บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

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

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

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

4. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius, Germany.

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

6. เครื่องเขย่า (Incubator shaker)

7. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท LEICA

8. แท่นอุ่นสไลด์ (Slide warmer) ของบริษัท Medax

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

10. ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัท Sanyo

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

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

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

14. ตู้แช่แข็ง -20^{o}ซ ของบริษัท Sanyo

15. ตู้แช่แข็ง -70^{o}ซ ของบริษัท Sanyo

16. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.

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

18. ชุด transblot apparatus ของบริษัท Bio-Rad

19. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70 ของบริษัท Olympus

3.2 **เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย**

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

2. อาหาร Mueller Hinton Broth ของบริษัท Difco Laboratories, USA

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

4. ชุดจัดจำแนกเชื้อสำเร็จรูป API20E ของบริษัท Biomerieux, France

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท Gibco BRL, USA

6. Fetal bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

7. Calf bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

8. D-glucose ของบริษัท Sigma

9. L-glutamine ของบริษัท Sigma

10. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) ของบริษัท Sigma

11. $NaHCO_3$

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

13. HT supplement ของบริษัท Gibco BRL, USA

14. Aminopterin ของบริษัท Sigma

15. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma

16. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD

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

18. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท BIO-RAD

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

20. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD

21. SDS molecular weight markers ของบริษัท Sigma

22. ชุดตรวจสอบ Hybridoma sub-isotyping, mouse ของบริษัท Zymed

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

24. N-butyl alcohol ของบริษัท Univar

25. ไซลีน (Xylene) ของบริษัท Carlo Erba

26. Formaldehyde ของบริษัท Carlo Erba

27. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

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

29. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) ของบริษัท Sigma

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

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

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

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

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

35. Davidson's fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

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

37. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl) ของบริษัท Merck

38. Permount ของบริษัท Ficther Scientific

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

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมแบคทีเรีย

3.4.1.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 3.1) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุลวิบริโอในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที และล้างเซลล์ด้วย 0.15 โมลาร์ phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยใน PBS ปรับค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ให้ได้ 1.0 โดยใช้ PBS

3.4.1.2 การเก็บเซลล์แบคทีเรีย โดยแขวนลอยเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยและกลีเซอรอล 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.1.3 การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E (BioMérieux, France) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ 18-24 ชม. 1 โคโลนีเดี่ยว มาแขวนลอยในน้ำเกลือ 0.85% ที่ปลอดเชื้อ

ผสมให้เข้ากันดี แล้วปิเปตลงในชุดทดสอบ หลุมที่ทดสอบ arginine dihydrolase(ADH), lysine decarboxylase (LDC), ornithine decarboxylase (ODC), H_2S production (H_2S) และ urease (URE) จะปิเปตทับด้วยพาราฟิน เพื่อให้อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน จากนั้นนำชุดทดสอบใส่ในถาดที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปิดฝาและบ่มที่อุณหภูมิ 36°ซ ±2°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดสอบดังตารางที่ 3.2

การวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน *V. vulnificus* VVC, *V. vulnificus* VVB และ *V. mimicus* ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

3.4.2 การเตรียมแอนติเจน

นำแอนติเจน (*V. vulnificus* และ *V. mimicus*) ที่เพาะเลี้ยงตามวิธีข้างต้นมาฆ่าด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 60 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ จากนั้นแบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ

3.4.2.1 รูปแบบ heat killed เติมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.4.2.1 รูปแบบ SDS-mercaptoethanol treated เติม SDS-mercaptoethanol อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต้มในน้ำเดือด 90 วินาที และไดแอลิซีสในน้ำกลั่น

3.4.3 การเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำน้ำหนัก 20 กรัม มาเลี้ยงในถังพลาสติกสี่เหลี่ยมที่บรรจุน้ำทะเลความเค็มประมาณ 20 ส่วนในพันส่วน จากนั้นฉีดด้วยแอนติเจนมีชีวิตความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อตัว เก็บกุ้งกุลาดำที่ฉีดและไม่ฉีดแอนติเจน (กลุ่มควบคุม) มาสลบในน้ำเย็นจัด ตัดหัวแช่ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี Immunohistochemistry ต่อไป

3.4.4 การปลูกภูมิคุ้มกัน

นำส่วนผสมของแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) มาฉีดเข้าที่ช่องท้องของหนูขาว (swiss mice) จำนวน 4 ตัว ฉีดกระตุ้นทุก 2 สัปดาห์ 3 ครั้ง ด้วยส่วนผสมของแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดหนูแต่ละตัวมาตรวจหาพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนโดย Western blotting คัดเลือกหนูตัวที่ให้แถบโปรตีนชัดเจนมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา โดยจะฉีดกระตุ้นหนูขาวด้วยแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบ ก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus* (VVC และ VVB) และ *V. mimicus*

แบคทีเรียทดสอบ	แหล่งที่มา
V. vulnificus VVC	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สัตว์น้ำเป็นโรค)
V. vulnificus VVB	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ปลากะพงเป็นโรค)
V. mimicus DMST 15142	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (อุจจาระผู้ป่วย)
V. vulnificus M06-24/0	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
V. parahaemolyticus	
V. harveyi 639	
V. cholerae	
V. penaeicida	
Bacillus subtilis	
Enterococcus faecalis ATCC 7080	
V. fluvialis	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
V. vulnificus BT 2-89/04/7052 Denmark	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
V. vulnificus MT 1506 UK	
V. vulnificus VVBS	
V. ordalii UK	
V. anguillarum AVL01	
Yersinia ruckeri B04023 UK	
Edwardsiella tarda B88308	
Photobacterium damsellae ssp. *piscicida* UK	
Aeromonas hydrophila VMARC 1234	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Aeromonas caviae NICMB 1444	
Plesiomonas shigelloides AAHRI	

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	แหล่งที่มา
Salmonella Typhi	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Salmonella Typhimurium ATCC 1408	
Shigella flexneri	
Morganella morganii	
Enterobacter cloacae	
Klebsiella pneumoniae	
Proteus vulgaris	
Pseudomonas aeruginosa	
V. vulnificus ATCC 29307	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
V. vulnificus ATCC 27562	
V. mimicus ATCC 33653	
V. alginolyticus DMST 14800	
Aeromonas sobria DMST 12446	
Escherichia coli ATCC 25922	
Salmonella Enteritidis DMST 7108	

ตารางที่ 3.2 การอ่านผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E (BioMérieux, France)

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

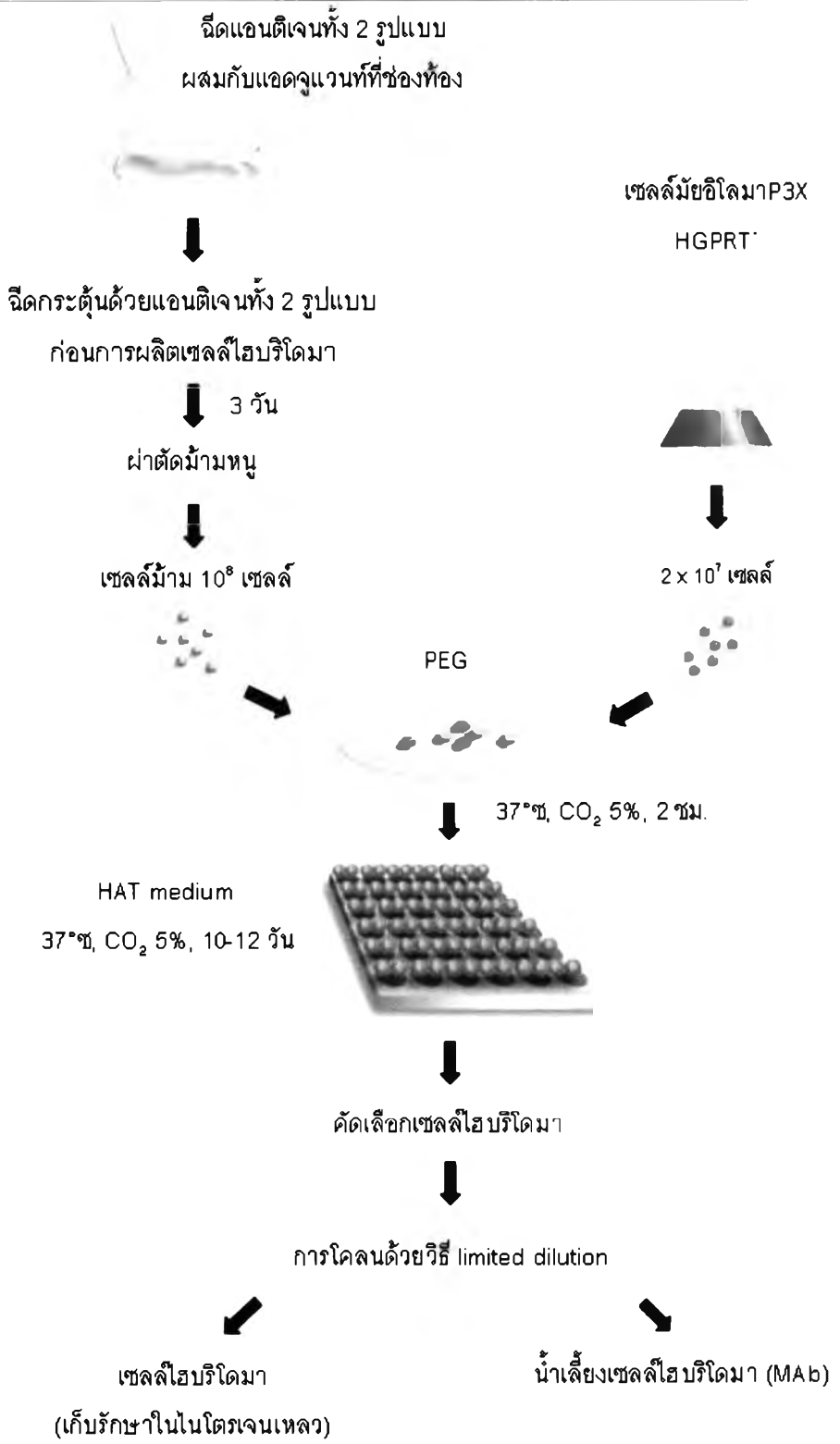
3.4.5 **การผลิตเซลล์มัยอิโลมา**

เซลล์มัยอิโลมาที่ใช้สำหรับผลิตเซลล์ไฮบริโดมาคือ P3X เตรียมโดยเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่เสริมด้วย calf bovine serum 20% บ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ

3.4.6 **การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา** (ดัดแปลงจากวิธีของ Mossman และคณะ, 1976; Goding, 1983)

นำเซลล์ม้ามของหนูขาวมาผสมกับเซลล์มัยอิโลมา P3X ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส (RPMI) ออก เติมสารละลาย polyethylene glycol (PEG) 1 มิลลิลิตร ทีละน้อย ใช้นิ้วตีก้นหลอดให้เซลล์ผสมกับ PEG เป็นเวลา 1 นาที ค่อยๆ เติม RPMI ปริมาตร 39 มิลลิลิตร ลงข้างหลอดช้าๆ บ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ผสมด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ใน HAT medium (RPMI 1640 ที่เสริมด้วย fetal bovine serum 20%, เม็ดเลือดแดง 0.5%, hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) และดูดใส่ใน microculture plate 30 ถาด (96 หลุมต่อถาด) บ่มใน CO_2 incubator ประมาณ 10-12 วัน ตรวจดูการเจริญของเซลล์ในหลุมต่างๆ ภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน (รูปที่ 3.1)

F 951918 38



รูปที่ 3.1 แผนภาพการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

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

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.7 **การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา**

3.4.7.1 **การคัดเลือกขั้นที่** 1 **ด้วยวิธี** Dot blotting

นำแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบ มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยอบที่ 60°ซ 10 นาที แช่ในสารละลาย blotto 5% (นมพร่องมันเนย 5% ที่ละลายใน PBS) เป็นเวลา 30 นาที ตัดและใส่ใน microculture plate จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (เจือจาง 1:4 ใน blotto 1%) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03%, H_2O_2 0.006% และ $CoCl_2$ 0.05% ใน PBS เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจะเกิดเป็นจุดสีดำ นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลเป็นบวกไปคัดเลือกในขั้นที่ 2 (รูปที่ 3.2)

3.4.7.2 **การคัดเลือกขั้นที่** 2

3.4.7.2.1 **การวิเคราะห์** Western blotting

นำแอนติเจนในรูปแบบคงสภาพ มาแยกใน SDS-PAGE 15% โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นำเจลที่ผ่านกระบวนการทำ SDS-PAGE มาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ transblot apparatus กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน blotto 5% เป็นเวลา 30 นาที ตัดแบ่งลงใน microculture plate ที่มี blotto 1% บ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (เจือจาง 1:40 ใน blotto 1%) จากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03%, H_2O_2 0.006% และ $CoCl_2$ 0.05% ใน PBS ตรวจสอบผลโดยเปรียบเทียบกับผลของพอลิโคลนอลแอนติบอดี (รูปที่ 3.3)

3.4.7.2.2 **การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามด้วย** Dot blotting

นำแอนติเจนและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml ในรูปแบบ heat killed มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยอบที่ 60°ซ 10 นาที จากนั้นแช่ใน blotto 5% เป็นเวลา 30 นาที ตัดแบ่งลงใน microculture plate ที่มี blotto 1% บ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (เจือจาง 1:40 ใน blotto 1%) จากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03%, H_2O_2 0.006% และ $CoCl_2$ 0.05% ใน PBS ตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จากจุดสีดำ (รูปที่ 3.3)

3.4.7.2.3 **การตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี** Immunohistochemistry

3.4.7.2.3.1 **การเตรียมเนื้อเยื่อ**

นำหัวกุ้งกุลาดำที่แช่ในสารละลาย Davidson's fixative 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นผ่านกระบวนการล้างพาราฟินและดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และไซลีน ฝังในพาราฟิน แล้วตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 โมโครเมตร ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน ติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน แล้วนำไปอบที่ 50°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3.4)

3.4.7.2.3.2 **การวิเคราะห์** Immunohistochemistry

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาล้างพาราฟินออกในไซลีน และผ่านกระบวนการเติมน้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลิน 10% ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และหยดสารละลาย P_1^+ (calf bovine serum 10% ใน PBS) คลุมเนื้อเยื่อ เก็บในกล่องเก็บความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นที่ 1 มาหยดคลุมเนื้อเยื่อบนสไลด์ บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03% และ H_2O_2 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีด้วยฮีมาทอกไซลีนและอีโอซีนผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลเป็นบวกจะติดสีน้ำตาล (รูปที่ 3.3 และ 3.5)

แอนติเจนรูปแบบ heat killed : SDS-mercaptoethanol treated (1:1)

↓

หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

↓ อบที่ 60°ซ 10 นาที

แช่ใน blotto 5%

↓ 30 นาที

เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

↓ บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 5 ชั่วโมง

ล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที

↓

เติม GAM-HRP 1: 1500

↓ บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 3 ชั่วโมง

ล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที

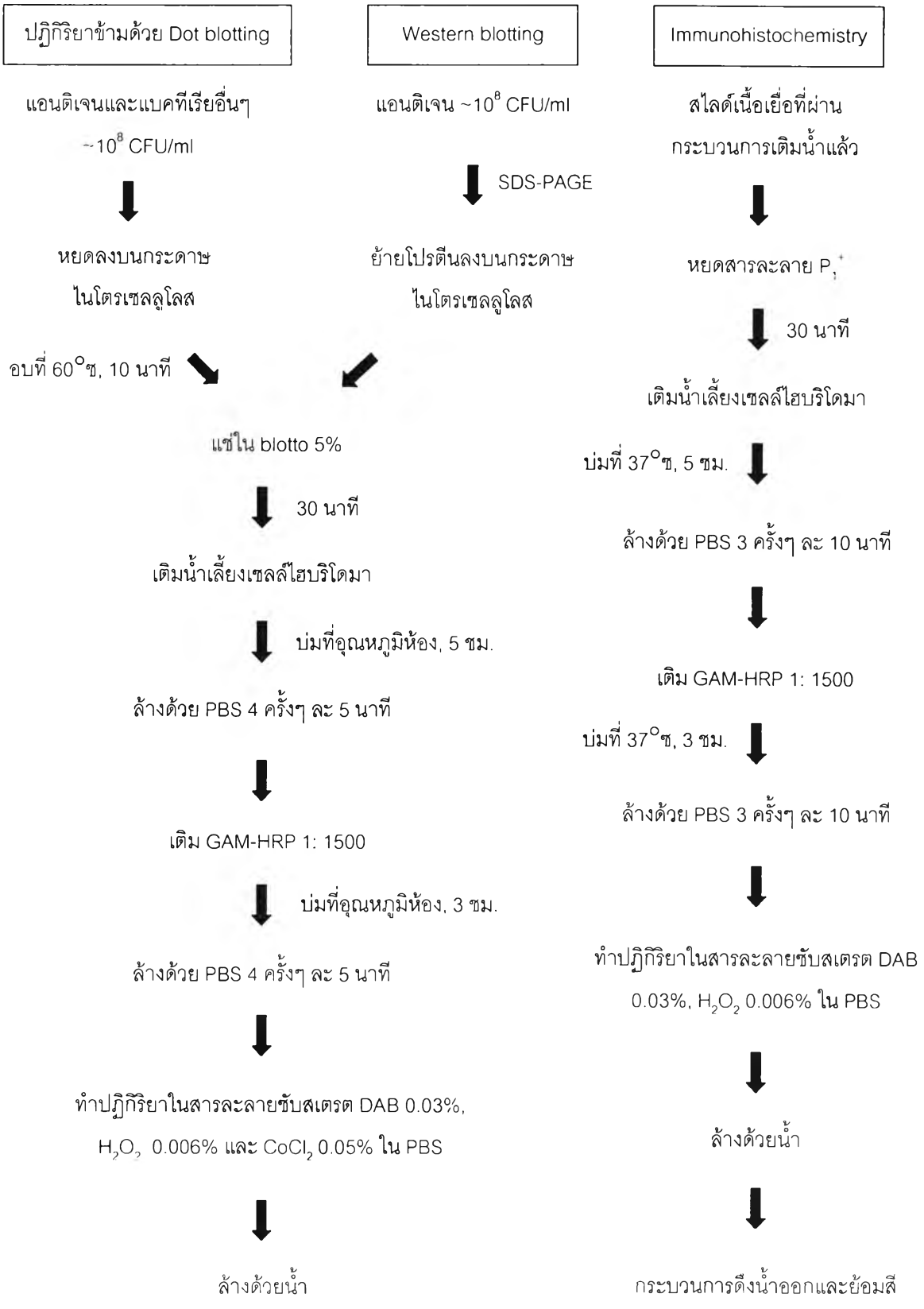
↓

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

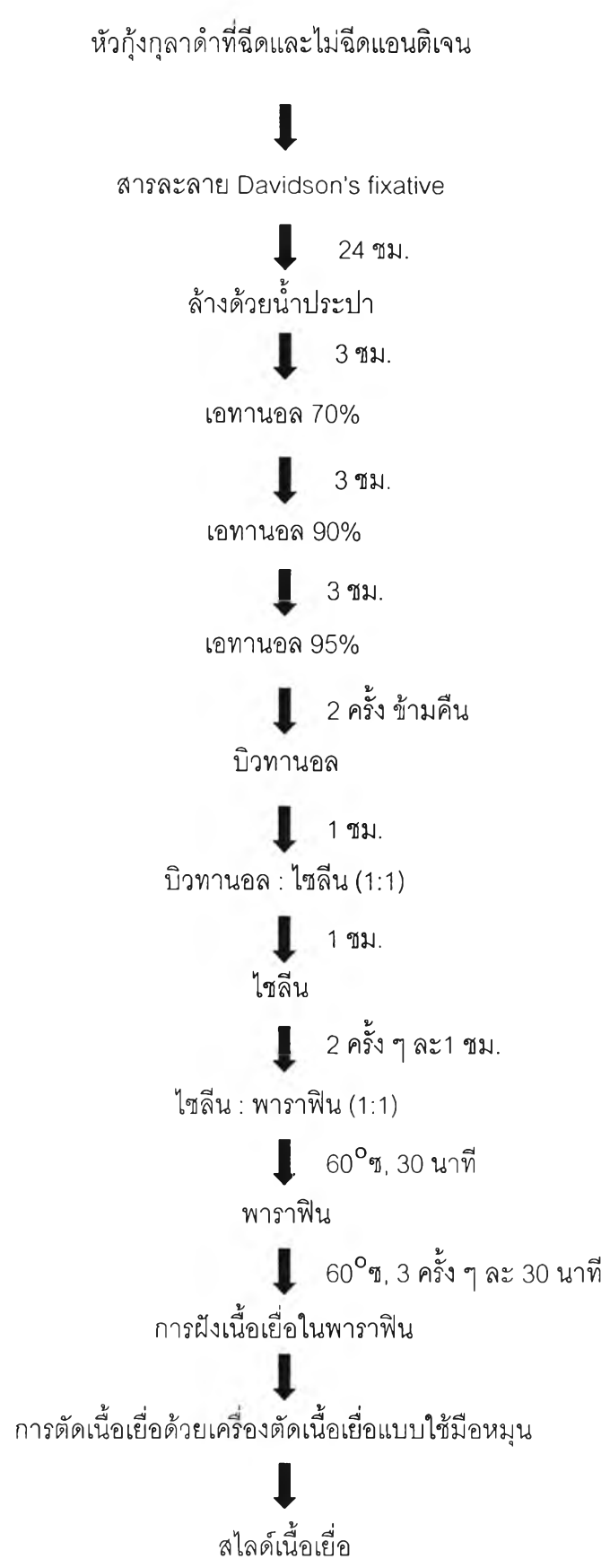
↓

ล้างด้วยน้ำ

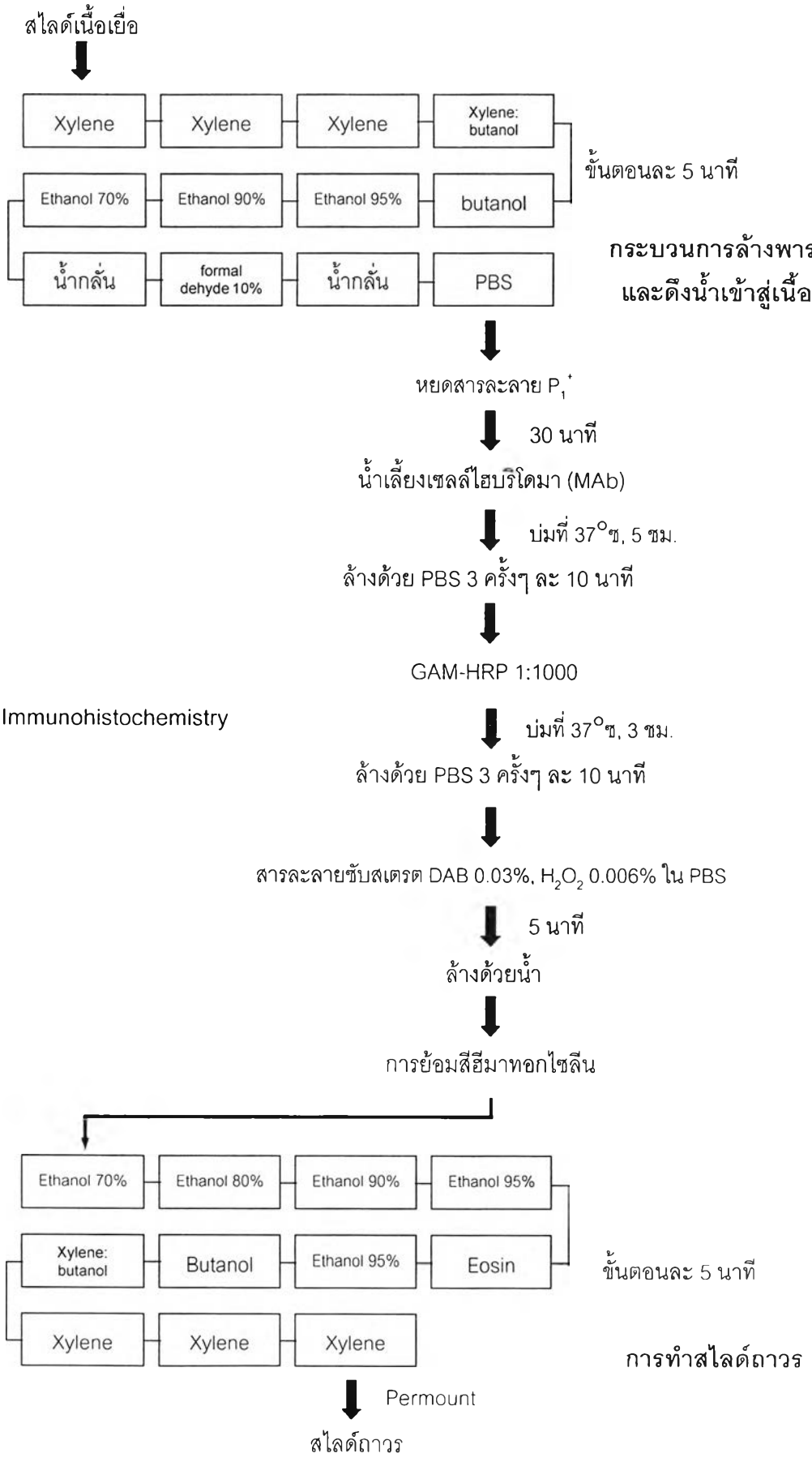
รูปที่ 3.2 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี Dot blotting (Sithigorngul และคณะ,2000)



รูปที่ 3.3 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ Western blotting ปฏิกิริยาข้ามด้วย Dot blotting และ Immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ (Sithigorngul และคณะ, 2000)



รูปที่ 3.4 แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำสำหรับการวิเคราะห์ Immunohistochemistry (IHC) (Sithigorngul **และคณะ**, 2000)



รูปที่ 3.5 แผนผังการเตรียม IHC ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ (Sithigorngul และคณะ, 1999)

3.4.8 **การโคลนด้วยวิธี** limited dilution (ดัดแปลงจาก Spinger, 1986)

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

3.4.9 **การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา**

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร RPMI 1640 ที่เสริมด้วย fetal bovine serum 20% กระจายและดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอด ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกจากเซลล์ไฮบริโดมาและเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป จากนั้นเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12% (DMSO) 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดสำหรับเซลล์แช่แข็ง (cryopreservation tube) เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°ซ)

3.4.10 **การพิสูจน์เอกลักษณ์แอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี**

3.4.10.1 **การวิเคราะห์** Western blotting

นำแอนติเจนในรูปแบบคงสภาพและโปรตีนมาตรฐานมาแยกใน SDS-PAGE 15% โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ แบ่งเจลส่วนที่มีโปรตีนมาตรฐานไปย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 0.1% และนำเจลอีกส่วนมาย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน blotto 5% เป็นเวลา 30 นาที ตัดแบ่งแล้วบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:200 ใน blotto 1%) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03%, H_2O_2 0.006% และ $CoCl_2$ 0.05% ใน PBS ตรวจสอบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

3.4.10.2 **การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี** Dot blotting

นำแอนติเจนและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml ในรูปแบบคงสภาพมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยอบที่ 60°ซ 10 นาที จากนั้นแช่ใน blotto 5% เป็นเวลา 30 นาที บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:200 ใน blotto 1%) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03%, H_2O_2 0.006% และ $CoCl_2$ 0.05% ใน PBS ตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จากจุดสีดำ

3.4.10.3 **การวิเคราะห์การติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี** Immunohistochemistry

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาล้างพาราฟินออกในไซลีน และผ่านกระบวนการเติมน้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลิน 10% ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และหยดสารละลาย P_1^+ (calf bovine serum 10% ใน PBS) คลุมเนื้อเยื่อ เก็บในกล่องเก็บความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาหยดคลุมเนื้อเยื่อบนสไลด์ บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03% และ H_2O_2 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีด้วยอีโอซีน ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลเป็นบวกจะติดสีน้ำตาล

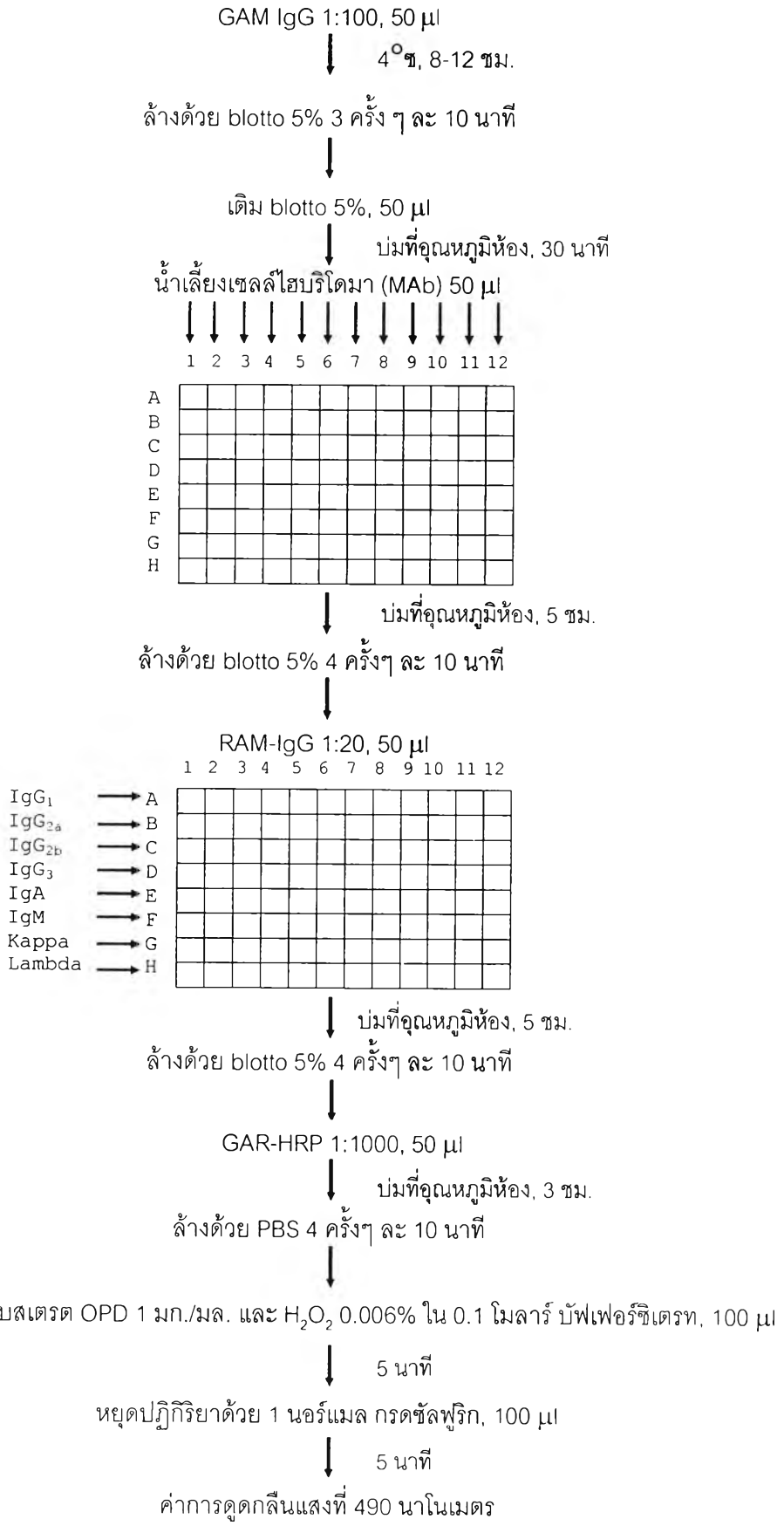
3.4.10.4 **การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี** Dot blotting

นำแอนติเจนที่เจือจางแบบ serial dilution ใน PBS มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด ทำให้แห้งโดยอบที่ 60°ซ 10 นาที แช่ในสารละลาย blotto 5% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (เจือจาง 1:200 ใน blotto 1%) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต DAB 0.03%, H_2O_2 0.006% และ $CoCl_2$ 0.05% ใน PBS ตรวจสอบจุดสีดำที่เกิดขึ้น โดยความเข้มข้นของแอนติเจนน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดจุดสีดำจะเป็นค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้วิเคราะห์

3.4.11 **การตรวจจำแนก** isotype **และ** subisotype **ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี**

วิเคราะห์ด้วยวิธี sandwich ELISA และใช้ sub-isotyping kit จาก Zymed Laboratories จำแนกโดยเคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วย GAM-IgG (goat anti-mouse

IgG) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย blotto 0.5% หลุมละ 150 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม blotto 5% หลุมละ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:50 ใน blotto 5% แถวละ 1 ชนิด (1-12) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย blotto 5% หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติม rabbit anti-isotype antibodies (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, λ และ κ) เจือจาง 1:20 ใน blotto 5% แถวละ 1 ชนิด (A-H) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย blotto 5% หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม GAR-HRP (goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต OPD (O-phenelenediamine dihydrochloride) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ H_2O_2 0.006% ใน 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ซิเตรท หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 นอร์แมล กรดซัลฟูริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลโดยสังเกตสีที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม หรืออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจะให้มีเข้ม 1 หลุมตาม isotype และอีก 1 หลุมตามชนิดของโปรตีนสายสั้น (light chain) (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 แผนผังการตรวจจำแนก isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Winotaphan และคณะ, 2005)

3.4.12 การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

เคลือบ microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ด้วยเซลล์แอนติเจน (*V. vulnificus* และ *V. mimicus*) ที่ทำให้แตกโดยวิธี sonicate หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย blotto 5% หลุมละ 150 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม blotto 5% หลุมละ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:10 ใน blotto 5% รวมหลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยเติมในแถวแนวนอนและแนวตั้ง จากซ้ายไปขวา (ตารางที่ 3.3) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย blotto 5% หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม GAM-HRP เจือจาง 1:1500 ใน blotto 5% หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างด้วย PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต OPD 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ H_2O_2 0.006% ใน 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ซิเตรท หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 นอร์แมล กรดซัลฟูริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

ตารางที่ 3.3 การเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีผสมสำหรับการวิเคราะห์อิพิโทป

MAbs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	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		2+2	2+3	2+4	2+5	2+6	2+7	2+8	2+9	2+10	2+11	2+12
3			3+3	3+4	3+5	3+6	3+7	3+8	3+9	3+10	3+11	3+12
4				4+4	4+5	4+6	4+7	4+8	4+9	4+10	4+11	4+12
5					5+5	5+6	5+7	5+8	5+9	5+10	5+11	5+12
6						6+6	6+7	6+8	6+9	6+10	6+11	6+12
7							7+7	7+8	7+9	7+10	7+11	7+12
8								8+8	8+9	8+10	8+11	8+12
9									9+9	9+10	9+11	9+12
10										10-10	10-11	10-12
11											11+11	11-12
12												12-12