา ขมวิลัย. 2545. แนวทางพัฒนาและวิจัยอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. วารสารกรมประมง [ออนไลน์]. (n.d.). แหล่งที่มา http://www.nicaonline.com/article2/site/view article.asp?idarticle=122. [6 ธันวาคม 2548]

ภาษาอังกฤษ

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

Acuña, M.T., Diaz, G., Bolaños, H., Barquero, C. Sănchez, O., Sănchez, L.M., Mora, G., Chaves, A. and Campos, E. 1999. Sources of *Vibrio mimicus* Contamination of Turtle Eggs. Applied and Environmental Microbiology. 65 : 336-338.

Alum, M., Miyoshi, S.I., Tomochika, K.I. and Shinoda, S. 1997. *Vibrio mimicus* Attaches to the Intestinal Mucosa by Outer Membrane Hemagglutinins Specific to Polypeptide Moieties of Glycoproteins. Infection and Immunity. 65 : 3662-3665.

Amaro, C., Biosca, E.A., Fouz, B., Toranzo, A.E., and Garay, E. 1994. Role of Iron, Capsule, and Toxins in the Pathogenecity of *Vibrio vulnificus* Biotype 2 for Mice. Infection and Immunity. 62 : 759-763.

Amaro, c., Fouz, B., Biosca, E.A., Marco-Noales, E. and Collado, R. 1997. The lipopolysaccharide O side chain of *Vibrio vulnificus* serogroup E is a virulence determinant for eels. Infection and Immunity. 65 : 2475.

Amaro, C.,HOR, L.I., Noalea, E.M., Bosque, T., Fouz, B. and Alcaide, E. 1999. Isolation of Vibrio vulnificus Serovar E from Aquatic Habitats in Taiwan. Applied and Environmental Microbiology. 65 : 1352-1355.

Aspan, A. and Söderhäll, K. 1991. Purification or prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochemistry. 21: 363–73.

Biosca, E. G., Ester, M. N., Amaro, C. and Alcaide, E. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Vibrio vulnificus* biotype 2: Development and field studies. Applied and Environmental Microbiology. 63 : 537-542.

Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D.N., Wykstra, D.L. and Swerdlow, D.L. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biotype 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. The Lancet. 354 : 1421-1424.

Campos, E., Bolanos, H., Acuna, M.T., Diaz, G., Matamoros, M.C., Raventos,H., Sanchez, L.M., Sanchez, O., Barquero, C. Colera, R.N.D.L. and Rica, C. 1996. Vibrio mimicus Diarrhea following Ingestion of Raw Turtle Eggs. Applied and Environmental Microbiology. 62 : 1141-1144.

Chang, T.M., Chuang, Y.C., Su, J.H. and Chang, M.C. 1997. Cloning and Sequence Analysis of a Novel Hemolysis Gene (*vllY*) from *Vibrio vulnificus*. Applied and Environmental Microbiology. 63 : 3851-3857.

Chen, D., Hanna, P.J., Altmann, K., Smith, A., Moon, P. and Hammond, L.S. 1992. Development of monoclonal antibodies that Identify *Vibrio* species commomly isolated from infections of humans, fish, and shellfish. Applied and Environmental Microbiology. 58 : 3694-3700.

Chun, J., Huo, A. and Colwell, R.R. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic Spacer Regions of Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. Applied and Environmental Microbiology. 65 : 2202-2208.

Chowdhury, M.A.R., Aziz, K.M.S., Kay, B.A. and Rahim, Z. 1987. Toxin Production by *Vibrio mimicus* Strains Isolated from Human and Environmental sources in Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology. 25 : 2200-2203.

Collado, R., Fouz, B., Sanjuan, E. and Amaro, C. 2000. Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla*. Diseases of Aquatic Organisms. 43 : 91-101.

Davis, B.R., Fanning, G.R., Madden, J.M., JR. Steigerwalt, A.G., Bradford, H.B., JR. Smith, H.L. and Brenner, D.J. 1981. Characterization of Biochemically Atypical *Vibrio cholerae* Strains and Designation of a New Pathogenic Species, *Vibrio mimicus*. Journal of Clinical Microbiology. 14 : 631-639.

Fukushima, H. and Seki, R. 2004. Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of Sada river in Shimane prefecture, Japan. FEMS Microbiology Ecology 48 : 221-229.

Gander, R.M. and Larocco, M.T. 1989. Detection of piluslike structures on clinical an environment isolates of *Vibrio vulnificus*. Journal Clinical Microbiology. 27 : 1015.

Goding J.W. 1983. Monoclonal Antibody Principle and Practice. Academic Press, London

Gulig, P.A., Bourdage, K.L. and Starks, A.M. 2005. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* Mic. The Journal of Microbiology. 43 : 118-131.

Guzman, G.A., Juarez, R.V. and Ascencio, F. 2001. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamai*) to four Vibrio species. Journal of invertebrate Pathology. 78 : 215-219.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Baltimore : Williams and Wilkins.

HØI, L., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A. 1998. Improved Isolation of Vibrio vulnificus from Seawater and Sediment with Cellobiose-Colistin Agar. Applied and Environmental Microbiology. 64 : 1721-1724.

Jermyn, W.S. and Boyd, E.F. 2005. Molecular evolution of Vibrio pathogenecity island-2 (VPI-2): mosaic structure among Vibrio cholerae and vibrio mimicus natural isolates. Miceobiology. 151 : 311-322.

Johanson, M. W., and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today. 5 : 171-176.

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

Kang, J.H., Lee, J.H., Park. J.H., Huh, S.H. and Kong, I.S. 1998. Cloning and identification of a phospholipase gene from Vibrio mimicus. Biochimica et Biophysica Acta. 1394 : 85-89.

Köhler, G., and Milstein, C. 1976. Derivative of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. Eur. Journal Immunology. 6 : 511-519.

Krieg, N.R. and Holt, J.D. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology : Vol1. Baltimore, London : William and Wilkins.

Lee, J.H., Ahn, S.H., Kim, S.H., Choi, Y.H., Park, K.J. and Kong, I.S. 2002. Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhlA) and cytotoxicity on fish cell. Biochemical and Biophysical Research Communications. 298 : 269-276.

Lee, J.H., Ahn, S.H., Lee, E.M., Jeong, S.H., Kim, Y.O., Lee, S.J., and Kong, I.S. 2005. The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of Vibrio mimicus metalloprotease is involved in binding to collagen. FEBS Letters. 579 : 2507-2513.

Lee, J.H., Rho, J.B., Park, K.J., Kim, C.B., Han, Y.S., Choi, S.H., Lee, K.H. and Park S.J. 2004a. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Infection and Immunity. 72 : 4905-4910.

Lee, Y.R., Park, K.H., Lin, Z.Z., Kho, Y.J., Park, J.W., Rho, H.W., Koo, B.S., Kim, H.R., Song, E.K., Yu, H.N., Han, M.K.. Lee, S.O., Jhee, E.C. and Kim, J.S. 2004b. A calcium-calmodulin antagonist blocks experimental *Vibrio vulnificus* cytolysin-induced lethality in an experimental mouse model.

Lightner D.V. and Redman R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic menhods. Aquaculture. 164 : 201-220.

Linkous, D. A. and Oliver, J. D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* : Minireview. FEMS Microbiology Letters. 174 : 207-214.

Macian, M.C., Arias, C.R., Aznar, R., Garay, E. and Pujalte, M.J. 2000. Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural sample. Internatl Microbiology. 3 : 51-53.

Martin, S. J. and Siebeling, R. J. 1991. Identification of *Vibrio vulnificus* O serovars with antilipopolysaccharide monoclonal antibody. Clinical Microbiology. 29 : 1684-1688.

Miyoshi, S.I., Sasahara, K., Akamatsu, S., Rahman, M.M., Katsu, T. Tomochika, K.I. and Shinoda, S. 1997. Purification and Characterization of a Hamolysin Produced by *Vibrio mimicus*. Infection and Immunity. 65 : 1830-1835.

Mosmann, T.R., Bauman R. and Williamson A.R. 1979. Mutations affecting immunoglobulin light chain secreting by myeloma cell : I. Functional analysis by cell fusion. Eur.J.Immunol. 9 : 511-516.

Motes, M.L., DePaola, A., Cook, D.W., Veazey, J.E., Hunsucker, J.C., Garthright, W.E, Blodgett, R.J., Chirtel, S.J. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). Applied and Environmental Microbiology. 41 : 442-446.

Munro, J., Oakey, J., Bromage, E. and Owens, L. 2003. Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. Diseases of Aquatic Organisms. 54 : 187-194.

Nilsson, W.B., Paranjype, R.N., DePaola, A. and Strom, M.S. 2003. Sequence Polymorphism of the 16S rRNA Gene of *Vibrio vulnificus* Is a Possible Indicator of Strain Vilulence. Journal of Clinical Microbiology. 41 : 442-446.

Noales, E.M., Biosca, E.G., Milan, M. and Amaro, C. 2000. An indirect immunofluorescent antibody technique for detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2): delevopment and applications. Journal of Applied microbiology. 89 : 599-606.

Oanh, D.T.H., Hoa, T.T.T. and Phuong, N.T. Characterization and Pathogenicity Studies on *Vibrio* Bacteria Isolated from Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Hatcheties [online]. (n.d.). Available from http://www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/pro01/D5-dtho-characterization.pdf [2006.February 18]

Oliver, J.D. 2005. Review article : Wound infection caused by *V. vulnificus* and other marine bacteria. Epidemiology infection. 133 : 383-391.

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.

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

Rodkhum, C., Wongtavatchai, J., Surachetpong, W., Tonweerapongsiri, O., Kumlungpeat, S. and Tangtrongpiros, J. 2001. Opportunistic Vibrios in cultured Taiwanese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). Thai J. Vet. Med. 31 : 29-35.

Sanjuan, E. and Amaro, C. 2004. Protocol for Specific Isolation of Virulent Strains of *Vibrio vulnificus* Serovar E (Biotype 2) from Environmental Samples. 2004. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 7024-7032.

Sanz, V.A., Roque, A. and Turnbull, J.F. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. 48 : 91-99.

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

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

Sithigorngul, P., Panchan, N., Vilaivan, T., Sithigorngul, W. and Petsom, A. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology. 124 : 73-80.

Song, Y. L., Chang, W., Shen, C. H., Ou, Y. C. and Sung, H. H. 1990. Occurrence of *Vibrio vulnificus* infections in cultured shrimp in Taiwan. Journal of Invertebrate Pathology. 61 : 24-31.

Springer, T.A. (edit). 1985. Hybridoma Technology in Biosciences and medicine. Plenum Press, New York, 602 p.

Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191 : 53-69.

Stelma, G.N., Spaulding, P.L., Reyes, A.L. and Johnson, C.H. 1988. Production of enterotoxin by *Vibrio vulnificus*. Journal Food Protection. 51 : 192.

Strom, M. S. and Paranjpye, R. N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Microbes Infection. 2 : 177-188.

Sung, H.H., Chang, H.J., Her, C.H., Chang, J.C. and Song, Y.L. 1998. Phenoloxidase Activity of Hemocytes Derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Invertebrate Pathology. 71 : 26-33.

Swain, P., Nayak, S.K., Sahu, A., Meher, P.K. and Mishra, B.K. 2003. High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious diseases 26 : 199-211.

Tampin, M. L., Martin, A. L., Ruple, A. D., Cook, D. W. and Kaspar, C. W. 1991. Enzyme Immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. Applied and Environmental Microbiology. 57 : 1235-1240.

Tison, D.L. and Kelly, M.T. 1986. Virulence of vibrio vulnificus Strains from Marine Environments. Applied and Environmental Microbiology. 51 : 1004-1006.

Torbjörn, H., and Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzyme in crustacean, possible role in immunity. Aquaculture172: 111–123.

Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. Microbiological Research. 158 : 299-308.

Vieira, V.V., Teixeira, L.F.M., Vicente, A.C.P.,Momen, H. and Selles, C.A. 2001. Differentiation of Environmental and Clinical Isolation of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 67 : 2360-2364.

Watanabe, H., Miyoshi, S.I., Kawase, T., Tomochika, K.I. and Shinoda, S. 2004. High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype 1 is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans. Microbial Pathogenesis. 36 : 117-123.

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

Wright, A.C., Powell, J.L., Tanner, M.K., Ensor, L.A., Karpas, A.B., Morris, J.G. and Sztein, M.B. 1999. Differential Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide. Infection and Immunology. 67 : 2250-2257.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง

1. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

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

ปรับพีเอชเป็น 7.3±0.2

2. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar)

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

ปรับพีเอชเป็น 7.3±0.2

3. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar)

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

ปรับพีเอชเป็น 8.6 ± 0.2

4. อาหารเอมไอโอ (Motile Indole Ornithine decarboxylase)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัม
ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
L-ornithine HCl	5.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	1.0	กรัม
วุ้นผง	2.0	กรัม
บรอม ครีซอล เพอเพิล (Brom Cresol Purple)	0.02	กรัม

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

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

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
หรือ $Na_2HPO_4 . 7H_2O$	2.15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

2. สารละลาย Blotto 5% (Johnson *et al.*, 1984)

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

3. สารละลาย Merthiolate 1%

Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	100.0	มล.

ภาคผนวก ค
สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหาร RPMI

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

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

2. อาหาร RPMI เสริมด้วยซีรั่ม

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

3. Hybridoma selective medium (HAT medium)

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

4. สารละลายสำหรับ fusion (polyethylene glycol 40%)

Polyethylene glycol (PEG)	4.0	กรัม

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

5. น้ำยาแช่แข็ง (DMSO12%)

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

เก็บรักษาที่ 4°ซ ก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ง

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

1. Stock solution

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

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

เก็บรักษาที่ 4°ซ ในขวดป้องกันแสง

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

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

ปรับพีเอชด้วย HCl

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

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	50.0	มล.

ปรับพีเอชด้วย HCl

1.4 SDS 10%

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

1.5 Ammonium persulfate 10%

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

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

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

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

0.5 โมลาร์ Tris (1.3)	2.5	มล.

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

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

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

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

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

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

3. Running buffer

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

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

4. Staining และ destaining solution

4.1 Staining solution สำหรับ (Coomassie blue)

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

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

4.1.2 Stain (Coomassie blue R-250 0.1%, methanol 50%, acetic acid 10%)

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

4.2 Destaining solution for Coomassie blue

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

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

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

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

ตารางที่ 1 ง การเตรียม separating gel และ stacking gel

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

วิธีย้อมสีโปรตีนในเจล

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

SDS molecular weight markers (Sigma) ประกอบด้วย

- Albumin, bovine serum	66	kDa
- Ovalbumin, chicken egg	45	kDa
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36	kDa
- Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29	kDa
- Trypsinogen, bovine pancreas	24	kDa
- Trypsin inhibitor, soybean	20	kDa
- α-Lactalbumin, bovine milk	14.2	kDa
- Aprotinin, bovine lung	6.5	kDa

6. Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blot

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

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

ก่อนใช้บัฟเฟอร์ต้องแช่เย็นจัด

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับการตรวจจำแนก isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ1 chain specific)
- Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ2a chain specific)
- Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ2b chain specific)
- Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ3 chain specific)
- Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
- Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
- Rabbit anti-Mouse kappa light chain
- Rabbit anti-Mouse lambda light chain

ภาคผนวก ฉ

บัฟเฟอร์และสารละลายสำหรับ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

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

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

2. Washing solution (Blotto 0.5%)

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

3. 0.1 M Citrate Buffer pH 4.5

Sodium citrate	29.41	กรัม
Merthiolate 1%	10.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.
ปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วย 0.1 โมลาร์ HCl		

4. 1 นอร์แมล H_2SO_4

H_2SO_4	27.0	มล.
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1000.0	มล.

5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)

ภาคผนวก ซ

สารเคมีและสารละลายสำหรับ Immunohistochemistry (IMC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

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

2. Davidson's fixative

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

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

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

4. Calf serum 10% (P_1^*)

Calf serum	10.0	มล.
PBS	100.0	มล.

5. Enrilich's acid hematoxylin

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

6. Eosin Y 0.2% ใน ethanol 95%

Eosin Y	0.2	กรัม
ethanol 95%	100.0	มล.

ภาคผนวก ซ

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VVC

ตารางที่ 1 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 1

MAbs	23	38	43	121	118	14	40	42	88	97
23	0.393	0.520	0.489	0.503	0.435	0.470	0.500	0.416	0.430	0.269
38		0.250	0.317	0.266	0.193	0.244	0.256	0.178	0.176	0.280
43			0.103	0.366	0.271	0.289	0.310	0.257	0.252	0.173
121				0.288	0.232	0.266	0.271	0.259	0.245	0.380
118					0.212	0.229	0.235	0.198	0.129	0.302
14						0.244	0.238	0.189	0.202	0.318
40							0.229	0.196	0.185	0.329
42								0.108	0.112	0.170
88									0.117	0.149
97										0.101

ตารางที่ 2 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 2

MAbs	71	90
71	1.031	0.848
90		0.384

ตารางที่ 3 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 3

MAbs	98	109
98	0.231	0.299
109		0.576

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VVB

ตารางที่ 4 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 1

MAbs	4	12	47	48	110	174	163
4	0.627	0.973	0.936	1.245	1.031	1.043	1.099
12		1.205	1.047	1.402	1.228	1.252	1.254
47			1.054	1.618	1.369	1.149	1.360
48				1.784	1.517	1.314	1.714
110					1.326	1.150	1.390
174						1.183	1.193
163							1.245

ตารางที่ 5 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 3

MAbs	34	202	3	152
34	0.159	0.196	0.186	0.225
202		0.203	0.219	0.254
3			0.228	0.265
152				0.306

ตารางที่ 6 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 4

MAbs	16	29	45
16	0.246	0.467	0.290
29		0.578	0.510
45			0.343

ตารางที่ 7 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 5

MAbs	56	64	92	172	180	125
56	1.889	1.811	1.940	1.895	1.927	2.196
64		0.752	1.145	0.722	1.190	1.513
92			1.157	1.148	1.213	1.755
172				0.553	1.249	1.383
180					1.214	1.569
125						0.965

ตารางที่ 8 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 6

MAbs	53	58	63
53	1.196	0.935	1.052
58		0.218	0.438
63			0.486

ตารางที่ 9 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 7

MAbs	68	123
68	1.028	1.315
123		0.876

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VM

ตารางที่ 10 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM กลุ่มที่ 1

MAbs	93	5	19
93	0.525	0.524	0.525
5		0.395	0.407
19			0.423

ตารางที่ 11 ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM กลุ่มที่ 3

MAbs	3	46	77	79
3	0.560	0.630	0.551	0.637
46		0.440	0.678	0.426
77			0.588	0.671
79				0.424

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สุทธินี ภู่ศิริฤทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 28 ตุลาคม 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546

ผลงานทางวิชาการ

Pusiririt, S., Sithigorngul, P. and Rengpipat, S. Production of monoclonal antibodies against *Vibrio vulnificus*. The 13th Congress on Science, 16-17 March 2005, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok Thailand. p. 1

Pusiririt, S., Rengpipat, S., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W., Chaivisuthangkura, P. and Sithigorngul, P. Differentiation of two isolates of *Vibrio vulnificus* with monoclonal antibody. Proceedings of the International Conference on Shrimp Biotechnology: New Challenges Through Thai Shrimp Industry. 4-5 November, 2005, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. p.114-118.

ทุนวิจัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสบการณ์

ผู้ช่วยสอน วิชา Industry of Microbiology ปีการศึกษา 2546