



การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบพิษของเชื้อ *Vibrio*  
*parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับผู่เฉียบพลัน (AHPND)

MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION FOR DETECTION OF TOXINS FROM *Vibrio*  
*parahaemolyticus* CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE  
(AHPND)

ธมลวรรณ พูลสมบูรณ์ผล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิ่นของเชื้อ *Vibrio*  
*parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน (AHPND)



ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION FOR DETECTION OF TOXINS FROM *Vibrio*  
*parahaemolyticus* CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE  
(AHPND)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาบัตร

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิมของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่  
ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน (AHPND)

ของ

ธมลวรรณ พูลสมบุญผล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร

ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ)

ชื่อเรื่อง	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซินของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน (AHPND)
ผู้วิจัย	ธมลวรรณ พูลสมบุญผล
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์

โรคตับฝ่อเฉียบพลันเกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. บางไอโซเลตที่สร้างที่อกซิน A และ B เข้าไปทำลายตับและตับอ่อนของกุ้ง ทำให้เกิดการตายของกุ้งได้อย่างรวดเร็ว สร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นการพัฒนาวีธีที่รวดเร็ว แม่นยำ และตรวจสอบได้ครวละหลายตัวอย่าง เพื่อใช้ตรวจสอบที่อกซินของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันจึงมีบทบาทสำคัญที่ช่วยให้การควบคุมโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลและพอลิโคลนอลแอนติบอดีและนำมาพัฒนาเพื่อตรวจสอบที่อกซินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยเทคนิค sandwich ELISA โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A และ B ปฏิกิริยาคู่กันในกระต่ายเพื่อผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี และปฏิกิริยาคู่กันในหนูขาวเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จำนวน 4 โคลนมีความจำเพาะต่อที่อกซิน B โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ร่วมกันในเทคนิค sandwich ELISA เพื่อตรวจสอบที่อกซิน B พบว่าปริมาณที่อกซิน B ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection) อยู่ที่ 1.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค เมื่อทดสอบวัดปริมาณที่อกซิน B ที่เติมลงไปในตัวอย่างเนื้อกุ้งพบว่า %recovery อยู่ในช่วง 87-105% และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกิน 15% และเมื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบที่อกซินหลังการบ่มเชื้อในอาหารที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อความเข้มข้น 1 CFU ต่อมิลลิลิตรได้หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับเวลาบ่มเชื้อที่แนะนำโดยกรมประมง ดังนั้นเทคนิค sandwich ELISA สำหรับตรวจสอบและวัดปริมาณที่อกซิน B นี้จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและป้องกันการระบาดของโรคตับฝ่อเฉียบพลันในกุ้งต่อไปได้

คำสำคัญ : โรคตับฝ่อเฉียบพลัน, ที่อกซิน A, ที่อกซิน B, sandwich ELISA

Title	MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION FOR DETECTION OF TOXINS FROM <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND)
Author	TAMONWAN PULSOMBULPOL
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Associate Professor Siwaporn Longyant , Ph.D.

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is caused by toxin A and B-secreting *Vibrio* spp., and leading to the rapid mortality of shrimp from hepatopancreatic cell sloughing, resulting in significant losses in the shrimp industry. An accurately, precisely and high throughput detection method could be an important tool for the effective control of AHPND outbreaks. Therefore, this study aimed to produce monoclonal and polyclonal antibody (MAb and PAb), then used in a sandwich ELISA (sELISA) for the detection of AHPND-causing toxins of *V. parahaemolyticus* (VP<sub>AHPND</sub>). In this study, recombinant proteins of toxin A and B were used to immunize rabbits and Swiss mice for PAb and MAb production. The four selected clones of MAbs specific to toxin B without cross-reactivity to non-AHPND bacteria. These PAb and MAb were used to develop a sELISA method to detect toxin B of *V. parahaemolyticus* with a limit of detection at 1.1 ng/ml without cross-reactivity. The detection of toxin B in spiked shrimp samples showed recovery between 87-105% and coefficient of variation below 15%. After six hours of pre-enrichment of spiked-shrimp samples, the recommended timing from the Thai Department of Fisheries, this sELISA method could detect 1 CFU/ml of VP<sub>AHPND</sub>. Thus, a sELISA developed from MAb and PAb in this study could be used to detect and evaluate toxin B of VP<sub>AHPND</sub> and might be a useful tool in further study for more understanding and preventing losses from AHPND outbreaks.

Keyword : AHPND, Toxin A, Toxin B, sandwich ELISA

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำและการดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจากรองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ผู้สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเล่าเรียน และเสียสละเวลาในการอบรม ตักเตือนชี้แนะ และให้ความรู้ทั้งในด้านวิชาการและด้านจริยธรรมประกอบการทำปริญญาานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ ดร.ธนวรรณ เตชางกูร และรองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธางกูร ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ รวมทั้งได้ให้คำแนะนำสำหรับการปรับปรุงปริญญาานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.ประติษฐ์ หวังมาน ผู้ซึ่งคอยให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหา ถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และเทคนิคต่างๆ ทั้งในการทำงานในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนงานการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา ส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ผู้วิจัยได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร.ชลธิชา จินาพร คุณนันต์ธวุฒิ พลภักดี พี่น้อง และเพื่อนทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโคลอนอลแอนติบอดีและภาควิชาชีววิทยา สำหรับมิตรภาพ การสนับสนุน การแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ และน้ำใจอันดีเยี่ยมที่มีให้แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณครอบครัวอันเป็นที่รัก เพื่อนๆ และผู้คนรอบตัวที่เป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดัน คอยให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอผลประโยชนอันเกิดจากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ อุทิศเป็นกุศลแก่สัตว์ทดลองที่ได้สละชีวิตเพื่อการศึกษาและการทำปริญญาานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ธมลวรรณ พูลสมบูรณ์ผล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพประกอบ .....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง .....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย .....	4
ความสำคัญของการวิจัย .....	5
ขอบเขตของการวิจัย .....	5
สมมติฐานในการวิจัย .....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
กุ้งขาว.....	6
กุ้งขาว หรือกุ้งขาวแวนนาไม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ .....	6
ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว .....	6
วงจรชีวิตของกุ้งขาว .....	8
การเพาะเลี้ยงและโรคในกุ้งขาว .....	9
ภูมิหลังโรคตับฝ่อเฉียบพลัน.....	11



ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกุ้งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน .....	13
สาเหตุของโรคตับฝ่อเฉียบพลัน.....	15
โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน .....	17
โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน B .....	19
โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน A .....	20
การวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลัน .....	25
1. การสังเกตอาการภายนอก (ระดับ I) .....	26
2. การวินิจฉัยจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (ระดับ II) .....	26
3. การวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (ระดับ III).....	26
3.1 การตรวจด้วยวิธี PCR .....	26
3.2 การตรวจด้วยวิธี LAMP.....	27
3.3 การตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน .....	29
4. การทดสอบทางชีวภาพ.....	29
4.1 การแช่ (immersion) .....	29
4.2 การป้อน (per os) .....	30
4.3 การฉีด (reverse gavage assay).....	30
โมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	30
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	31
พอลิโคลนอลแอนติบอดี .....	32
Enzyme-linked immunosorbent assay .....	33
1. Direct ELISA .....	33
2. Indirect ELISA.....	34
3. Competitive ELISA.....	34

4. Sandwich ELISA .....	34
การประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA.....	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	42
แบคทีเรียและสัตว์ทดลอง.....	42
เครื่องมือ.....	44
สารเคมี.....	45
วิธีดำเนินการทดลอง .....	47
1. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนที่ออกซิน A และ B .....	48
2. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B.....	48
3. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B .....	49
4. การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B ให้บริสุทธิ์.....	49
5. การเตรียมแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดสอบความจำเพาะ .....	50
6. การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของพอลิโคลนอนแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ที่ออกซิน A และ B โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในระยะตาย .....	50
6.1 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอนแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting .....	51
6.2 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอนแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting.....	51
7. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอนแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซินของเชื้อ V. parahaemolyticus ที่ก่อโรค AHPND .....	52
7.1 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A หรือ B.....	52
7.2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา.....	52
7.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา .....	53
7.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting .....	53
7.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting .....	53

7.3.3 การคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blotting .....	54
7.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution.....	54
8. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	55
8.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA .....	55
8.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	56
8.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting .....	58
8.4 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting .....	58
8.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting....	58
9. การพัฒนาวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .	59
9.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	59
9.2 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิโคลนอลแอนติบอดีและ โมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับวิธี sandwich ELISA.....	59
9.3 วิธี sandwich ELISA เพื่อตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .....	59
9.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน .....	60
9.5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี sandwich ELISA ที่ใช้สำหรับตรวจสอบ ที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .....	61
9.5.1 การทดสอบความไวของวิธี sandwich ELISA.....	61
9.5.2 การทดสอบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้ามของวิธี sandwich ELISA .....	62
9.5.3 การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของวิธี sandwich ELISA .....	62
9.6 การตรวจสอบโปรตีนที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง .....	63

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย .....	64
1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A และ B .....	64
2. การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน A และ B โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่าย .....	66
3. การผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซินของเชื้อ V. parahaemolyticus ที่ก่อโรค AHPND .....	69
3.1 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว .....	69
3.2 การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	71
4. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	74
4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA .....	74
4.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	75
4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting .....	77
5. การพัฒนาวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .....	79
5.1 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการ ตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .....	79
5.2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของ เชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .....	81
5.3 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ sandwich ELISA ที่ใช้สำหรับตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> .....	82
5.3.1 การทดสอบความไวของวิธีการ sandwich ELISA .....	82
5.3.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของวิธีการ sandwich ELISA .....	83
5.3.3 การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการ sandwich ELISA .....	87
5.3.4 การตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง .....	88

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ ..... 91

    บรรณานุกรม ..... 97

    ภาคผนวก ..... 105

    ประวัติผู้เขียน ..... 126



## สารบัญตาราง

### หน้า

ตาราง 1	สรุปการศึกษาสายพันธุ์กลายของ <i>V. parahaemolyticus</i> .....	24
ตาราง 2	แสดงวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน .....	28
ตาราง 3	ข้อดีและข้อเสียของเทคนิค ELISA .....	37
ตาราง 4	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของ ELISA รูปแบบต่างๆ .....	38
ตาราง 5	แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี .....	42
ตาราง 6	ค่าดูดกลืนแสงจากการตรวจสอบอิมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ด้วยวิธี indirect ELISA .....	74
ตาราง 7	สรุปคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> ที่ผลิตได้ ซึ่งทดสอบโดยวิธี dot blotting และ Western blotting .....	78
ตาราง 8	แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ .....	80
ตาราง 9	แสดงค่าที่ได้จากการทดสอบความไวของวิธีการ sandwich ELISA .....	82
ตาราง 10	แสดงการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของวิธีการ sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้น .....	85
ตาราง 11	ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและแม่นยำแบบ intra-assay .....	87
ตาราง 12	ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและแม่นยำแบบ inter-assay .....	88
ตาราง 13	ผลการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี sandwich ELISA หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง ที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ .....	90
ตาราง 14	การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง ด้วยวิธี sandwich ELISA และวิธี dot blotting .....	90

## สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ลักษณะทั่วไปของกึ่งขาว .....	7
ภาพประกอบ 2 ภาพวาดลักษณะทั่วไปของกึ่งขาว .....	7
ภาพประกอบ 3 วงจรชีวิตของกึ่งขาว .....	8
ภาพประกอบ 4 แสดงขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงกึ่ง .....	10
ภาพประกอบ 5 ลักษณะภายนอกของกึ่งขาวที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน.....	12
ภาพประกอบ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกึ่งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน.....	14
ภาพประกอบ 7 แสดงการแบ่งประเภทของยีนต่างๆ ที่พบบนพลาสมิด pVA1 .....	16
ภาพประกอบ 8 แสดงโครงสร้างสามมิติของท็อกซิน A (PirA <sup>VP</sup> ) และท็อกซิน B (PirB <sup>VP</sup> ).....	18
ภาพประกอบ 9 เปรียบเทียบโครงสร้างระหว่างท็อกซิน Cry ของ <i>B. thuringiensis</i> กับท็อกซิน A และ B ของ <i>V. parahaemolyticus</i> .....	21
ภาพประกอบ 10 แผนผังของการวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลัน.....	25
ภาพประกอบ 11 หลักการของ ELISA รูปแบบต่างๆ .....	35
ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบอิมูโนโพรตีนของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	56
ภาพประกอบ 13 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA .....	57
ภาพประกอบ 14 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA .....	57
ภาพประกอบ 15 การตรวจสอบการแสดงออกและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนท็อกซิน A และ B ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	65
ภาพประกอบ 16 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้.....	67
ภาพประกอบ 17 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี dot blotting .....	68

ภาพประกอบ 18 การทดสอบแอนติซีรัมจากหนู โดยวิธี Western blotting .....	70
ภาพประกอบ 19 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน B ชั้นที่ 2 .....	72
ภาพประกอบ 20 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Western blotting.....	73
ภาพประกอบ 21 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting ....	76
ภาพประกอบ 22 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี dot blotting.....	77
ภาพประกอบ 23 กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของ ไรคอมปิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B (●) กราฟมาตรฐาน (▲) สมการเส้นตรง และค่า R <sup>2</sup> .....	81
ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบที่อกซิน B จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี sandwich ELISA.....	83
ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงหลังตัดค่า blank ออกจากแต่ละตัวอย่างของการตรวจสอบที่อกซิน B จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี sandwich ELISA.....	84
ภาพประกอบ 26 การตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> หลังบ่มเชื้อในอาหาร TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง ด้วยวิธี dot blotting .....	89



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง ได้รับความนิยมนำทั่วโลก รวมไปถึงประเทศในแถบเอเชียและประเทศไทย ซึ่งเป็นหนึ่งในประเทศผู้ผลิตกุ้งหลักของโลก (Briggs, 2021) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตกุ้งทะเลสายพันธุ์ *Penaeus vannamei* หรือกุ้งขาว ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน 80% ของผลผลิตกุ้งทั่วโลก (Dugassa & Gaetan, 2018) จากรายงานของกรมประมง ปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งทะเล 149,490.99 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 4 หมื่นล้านบาท โดยมีการส่งออกกุ้งขาวเป็น 76% หรือมูลค่ากว่า 3 หมื่นล้านบาท (จิตรลดา ศรีตระกูล และพัชรินทร์ ลังกาปอน, 2563) อย่างไรก็ตามการขยายตัวอย่างรวดเร็วของฟาร์มกุ้ง การเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น ความแปรปรวนของสภาพอากาศและสภาพแวดล้อม อาจเป็นผลให้เกิดการแพร่กระจายของโรคในกุ้งมาตั้งแต่เริ่มมีการทำฟาร์มกุ้งกันอย่างแพร่หลาย โดยโรคบางชนิดก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง เช่น โรคจุดขาว (white spot disease) (Lo & Kou, 1998) โรคหัวเหลือง (yellow head disease) (Cowley et al., 1999) โรคกล้ามเนื้อตายจากการติดเชื้อไวรัส (infectious myonecrosis) (Lightner, Redman, Pantoja, Noble, & Tran, 2012) การติดเชื้อ covert mortality nodavirus (CMNV) (Zhang et al., 2014) การติดเชื้อ microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) (Tourtip et al., 2009) และโรคตับผื่นเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND) ที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013) เป็นต้น

สำหรับโรคตับผื่นเฉียบพลันเป็นโรคที่ทำให้เกิดการตายของกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ในฟาร์มเพาะเลี้ยงได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง (Han, Tang, Aranguren, & Piamsomboon, 2017) ทำให้เกษตรกรไม่สามารถเก็บเกี่ยวกุ้งหรือจัดการฟาร์มได้ทัน ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งอย่างมาก โดยในประเทศไทยมีผลผลิตของกุ้งลดลงมากกว่า 400,000 เมตริกตัน ในช่วงที่มีการระบาดของโรค (Thitamadee et al., 2016) การระบาดของโรคนี้เริ่มพบในปี ค.ศ. 2009 ในประเทศจีน และกระจายไปยังเวียดนามในปี 2010 มาเลเซียในปี 2011 ประเทศไทยในปี 2012 (Tran et al., 2013) และแพร่ระบาดไปยังประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชียและอเมริกาใต้ (Soto-Rodriguez, Gomez-Gil, Lozano-Olivera, Betancourt-Lozano, & Morales-Covarrubias, 2015) ในปี 2013 Tran และคณะ ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากกึ่งที่เป็นโรคจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค และนำเชื้อไปทดสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) ในกึ่งปกติ พบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดโรคตับฝ่อเฉียบพลันที่แยกได้นี้คือ *V. parahaemolyticus* ที่สามารถสร้างที่อกซินที่ทำให้เกิดการหลุดลอกของเซลล์บุท่อในตับ (hepatopancreatic tubule epithelial cell) ของกึ่ง ลักษณะของกึ่งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน แสดงอาการเซื่องซึม มีทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) ที่ว่างเปล่าและเป็นสีขาวยืด มีการฝ่อของตับและตับอ่อน เมื่อตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาพบการตายของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน และการหลุดลอกของเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อน (necrotic sloughing) ไม่พบเซลล์ปกติในตับ และตับอ่อนของกึ่ง ได้แก่ เซลล์ B เซลล์ F และเซลล์ R ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการย่อย ดูดซึม สะสม และลำเลียงสารอาหารในกึ่ง พบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemolytic infiltration) ที่บริเวณโดยรอบของเซลล์ที่เกิดการหลุดลอก เซลล์บุท่อบางเซลล์มีการขยายตัวของนิวเคลียส (karyomegaly) และมักพบการบุกรุกของแบคทีเรียในช่องว่าง (lumen) ของท่อของตับและตับอ่อนในระยะท้ายของการเป็นโรค (Tran et al., 2013)

ต่อมาในปี 2014 และ 2015 มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันเปรียบเทียบกับ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน พบว่าในทุกไอโซเลตที่ก่อโรคมียาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในตระกูล pVH ที่มีขนาดประมาณ 6,900 คู่เบส ในขณะที่ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรคไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดนี้ (Han, Tang, Tran, & Lightner, 2015; Yang et al., 2014) และจากการศึกษาของ Han และคณะ พบว่าบนพลาสมิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสได้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin ที่เป็นที่อกซินซึ่งหลั่งโดยแบคทีเรียในลำไส้ของหนอนตัวกลมที่ทำให้เกิดการตายในแมลง จึงมีการตั้งชื่อที่อกซินจาก *V. parahaemolyticus* นี้ว่า Pir-like toxin ซึ่งที่อกซินทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีน *pirA*-like และ *pirB*-like โดยโปรตีนที่อกซิน A ถอดรหัสมาจากยีน *pirA*-like (336 คู่เบส) มีขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตัน ในขณะที่โปรตีนที่อกซิน B ถอดรหัสมาจากยีน *pirB*-like (1317 คู่เบส) มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน (Han et al., 2015; Yang et al., 2014) และจากการศึกษาของ Sirikharin และคณะ ได้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) เพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของที่อกซิน A และ B เพื่อศึกษาคูณสมบัติในการก่อโรคของสารพิษทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเกิดโรคตับฝ่อเฉียบพลันในกึ่งต้องอาศัยทั้งที่อกซินชนิด A และ B ร่วมกัน จึงทำให้เกิดพยาธิสภาพของการหลุดลอกของเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อน และเกิดการตายของกึ่งได้ (Sirikharin et al., 2015) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ

Lee และคณะในปีเดียวกันพบว่าที่อกซิน B เพียงอย่างเดียวก็สามารถชักนำให้เกิดการหลุดลอกของเซลล์บุท่อตับและตับอ่อนซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของโรคตับฝ่อเฉียบพลันได้ (Lee et al., 2015)

จากสถานการณ์ดังกล่าวทำให้การพัฒนาวิธีที่ถูกต้อง รวดเร็ว แม่นยำ และตรวจสอบได้ คราวละหลายตัวอย่าง เพื่อใช้ตรวจสอบที่อกซินของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน น่าจะมีบทบาทสำคัญที่ช่วยให้การควบคุมโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับวิธีการตรวจโรคตับฝ่อเฉียบพลันมีวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือการตรวจทางชีวโมเลกุล (molecular-based assay) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อก่อโรคและที่อกซินที่เป็นสาเหตุของโรค ตัวอย่างเช่น วิธี AP3 ซึ่งเป็นการตรวจสอบยีนที่สร้างที่อกซิน A (Sirikharin et al., 2015) หรือวิธี AP4 nested PCR ที่เป็นการตรวจสอบที่ครอบคลุมยีนที่สร้างที่อกซิน A และ B (Sritunyalucksana et al., 2015) ถึงแม้การตรวจโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลจะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีความไวสูง และให้ผลการตรวจที่ค่อนข้างแม่นยำสูง แต่ก็อย่างไรก็ตามมีการพบสายพันธุ์กลายของ *V. parahaemolyticus* ที่สูญเสียความสามารถในการก่อโรค โดยพบว่าบนพลาสมิดของสายพันธุ์กลายที่พบนั้น เกิดการ deletion หรือ insertion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างที่อกซิน ส่งผลให้บางไอโซเลตของเชื้อสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมได้ แต่อาจไม่มีการถอดรหัสสารพันธุกรรมออกมาเป็นโปรตีนที่อกซินที่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันหรือทำให้กุ้งตายได้ สายพันธุ์กลายดังกล่าวจึงอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อได้ ทั้งนี้การพัฒนากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนหรือตรวจสอบโปรตีนที่อกซินควบคู่ไปกับการตรวจสอบสารพันธุกรรม น่าจะเป็นเครื่องมือสำคัญที่จะช่วยให้การวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันมีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากขึ้นได้ (Aranguren Caro, Mai, Kanrar, Cruz-Flores, & Dhar, 2020; Han et al., 2017) ดังนั้นวิธีการตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) หรือการตรวจโดยใช้แอนติบอดี (antibody-based assay) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจที่มีราคาไม่สูง ปฏิบัติได้ไม่ยาก มีความจำเพาะสูง และมีความไวเพียงพอที่สามารถใช้ในการตรวจติดตามโรคติดเชื้อต่างๆ โดยในปี 2017 มีรายงาน ว่า Wangman และคณะ ได้ทำการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อที่อกซิน A ได้จำนวน 1 โคลน และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อที่อกซิน B ได้จำนวน 2 โคลน โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันได้ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อชนิดอื่นๆ ที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

(Wangman et al., 2017) และจากความรู้เกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ทัอกซิน A และ B ของ *V. parahaemolyticus* ทำให้สามารถสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ทัอกซินได้ (Sirikharin et al., 2015) การผลิตทัอกซินจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนนี้ น่าจะสามารถ นำมาใช้ปลูกภูมิคุ้มกันเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อทัอกซินที่ ต้องการ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาตรวจวินิจฉัยโรคตับผ้อเฉียบพลันได้ โดยวิธีการตรวจด้วย เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันหรือการตรวจโดยใช้แอนติบอดีที่น่าสนใจวิธีหนึ่งคือการใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ มีความไวสูง โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ซึ่งข้อได้เปรียบของเทคนิค ELISA คือมีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถตรวจตัวอย่างได้ คราวละหลายๆ (Duong et al., 2021; B. K. Kumar et al., 2011; Li et al., 2019; Mai, Cruz-Flores, & Dhar, 2020) ซึ่งน่าจะทำให้สามารถลดต้นทุนและระยะเวลาในการตรวจตัวอย่าง จำนวนมากลงได้ ทำให้สามารถตรวจสอบและรายงานผลให้กับฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ซึ่งต้องมีการสุ่ม ตัวอย่างคราวละหลายๆ เพื่อเป็นข้อมูลให้เกษตรกรตัดสินใจในการจัดการฟาร์มได้ทันสถานการณ์ นอกจากนี้เทคนิค ELISA ยังสามารถออกแบบให้ตรวจวัดปริมาณสารที่ต้องการตรวจสอบได้ จึงอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษเกี่ยวกับโรคตับผ้อเฉียบพลันต่อไปได้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อทัอกซินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับผ้อเฉียบพลันเพิ่มเติม โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของทัอกซิน A และ B เป็นแอนติเจนสำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนู และกระต่าย และทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะและความไวสูง สำหรับ ใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคตับผ้อเฉียบพลัน ด้วยเทคนิค sandwich ELISA ต่อไป

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนทัอกซิน A และ B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับผ้อเฉียบพลัน
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทัอกซิน ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับผ้อเฉียบพลัน
3. เพื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้พัฒนาวิธีการตรวจสอบทัอกซินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับผ้อเฉียบพลันด้วยเทคนิค sandwich ELISA

### ความสำคัญของการวิจัย

เทคนิค sandwich ELISA สำหรับตรวจสอบที่อกซิทินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบและวัดปริมาณของที่อกซิทิน เพื่อประโยชน์ในการศึกษาและป้องกันการระบาดของโรคตับฝ่อเฉียบพลันในกุ้งต่อไป

### ขอบเขตของการวิจัย

1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิทิน A และ B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวและกระต่าย
2. เก็บแอนติซีรัมของกระต่ายนำไปแยกเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ทำการทดสอบความจำเพาะและความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting และ dot blotting
3. คัดเลือกหนูขาวตัวที่ตอบสนองดีที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา
4. คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิทินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน โดยวิธี dot blotting และ Western blotting
5. ทดสอบทราบคุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทป การจำแนก class และ subclass รวมทั้งความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้
6. พัฒนาวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบโปรตีนที่อกซิทินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

### สมมติฐานในการวิจัย

การใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของที่อกซิทิน A หรือ B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นหนูขาวและกระต่าย อาจทำให้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิทินดังกล่าวได้ และสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ มาใช้พัฒนาวิธี sandwich ELISA สำหรับใช้ในการตรวจสอบโปรตีนที่อกซิทินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### กุ้งขาว

กุ้งขาว หรือกุ้งขาวแวนนาไม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* ชื่อสามัญ Pacific white shrimp, white leg shrimp และ white shrimp

#### อนุกรมวิธาน

Perez และ Kensley (1997) ได้จัดจำแนกอนุกรมวิธานของกุ้งขาวไว้ดังนี้

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Dendrobranchiata
Family	Penaeidae
Genus	<i>Litopenaeus</i>
Species	<i>P. vannamei</i> (Boone, 1931)

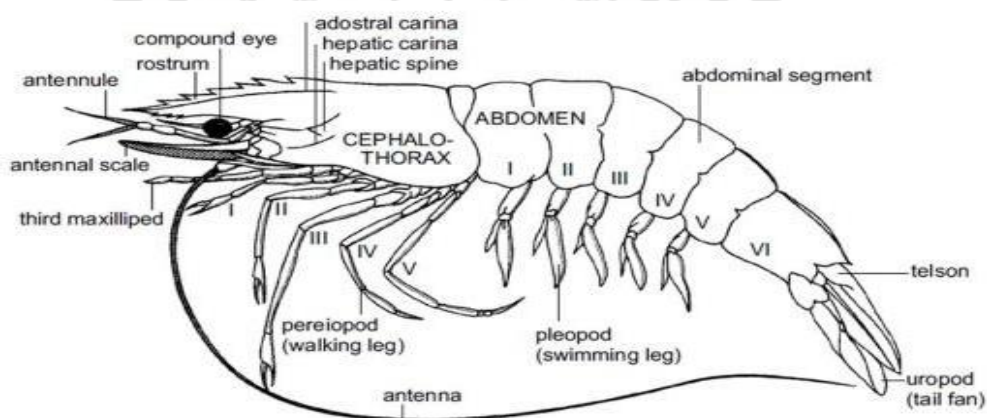
#### ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

กุ้งขาวเป็นกุ้งพื้นเมืองทางชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก โดยทั่วไปอาศัยอยู่ในน้ำเค็ม ลักษณะทั่วไปคล้ายกับกุ้งในตระกูล Penaeid ตัวสีขาวใส ขาสีขาว ร่างกายแบ่งออกเป็น ส่วนหัวเชื่อมกับอก (cephalothorax) มีเปลือกคลุมเป็นส่วนเดียว และส่วนท้อง (abdomen) มีเปลือกคลุมแบ่งเป็นปล้องจำนวน 6 ปล้อง ทางด้านหน้าของส่วนหัวมีกรีที่มีลักษณะนุ่มเล็กน้อย สันกรีบบน (dorsal rostrum) มีหยักประมาณ 7-10 ซี่ สันกรีล่าง (ventral rostrum) มีหยักประมาณ 1-3 ซี่ ไรยงค์ส่วนหัวประกอบด้วยหนวด 2 คู่ (antennule & antenna) ขากรรไกรล่าง (mandible) 1 คู่ และขากรรไกรบน (maxilla) 2 คู่ ไรยงค์ส่วนอกประกอบด้วย maxilliped 3 คู่ ขาเดิน (pereopod) 5 คู่ ไรยงค์ส่วนท้องประกอบด้วยขาว่ายน้ำ (pleopod) 5 คู่ แพนหาง (uropod) 2 คู่ และปลายหาง (telson) (Bailey-Brock & Moss, 1992) ดังภาพประกอบ 1 และ 2



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wakida-Kusunoki, A. T., Amador-del Angel, L. E., Alejandro, P. C., & Brahm, C. Q. (2011). Presence of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in the Southern Gulf of Mexico. *Aquatic Invasions*, 6(1), S139-S142.

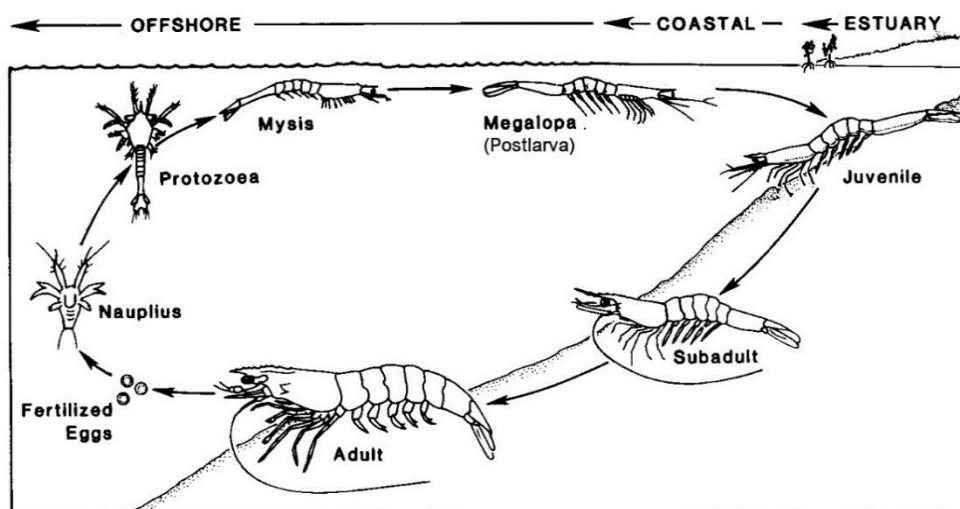


ภาพประกอบ 2 ภาพวาดลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

ที่มา: Sucharitha, V., & Jyothi, S. (2013). An identification of penaeid prawn species based on histogram values. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, 3(7), 807-811.

### วงจรชีวิตของกุ้งขาว

กุ้งขาวตัวเต็มวัย (adult) อาศัยและวางไข่ในทะเล กุ้งที่มีอายุประมาณ 6-7 เดือนเพศผู้มี น้ำหนักประมาณ 20 กรัมขึ้นไป และเพศเมียมีน้ำหนักประมาณ 28 กรัมขึ้นไป กุ้งขาวที่มีน้ำหนัก ประมาณ 30-45 กรัม สามารถวางไข่ได้ประมาณ 100,000-250,000 ฟอง โดยไข่จะฟักเป็นตัว ภายในระยะเวลาประมาณ 16-24 ชั่วโมง กุ้งตัวอ่อน (larva) ในระยะแรกหลังฟักเรียกว่า nauplius เป็นระยะที่ยังไม่กินอาหาร แต่อาศัยสารอาหารจากไข่แดง (yolk) และเจริญไปเป็นตัวอ่อนในระยะ ถัดไป ได้แก่ระยะ protozoa และ mysis ตามลำดับ กุ้งในระยะนี้จะกินแพลงก์ตอนพืชและ แพลงก์ตอนสัตว์ ก่อนเริ่มเข้าใกล้ชายฝั่งเพื่อพัฒนาเป็นกุ้งระยะหลังวัยอ่อน (postlarva; PL) กุ้งวัยรุ่น (juvenile) และกุ้งระยะก่อนเต็มวัย (subadult) ตามลำดับ ซึ่งจะเริ่มกินอาหารบนหน้า ดิน ได้แก่ หนอน หอย และสัตว์ในตระกูล crustacean ต่างๆ (Bailey-Brock & Moss, 1992; Briggs, 2021) วงจรชีวิตของกุ้งขาวแสดงดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 วงจรชีวิตของกุ้งขาว

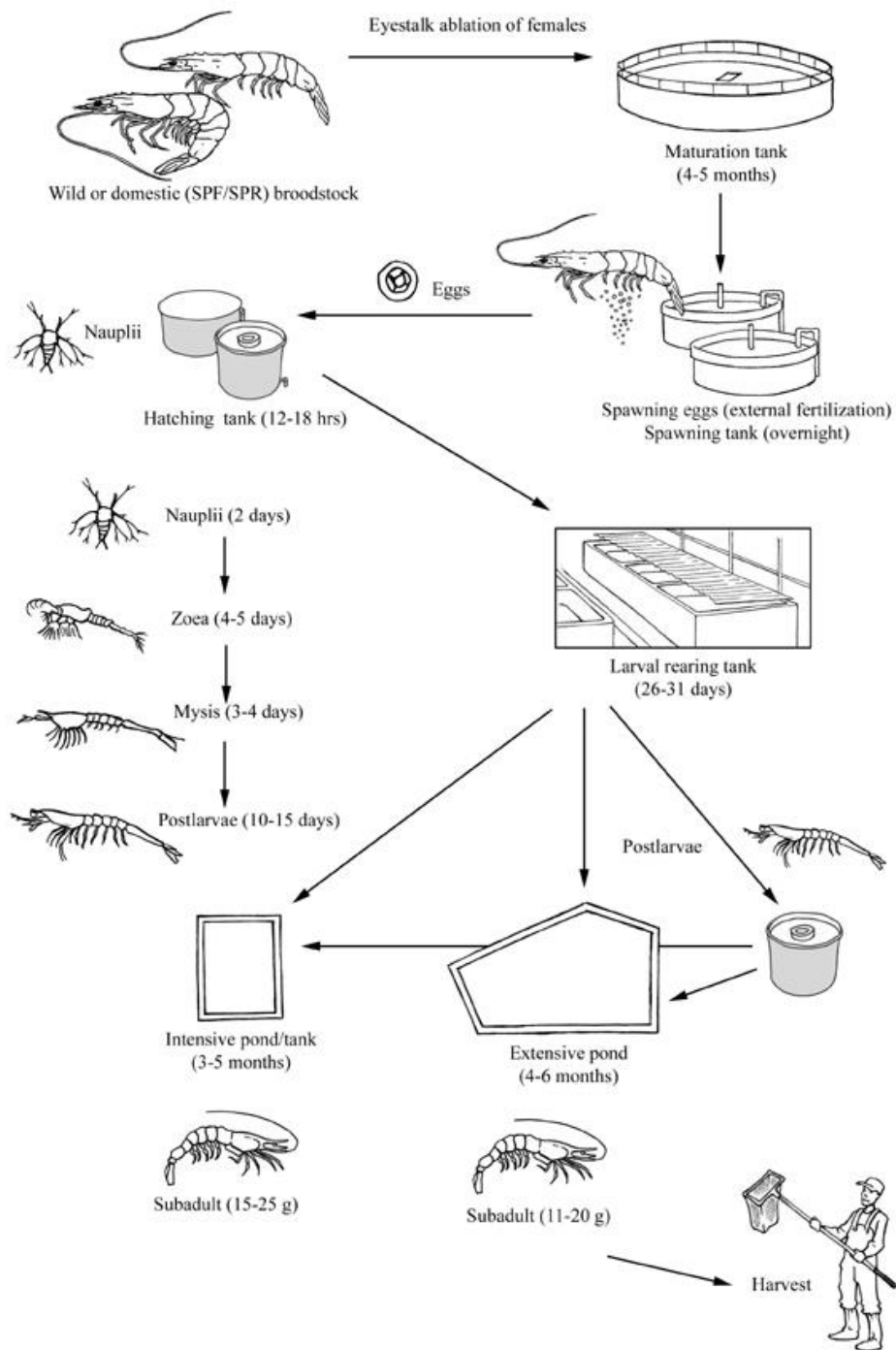
ที่มา : ดัดแปลงจาก Bailey-Brock, J.H., & Moss, S. M. (1992). Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. *Developments In Aquaculture And Fisheries Science*, 23, 9-27.



### การเพาะเลี้ยงและโรคในกุ้งขาว

การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเริ่มจากการนำพ่อแม่พันธุ์ (broodstock) มาเลี้ยงให้เจริญเติบโต ทำการผสมภายนอก (external fertilization) และให้แม่พันธุ์วางไข่ในบ่อวางไข่ (spawning tank) และนำไปฟักในบ่อเพาะฟัก (hatching tank) เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นำตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ไปเลี้ยงในบ่ออนุบาล (rearing tank) เป็นเวลา 26-31 วัน จนตัวอ่อนเจริญเป็นกุ้งระยะ post larva ก่อนนำไปเลี้ยงในบ่อเลี้ยงเป็นเวลา 3-5 เดือนสำหรับการเลี้ยงแบบหนาแน่น หรือ 4-6 เดือน สำหรับการเลี้ยงแบบไม่หนาแน่น จึงจะสามารถเก็บเกี่ยวกุ้งเพื่อนำมาบริโภคหรือจำหน่ายได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 4

กุ้งขาวเริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญและเป็นทางเลือกที่เป็นที่นิยมของเกษตรกรในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทั่วโลกหลังปี ค.ศ. 2000 เนื่องจากประสบความสำเร็จในการพัฒนากุ้งปลอดเชื้อ (specific pathogen free; SPF) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาจากการระบาดของโรคจุดขาว (white spot disease; WSD) ซึ่งเป็นโรคระบาดสำคัญในกุ้งกุลาดำหรือ *P. monodon* อย่างไรก็ตามกุ้งขาวรวมถึงกุ้ง *Penaeus* สปีชีส์อื่น เช่น *P. japonicus* ก็ได้รับผลกระทบจากโรคระบาดอื่นๆ เช่น การระบาดของไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) การติดเชื้อ covert mortality nodavirus (CMNV) การติดเชื้อ microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) การระบาดของโรคตับผองเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis disease) ที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นต้น (Thitamadee et al., 2016)



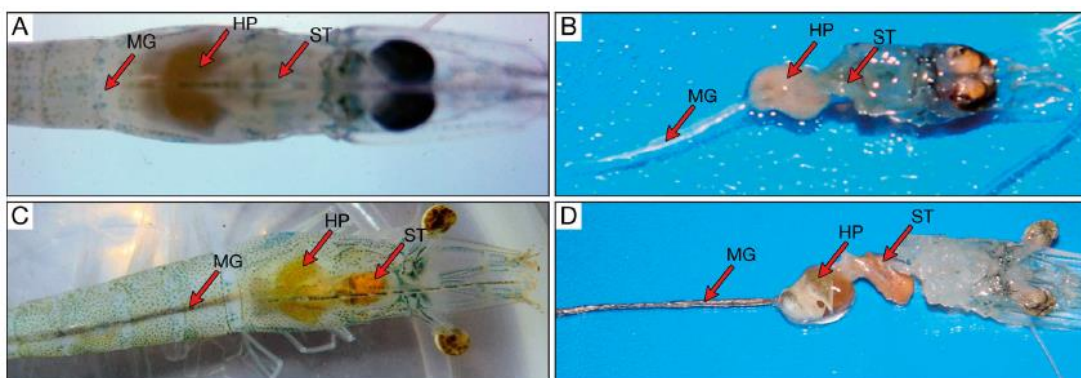
ภาพประกอบ 4 แสดงขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ที่ ม ๑ : Briggs, M. (2021). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Retrieved from [https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/en](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en)

## ภูมิหลังโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

โรคตับฝ่อเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND) เป็นโรคที่ทำให้เกิดการตายของกุ้งขาว (*P. vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ในฟาร์มเพาะเลี้ยงได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง (Han et al., 2017) เริ่มพบการระบาดในปี ค.ศ. 2009 ในประเทศจีน และกระจายไปยังเวียดนามในปี 2010 มาเลเซียในปี 2011 ประเทศไทยในปี 2012 (Tran et al., 2013) และแพร่ระบาดไปยังประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชียและอเมริกาใต้ (Soto-Rodriguez et al., 2015) การระบาดของโรคตับฝ่อเฉียบพลันก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศ รวมไปถึงประเทศไทยที่มีผลผลิตของกุ้งลดลงมากกว่า 400,000 เมตริกตัน ในช่วงที่มีการระบาดของโรสดังกล่าว (Thitamadee et al., 2016)

โรคตับฝ่อเฉียบพลัน ทำให้เกิดการตายของกุ้งได้อย่างรวดเร็ว โดยอาจเกิดการตายขึ้นได้ภายใน 30-35 วัน หลังจากปล่อยกุ้งระยะหลังวัยอ่อนลงในบ่อเลี้ยง (Tang et al., 2020) จึงทำให้โรคนี้เดิมมีชื่อว่า โรคตายด่วน (early mortality syndrome; EMS) จากการศึกษาของ Lightner และคณะ ในปี 2012 พบว่ากุ้งที่ตายด้วยโรคนี้มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ที่มีการหลุดลอกของเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อน (hepatopancreatic tubule epithelial cell) และมีการตาย (necrosis) ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน ทำให้มีการเปลี่ยนมาเรียกโรคนี้ว่า กลุ่มอาการตับฝ่อเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome; AHPNS (Lightner et al., 2012) ในปี 2013 Tran และคณะ ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งที่เป็นโรคจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค และนำเชื้อไปทดสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) ในกุ้งปกติ พบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดโรคตับฝ่อเฉียบพลันที่แยกได้นี้คือ *V. parahaemolyticus* ที่สามารถสร้างท็อกซินที่ทำให้เกิดการหลุดลอกของเซลล์บุท่อในตับของกุ้งได้ และในภายหลังได้มีการเปลี่ยนชื่อโรคเป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน (AHPND) โดยลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลันจะแสดงอาการเซื่องซึม มีทางเดินอาหารที่ว่างเปล่าและเป็นสีขาวซีด มีการฝ่อของตับและตับอ่อน (ภาพประกอบ 5) และ กุ้งที่ใช้ในการทดสอบมีอัตราการตายสะสมเป็น 100% ภายในระยะเวลา 4 วันหลังจากได้รับเชื้อด้วยวิธีการแช่กุ้งลงในเชื้อ (immersion) (Tran et al., 2013)



ภาพประกอบ 5 ลักษณะภายนอกของกุ้งขาวที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

ภาพ A และ B คือตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรคแสดงลักษณะของทางเดินอาหารที่ว่างเปล่าและเป็นสีขาวซีด และมีการฝ่อของตับและตับอ่อน ภาพ C และ D คือตัวอย่างของกุ้งปกติ (MG; midgut, HP; hepatopancreas, ST; stomach)

ที่ ม ๑ : Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105(1), 45-55.

ต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดจากไอโซเลตของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ( $VP_{AHPND}$ ) เปรียบเทียบกับไอโซเลตที่ไม่ก่อให้เกิดโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ( $VP_{non-AHPND}$ ) พบว่าในไอโซเลตที่ก่อโรคมียาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในตระกูล pVH ที่มีขนาดประมาณ 6,900-7,000 คู่เบส ในขณะที่ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรคไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดนี้ (Han et al., 2015; Yang et al., 2014) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดนี้ นำไปสู่การพัฒนาเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันเบื้องต้นในเวลาต่อมา เรียกว่าวิธี AP1 และ AP2 (Flegel & Lo, 2014) และจากการศึกษาของ Sirikharin และคณะในปี 2015 สามารถแยกโปรตีนที่ออกซิน A และ B จากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคได้ และมีการพัฒนาวิธีการ AP 3 เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันซึ่งให้ผลการตรวจที่แม่นยำกว่าวิธี AP1 และ AP2 (Sirikharin et al., 2014) ต่อมาในปี 2015 Sritunyalucksana และคณะ ได้พัฒนาวิธีการ AP4 ซึ่งเป็นวิธีตรวจโรคตับฝ่อเฉียบพลันโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลด้วยหลักการ nested PCR (Sritunyalucksana et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ ที่ถูกพัฒนาขึ้น

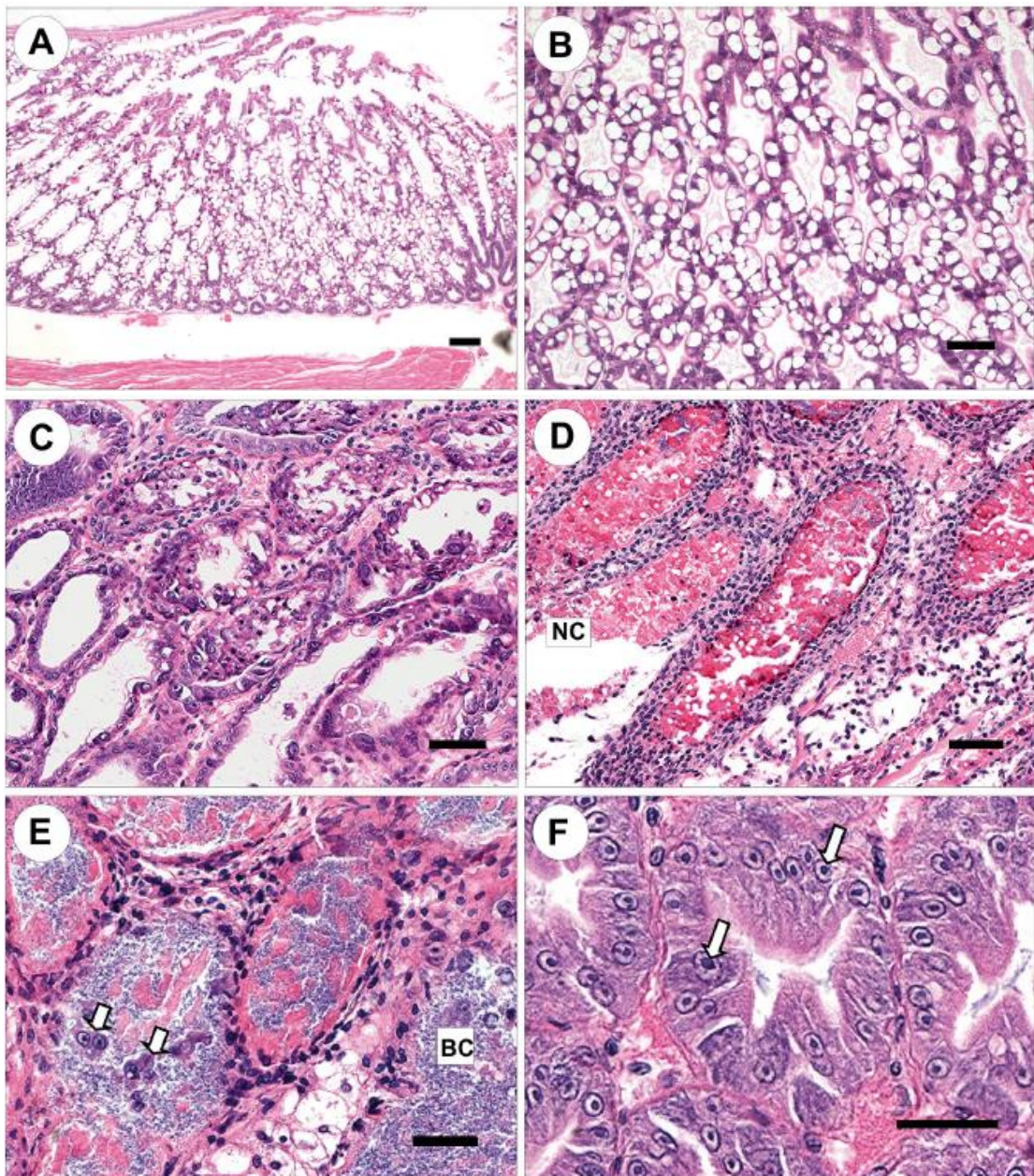
ตามมาเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของท็อกซินดังกล่าว

จากการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาข้างต้นนำไปสู่การสำรวจโดยการเก็บตัวอย่างพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งปราศจากเชื้อที่นำเข้ามาจากต่างประเทศพบว่าให้ผลการตรวจที่เป็นลบ ในขณะที่ตัวอย่างพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักและกุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงในประเทศไทยให้ผลเป็นบวก การเก็บตัวอย่างและตรวจวินิจฉัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการปนเปื้อนของพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งอาจเกิดขึ้นในโรงเพาะฟัก และเมื่อนำลูกกุ้งที่เป็นโรคไปเลี้ยงต่อในบ่อเพาะเลี้ยง จึงทำให้เกิดการระบาดของโรคในบ่อเลี้ยงเช่นกัน สาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคอันเนื่องมาจากการติดเชื้อ  $VP_{AHPND}$  ในพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้ง ซึ่งอาจติดมาจากอาหารสดที่ให้กับกุ้ง เช่น หอยกาบ หอยนางรม เนื้อปลาหมึก และได้เดือนทะเล จากการตรวจสอบอาหารสดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ พบว่ามีเชื้อ  $VP_{AHPND}$  ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อในอาหารที่นำเข้มาดังกล่าว อาจเป็นเส้นทางของการเริ่มต้นการระบาดของโรคตับฝ่อเฉียบพลันเข้ามาในประเทศไทย (Thitamadee et al., 2016)

### ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกุ้งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

จากการศึกษากุ้งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ที่มีการฝ่อของตับและมีทางเดินอาหารที่ว่างเปล่าเป็นสีขาวซีด เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาพบการตายของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนและการหลุดลอกของเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อน (necrotic sloughing) ไม่พบเซลล์ปกติที่พบในตับและตับอ่อนของกุ้ง ได้แก่ เซลล์ B ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ การย่อยและขนส่งสารอาหาร เซลล์ F ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและสะสมแร่ธาตุ และเซลล์ R ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขับแร่ธาตุ การดูดซึมและสะสมลิพิดและไกลโคเจน และยังพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemolytic infiltration) ที่บริเวณโดยรอบของเซลล์ที่เกิดการหลุดลอก เซลล์บุท่อบางเซลล์มีการขยายตัวของนิวเคลียส (karyomegaly) และในระยะท้ายของการเป็นโรค พบการรุกรานของแบคทีเรียในช่องว่าง (lumen) ของท่อของตับและตับอ่อนด้วย (Tran et al., 2013)

ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกุ้งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน  
 ตีรังเนื้อเยื่อด้วย AFA Davidson's fixative และย้อมด้วย hematoxylin และ eosin-phloxine (H&E) ภาพ A และ B แสดงเนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อน (hepatopancreas) จากกุ้งปกติ (ขนาดสเกลเท่ากับ 100 ไมโครเมตร) ภาพ C ถึง F แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกุ้งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ภาพ C และ D แสดงการตายและหลุดลอกเซลล์น้ำตาลของตับและตับอ่อน (NC; necrosis) (ขนาดสเกลของภาพ C เท่ากับ 50 ไมโครเมตร ของภาพ D เท่ากับ 100 ไมโครเมตร) ภาพ E แสดงระยะท้ายของการเป็นโรค โดยมีการหลุดลอกของเซลล์ (ลูกศร)

มีการบุกรุกของแบคทีเรีย (BC; bacterial colonization) และพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (ขนาดสเกลเท่ากับ 50 ไมโครเมตร) ภาพ F ลูกศรแสดงการขยายตัวของนิวเคลียสของเซลล์บุท่อนใต้ และตับอ่อนของกุ้งที่เป็นโรค (ขนาดสเกลเท่ากับ 30 ไมโครเมตร)

ที่ ม า : Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105(1), 45-55.

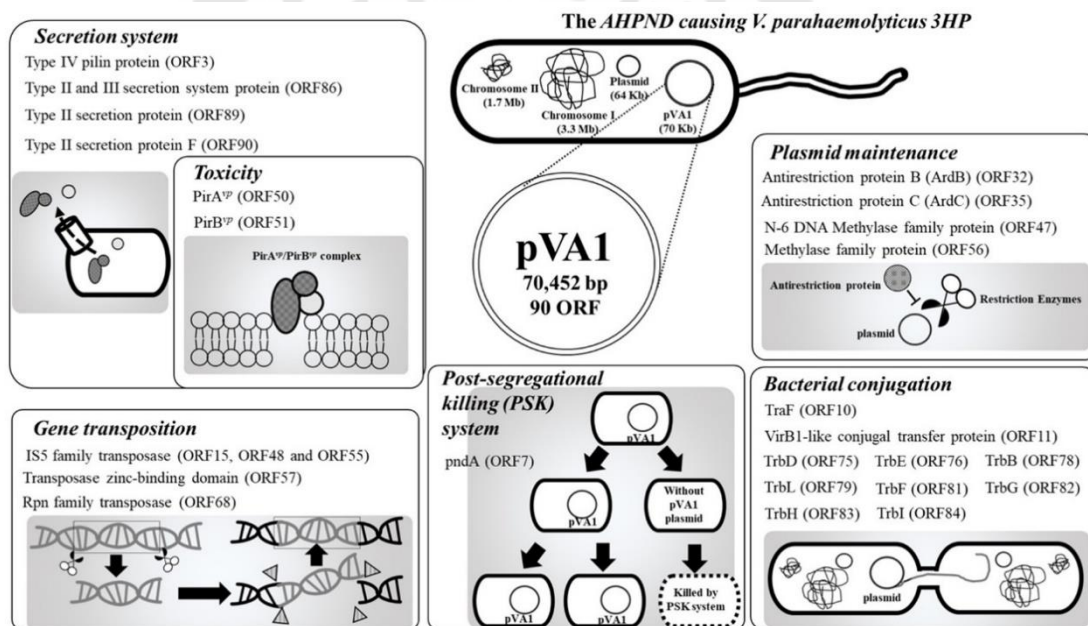
### สาเหตุของโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

เชื้อ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง พบในน้ำทะเลและแถบชายฝั่งได้ทั่วโลก รวมไปถึงเป็นหนึ่งในเชื้อประจำถิ่นในบ่อเลี้ยงกุ้ง และมักเป็นเชื้อพหุติยภูมิที่จะฉวยโอกาสเข้ารุกรานเมื่อสัตว์น้ำเป็นโรค (Tang et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตาม *Vibrio* spp. บางไอโซเลตถูกค้นพบว่า เป็นสาเหตุปฐมภูมิของโรคตับฝ่อเฉียบพลันในกุ้ง จากการศึกษาของ Tran และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 พบว่าสาเหตุของโรคตับฝ่อเฉียบพลันเกิดจากบางไอโซเลตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (VP<sub>AHPND</sub>) ที่เข้าไปอาศัยอยู่ในกระเพาะของกุ้งและสร้างท็อกซินออกมา โดยท็อกซินนี้จะเข้าไปสู่ส่วนตับและตับอ่อนของกุ้ง ทำให้เกิดการหลุดลอกของเซลล์บุท่อนของตับและตับอ่อน (Tran et al., 2013)

ต่อมาในปี 2015 มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันเปรียบเทียบกับ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน (VP<sub>non-AHPND</sub>) พบว่าในไอโซเลตที่ก่อโรคมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pVA1 หรือ pVPA3-1 ซึ่งเป็นพลาสมิดในตระกูล pVH ที่มีขนาดประมาณ 69-70 กิโลเบส ในขณะที่ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรคไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดนี้ (Han et al., 2015; Lee et al., 2015) พลาสมิดดังกล่าวมีส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ (open reading frame; ORF) จำนวน 90-92 แห่ง ประกอบไปด้วยส่วนที่สามารถถอดรหัสให้โปรตีนท็อกซินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันที่มีความคล้ายคลึงกับ *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin ซึ่งเป็นท็อกซินซึ่งหลังโดยแบคทีเรียในลำไส้ของหนอนตัวกลมที่ทำให้เกิดการตายของแมลง จึงมีการตั้งชื่อท็อกซินจาก *V. parahaemolyticus* นี้ว่าท็อกซิน Pir-like เป็นโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีน *pirA*-like (336 คู่เบส) และ *pirB*-like (1317 คู่เบส) บนพลาสมิดดังกล่าว และถูกขนานบข้างด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น inverted repeat และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ transposition จากการศึกษาด้านโปรตีน พบว่าโปรตีนท็อกซิน A ที่ถอดรหัสมาจากยีน *pirA*-like มีขนาด

ประมาณ 13 กิโลดาลตัน ในขณะที่โปรตีนที่ออกซิน B ที่ถอดรหัสมาจากยีน *pirB*-like มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน (Han et al., 2015) นอกจากนี้พลาสมิด pVA1 ยังประกอบไปด้วยยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบการหลั่งสาร (secretion system) ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ conjugate (conjugation factor) ยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาพลาสมิด ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ post-segregational killing (PSK) และยีนอื่นๆ (Wang et al., 2020) ดังแสดงในภาพประกอบ 7

ทั้งนี้ นอกจาก *V. parahaemolyticus* แล้วยังมี *Vibrio* สปีชีส์อื่นอีกที่ถูกค้นพบว่ามียีนของพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ได้แก่ *V. harveyi* (Xiao et al., 2017), *V. campbelli* (Wangman et al., 2018), *V. owensii* (Liu et al., 2018) และ *V. punensis* (Restrepo et al., 2018)



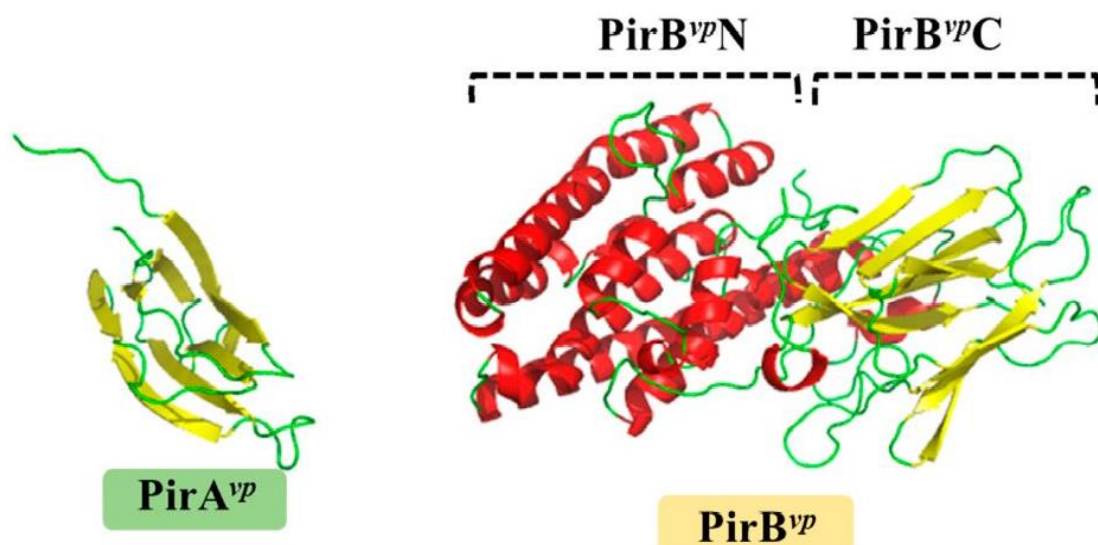
ภาพประกอบ 7 แสดงการแบ่งประเภทของยีนต่างๆ ที่พบบนพลาสมิด pVA1 โดยข้อมูลดังกล่าวศึกษาบนพลาสมิด pVA1 ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต 3HP (NCBI accession number: KP324996)

ที่มา : Wang, H-C., Lin, S-J., Mohapatra, A., Kumar, R., & Wang, H-C. (2020). A Review of the Functional Annotations of Important Genes in the AHPND-causing pVA1 Plasmid. *Microorganisms*, 8(7), 996.



### โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของท็อกซิน A และ B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ภาพประกอบ 8) พบว่ามีความสัมพันธ์กันกับโครงสร้างท็อกซิน Cry ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นท็อกซินที่ทำให้เกิดการตายของแมลง โดยโครงสร้างหลักของท็อกซิน Cry ประกอบด้วย 3 โดเมน (ภาพประกอบ 9) ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันได้แก่ โดเมน I ที่ทำให้เกิดรูพรุน (pore-forming domain I) โดเมน II สำหรับจับกับ receptor (receptor-binding domain II) และ โดเมน III สำหรับจับกับน้ำตาล (sugar-binding domain III) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน Cry จะขึ้นอยู่กับโดเมนเหล่านี้ เริ่มจากโดเมน III จับกับ *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) ซึ่งพบมากใน receptor เช่น aminopeptidase N (APN) ที่อยู่ในทางเดินอาหารส่วนกลางของตัวอ่อนแมลง ตามมาด้วยโดเมน II ที่สามารถจับกับ receptor ดังกล่าว และเมื่อท็อกซิน Cry ถูกสะสมจนมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดปฏิกิริยากับ receptor อีกตัวคือ cadherin-like receptor (CAD) ซึ่งนำไปสู่การตัดโปรตีนบน  $\alpha$ 1 helix ของโดเมน I การตัดนี้ทำให้เกิด Cry oligomer เกิดเป็นโครงสร้างของโดเมน I ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างรูพรุนขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ นำไปสู่การรั่วไหลของของเหลวส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลของแรงดัน colloidal osmotic ทำให้เซลล์แตกในที่สุด (Lin, Hsu, & Wang, 2017; Wang et al., 2020)



ภาพประกอบ 8 แสดงโครงสร้างสามมิติของทีออกซิน A (PirA<sup>vp</sup>) และทีออกซิน B (PirB<sup>vp</sup>)  $\alpha$ -helix และ  $\beta$ -strand แสดงด้วยสีแดงและเหลือง ตามลำดับ โดยลักษณะทางกายภาพของทีออกซิน A มีการจัดเรียงตัวของ antiparallel  $\beta$ -barrel จำนวน 8 สายด้วยลักษณะแบบ jelly-roll ส่วนทีออกซิน B แบ่งออกเป็น 2 โดเมนด้วยลักษณะของโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยส่วนปลายด้านหมู่อะมิโน (PirB<sup>vp</sup>N; ลำดับอะมิโนที่ 12-256) เรียงตัวเป็น  $\alpha$ -helix จำนวน 7 เกลียว ส่วนปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (PirB<sup>vp</sup>C; ลำดับอะมิโนที่ 279-436) ประกอบไปด้วย antiparallel  $\beta$ -sheet 4 สาย จำนวน 2 คู่ โดยทั้ง 2 ส่วนนี้เชื่อมกันด้วยลูป (loop) ขนาดยาว (รหัสสืบค้นสำหรับทีออกซิน A และ B ของ *V. parahaemolyticus* บน protein data bank คือ 3X0T และ 3X0U ตามลำดับ)

ที่ ม ๑ : Lin, S-J., Hsu, K-C., & Wang, H-C. (2017). Structural Insights into the Cytotoxic Mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA<sup>vp</sup> and PirB<sup>vp</sup> Toxins. *Marine Drugs*, 15(373), 1-12.

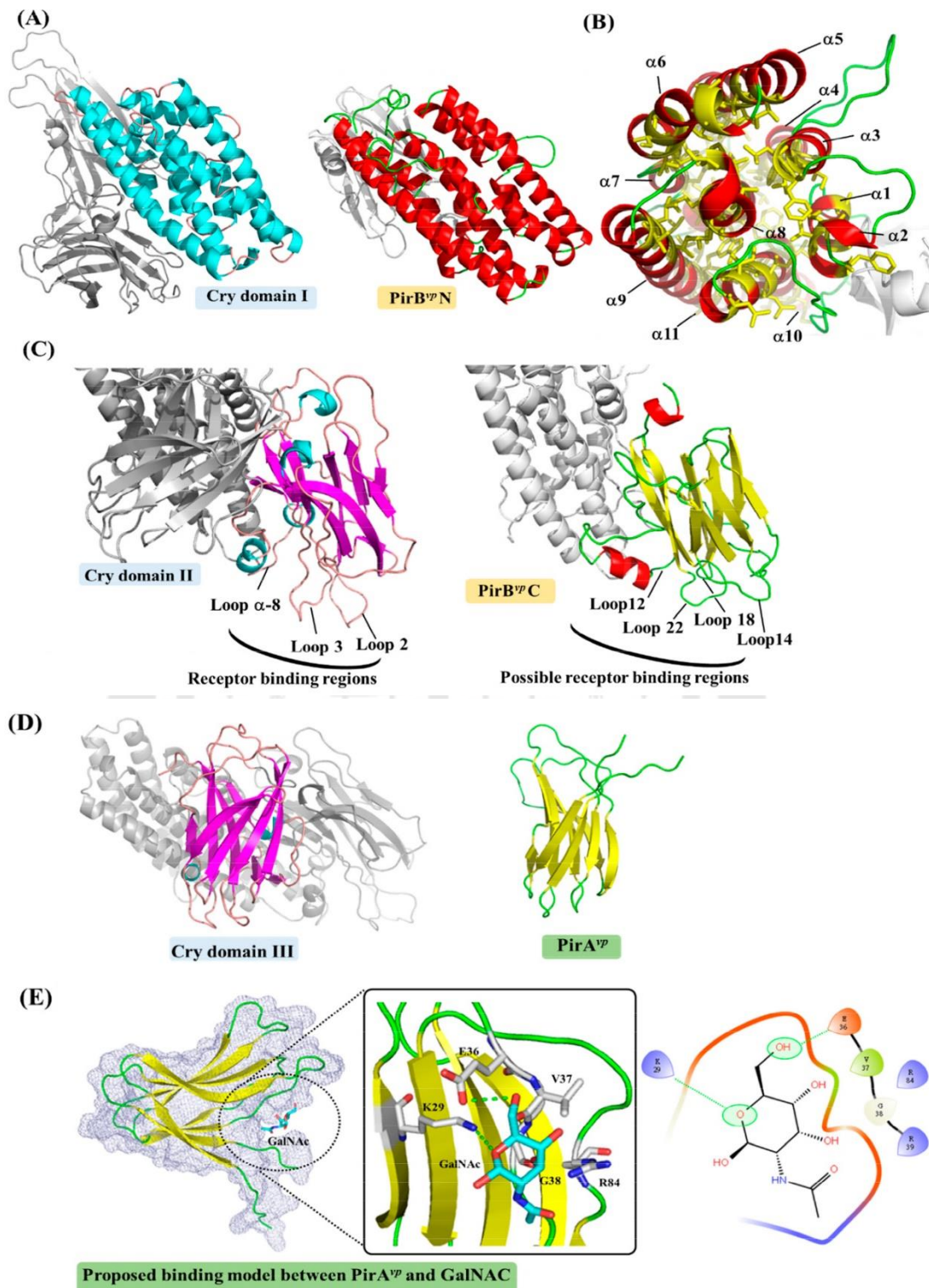
## โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน B

ท็อกซิน B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีโครงสร้างคล้ายกับโดเมน I และ II ของท็อกซิน Cry ของเชื้อ *B. thuringiensis* ซึ่งมีหน้าที่ทำให้เกิดรูพรุนบนเซลล์และจับกับ receptor ตามลำดับ โดยปลายด้านหมู่อะมิโนของท็อกซิน B (PirB<sup>VP</sup>N) และโดเมน I ของท็อกซิน Cry ประกอบไปด้วยส่วนที่จัดเรียงตัวแบบ  $\alpha$ -helix (ภาพประกอบ 9A) ส่วนกลางของกลุ่ม  $\alpha$ -helix ดังกล่าวประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จำนวนมาก และถูกล้อมรอบไปด้วยส่วนที่ชอบทั้งน้ำและลิพิด (amphipathic) (ภาพประกอบ 9B) การจัดเรียงโครงสร้างในลักษณะนี้เรียกว่า inside-out membrane fold ซึ่งมักพบในท็อกซินที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดรูพรุน การจัดเรียงตัวในลักษณะนี้ทำให้โปรตีนดังกล่าวสามารถเปลี่ยนรูปร่างกลับไปมาระหว่างการเป็นโปรตีนที่ละลายได้และโปรตีนที่เป็น transmembrane โดยหลังจากที่ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนรูปร่างแล้วส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะหันออกสู่ภายนอกทำให้สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นลิพิดได้นอกจากนี้  $\alpha$ -helix ดังกล่าวมักมีความยาวมากกว่า 40 อังสตรอม (Å) ซึ่งเป็นความยาวที่สามารถผ่านชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (โดยทั่วไปชั้นเยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 40 อังสตรอม) จากการศึกษาโครงสร้างดังกล่าวจึงอาจเชื่อได้ว่าปลายด้านหมู่อะมิโนของท็อกซิน B น่าจะสามารถทำให้เกิดรูพรุนบนเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้

สำหรับปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลของท็อกซิน B (PirB<sup>VP</sup>C) มีลักษณะเป็น  $\beta$ -sheet ที่เรียงตัวแบบ antiparallel คล้ายกับโดเมน II ของท็อกซิน Cry (ภาพประกอบ 9C) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีน-โปรตีน และโปรตีน-ลิแกนด์ ดังนั้นจึงคาดว่าปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลของท็อกซิน B น่าจะมีหน้าที่อย่างเดียวกัน และเนื่องจากโดเมน II ของท็อกซิน Cry สามารถจับกับ receptor ในแมลงได้ ดังนั้นจากความคล้ายกันทางโครงสร้างนี้ ปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลของท็อกซิน B ก็น่าจะเป็นส่วนที่ใช้จับกับ receptor ของกุงเช่นกัน (Lin et al., 2017)

### โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของท็อกซิน A

ท็อกซิน A ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีการเรียงตัวแบบ antiparallel ของ  $\beta$ -sheet ในลักษณะ jelly-roll ซึ่งคล้ายกับโครงสร้างของโดเมน III ของท็อกซิน Cry (ภาพประกอบ 9D) โดยโดเมน III ของท็อกซิน Cry นี้มีส่วนพับที่เป็น galactose-binding domain-like ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความจำเพาะของท็อกซินโดยการจดจำกับ *N*-acetylgalactosamine โดยในการจับกันของท็อกซิน Cry1Ac กับ aminopeptidase N โดเมน III ของท็อกซินดังกล่าวจะเป็นตัวริเริ่มจับกับ *N*-acetylgalactosamine บน aminopeptidase N นำไปสู่การจับกันของ receptor กับท็อกซินดังกล่าว ดังนั้นบทบาทของท็อกซิน A น่าจะมีความคล้ายกันกับบทบาทของโดเมน III ของท็อกซิน Cry ซึ่งเป็นการจดจำกับเป้าหมายอย่างจำเพาะด้วยการจับกับลิแกนด์บนเยื่อหุ้มเซลล์หรือ receptor นอกจากนี้ท็อกซิน A ยังมีโครงสร้างส่วน loop ที่น่าจะเป็นช่องที่ใช้จับกับน้ำตาลได้ (ภาพประกอบ 9E) นอกจากนี้โมเดลจำลองการจับกันของท็อกซิน A กับ *N*-acetylgalactosamine แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลดังกล่าวจะมีปฏิสัมพันธ์กับ Lys29, Glu36, Val37, Gly38 และ Arg84 ของท็อกซิน A และด้วยลักษณะของช่องจับที่ลึกและแคบน่าจะทำให้ท็อกซิน A จับกับ oligosaccharide ได้ด้วย (Lin et al., 2017)



ภาพประกอบ 9 เปรียบเทียบโครงสร้างระหว่างที่อกซิน Cry ของ *B. thuringiensis* กับที่อกซิน A และ B ของ *V. parahaemolyticus*

โดย  $\alpha$ -helix และ  $\beta$ -sheet ของที่อกซิน Cry แสดงด้วยสีฟ้าและชมพู ส่วนของที่อกซิน A และ B แสดงด้วยสีแดงและเหลือง ตามลำดับ A) เปรียบเทียบระหว่างโดเมน I ของที่อกซิน Cry กับปลายด้านหมู่อะมิโนของที่อกซิน B; B) ในกลุ่มของ  $\alpha$ -helix ของที่อกซิน B มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) แสดงด้วยสีเหลือง; C) เปรียบเทียบระหว่างโดเมน II ของที่อกซิน Cry กับปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลของที่อกซิน B ภาพแสดงดูภายในโดเมน II ของที่อกซิน Cry ที่ใช้สำหรับจับกับ receptor (receptor binding region) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลของที่อกซิน B มีความเป็นไปได้ว่าส่วนนี้ของที่อกซิน B จะเป็นส่วนที่ใช้จับกับ receptor (possible receptor binding region); D) เปรียบเทียบระหว่างโดเมน III ของที่อกซิน Cry กับที่อกซิน A; E) ส่วนของที่อกซิน A ที่มีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นส่วนที่ใช้จับกับลิแกนด์ซึ่งในภาพเป็นการจำลองการจับกับ *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) โดยใช้เครื่องมือ iGEMDOCK โดยในแบบจำลอง ออกซิเจนซึ่งเป็น heteroatom ของ GalNAc สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Lys29 ของที่อกซิน A กรดอะมิโน Glu36 ของที่อกซิน A สร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลของ GalNAc กรดอะมิโน Gly38 เป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้วซึ่งถูกขนาบข้างแบบ sandwich ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลสองหมู่ที่อยู่ติดกันของ GalNAc กรดอะมิโน Val37 และ Arg84 สร้างพันธะด้วยแรง van der Waals ต่อโมเลกุลของ GalNAc (รหัสสืบค้นสำหรับที่อกซิน Cry บน protein data bank คือ 1CIY)

ที่ ม า : Lin, S-J., Hsu, K-C., & Wang, H-C. (2017). Structural Insights into the Cytotoxic Mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA<sup>vp</sup> and PirB<sup>vp</sup> Toxins. *Marine Drugs*, 15(373), 1-12.

จากการศึกษาของ Sirikharin และคณะ ในปี 2015 โดยการทดสอบการก่อโรคของ ทัอกซินที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% เปรียบเทียบกับการก่อโรคของ ทัอกซินที่ได้จากการแสดงออกของยีนสร้างทัอกซินที่โคลนเข้าสู่พลาสมิด พบว่าการเกิดโรคตับฝ่อ เฉียบพลันในกึ่งต้องอาศัยทั้งทัอกซินชนิด A และ B ร่วมกัน จึงจะทำให้เกิดการตายสะสมของกึ่งได้ 100% และเกิดการหลุดลอกของเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อนของกึ่ง นอกจากนี้ทัอกซินที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค อาจมีปัจจัยอื่นๆ อีกที่ส่งเสริมการทำงานของทัอกซิน เนื่องจากสามารถทำให้เกิดการตายของกึ่งได้ 100% แม้ใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าทัอกซิน A และ B บริสุทธิ์ที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกของ ยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (recombinant plasmid) (Sirikharin et al., 2015) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในปีเดียวกันของ Lee และคณะ พบว่าเมื่อฉีดกึ่งด้วยวิธี reverse gavage assay ด้วยรีคอมบิแนนท์ทัอกซิน A หรือรีคอมบิแนนท์ทัอกซิน B เพียงอย่างเดียวหรือผสมรีคอมบิแนนท์ ทัอกซิน A และ B เข้าด้วยกัน กึ่งที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ทัอกซิน A เพียงอย่างเดียวมีจุลพยาธิสภาพ ของตับและตับอ่อนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ทัอกซิน B เพียงอย่างเดียวและรีคอมบิแนนท์ทัอกซิน A และ B ผสมกัน สามารถชักนำให้เกิดอาการของโรค ตับฝ่อเฉียบพลันซึ่งมีการหลุดลอกของเซลล์บุท่อตับและตับอ่อนได้ (Lee et al., 2015)

### สายพันธุ์กลายของ *V. parahaemolyticus*

จากรายงานการพบสายพันธุ์กลาย (mutant) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่พบยีนของ พลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับโรคตับฝ่อเฉียบพลันรวมไปถึงพบยีนของทัอกซินแต่ไม่ก่อโรคตับฝ่อ เฉียบพลัน โดยในปี 2017 Phiwsaiya และคณะ พบว่าเมื่อตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต XN87 ไม่พบยีนที่สร้างทัอกซิน A แต่พบการ insertion ในส่วนของยีนดังกล่าว ในขณะที่ สามารถตรวจพบยีนของทัอกซิน B ได้ แต่มีการ frameshift และไม่สามารถสร้างทัอกซิน B ได้ อย่างไรก็ตามไอโซเลตดังกล่าวทำให้เกิดอัตราการตายของกึ่งได้ 47% โดยไม่แสดงการหลุดลอก ของเซลล์บุท่อตับและตับอ่อนแต่เกิดการทรุดตัว (collapse) ของเซลล์แทน (Phiwsaiya et al., 2017) จากการศึกษาในปีเดียวกันของ Han และคณะ ได้แบ่งประเภทของสายพันธุ์กลายออกเป็น ประเภท I และ II โดยสายพันธุ์กลายประเภท I เป็นสายพันธุ์ที่เกิดการ deletion ของยีนทัอกซิน A และ B ทั้งหมด ในขณะที่สายพันธุ์กลายประเภท II เป็นสายพันธุ์ที่เกิดการ deletion ของยีน ทัอกซิน A ทั้งหมดและยีนทัอกซิน B บางส่วน ซึ่งสายพันธุ์กลายทั้งสองประเภทนี้ไม่สามารถก่อโรค ตับฝ่อเฉียบพลันในกึ่งได้เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ (Han et al., 2017) ต่อมาในปี 2020 Aranguren Caro และคณะ พบสายพันธุ์กลายที่มีทั้งยีนทัอกซิน A และ B แต่ไม่สามารถสร้าง

ทีออกซิน A และ B ได้ ส่งผลให้ไม่มีความสามารถในการก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน และไม่ทำให้เกิดการตายของกุ้ง จึงได้จำแนกเป็นสายพันธุ์กลายประเภท III (Aranguren Caro et al., 2020) (ตาราง 1)

ตาราง 1 สรุปการศึกษาสายพันธุ์กลายของ *V. parahaemolyticus*

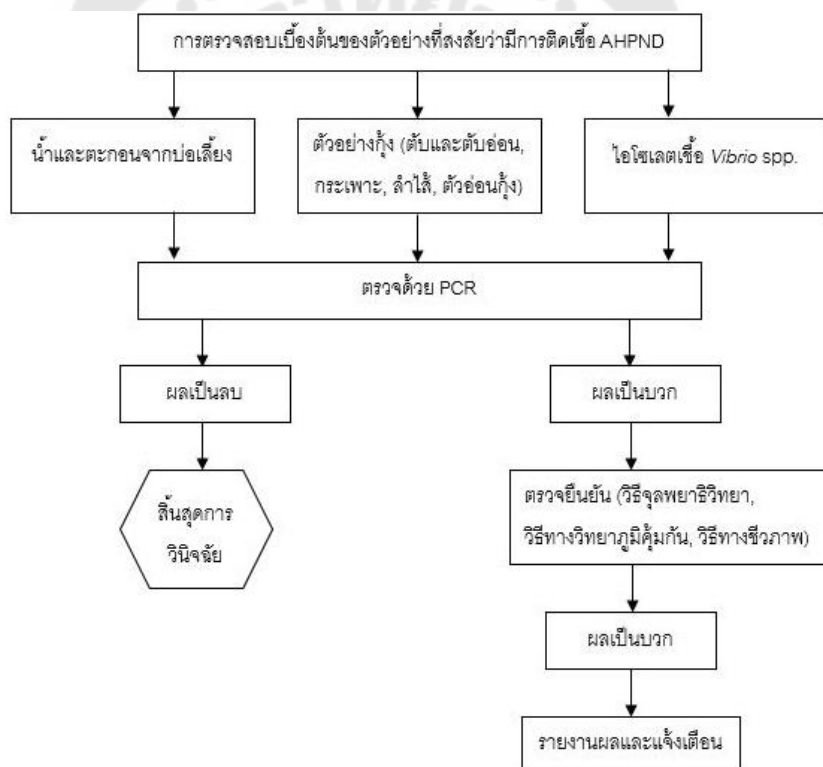
ประเภทของสายพันธุ์กลาย	ตัวอย่างไอโซเลต	ยีนทีออกซินที่ตรวจไม่พบ	ยีนทีออกซินที่ตรวจพบ	การก่อโรค	อ้างอิง
-	XN87	A	B (frameshift)	อัตราการตาย 47% แต่ไม่มีลักษณะของ AHPND	(Phiwsaiya et al., 2017)
ประเภท I	13-511/A2, 14-188/7, 14-231/32.1	A และ B	-	ไม่ก่อโรค	(Han et al., 2017)
ประเภท II	16-900/1, 16-901/1, S2, R13	A	B (บางส่วน)	ไม่ก่อโรค	(Han et al., 2017; Aranguren Caro et al., 2020)
ประเภท III	R14	-	A และ B	ไม่ก่อโรค	(Aranguren Caro et al., 2020)

การสูญเสียความสามารถในการก่อโรคในสายพันธุ์กลายของเชื้อ *V. parahaemolyticus* รวมไปถึงการพบ *Vibrio* ชนิดอื่นที่สร้างทีออกซิน A และ B ได้นั้น อาจเกิดจากการที่บนพลาสมิดที่มียีนทีออกซิน A และ B ของ *Vibrio* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ transposition ของยีน ทำให้เกิดการ deletion และ insertion และเกิดการถ่ายถอดยีนทั้งภายในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์กันได้ และจากการ transposition รวมไปถึงการไม่แสดงออกของยีนดังกล่าวอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยวิธีที่อาศัยการตรวจสอบเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของทีออกซินได้ ดังนั้นการออกแบบวิธีการตรวจสอบยีนที่ครอบคลุมควบคู่ไปกับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนหรือการตรวจสอบโปรตีนทีออกซินน่าจะเป็นเครื่องมือสำคัญที่จะช่วยให้การวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันแม่นยำขึ้นได้ (Aranguren Caro et al., 2020; Han et al., 2017)



## การวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

จากคำแนะนำขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health; OIE) และองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) การตรวจวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันและการเก็บตัวอย่างกึ่งที่สงสัยว่าเป็นโรค มีอยู่ด้วยกันหลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการตรวจและความพร้อมของเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ โดยเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลันแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ระดับ I การสังเกตอาการภายนอก (gross clinical signs) ระดับ II การวินิจฉัยจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) และระดับ III การวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecular techniques) (OIE, 2021; Tang et al., 2020) โดยมีแผนผังของการวินิจฉัยแสดงดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 แผนผังของการวินิจฉัยโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Tang, K. F., Bondad-Reantaso, M. G., Arthur, J. R., MacKinnon, B., Hao, B., Alday-Sanz, V., Liang, Y. & Dong, X. (2020). Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular (No. 1190)*, 1-65.

รายละเอียดของการวินิจฉัยในขั้นตอนต่างๆ ได้แก่

### 1. การสังเกตอาการภายนอก (ระดับ I)

โรคตับฝ่อเฉียบพลันก่อให้เกิดการตายของกึ่งภายในเวลาประมาณ 30-35 วันหลังจากนำกึ่งลงสู่บ่อเลี้ยง อาการภายนอกของกึ่งที่เป็นโรคจะมีการฝ่อของตับและตับอ่อนและมีสีซีดขาวทางเดินอาหารว่าง เกิดจุดหรือรอยขีดสีดำนบนตับและตับอ่อน และอาจมีเปลือกนิ่มเมื่อโรคอยู่ในระยะเรื้อรัง (chronic phase)

### 2. การวินิจฉัยจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (ระดับ II)

การวินิจฉัยโรคด้วยลักษณะทางพยาธิวิทยา เมื่อนำตับและตับอ่อนหรือตับอ่อนของกึ่งไปผ่านกระบวนการตรึงเนื้อเยื่อด้วย Davidson's fixative ตัดเนื้อเยื่อ และย้อมด้วยสี H&E ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ากึ่งที่เป็นโรคตับฝ่อเฉียบพลันในระยะแรกพบการหลุดลอกของเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อน ในขณะที่กึ่งที่เป็นโรคในระยะท้ายๆ พบการตายและการหลุดลอกของเนื้อเยื่อและเซลล์บุท่อของตับและตับอ่อน พบการแทรกตัวของเม็ดเลือดโดยรอบเซลล์ที่เกิดการหลุดลอกและพบการติดเชื้อมากจากแบคทีเรียชนิดอื่นร่วมด้วย (Tran et al., 2013)

### 3. การวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (ระดับ III)

#### 3.1 การตรวจด้วยวิธี PCR

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ทำให้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของที่ออกซิน A และ B บนพลาสมิด pVA1 ที่เป็นสาเหตุของโรคตับฝ่อเฉียบพลัน การวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี one-step polymerase chain reaction (single-step PCR) จึงถูกพัฒนาขึ้นโดย Flegel และ Lo ในปี 2014 เรียกว่าวิธี AP1 และ AP2 (Flegel & Lo, 2014) และจากการศึกษาของ Sirikharin และคณะ พบว่าวิธี AP2 ให้ผลการตรวจที่แม่นยำกว่า เนื่องจากให้ผลบวกปลอม (false positive) ที่น้อยกว่าวิธี AP1 จากการทดสอบด้วยไอโซเลตของเชื้อที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันจำนวน 80 ไอโซเลต และเชื้อที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันจำนวน 24 ไอโซเลต (Sirikharin et al., 2015) และต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี AP3 (Sirikharin et al., 2014) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยจากการศึกษาของ Soto-Rodriguez และคณะ พบว่าเป็นวิธีที่ให้ผลบวกปลอมเพียงครั้งเดียว จากการทดสอบด้วยไอโซเลตของเชื้อที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันจำนวน 9 ไอโซเลต และเชื้อที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันจำนวน 11 ไอโซเลต ที่แยกได้จากประเทศเม็กซิโก (Soto-Rodriguez et al., 2015)

วิธีที่กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีการวินิจฉัยที่ต้องมีขั้นตอนของการทำให้เชื้อในตัวอย่างมีจำนวนมากขึ้นก่อน หากต้องการตรวจตัวอย่างที่มีการติดเชื้อในปริมาณน้อยหรือตัวอย่างที่เกิดการติดเชื้อในระยะแรกๆ โดยการนำตัวอย่างไปผสมใน alkaline peptone water (APW) หรือ tryptic soy broth (TSB) ที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.5 ก่อนนำไปบ่มและเขย่าเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเจริญของเชื้อในตัวอย่าง ทำให้การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีดังกล่าว ต้องใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่าง จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยวิธี AP4 nested PCR ขึ้น (Sritunyalucksana et al., 2015) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มความจำเพาะและความไวในการตรวจสอบ อีกทั้งยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่ครอบคลุมทั้งยีนของท็อกซิน A และ B ควบคู่กัน โดยวิธี AP4 นี้ ให้ผลบวกและผลลบถูกต้องเมื่อการทดสอบกับเชื้อที่ก่อโรคตับฟอเฉียบพลันจำนวน 51 ไอโซเลต และเชื้อที่ไม่ก่อโรคจำนวน 34 ไอโซเลต นอกจากนี้วิธี AP4 nested PCR ยังมีความไวมากกว่าวิธี AP3 one-step PCR ถึง 100 เท่า และสามารถตรวจสอบเชื้อที่ก่อโรคตับฟอเฉียบพลันในกึ่งที่ถูกทำให้ติดเชื้อได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากการติดเชื้อ (Dangtip et al., 2015)

### 3.2 การตรวจด้วยวิธี LAMP

โดยทั่วไปการตรวจด้วย single-step PCR มีความไวในการตรวจเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ที่ความเข้มข้นประมาณ  $10^4$  CFU ต่อมิลลิลิตร การตรวจด้วยวิธี LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) ให้ความไวมากกว่าวิธี PCR ประมาณ 100 เท่า โดยในปี 2015 Kongrueng และคณะ ได้พัฒนาการตรวจด้วยวิธี LAMP โดยพัฒนามาจากไพรเมอร์ของวิธี PCR AP2 (จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนพลาสมิด) และ AP3 (จำเพาะกับยีนท็อกซิน A) (Kongrueng et al., 2015) และในปีเดียวกัน Koiwai และคณะได้พัฒนาวิธี LAMP ที่จำเพาะต่อยีนท็อกซิน A และ B (Koiwai, Tinwongger, Nozaki, Kondo, & Hirano, 2016) และต่อมาในปี 2016 Arunrut และคณะ ได้พัฒนาการใช้วิธี LAMP จำเพาะต่อยีนท็อกซิน A ร่วมกับการตรวจสอบผลด้วย ssDNA-labeled nanogold probe (AuNP) ที่มีความไวในการตรวจสอบเชื้ออยู่ที่ 100 CFU และสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่า ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้งาน (Arunrut et al., 2016)

นอกจากวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ยังมีวิธีการวินิจฉัยด้วยการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคตับฟอเฉียบพลันที่ถูกพัฒนาขึ้นอีกหลายวิธี ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

วิธีการตรวจ	ไพรเมอร์และ ยีนที่จำเพาะ	ตัวอย่างที่แนะนำให้ ใช้ตรวจ	อ้างอิง
Conventional PCR	AP1, AP2 (พลาสมิด)	กระเพาะ, ตับและตับอ่อน	(Flegel & Lo, 2014)
Conventional PCR	TUMSAT-Vp3 ( <i>pirA</i> -like)	กระเพาะ	(Tinwongger et al., 2014)
Conventional PCR	AP3 ( <i>pirA</i> -like)	กระเพาะ, ตับและตับอ่อน, อุจจาระ	(Sirikharin et al., 2015)
Nested PCR	AP4 ( <i>pirA</i> -like, <i>pirB</i> -like)	กระเพาะ	(Sritunyalucksana et al., 2015)
Multiplex PCR	<i>pirA</i> -like, <i>pirB</i> -like, 18S rRNA ของกุ้ง และ 16S rRNA ของแบคทีเรีย	ตับและตับอ่อน	(Cruz-Flores, Mai, & Dhar, 2019)
Isothermal recombinase polymerase amplification assay (RPA)	<i>pirA</i> -like	ตับและตับอ่อน	(Liu et al., 2017)
LAMP	<i>pirA</i> -like และพลาสมิด	-	(Kongrueng et al., 2015)
LAMP	<i>pirA</i> -like, <i>pirB</i> -like	-	(Koiwai et al., 2016)
LAMP	<i>pirA</i> -like	กระเพาะ	(Arunrut et al., 2016)
PCR-DNA chromatography	TUMSAT-Vp3 ( <i>pirA</i> -like)	-	(Koiwai et al., 2018)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H. C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1867-1880.

### 3.3 การตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

การตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง ทำให้สามารถใช้พิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ ตรวจหา ตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างแม่นยำและมีความเชื่อมั่นสูง (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ในปี 2017 ได้มีการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อท็อกซิน A และ B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันในกุ้ง โดย Wangman และคณะ สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อท็อกซิน A จำนวน 1 โคลน และจำเพาะต่อ ท็อกซิน B จำนวน 2 โคลน โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อท็อกซิน A และ B ทั้ง 3 โคลน ดังกล่าว สามารถตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันได้ และ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไม่ก่อโรคตับฝ่อ เฉียบพลัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting โดยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ท็อกซิน A และ B นี้มีความไวในการตรวจสอบสารพิษโดยวิธี dot blotting อยู่ที่ 3 นาโนกรัมต่อจุด และ 0.78 นาโนกรัมต่อจุด ตามลำดับ จากการทดสอบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อ ตรวจสอบท็อกซิน A และ B ในตัวอย่างของกุ้งที่มีเชื้อ พบว่าแอนติบอดีต่อท็อกซิน A สามารถ ตรวจพบท็อกซินจากเชื้อจำนวน  $10^5$  CFU ต่อมิลลิลิตร ในตัวอย่างได้ภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในขณะที่แอนติบอดีต่อท็อกซิน B สามารถตรวจพบท็อกซินจากเชื้อจำนวน  $10^6$  CFU ต่อ มิลลิลิตรในตัวอย่างได้ภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 0 ชั่วโมง และแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด สามารถ ตรวจพบท็อกซินจากเชื้อจำนวน 1 CFU ต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างได้ภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Wangman et al., 2017)

## 4. การทดสอบทางชีวภาพ

การทดสอบทางชีวภาพ (bioassay) ใช้สำหรับตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของ *Vibrio* spp. โดยมีวิธีต่างๆ ดังนี้

### 4.1 การแช่ (immersion)

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวหรือแข็งเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เจือจางให้ได้ ความเข้มข้นที่ต้องการ นำกุ้งสุขภาพดีมาแช่ในภาชนะที่มีเชื้อความเข้มข้น  $10^8$ - $10^9$  CFU ต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยเชื้อความเข้มข้น  $10^5$ - $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร อีก 15 นาที โดย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อแทนในกลุ่มควบคุมผลลบ กุ้งที่สัมผัสกับเชื้อก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน

มักมีการตายสะสมเป็น 100% ภายในเวลา 72 ชั่วโมง อาการใกล้ตายหรือการตายสามารถเกิดขึ้นได้ภายใน 12 ชั่วโมงหลังสัมผัสเชื้อ ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อที่ใช้ทดสอบ

#### 4.2 การป้อน (per os)

เลี้ยงแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้น  $10^9$  CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมคลุกเคล้ากับอาหารกึ่งเป็นเวลา 5 นาที (อัตราส่วน 1 กรัมของอาหารต่อเชื้อ 1 มิลลิลิตร) นำอาหารที่ผสมเชื้อแล้วไปให้กึ่งที่ใช้ทดสอบ โดยกลุ่มควบคุมผลลบบใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อผสมกับอาหารกึ่ง

#### 4.3 การฉีด (reverse gavage assay)

การฉีดด้วยวิธี reverse gavage เป็นการส่งที่อกซินให้เข้าสู่ตับและตับอ่อนของกึ่งโดยตรง ทำได้โดยการเลี้ยงหัวเชื้อในอาหารเหลวเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,200 xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่มีที่อกซิน A และ B ไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครเมตร จากนั้นนำไปเติมสเต็มอาหาร เพื่อใช้ติดตามสารละลายที่อกซินที่ฉีดเข้าไป โดยฉีดเข้าตัวละ 0.1 มิลลิลิตรผ่านทางทวาร กลุ่มควบคุมผลลบบใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อผสมกับสี

#### โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาหรือเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี (B-lymphocyte) หรือบีเซลล์ที่ถูกกระตุ้นซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียว ทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ โดยจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ของแอนติเจนเพียงตำแหน่งเดียว ทำให้สามารถใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ วัดความเข้มข้น ใช้ตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล ของเซลล์ หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างแม่นยำ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีอาจถูกสร้างได้จากห้องปฏิบัติการโดยกลุ่มเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (hybridoma) ที่เกิดจากการหลอมรวมกันของเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ไมอีโลมา (myeloma) ที่มีความเป็นอมตะกับบีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่สนใจ ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง ผลิตซ้ำได้อย่างต่อเนื่องโดยมีคุณสมบัติคงเดิมสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้มากมาย ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นตัวตรวจสอบด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค ใช้ในการรักษาโรค (immunotherapy) ใช้ในงานด้านการศึกษาวิจัย เป็นต้น (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

### การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปที่หลากหลายและมีจำนวนมาก จึงสามารถชักนำและกระตุ้นการตอบสนองโดยหลากหลายโคลนของบีเซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจน ทำให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนกันอยู่ในซีรัมของสัตว์ที่ได้รับ การปลูกหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แอนติบอดีแต่ละชนิดที่จำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปซึ่งรวมอยู่ด้วยกันใน ซีรัม เรียกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) อย่างไรก็ตามความจำเพาะที่ หลากหลายของพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้น อาจส่งผลกระทบต่อการใช้งานนอกห้องกาย เช่น การตรวจสอบแอนติเจนด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน การตรวจวินิจฉัย การรักษา หรือการศึกษาวิจัย ต่างๆ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่มีอิพิโทปหลากหลายหรือ แอนติเจนที่ปนเปื้อนมากับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือแอนติเจนที่สัตว์สัมผัสจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงต้องมีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากโคลนเดียวของบี เซลล์ที่จำเพาะต่ออิพิโทปเดียวของแอนติเจนที่สนใจ โดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นวิธีที่ พัฒนาโดย Köhler และ Milstein ในปี 1976 (Köhler & Milstein, 1976) จากการนำบีเซลล์จาก สัตว์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการ มาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ไมอิโลมา กลายเป็นเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอมตะของเซลล์มะเร็งและสามารถผลิต แอนติบอดีที่ต้องการได้ ทำให้สามารถผลิตโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาสามารถทำได้โดยการใช้สาร polyethylene glycol (PEG) ช่วย ในการหลอมรวมเซลล์ไมอิโลมากับบีเซลล์ที่ได้จากม้ามของสัตว์ที่ถูกปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน ที่สนใจ ในขั้นตอนของการหลอมรวมเซลล์ให้กลายเป็นเซลล์ไฮบริโดมานั้น จะมีทั้งบีเซลล์กับเซลล์ ไมอิโลมาที่หลอมรวมกันสำเร็จ และเซลล์ที่หลอมรวมไม่สำเร็จ ได้แก่เซลล์ที่หลอมรวมกับเซลล์ ประเภทเดียวกันเองและเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันปะปนกันอยู่ด้วย ดังนั้นจึงต้องอาศัยระบบการ คัดเลือกและเพาะเลี้ยงให้มีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่มีชีวิตรอดและเจริญเติบโตเพื่อสร้าง แอนติบอดีที่ต้องการต่อไปได้ โดยทั่วไปทำได้โดยการเลี้ยงเซลล์ที่หลอมรวมกันนี้ในอาหารเลี้ยง เซลล์ HAT โดยเซลล์ไมอิโลมาที่นำมาใช้ในการผลิตไฮบริโดมาจะมีความบกพร่องของเอนไซม์ที่ เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน salvage pathway ได้แก่เอนไซม์ thymidine kinase (TK) และ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งการบกพร่องเอนไซม์ TK หรือ HGPRT ดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มีส่วนผสมของ hypoxanthine aminopterin และ thymidine โดย aminopterin ที่มีในอาหารจะไปขัดขวางการ สังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ด้วย de novo pathway ทำให้เซลล์ต้องเปลี่ยนไปใช้ salvage pathway ใน

การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์แทน ซึ่งเมื่อนำเซลล์ที่ถูกผสมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่ได้หลอมรวมกับบีเซลล์หรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ TK หรือ HGPRT ส่วนบีเซลล์ที่ไม่บกพร่องเอนไซม์นั้นจะสามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ แต่เมื่อไม่ได้หลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมาจะไม่มีความเป็นอมตะเนื่องจากการแบ่งเซลล์ที่จำกัด ส่งผลให้สามารถอยู่รอดได้เพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเอง ในขณะที่บีเซลล์ที่หลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมากลายเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะสามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เนื่องจากได้เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จากบีเซลล์และได้ความเป็นอมตะจากเซลล์ไมอิโลมา และเมื่อคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้เซลล์ที่หลอมรวมกันสำเร็จเป็นเซลล์ไฮบริโดมาแล้ว จะต้องมีการคัดเลือกเฉพาะโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ โดยอาจใช้วิธีทางวิทยามิคุ้มกันรูปแบบต่างๆ เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot blotting หรือ Western blotting เป็นต้น หลังจากคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการแล้ว เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออีพิโทปเดียวและมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการจริง เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีดังกล่าวต้องมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียว ซึ่งแยกได้ได้โดยการโคลนซ้ำ (reclone) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อขยายและเพิ่มจำนวนเพื่อใช้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างขึ้นได้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

### พอลิโคลนอลแอนติบอดี

พอลิโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหลากหลายอีพิโทปของแอนติเจนที่รวมอยู่ด้วยกันในซีรัม สามารถทำหน้าที่ต่างๆ เช่น จับกับแอนติเจน กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งทำให้ตัวสิ่งมีชีวิตสามารถชักนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันและกำจัดอันตรายจากเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้ โดยการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ประโยชน์นอกร่างกายรวมถึงในการศึกษาวิจัยยังคงเป็นที่นิยมมาก เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ได้กับวิธีทางวิทยามิคุ้มกันส่วนใหญ่ได้หลากหลายและเกือบทุกรูปแบบ อีกทั้งมีขั้นตอนการผลิตที่ใช้เวลาไม่มากและไม่ยุ่งยากนัก สามารถผลิตในปริมาณมากเชิงพาณิชย์ได้ในสัตว์ที่ใหญ่ขึ้น แต่เนื่องจากพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อหลากหลายอีพิโทปของแอนติเจน จึงมีข้อควรพิจารณาในการนำมาใช้ในการทดสอบต่างๆ เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนที่ปนเปื้อนในขั้นตอนของการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรืออาจมีแอนติบอดีที่เกิดจากการที่สัตว์ทดลองตอบสนองต่อแอนติเจนในสิ่งแวดล้อมปะปนอยู่ด้วย (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



## Enzyme-linked immunosorbent assay

ในปี 1960 Yalow และ Berson ได้พัฒนาเทคนิค Radioimmunoassay (RIA) ที่ใช้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในการตรวจสอบปริมาณสาร โดยอาศัยการติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีในการตรวจสอบปฏิกิริยา (Yalow & Berson, 1960) ต่อมาได้มีการใช้เอนไซม์เข้ามาทดแทนการใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับการจัดการของเสียปนเปื้อน กลายเป็นวิธีที่เรียกว่า Enzyme immunoassay (EIA) หรือ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีความไวสูง โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทที่ไม่มีสี (chromogenic substrate) เช่น 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TBM) หรือ o-phenylenediamine (OPD) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี หลักการโดยทั่วไปมักตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีไว้ด้วยวัสดุดูดซับที่เป็น solid phase เช่น หลุมพลาสติก polystyrene หรือ polyvinyl chloride จากนั้นจึงใส่ตัวตรวจสอบโดยตรง (direct) ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์ หรือตรวจสอบแบบอ้อม (indirect) ด้วยการเติมแอนติบอดีตัวแรก แล้วตามด้วยแอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมกับเอนไซม์โดยแอนติบอดีตัวนี้จะจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นจึงเติมสับสเตรทเพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ใน ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase (ALP), horseradish peroxidase (HRP) หรือ  $\beta$ -galactosidase เป็นต้น ELISA ถูกพัฒนาให้มีรูปแบบต่างๆ เพื่อให้สามารถเลือกใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยการตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยการใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบความเข้มข้นหรือปริมาณแน่นอนเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับเปรียบเทียบผลที่ได้จากตัวอย่าง (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) รูปแบบต่างๆ ของ ELISA สามารถแบ่งออกเป็น 4 แบบ ได้แก่ direct ELISA, indirect ELISA, competitive ELISA และ sandwich ELISA ดังนี้

### 1. Direct ELISA

วิธี direct ELISA เป็นวิธีที่มีความซับซ้อนน้อยที่สุด สามารถใช้ตรวจสอบหรือตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีหรือแอนติเจนได้ โดยการเคลือบแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบไว้ที่ก้นหลุม จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาก่อนล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่จับกับแอนติเจนออก เติมสับสเตรทและวัดค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ภาพประกอบ 11A)

## 2. Indirect ELISA

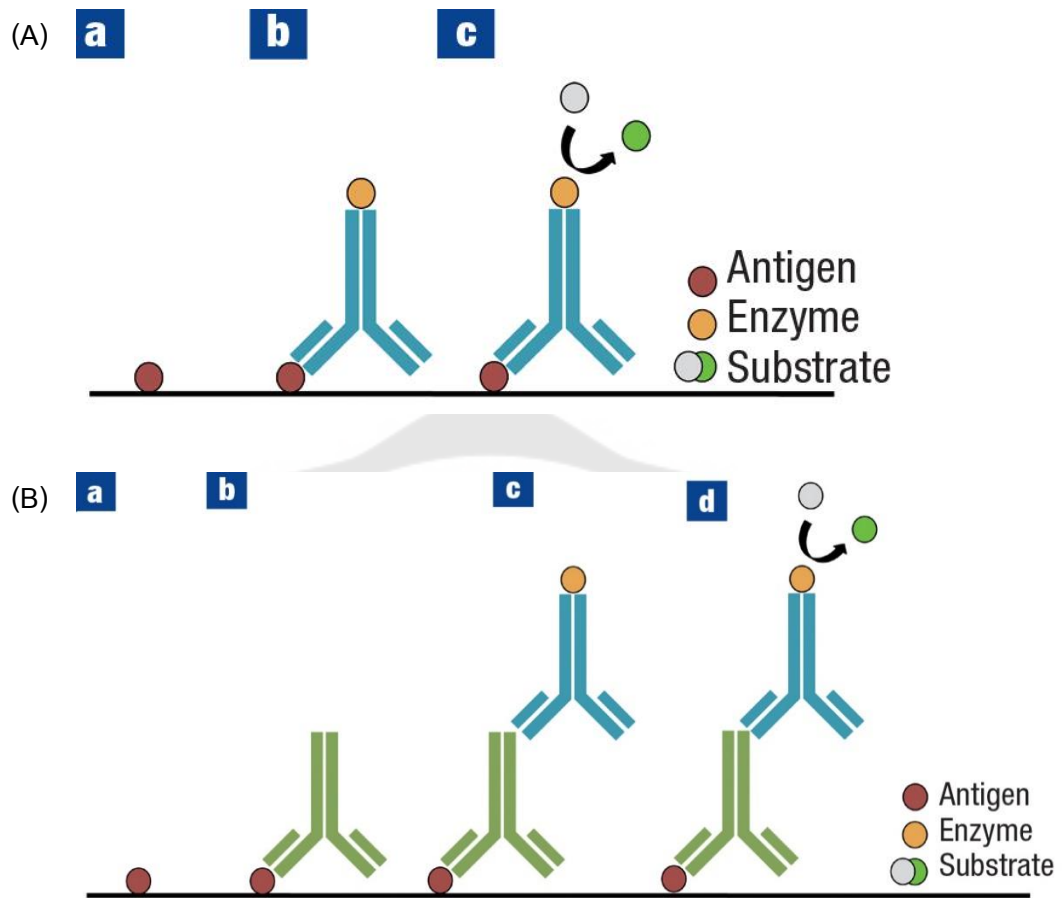
วิธี indirect ELISA คล้ายกับ direct ELISA แต่ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบกันหลุมโดยที่แอนติบอดีตัวแรกนี้ไม่ติดหลุม จากนั้นตรวจสอบการจับกันของแอนติบอดีตัวแรกกับแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมกับเอนไซม์ โดยที่แอนติบอดีตัวที่สองนี้มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก เติมสับสเตรทและตรวจสอบผลเช่นเดียวกับ direct ELISA (ภาพประกอบ 11B)

## 3. Competitive ELISA

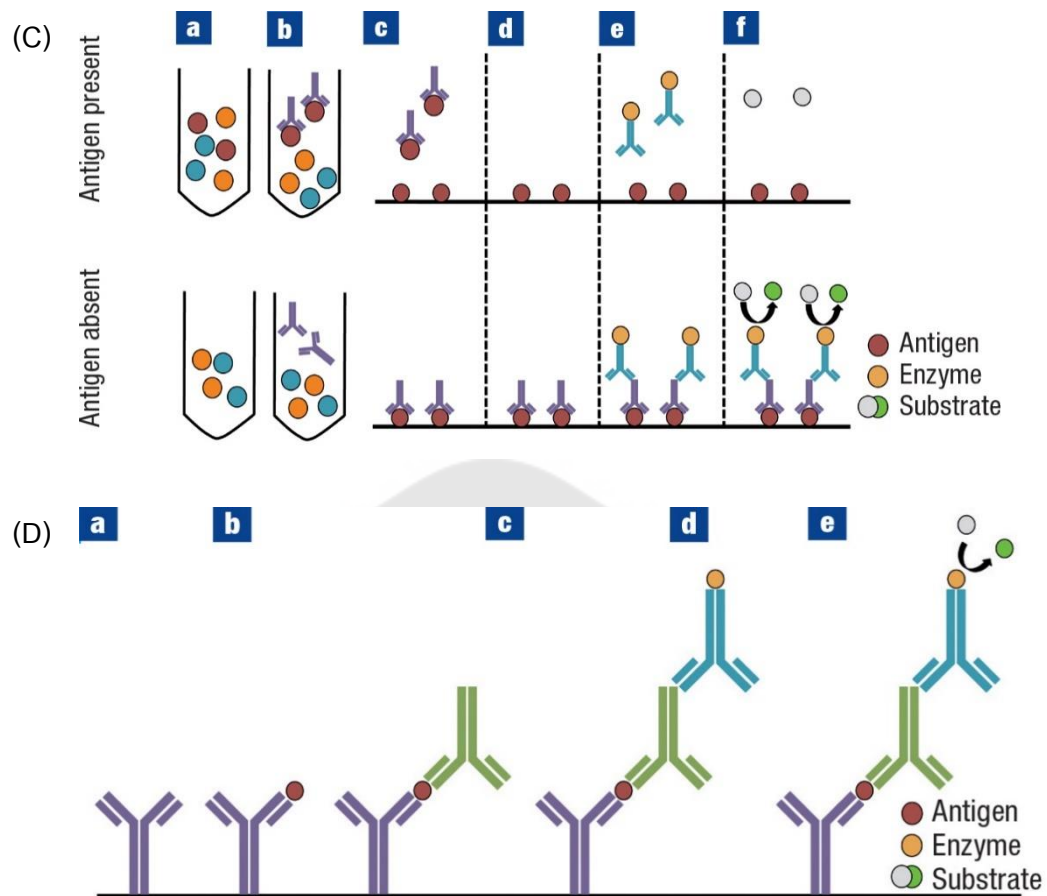
เป็นวิธีการวัดปริมาณแอนติเจน โดยอาศัยการแข่งขันในการจับ ทำได้โดยใช้แอนติบอดีผสมกับตัวอย่างแอนติเจนมาตรฐานหรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ให้เกิดเป็นคอมเพลกซ์ของแอนติเจน-แอนติบอดี (antigen-antibody complex) จากนั้นเติมลงในเพลท 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจน ซึ่งถ้าเติมตัวอย่างมากแอนติบอดีที่เหลือสำหรับจับกับแอนติเจนที่กันหลุมจะมีย่อยลง จากนั้นล้างคอมเพลกซ์ของแอนติเจน-แอนติบอดีและแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับแอนติเจนที่กันหลุมออกก่อนเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมด้วยเอนไซม์ และมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก เพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับแอนติเจนที่กันหลุม คล้ายกับ indirect ELISA แต่ในกรณีนี้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ (สีจาง) กว่าหลุมที่มีแอนติเจนความเข้มข้นต่ำ (ภาพประกอบ 11C)

## 4. Sandwich ELISA

วิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่ผสมอยู่กับสารชนิดอื่นในสารละลายได้ดี ทำได้โดยการใช้แอนติบอดีตัวตรึง (capture antibody) เคลือบในเพลท 96 หลุม จากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ทิ้งให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ถูกตรึงอยู่ ล้างแอนติเจนส่วนเกินออกก่อนเติมแอนติบอดีตัวตรวจสอบ (detection antibody) อีกตัวที่ติดหลุมเอนไซม์ และจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนบริเวณที่ต่างจากอีพิโทปที่แอนติบอดีตัวตรึงจับอยู่ ในขั้นตอนนี้แอนติเจนจะถูกจับไว้ตรงกลางในลักษณะของ sandwich จากนั้นล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรทและตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งกรณีนี้อาจดัดแปลงเป็นวิธี indirect ได้ โดยใช้แอนติบอดีอีกตัวที่ติดหลุมเอนไซม์ซึ่งแอนติบอดีนี้จำเพาะต่อแอนติบอดีตัวที่สองหรือแอนติบอดีตัวตรวจสอบ แต่ในกรณี indirect นี้ แอนติบอดีตัวตรึงและแอนติบอดีตัวตรวจสอบต้องมาจากสัตว์คนละชนิดกัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้าม (ภาพประกอบ 11D)



ภาพประกอบ 11 หลักการของ ELISA รูปแบบต่างๆ  
โดย (A) คือ direct ELISA (B) คือ indirect ELISA



ภาพประกอบ 11 (ต่อ) หลักการของ ELISA รูปแบบต่างๆ  
โดย (C) คือ competitive ELISA และ (D) คือ sandwich ELISA

ที่มา: Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98-C101.

จะเห็นได้ว่าเทคนิค ELISA แบบต่างๆ นิยมทำในตู้ดูดซับที่เป็นเพลท 96 หลุมทำให้สามารถทดสอบได้หลายตัวอย่างในคราวเดียว ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้ นอกจากนี้เทคนิค ELISA แบบต่างๆ ยังมีข้อดีและข้อเสียอื่นๆ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังแสดงในตาราง 3 และตาราง 4

ตาราง 3 ข้อดีและข้อเสียของเทคนิค ELISA

ข้อดี	ข้อเสีย
<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีความไวและความจำเพาะสูง เนื่องจากอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี</li> <li>- ตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ (high throughput)</li> <li>- รู้ผลได้รวดเร็ว</li> <li>- ใช้งานง่าย สามารถปฏิบัติการตามขั้นตอนได้</li> <li>- มีความยุ่งยากน้อย และไม่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญพิเศษ สามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจได้</li> <li>- สามารถพัฒนาให้วัดปริมาณของสารที่ต้องการตรวจได้</li> <li>- ใช้ตัวอย่างได้หลากหลาย เช่น ซีรัม พลาสมา น้ำเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- การอ่านผลตรวจต้องทำในทันที</li> <li>- ความไวและความจำเพาะขึ้นอยู่กับความสามารถของแอนติบอดีที่ผลิตได้</li> </ul>

(Duong et al., 2021; B. K. Kumar et al., 2011; Li et al., 2019; Mai et al., 2020)

ตาราง 4 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของ ELISA รูปแบบต่างๆ

รูปแบบของ ELISA	ข้อดี	ข้อเสีย
Direct ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- รวดเร็ว ใช้เวลาน้อย</li> <li>- ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีตัวที่สอง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความไวต่ำ</li> <li>- ต้องมีการเตรียมแอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนโดยเฉพาะ ทำให้เสียเวลาในการเตรียมมาก</li> </ul>
Indirect ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความไวสูง</li> <li>- ค่อนข้างประหยัดค่าใช้จ่าย</li> <li>- มีความยืดหยุ่นสูง สามารถใช้แอนติบอดีตัวแรกได้หลากหลาย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีความเสี่ยงที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีตัวที่สอง</li> </ul>
Competitive ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูง</li> <li>- มีช่วงของความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ค่อนข้างกว้าง</li> <li>- ใช้กับแอนติเจนที่มีขนาดเล็กได้</li> <li>- ความแปรปรวนต่ำ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีความจำเพาะต่ำกว่าแบบ sandwich</li> </ul>
Sandwich ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูง</li> <li>- มีความไวและความจำเพาะสูง</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องมีการทดสอบคู่ของแอนติบอดีตัวจริงและตัวตรวจสอบที่ให้ผลดีที่สุด</li> <li>- ใช้เวลามากกว่าแบบอื่นๆ</li> </ul>

ที่มา: Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98-C101.

## การประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค ELISA มาประยุกต์ใช้งานอย่างหลากหลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ และให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว จึงนิยมนำมาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนในอาหาร เช่น การใช้เทคนิค sandwich ELISA ตรวจการปนเปื้อนของ botulinum neurotoxin serotype B ในน้ำนม (Scotcher, Cheng, & Stanker, 2010) ใช้ในด้านการศึกษาวิจัย เช่น การใช้เทคนิค ELISA ในการคัดเลือกไฮบริโดมาโคลนในการผลิตโมโนโคลนอแอนติบอดี (Longyant, Sithigorngul, Thammapalerd, Sithigorngul, & Menasveta, 2000) ใช้ในด้านการแพทย์ การตรวจวินิจฉัยโรค เช่น การตรวจสอบเชื้อ HIV โดยการตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่างเลือด การพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับตรวจวัดปริมาณ AB peptide เพื่อวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ (Schmidt, Mazzella, Nixon, & Mathews, 2012)

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับการตรวจโรคในสัตว์ รวมไปถึงสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรและความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ตัวอย่างเช่น ในปี 2019 ได้มีการพัฒนาเทคนิค sandwich ELISA ที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบ KHV ในซีรัมของปลาคาร์พได้โดยตรง ซึ่งให้ผลการตรวจที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสอย่าง PCR ซึ่งเทคนิค sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบไวรัสที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด (limit of detection) ได้ที่ 3.923 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสชนิดอื่นที่พบในปลาคาร์พ (Li et al., 2019)

เชื้อ *Vibrio* บางสปีชีส์อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงและส่งออกสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงและส่งออกกุ้ง เนื่องจาก *Vibrio* บางชนิดที่ปนเปื้อนมากับกุ้งและอาหารทะเลอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น เชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยผู้ได้รับเชื้อจะมีอาการอาเจียนและท้องเสีย (Fujino et al., 1953) ในขณะเดียวกัน เชื้อ *Vibrio* บางสปีชีส์ยังเป็นสาเหตุของโรคระบาดที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น การตายของกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* (Jiravanichpaisal, Miyazaki, & Limsuwan, 1994) หรือโรคตับฝ่อเฉียบพลันซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ทำให้เกิดการตายอย่างรวดเร็วของกุ้ง (Tran et al., 2013)

เทคนิค ELISA เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ถูกพัฒนาเพื่อนำมาใช้ตรวจเชื้อ *Vibrio* ที่ก่อโรค ซึ่งอาจปนเปื้อนมากับสัตว์น้ำที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือส่งออก ซึ่งข้อดีที่สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้ที่หลายตัวอย่าง มีความไวและความจำเพาะสูง ให้ผลการตรวจที่ค่อนข้างเร็ว เป็นข้อได้เปรียบในการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ เนื่องจากทำให้สามารถตรวจสอบและคัดเลือกตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วก่อนที่ตัวอย่างจะเน่าเสีย และเป็นการประหยัดเวลาและต้นทุนได้ ตัวอย่างการพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อนำมาใช้ตรวจเชื้อ *Vibrio* ก่อโรค เช่น ในปี 2011 Kumar และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค sandwich ELISA สำหรับตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในตัวอย่างอาหารทะเล โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน TRH (TDH-related hemolysin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เทคนิค sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ โดยสามารถตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น  $10^3$  เซลล์ได้ เมื่อผ่านการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline peptone water ที่มีตัวอย่างอาหารทะเลเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในขณะที่ PCR สามารถตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น  $10^1$  เซลล์ได้ และเมื่อนำเทคนิคที่พัฒนานี้ไปทดลองใช้ในการตรวจตัวอย่างอาหารทะเล พบว่าให้ผลเป็นบวก 14 ตัวอย่าง จาก 34 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่เทคนิค PCR ให้ผลบวก 15 ตัวอย่าง ซึ่งผู้วิจัยได้วิเคราะห์ว่าผลการตรวจด้วยเทคนิค sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ผลที่คลาดเคลื่อนจากการตรวจด้วยเทคนิค PCR ไป 1 ตัวอย่าง อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการตรวจด้วยเทคนิค PCR เป็นการตรวจสอบยีน *trh* และ *tdh* (thermostable direct hemolysin) ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีนที่ออกซินที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* เป็นไปได้ว่าในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR แต่ให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจด้วยเทคนิค sandwich ELISA อาจมีการแสดงออกของยีน *trh* น้อย เนื่องจากมีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปริมาณไม่มากหรือเชื้ออาจตายไปแล้ว ทำให้ได้ผลผลิตเป็นโปรตีน TRH น้อย จึงเกิดผลลบเมื่อตรวจด้วยเทคนิค sandwich ELISA ซึ่งเป็นการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิค sandwich ELISA นับว่าเป็นเทคนิคที่มีข้อดีที่สามารถให้ผลการตรวจได้รวดเร็ว ตรวจได้คราวละหลายตัวอย่าง และเป็นเทคนิคที่ทำได้ไม่ยากเมื่อเทียบกับเทคนิค PCR จึงอาจนำมาใช้เป็นทางเลือกหรือเทคนิคที่ใช้ควบคู่กันไปในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างได้ (B. K. Kumar et al., 2011)

สำหรับการพัฒนาการตรวจสอบโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยเทคนิค ELISA มีรายงานว่า Mai และคณะได้พัฒนาการตรวจโรคตับฝ่อเฉียบพลันด้วยเทคนิค indirect ELISA ขึ้นในปี 2020 โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของท็อกซินในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อท็อกซิน A



และ B ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวในการตรวจสอบทั้งที่อกซิทิน A และ B อยู่ที่ 8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ผลบวกในการทดสอบกึ่งที่ติดเชื้อโรคตับฝ่อเฉียบพลันได้ 29 จาก 30 ตัวอย่าง (Mai et al., 2020) ต่อมาในปี 2021 Duong และคณะ ได้พัฒนาพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิทิน B โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่าย พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting มีความไวต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิทิน B และที่อกซิทิน B ธรรมชาติเป็น 6.25 และ 12.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิทิน B ที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Duong et al., 2021)



### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### แบคทีเรียและสัตว์ทดลอง

1. แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด *ToxA-pET-15b* ซึ่งมียีนที่ออกซิน A ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND
2. แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด *ToxB-pET-15b* ซึ่งมียีนที่ออกซิน B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND
3. แบคทีเรียไฮโซเลตต่างๆ ดังตาราง 5
4. หนูขาว (swiss mouse) สายพันธุ์ ICR เพศเมีย ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม

ตาราง 5 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี

No.	แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	แหล่งที่แยกเชื้อ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่ก่อโรค AHPND (VP <sub>AHPND</sub> )			
1	<i>V. parahaemolyticus</i> CN (China)	CENTEX	<i>Penaeus vannamei</i>
2	<i>V. parahaemolyticus</i> 3HP (Thailand)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
3	<i>V. parahaemolyticus</i> F2 (Thailand)	CPF	<i>P. vannamei</i>
4	<i>V. parahaemolyticus</i> F6 (Thailand)	CPF	<i>P. vannamei</i>
5	<i>V. parahaemolyticus</i> TR (Thailand)	CPF	<i>P. vannamei</i>
6	<i>V. parahaemolyticus</i> XN82 (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
7	<i>V. parahaemolyticus</i> XN83 (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
8	<i>V. parahaemolyticus</i> XN84 (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
9	<i>V. parahaemolyticus</i> XN86 (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
10	<i>V. parahaemolyticus</i> XN88 (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
11	<i>V. parahaemolyticus</i> XN89 (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
12	<i>V. parahaemolyticus</i> 2983MCO (Vietnam)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
13	<i>V. parahaemolyticus</i> SE-B2 (Malaysia)	CENTEX	<i>P. vannamei</i>

## ตาราง 5 (ต่อ)

No.	แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	แหล่งที่แยกเชื้อ
<i>V. campbellii</i> ที่ก่อโรค AHPND			
14	<i>V. campbellii</i> VH-639	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
15	<i>V. campbellii</i> VH-Surat	CENTEX	<i>P. vannamei</i>
<i>V. parahaemolyticus</i> ที่ไม่ก่อโรค AHPND (VP <sub>non-AHPND</sub> )			
16	<i>V. parahaemolyticus</i> VPV	VMRC	Aquatic animal
17	<i>V. parahaemolyticus</i> VPB	DABU	<i>P. monodon</i>
18	<i>V. parahaemolyticus</i> 45034	DABU	-
19	<i>V. parahaemolyticus</i> 5665	DMSC	Stool
20	<i>V. parahaemolyticus</i> 15285	DMST	Food
21	<i>V. parahaemolyticus</i> 20245	DMST	-
22	<i>V. parahaemolyticus</i> 21243	DMST	-
23	<i>V. parahaemolyticus</i> 21296	DMST	Chicken
24	<i>V. parahaemolyticus</i> 21308	DMST	Cuttlefish
25	<i>V. parahaemolyticus</i> 21318	DMST	Pork
<i>Vibrio</i> spp. และแบคทีเรียอื่นๆ			
26	<i>V. alginolyticus</i> 24049	DMST	Water
27	<i>V. vulnificus</i> 22441	DMST	Hemoculture
28	<i>V. campbellii</i> 21362	GB	-
29	<i>V. harveyi</i> H1	CPF	<i>P. monodon</i>
30	<i>V. fluvialis</i> 22086	DMST	Stool
31	<i>V. mimicus</i> 24053	DMST	Food
32	<i>V. cholerae</i> 22137	DMST	Stool
33	<i>V. ordalii</i>	DABU	-
34	<i>V. shilonii</i>	DBSWU	<i>P. vannamei</i>
35	<i>Aeromonas hydrophila</i> 04082	AAHRI	-
36	<i>Flavobacterium columnare</i> CUVET 1201	CUVET	Red tilapia
37	<i>Flavobacterium columnare</i> AT	CPF	Nile tilapia
38	<i>Shigella dysenteriae</i>	DMST	-
39	<i>Salmonella</i> Typhi	DMSM	-
40	<i>Morganella morganii</i>	DMST	-
41	<i>E. coli</i> ATCC 25922	ATCC	-

หมายเหตุ:

AAHRI = Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture

ATCC = The American Type Culture Collection

CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University

CUVET = Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

DMSC = Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand

DABU = Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

VMARC = Veterinary Medical Aquatic Research Center, Chulalongkorn University

DBSWU = Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd

GB= Ghent University, Belgium

- = ไม่ทราบแหล่งที่แยกเชื้อ

## อุปกรณ์และสารเคมี

### เครื่องมือ

1. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์ ของบริษัท Bio-Rad
2. ชุด mini-protein III electrophoresis ของบริษัท Bio-Rad
3. ชุด transblot apparatus ของบริษัท Bio-Rad
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น 5804 R ของบริษัท Eppendorf
5. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet) ของบริษัท NUAIRE
6. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO<sub>2</sub> incubator) ของบริษัท NUAIRE
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น RO8 ของบริษัท Memmert
8. ตู้อบ (hot air oven) ของบริษัท Sanyo

### เครื่องมือ (ต่อ)

9. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Jenway 6400 ของบริษัท Bausch & Lomb
10. เครื่องชั่ง รุ่น TE313S ของบริษัท Sartorius
11. เครื่องอ่านค่าดูดกลืนแสงจากไมโครเพลท (microplate reader) ของบริษัท Thermo
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำและความดัน (autoclave) รุ่น ES315 ของบริษัท Tomy
13. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70 ของบริษัท Olympus
14. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo
15. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo
16. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VX100 ของบริษัท Labnet

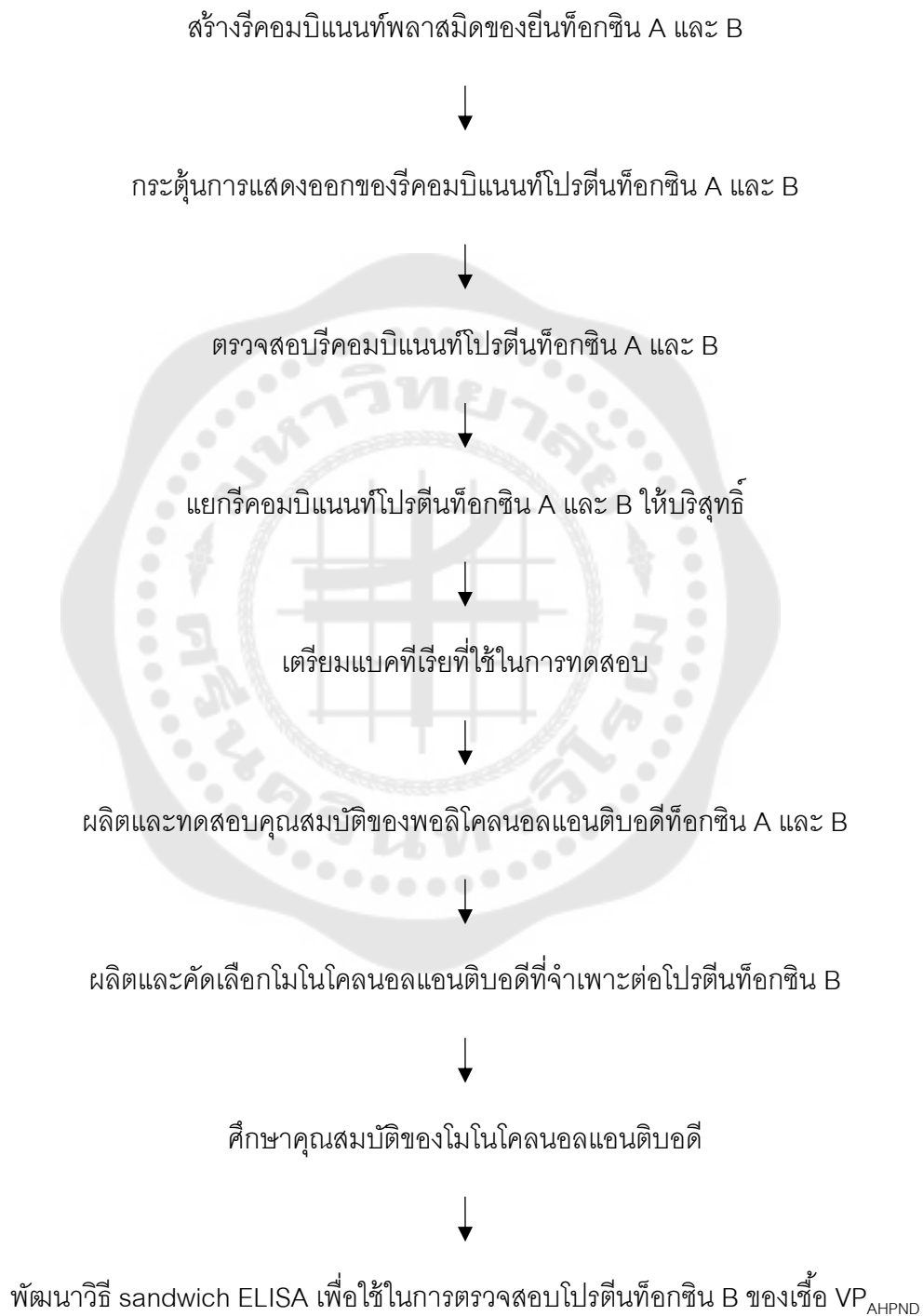
### สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth
  - 1.1 Tryptone type-1 (Casitone type-I) ของบริษัท HIMEDIA
  - 1.2 Yeast extract powder ของบริษัท HIMEDIA
  - 1.3 NaCl ของบริษัท Ajax Finechem
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ของบริษัท HIMEDIA
3. ผงวุ้น (agar powder) ของบริษัท HIMEDIA
4. ยาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol ของบริษัท SIGMA
5. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท GIBCO
6. Fetal bovine serum ของบริษัท Thermo
7. D-glucose ของบริษัท GIBCO
8.  $\text{NaHCO}_3$  ของบริษัท AMRESCO
9. Sodium pyruvate ของบริษัท SIGMA
10. HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylethanesulfonic acid) ของบริษัท AMRESCO
11. HT supplement ของบริษัท GIBCO
12. Aminopterin ของบริษัท SIGMA
13. Dimethyl sulfoxide (DMSO) ของบริษัท SIGMA
14. Polyethylene glycol (PEG) ของบริษัท SIGMA

**สารเคมี (ต่อ)**

15. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ของบริษัท BIO BASIC
16. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD
17. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide) ของบริษัท BIO BASIC
18. TRIS (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท AMRESCO
19. Glycine ของบริษัท AMRESCO
20. 2-mercaptoethanol ของบริษัท SIGMA
21. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD
22. TEMED (N',N',N',N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท PROMEGA
23. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ของบริษัท SIGMA
24. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ของบริษัท SIGMA
25. Coomassie brilliant blue R-250 ของบริษัท SIGMA
26. Coomassie brilliant blue G-250 ของบริษัท BIO BASIC
27. o-phenylenediamine (OPD) ของบริษัท SIGMA
28. Cobalt Chloride (CoCl<sub>2</sub>) ของบริษัท SIGMA
29. Imidazole ของบริษัท PanReac AppliChem
30. Goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ของบริษัท BIO-RAD
31. Goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) ของบริษัท BIO-RAD
32. Protein standard (Kaleidoscope™) ของบริษัท BIO-RAD
31. ชุด Zymed's Mouse MonoAb (HRP) ของบริษัท Zymed

วิธีดำเนินการทดลอง  
ดำเนินการโดยภาพรวม



## 1. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนที่ออกซิน A และ B

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ของยีน *ToxA* ขนาด 336 คู่เบส และยีน *ToxB* ขนาด 1,317 คู่เบส ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในฐานข้อมูล Genbank (accession number; KU556825.1) และโคลนเข้าสู่ expression vector (pET-15b) โดยบริษัท Genscript (New Jersey, USA) ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF โดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอก่อน transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA*-pET-15b หรือ *ToxB*-pET-15b ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นวางลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำลงอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (heat-shock) แล้วนำลงวางในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ป่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออก และเติม LB broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ก่อนนำไป spread บน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ป่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร LB broth และกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B ในขั้นตอนต่อไป

## 2. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A (His-ToxA) และ B (His-ToxB) โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA*-pET-15b หรือ *ToxB*-pET-15b มาเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ป่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที นำเชื้อตั้งต้นที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ป่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.6 ถึง 0.8 ก่อนกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยการเติม isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำไปป่มและเขย่าต่ออีก 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยใน 0.15 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม phenylmethane-sulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ก่อนนำไปทำให้เซลล์ของ



แบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 xg เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บสารละลายส่วนใส (lysate) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

### 3. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B

นำสารละลายส่วนใสที่ได้หลังจากการทำให้เซลล์แตกจากเชื้อ *E. coli* BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A หรือ B จากข้อ 2 มาผสมกับ 2X sodium dodecyl sulfate (SDS) treatment buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำไปโปรตีนไปแยกด้วย 15% SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ lysate จาก *E. coli* BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ไม่ถูกกระตุ้นการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย IPTG ทำการแยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้อมเจลาด้วยสี coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ควรมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 และ 50 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

### 4. การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B ให้บริสุทธิ์

การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ ทำโดยนำสารละลายส่วนใสที่ได้หลังจากการทำให้เซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแตกจากข้อ 2 มากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำไปแยกผ่าน metal ion affinity column HisTrap FF (GE Healthcare, USA) ล้างโปรตีนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย binding buffer (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) ก่อนชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) เก็บสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร ไปตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากนั้นรวบรวม fraction ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ มาโดยอะไลซ์ในสารละลาย PBS เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้นโดยใช้ชุด Vivaspin 6 (GE Healthcare) ที่มี molecular weight cut off 10 kDa จากนั้นนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี coomassie brilliant blue วัดความเข้มข้นของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford protein assay โดยเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin

(BSA) แบ่งสารละลายยรีคอมบีแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B บริสุทธิ์ ใส่หลอด หลอดละ 1 มิลลิกรัม เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 5. การเตรียมแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดสอบความจำเพาะ

นำแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังที่แสดงในตาราง 5 มาเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) โดยแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ให้เสริมอาหารด้วย 1.5% NaCl (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการล้างหน้าจานเพาะเชื้อด้วยสารละลาย PBS แล้วนำไปทำให้เชื้อตายด้วยความร้อน (heat-killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเจือจางเซลล์แขวนลอยด้วยสารละลาย PBS ให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^9$  CFU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นแบ่งเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 6. การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของพอลิโคลนอนแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซิน A และ B โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่าย

ดำเนินการผลิตพอลิโคลนอนแอนติบอดีโดยบริษัท ChinaPeptides (Shanghai, China) โดยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายด้วยยรีคอมบีแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A (His-ToxA) หรือ B (His-ToxB) บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) และฉีดกระตุ้นอีก 2 ครั้ง โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (IFA) การฉีดในแต่ละครั้งห่างกัน 14 วัน หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เจาะเลือดของกระต่าย นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บแอนติซีรัมและนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนแอนติบอดีด้วย 40% saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกตะกอนโปรตีนออกที่ความเร็ว 3000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้ไปแขวนลอยและไดอะไลซ์ในสารละลาย binding buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายส่วนใสและนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน protein A affinity column รวบรวม fraction ที่มีแอนติบอดีนำไปไดอะไลซ์ในสารละลาย PBS วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay ทดสอบความจำเพาะและความไวของพอลิโคลนอนแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting และ dot blotting

## 6.1 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting

นำ lysate จาก *E. coli* BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด, lysate รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A หรือ B, เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND (CN-VP<sub>AHPND</sub>) และไม่ก่อโรค AHPND (VP<sub>non-AHPND</sub>) ที่ผ่านการฆ่าด้วยความร้อน ผสมกับ 2X SDS treatment buffer ก่อนนำมาแยกด้วย 15% SDS-PAGE ผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายโปรตีนที่แยกได้จากเจลลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) โดยใช้ชุด transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto (ประกอบด้วย 5% non-fat dry milk, 0.1% Triton X-100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อปิดกั้นไม่ให้โปรตีนชนิดอื่นถูกดูดซับลงบนกระดาษส่วนที่ไม่มีแอนติเจน ก่อนล้างด้วย PBS และบ่มกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มกับ goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1: 3,000 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรท (ประกอบด้วย 0.030 % diaminobenzidine (DAB) 0.006% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.050% cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำสะอาด (ไพศาลสิทธิกรกุล, 2548) ตรวจสอบแถบตะกอนที่เกิดขึ้น

## 6.2 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A หรือ B ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตรหยดละ 1 ไมโครลิตร อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย PBS และบ่มกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มกับ GAR-HRP เจือจาง 1:3,000 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทเช่นเดียวกับข้อ 6.1 ตรวจสอบระดับความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่แสดงปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์ที่ออกซิน โดยสังเกตความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยาและเกิดตะกอนสีดำบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

## 7. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND

### 7.1 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A หรือ B

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A (His-ToxA) หรือ B (His-ToxB) บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาวตัวละ 100 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติเจนเป็น 50 ไมโครกรัม และฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้งโดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant การฉีดในแต่ละครั้งห่างกัน 14 วัน หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บเลือดของหนูแต่ละตัว โดยการเจาะแฉ่งเลือดบริเวณตา (orbital sinus) นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดออกเพื่อเก็บแอนติซีรัมมาทดสอบความจำเพาะต่อที่อกซิน A หรือ B โดยวิธี Western blotting เลือกรูปร่างที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซินอีกครั้ง ก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน

สำหรับการผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน A หรือที่อกซิน B นั้น แบ่งเป็น 2 ส่วนคือการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน A และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน B ซึ่งมีขั้นตอนในการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะคล้ายคลึงกัน แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อที่อกซิน A ได้ จึงเขียนบรรยายเฉพาะขั้นตอนการผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อที่อกซิน B เท่านั้น

### 7.2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษานี้พัฒนาจากวิธีการดั้งเดิมของ Köhler และ Milstein ในปี 1976 ซึ่งถูกดัดแปลงในปี ค.ศ. 1979 โดย Mosmann Bauman และ Williamson โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซินที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้ามให้เป็นเซลล์เดี่ยว แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ 50% polyethylene glycol (PEG) หลังจากนั้นนำเซลล์ลูกผสมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine และ 20% fetal bovine serum ในอาหาร RPMI 1640 และมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ในเพลท 96 หลุมจำนวน 20 เพลท บ่มไว้ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมที่มี

เซลล์ไฮบริโดมาไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน B โดยวิธี dot blotting และ Western blotting

### 7.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในเพลท 96 หลุมซึ่งมีจำนวน 20 เพลท ทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องทำการคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อน จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากโคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting ในขั้นที่ 1 มาคัดเลือกขั้นที่ 2 ต่อโดยวิธี dot blotting และ Western blotting

#### 7.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

สำหรับการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน B ด้วยวิธี dot blotting ทำโดยแยกการหยดแอนติเจนออกเป็นสองส่วนคือ 1) lysate ชื่อ *E. coli* BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ 2) lysate ชื่อ *E. coli* BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส อบกระดาษที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto ก่อนนำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม เจือจาง 1:8 ด้วย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้งแล้วนำมาบ่มกับ goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1: 3,000 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรท เช่นเดียวกับข้อ 6.1 เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำสะอาด เลือกลายไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะ lysate ชื่อ *E. coli* BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B แต่ไม่จับกับ lysate ชื่อ *E. coli* BL21 นำไปคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting ต่อไป

#### 7.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting

สำหรับการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน B ในขั้นที่ 2 ทำโดยการหยดแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ 4 แบบ ได้แก่ 1) lysate ชื่อ *E. coli* BL21 2) lysate ชื่อ *E. coli* BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B 3) เซลล์แบคทีเรียไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND (VP<sub>non-AHPND</sub>) และ 4) ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND (CN-VP<sub>AHPND</sub>) ที่ผ่านการฆ่าด้วยความร้อน หยดแอนติเจนดังกล่าวลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาบ่มกับน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot

blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:20 ในสารละลาย 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย PBS และนำมาบ่มกับ GAM-HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทเช่นเดียวกับข้อ 6.1 คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อท็อกซิน B ทั้งในรูปแบบของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และรูปแบบธรรมชาติของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

### 7.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blotting

นำเชื้อ CN-VP<sub>AHPND</sub> ที่ผ่านการฆ่าด้วยความร้อน ความเข้มข้น  $1 \times 10^9$  CFU ต่อ มิลลิลิตร มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนที่แยกได้จากเจล ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ชุด transblot apparatus จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ได้รับการถ่ายโปรตีนแล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย PBS แยกบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:20 ในสารละลาย 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มกับ GAM-HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทเป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำสะอาด ตรวจสอบแถบตะกอนที่เกิดขึ้น เพื่อยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีที่มาจากโคลนของไฮบริโดมาที่ผลิตได้

### 7.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

นำโคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนท็อกซิน B ของ VP<sub>AHPND</sub> ซึ่งผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ขั้นตอนมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar, 1985) ทำโดยกระจายเซลล์ไฮบริโดมาในเพลท 96 หลุมโดยใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงหลายๆ ครั้ง หยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 ไมโครลิตร นำไปตรวจดูใต้กล้อง inverted microscope และปรับให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ จากนั้นเติมอาหาร RPMI ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum และ 1% mouse red blood cell ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงในเพลท 96 หลุมในแถวที่ 1-6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมอาหาร RPMI เพิ่มลงในจานอีก 2.5 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ลงในแถวที่ 7-12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา นำน้ำเลี้ยงเซลล์ของหลุมที่มีไฮบริโดมาโคลนเดี่ยวมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ก่อนขยายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป

## 8. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากการโคลนซ้ำและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติ โดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ทำการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA รวมทั้งทดสอบความไวและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังนี้

### 8.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ในเพลท ELISA บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงสกัดออกและล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที แล้วจึงสกัดออกก่อนเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 หรือ 2 ชนิดที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1: 20 ในสารละลาย 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุมต่างๆ (ภาพประกอบ 12) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนสกัดออกแล้วล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1: 1,500 ในสารละลาย 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายสับสเตรท ประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006%  $H_2O_2$  ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N  $H_2SO_4$  ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

MAbs	A	B	C	D
A	A+A	A+B	A+C	A+D
B		B+B	B+C	B+D
C			C+C	C+D
D				D+D

ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบอิมูโนโพลีเมอร์ของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

โดยตัวอักษร A-D แสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่จำเพาะต่อที่อกซิม B ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND)

## 8.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's mouse MonoAb (HRP) ดังนี้ ทำการตรึง goat anti-mouse Ig heavy chain and light chain specific antibody (GAM H+L) ลงที่พื้นผิวของเพลท ELISA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดออกแล้วล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที สกัดออกก่อนเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1: 20 ในสารละลาย 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ (1-12) (ภาพประกอบ 13) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นสกัดออกและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนเติม rabbit anti-isotype antibody แต่ละชนิดเจือจาง 1: 50 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในแถวแต่ละแถว (A-H) (ภาพประกอบ 14) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนสกัดออกและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม GAR-HRP เจือจาง 1: 1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดออกและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายสับสเตรทและหยุดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการตรวจสอบอิมูโนโพลีเมอร์ที่บัพซันในข้อ 8.1 สังเกตปฏิกิริยาที่



เกิดขึ้นในแต่ละหลุม โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจะให้สีเหลืองส้ม 1 หลุมตาม isotype และอีก 1 หลุมตามชนิดของโปรตีนสายสั้น (light chain)

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

ภาพประกอบ 13 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละ

โคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA

ลูกศรแสดงการเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบลงในแต่ละคอลัมน์ (1 คอลัมน์ต่อ 1 โคลนที่ต้องการทดสอบ)

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

ภาพประกอบ 14 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแต่ละ

โคลนของไฮบริโดมา ด้วยวิธี sandwich ELISA

ลูกศรแสดงการเติม rabbit anti-isotype antibody แต่ละชนิดในแต่ละแถว ตั้งแต่แถว A-H

### 8.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางเป็นลำดับ แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ เจือจาง 1:100 ใน 1% blotto เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มกับ GAM-HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรท เช่นเดียวกับข้อ 6.1 ตรวจสอบระดับความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แสดงปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์ที่ออกซิน โดยสังเกตความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยาและเกิดตะกอนสีดำบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

### 8.4 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting

นำ lysate จาก *E. coli* BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด, lysate รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B, เชื้อ CN-VP<sub>AHPND</sub> และเชื้อ VP<sub>non-AHPND</sub> ที่ผ่านการฆ่าด้วยความร้อน ความเข้มข้น  $1 \times 10^9$  CFU ต่อมิลลิลิตร มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนที่แยกได้จากเจลลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ชุด transblot apparatus จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ได้รับการถ่ายโปรตีนแล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย PBS บ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ เจือจาง 1:100 ใน 1% blotto เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มกับ GAM-HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรท เช่นเดียวกับข้อ 6.1 ตรวจสอบแถบตะกอนที่เกิดขึ้น

### 8.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

ทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> หรือ *Vibrio* ที่ก่อโรค AHPND กับเชื้อ VP<sub>non-AHPND</sub> และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ดังตาราง 5 โดยหยดเชื้อที่ผ่านการฆ่าด้วยความร้อนความเข้มข้น  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนแช่ใน 5% blotto และล้างด้วย PBS จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ เจือจาง 1:100 ใน 1% blotto เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ก่อนบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงกับ GAM-HRP เจือจาง 1:3,000 ล้างด้วย PBS

และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรท เช่นเดียวกับข้อ 6.1 ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

## 9. การพัฒนาวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิทิน B ของเชื้อ

VP<sub>AHPND</sub>

### 9.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำโคลนของไฮบริโดมาที่คัดเลือก (มีความจำเพาะและความไวสูงสุด) มาเลี้ยงและโคลนซ้ำ (reclone) ขยายเซลล์จนมีจำนวนประมาณ 50 ล้านเซลล์ บั่นแยกเซลล์และนำไปเลี้ยงใน serum free medium รวบรวมน้ำเลี้ยงเซลล์ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน protein A หรือ protein G affinity column ขึ้นอยู่กับ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้โดยวิธี SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford protein assay ปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บใส่หลอดและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป

### 9.2 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับวิธี sandwich ELISA

ในการพัฒนาวิธี sandwich ELISA สำหรับตรวจสอบที่อกซิทิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ได้ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ 1) ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ใช้ตรึงที่พื้นผิวเพลท ELISA (capture antibody) โดยทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน PBS ทำ two-fold serial dilution ไปจนถึง 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2) ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ใช้ตรวจสอบ (detection antibody) โดยทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน 1% blotto ทำ two-fold serial dilution ไปจนถึง 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 9.3 วิธี sandwich ELISA เพื่อตรวจสอบที่อกซิทิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

ขั้นตอนของ sandwich ELISA เพื่อตรวจสอบที่อกซิทิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> เริ่มจากการตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้นที่เหมาะสม เจือจางใน PBS ลงในแต่ละหลุมของเพลท ELISA ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สกัดออกและล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน

4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม 5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สกัดออก ก่อนเติมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเชื้อจางใน 1% blotto ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดออกและล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ตรวจสอบตามความเข้มข้นที่เหมาะสม เชื้อจางใน 1% blotto ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดออกและล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม GAR-HRP ความเข้มข้น 1:1500 เชื้อจางใน 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที สกัดออกและล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS ก่อนเติมสารละลายสับสเตรท ประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

#### 9.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 50,000, 20,000, 10,000, 5,000, 2,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 และ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อจางใน 1% blotto สำหรับใช้เป็นแอนติเจนเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B

## 9.5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี sandwich ELISA ที่ใช้สำหรับตรวจสอบ ที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

### 9.5.1 การทดสอบความไวของวิธี sandwich ELISA

เตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย 1% blotto และใช้เป็นแอนติเจนเพื่อทดสอบความไวของวิธีการ sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้น โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 9.2 ทำการคำนวณค่าดูดกลืนแสงและค่าปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) และค่าดูดกลืนแสงและค่าปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถวัดในเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้อง (limit of quantitation; LOQ) ตามวิธีการของ Shrivastava., et al 2011

$$\text{LOD}_{\text{OD}} = \text{Mean}_{\text{blank}} + 3\text{SD}$$

$$\text{LOQ}_{\text{OD}} = \text{Mean}_{\text{blank}} + 10\text{SD}$$

$$\text{LOD}_{\text{conc.}} = \frac{3\text{SD}}{\text{slope}}$$

$$\text{LOQ}_{\text{conc.}} = \frac{10\text{SD}}{\text{slope}}$$

เมื่อ  $\text{Mean}_{\text{blank}}$  คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของ blank ที่ 492 นาโนเมตร

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

### 9.5.2 การทดสอบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้ามของวิธี sandwich ELISA

นำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND และไม่ได้ก่อโรค AHPND ชนิดต่างๆ ดังตาราง 5 มาเจือจางด้วย 1% blotto ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น  $1 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบด้วยวิธี sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้น โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 9.3 สามารถสังเกตปฏิกิริยาจากสีที่เกิดขึ้น หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

### 9.5.3 การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของวิธี sandwich ELISA

ค่าความถูกต้องของวิธี sandwich ELISA ที่ใช้สำหรับตรวจสอบที่อกซิม B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> วิเคราะห์ได้จากค่า %recovery โดยทำการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิม B ในสารละลาย 1% blotto ที่มีตัวอย่างเนื้อกึ่งผสมอยู่ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็น 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปตรวจด้วยวิธี sandwich ELISA และดำเนินการตามข้อ 9.3 เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % recovery ตามวิธีการของ Lugos et al., 2019 โดยมีเกณฑ์การยอมรับ %recovery อยู่ในช่วง 80 - 120%

$$\%RC = \frac{\text{ความเข้มข้นของที่อกซิมที่วัดได้}}{\text{ความเข้มข้นของที่อกซิมที่เติมลงไป}} \times 100$$

ค่าความแม่นยำวิเคราะห์ได้โดยการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation; %CV) ของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (inter-assay) โดยทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจากสูตร

$$\%CV = \frac{SD}{\mu} \times 100$$

เมื่อ %CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดข้อมูล

$\mu$  คือ ค่าเฉลี่ยของชุดข้อมูล

### 9.6 การตรวจสอบโปรตีนที่ออกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth ที่มีตัวอย่างเนื้อกึ่ง

นำเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ไอโซเลต F2 ที่เก็บรักษาอยู่ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหาร TSA ที่เสริมด้วย 1.5% NaCl บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยล้างหน้าจานเพาะเชื้อด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ เจือจางเซลล์แขวนลอยให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $1 \times 10^9$  CFU ต่อ มิลลิเมตร) นำเซลล์แขวนลอยมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ชั้นละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ในอาหาร TSB ที่เสริมด้วย 1.5% NaCl ที่มีตัวอย่างเนื้อกึ่งขาวผสมอยู่ 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้มีเชื้อความเข้มข้นสุดท้ายเป็น  $1 \times 10^7$  ถึง 1 CFU ต่อ มิลลิเมตร และใช้อาหารที่มีตัวอย่างเนื้อกึ่งแต่ไม่มีการผสมเชื้อเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาดังกล่าว โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำมาทำให้เชื้อตายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีในข้อ 7.3 อีกส่วนนำมาผสมกับ lysis buffer (30 mM Tris, 336 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 9.3) ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ก่อนนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ sandwich ELISA ตามวิธีในข้อ 9.3 เปรียบเทียบระดับการเจือจางของเชื้อแบคทีเรียสูงสุดและระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่แต่ละวิธีสามารถตรวจพบที่ออกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

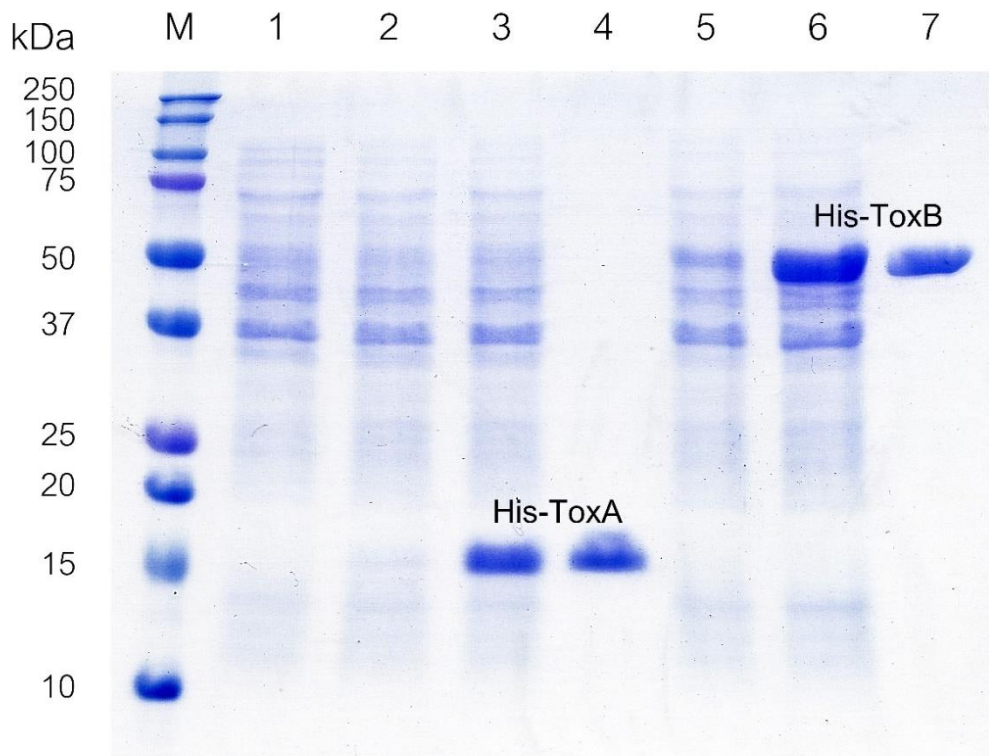
## บทที่ 4

### ผลการดำเนินงานวิจัย

#### 1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA-pET-15b* และ *ToxB-pET-15b* ที่โคลนได้ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีน *ToxA* (336 คู่เบส) และยีน *ToxB* (1,317 คู่เบส) ของเชื้อ *VP<sub>AHPND</sub>* ที่รายงานในฐานข้อมูล GenBank ร้อยละ 100 และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน open reading frame ของพลาสมิด pET-15b อย่างถูกต้อง โดยสามารถถอดรหัสได้กรดอะมิโน 112 และ 439 หน่วย ตามลำดับ จึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังเก็บเซลล์ของแบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตก และทำการวิเคราะห์ผลโดยแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรีย *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซินได้ทั้ง 2 ชนิด และสามารถทำโปรตีนบริสุทธิ์ได้จากการแยกผ่าน metal ion affinity column โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A (His-ToxA) มีขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 15 แถวที่ 3 และ 4) และรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B (His-ToxB) มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 15 แถวที่ 6 และ 7) ในขณะที่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด หรือมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว (ภาพประกอบ 15 แถวที่ 1, 2 และ 5)





ภาพประกอบ 15 การตรวจสอบการแสดงออกและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B ด้วยวิธี SDS-PAGE

โดยนำ lysate ชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียและโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมสีเจลาด้วย coomassie brilliant blue R-250 เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA*-pET-15b ที่ยังไม่ได้กระตุ้นการแสดงออก

แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA*-pET-15b ที่ได้รับการกระตุ้นการแสดงออก

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A (ขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน) หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

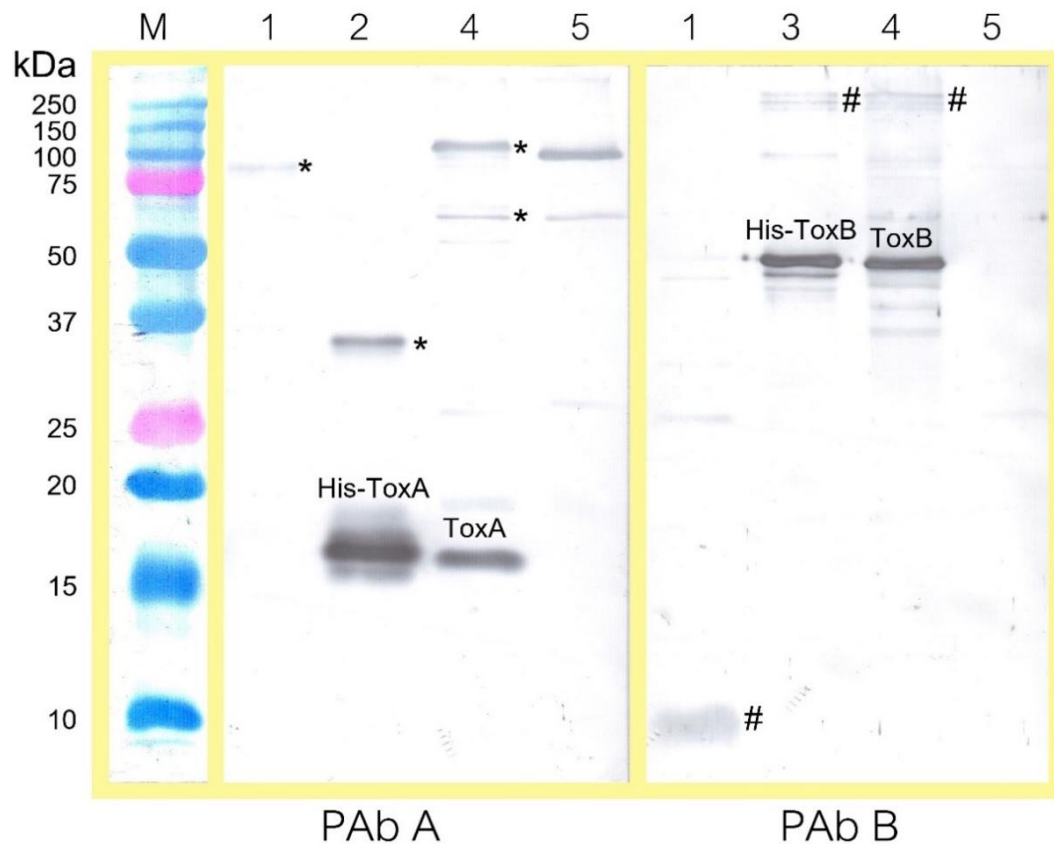
แถวที่ 5 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxB*-pET-15b ที่ยังไม่ได้กระตุ้นการแสดงออก

แถวที่ 6 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxB*-pET-15b ที่ได้รับการกระตุ้นการแสดงออก

แถวที่ 7 รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B (ขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน) หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

## 2. การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน A และ B โดยการปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่าย

จากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน A และ B ที่ผลิตได้ไปปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่าย ก่อนเก็บแอนติซีรัมและทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์และนำมาทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blotting พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่ายด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A (rabbit anti His-ToxA antibody) มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A และสามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND (VP<sub>AHPND</sub>) ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีนที่อกซิน A ของเชื้อที่ก่อโรค AHPND เช่นเดียวกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B (rabbit anti His-ToxB antibody) พบว่ามีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B และสามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีนที่อกซิน B ของเชื้อก่อโรค AHPND นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) โดยจับกับโปรตีนขนาดต่างๆ ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND (VP<sub>non-AHPND</sub>) (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ lysate ชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียมาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วทำการย้ายแถบโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ก่อนนำมาบ่มกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อท็อกซิน A (PAb A) หรือท็อกซิน B (PAb B) โดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (M)

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA*-pET-15b

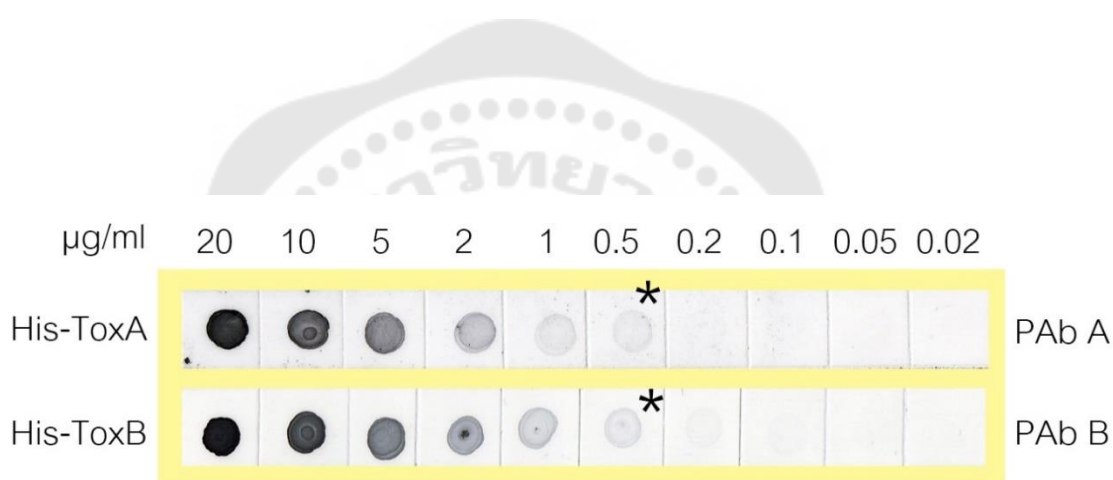
แถวที่ 3 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxB*-pET-15b

แถวที่ 4 เซลล์แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND ( $VP_{AHPND}$ )

แถวที่ 5 เซลล์แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND ( $VP_{non-AHPND}$ )

(\* และ # คือโปรตีนอื่นๆ ที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ)

เมื่อทำการทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี dot blotting โดยการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A หรือ B ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ก่อนนำไปป่มกับ พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน A หรือ B ที่ผลิตได้ พบว่าแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด สามารถตรวจจ้บรีคอมบิแนนท์ที่อกซินได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพประกอบ 17)

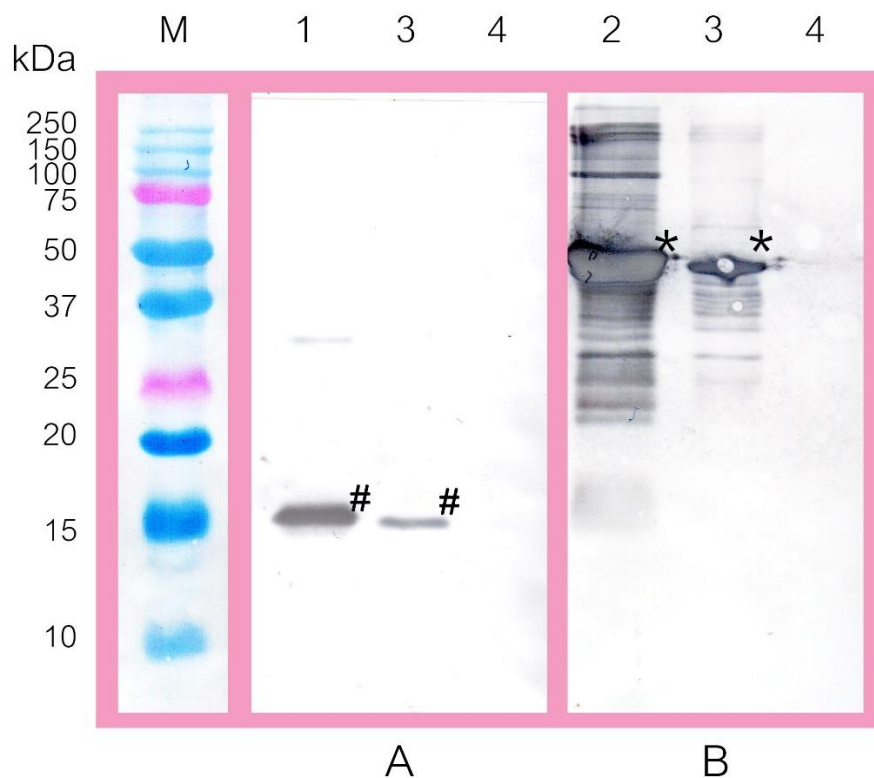


ภาพประกอบ 17 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี dot blotting โดยการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน A (His-ToxA) หรือที่อกซิน B (His-ToxB) มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 20 ถึง 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อจุด แล้วนำไปป่มกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน A (PAb A) หรือที่อกซิน B (PAb B) (\* คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้)

### 3. การผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND

#### 3.1 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

หลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A หรือ B จำนวน 4 ครั้ง เมื่อเก็บซีรัมมาทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A มีการตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และสามารถจับกับโปรตีนที่ออกซิน A ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND ขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 18A) ส่วนหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B มีการตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B และสามารถจับกับโปรตีนที่ออกซิน B ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND ขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังตอบสนองต่อโปรตีนขนาดต่างๆ ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND (ภาพประกอบ 18B) จึงนำหนูทดลองดังกล่าวมาทำการปลูกภูมิคุ้มกันอีกครั้งเพื่อทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป



ภาพประกอบ 18 การทดสอบแอนติซีรัมจากหนู โดยวิธี Western blotting

โดยนำ lysate รีคอมบิแนนท์โปรตีนและแบคทีเรียที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค AHPND มาแยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้ายแถบโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาบ่มกับแอนติซีรัมจากหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย A) รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B) รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B โดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (M)

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA*-pET-15b

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxB*-pET-15b

แถวที่ 3 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND

แถวที่ 4 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND

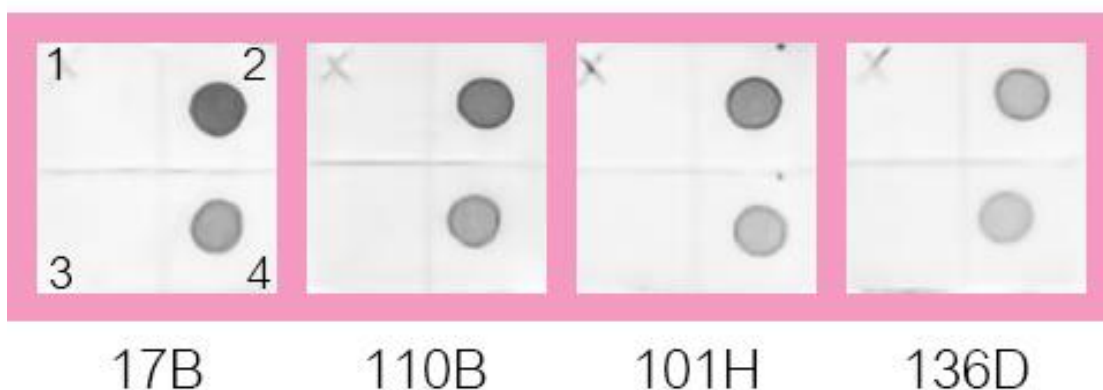
(# คือ โปรตีนของที่ออกซิน A ขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน และ \* คือ โปรตีนของที่ออกซิน B ขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน)

### 3.2 การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการนำเซลล์ม้ามของหนูที่ตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A หรือ B มาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาและเพาะเลี้ยงในเพลท 96 หลุม ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซิน A ได้ จึงแสดงเฉพาะผลการผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่ออกซิน B โดยเมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบปฏิกิริยากับที่ออกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> พบหลุมที่ให้ผลบวกประมาณ 10 หลุม เมื่อคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting พบว่าสามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซิน B ได้จำนวน 4 โคลน คือ 17B, 110B, 101H และ 136D ซึ่งจากการตรวจสอบความจำเพาะด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่ผลิตได้ สามารถจับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B และจับกับเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND และ lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่ใช้เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (ภาพประกอบ 19)

สำหรับการทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่ผลิตได้ สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน His-ToxB และจับกับโปรตีนขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตันของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีนที่ออกซิน B ตามธรรมชาติ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไอโซเลตที่ไม่ก่อโรคและ lysate จาก *E. coli* BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (ภาพประกอบ 20)

ทั้งนี้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตได้ดังกล่าวสามารถเพาะเลี้ยงต่อไปเป็น cell line ถาวรได้ ส่วนการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ชุด Zymed's Mouse MonoAb ID (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่ผลิตได้มี class เป็น IgG โดยมี subclass IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>2b</sub> ส่วน light chain เป็น kappa (K) ดังตาราง 7



ภาพประกอบ 19 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน B ชั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดตัวอย่างชนิดต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาบ่มกับ น้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ 17B, 110B, 101H และ 136D ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับสับเสตรทและสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเห็นเป็นจุดสีดำ

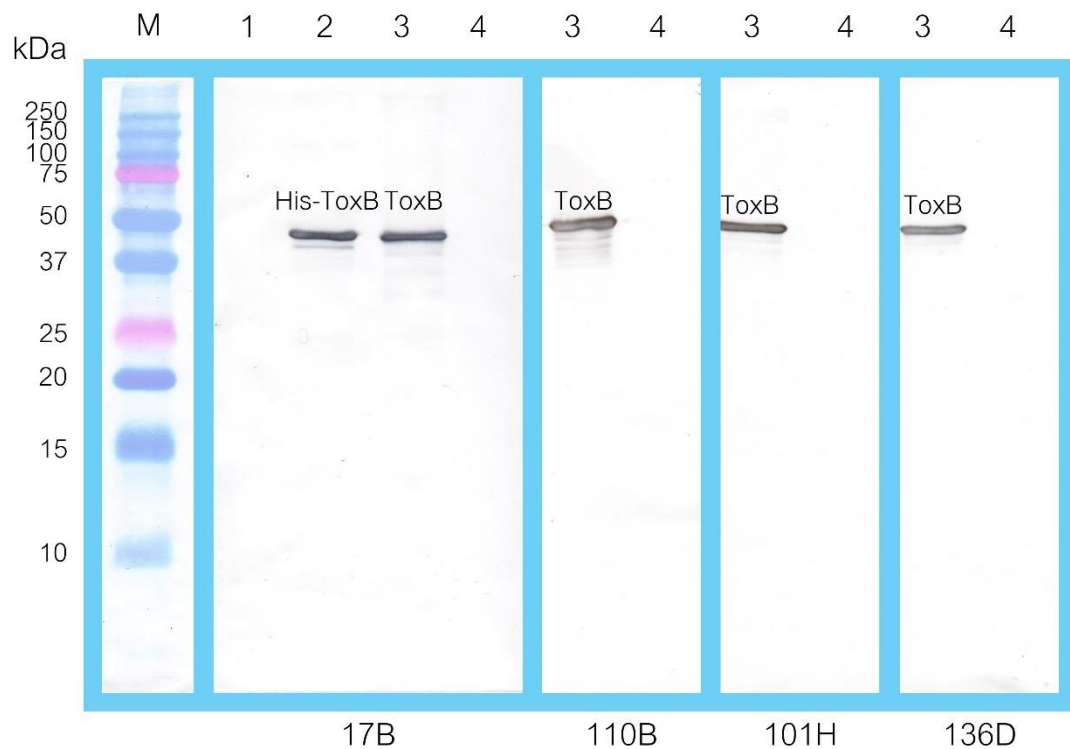
ช่องที่ 1 lysate เซลล์ *E. coli* BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ช่องที่ 2 lysate เซลล์ *E. coli* BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B

ช่องที่ 3 เซลล์แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND

ช่องที่ 4 เซลล์แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND





ภาพประกอบ 20 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ผลิตได้  
ด้วยวิธี Western blotting

โดยนำ lysate และเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค AHPND มาแยกโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE แล้วทำการย้ายแถบโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (17B, 110B, 101H และ 136D) โดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (M)

แถวที่ 1 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

แถวที่ 2 lysate ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B

แถวที่ 3 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND

แถวที่ 4 เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND

#### 4. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

##### 4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปที่จับของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนทีอกซิน B ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำนวน 3 โคลน คือ 17B, 110B, และ 101H จับที่อิพิโทปตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เมื่อนำมาผสมรวมกัน (combine) มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อย (ไม่เกิน 0.200) เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 136D น่าจะจับตำแหน่งอิพิโทปที่ต่างออกไป อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ดังตาราง 6

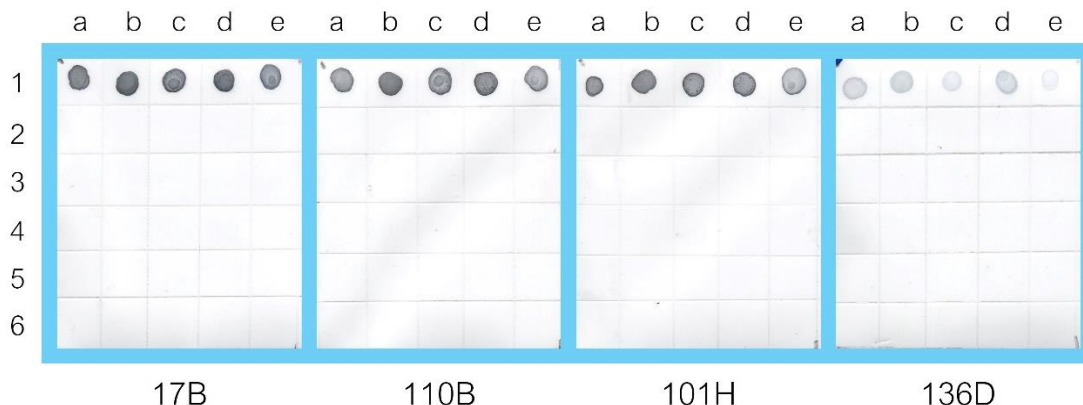
ตาราง 6 ค่าดูดกลืนแสงจากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ด้วยวิธี indirect ELISA

MAbs	17B	110B	101H	136D
17B	1.572	1.535	1.506	1.613
110B		1.427	1.622	1.572
101H			1.049	1.423
136D				0.844

#### 4.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดสอบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ จำนวน 30 ไอโซเลต ด้วยวิธี dot blotting โดยนำแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B, 110B, 101H และ 136D พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 4 โคลนสามารถจับกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. campbellii* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp. ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค AHPND และแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ ที่ใช้ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะโปรตีนที่ออกซิน B สามารถใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างที่ออกซินและก่อโรค AHPND ได้ (ภาพประกอบ 21)





ภาพประกอบ 21 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ จากตาราง 5 ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (17B, 110B, 101H และ 136D) ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

แถวที่ 1 เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND (a-d) ได้แก่ ไอโซเลต CN, 3HP, XN82, และ SE-B2 และ (e) *V. campbellii* VH-639

แถวที่ 2 เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ก่อโรค AHPND (a-e) ได้แก่ ไอโซเลต VPV, VPB, 45034, 5665, และ 15285

แถวที่ 3 เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ก่อโรค AHPND (a-e) ได้แก่ ไอโซเลต 20245, 21243, 21296, 21308 และ 21318

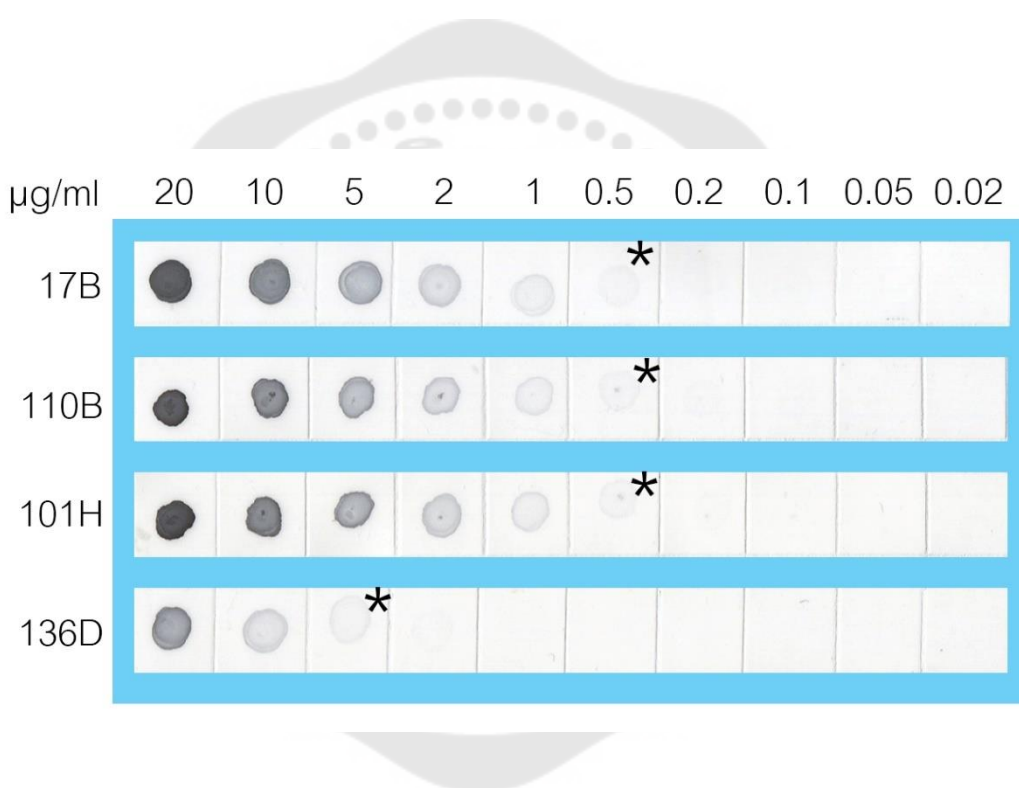
แถวที่ 4 เชื้อ *Vibrio* ที่ไม่ก่อโรค AHPND (a) *V. alginolyticus* 24049, (b) *V. vulnificus* 22441, (c) *V. campbellii* 21362, (d) *V. harveyi* H1, (e) *V. fluvialis* 22086

แถวที่ 5 เชื้อ *Vibrio* ที่ไม่ก่อโรค AHPND และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ (a) *V. mimicus* 24053, (b) *V. cholerae* 22137, (c) *V. ordalii*, (d) *V. shilonii*, (e) *Aeromonas hydrophila* 04082

แถวที่ 6 เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ (a) *Flavobacterium columnare* CUVET 1201, (b) *Salmonella* Typhi, (c) *Shigella dysenteriae*, (d) *Morganella morganii*, (e) *E. coli* ATCC 25922

### 4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ก่อนนำไปทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ได้แก่ 17B, 110B, 101H และ 136D พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 17B, 110B และ 101H สามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B ที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่โคลน 136D ตรวจสอบได้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 22 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้ด้วยวิธี dot blotting

โดยการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 20 ถึง 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อจุด นำไปป่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 17B, 110B, 101H และ 136D (\* คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้)

ตาราง 7 สรุปคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ที่ผลิตได้ ซึ่งทดสอบโดยวิธี dot blotting และ Western blotting

MAb (Isotype)	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจน โดยวิธี dot blotting (µg/ml)	ความจำเพาะต่อ แอนติเจนโดยวิธี Western blotting (ขนาด (kDa))	ปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค
17B (IgG <sub>2b</sub> )	0.5	ที่อกซิน B (~50)	-
110B (IgG <sub>1</sub> )	0.5	ที่อกซิน B (~50)	-
101H (IgG <sub>2b</sub> )	0.5	ที่อกซิน B (~50)	-
136D (IgG <sub>1</sub> )	5	ที่อกซิน B (~50)	-

## 5. การพัฒนาวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

จากการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี และทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ได้แก่ class และ subclass อีพิโทป ความไว ความจำเพาะ และปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีแล้ว จึงเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B ที่จำเพาะต่อที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> เนื่องจากเป็นแอนติบอดีที่มีความไวและความจำเพาะสูง จับได้ทั้งที่อกซิน B ในรูปแบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนและรูปแบบธรรมชาติ และจากการทดสอบอีพิโทปด้วยวิธี ELISA แสดงให้เห็นว่าเป็นแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด จึงเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาใช้ร่วมกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีเพื่อพัฒนาเป็นวิธี sandwich ELISA สำหรับตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ต่อไป

### 5.1 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ทำโดยการตั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 20, 10, 5, 2.50, 1.25, 0.63, 3.12 และ 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไว้ที่พื้นผิวเพลท ELISA จากนั้นใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวตัวอย่างที่ให้ผลบวก และเชื้อ VP<sub>non-AHPND</sub> เป็นตัวอย่างที่ให้ผลลบ จากนั้นเติมพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน B ซึ่งใช้เป็นแอนติบอดีสำหรับการตรวจสอบ ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 20, 10, 5, 2.50, 1.25, 0.63, 3.12 และ 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรทและอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร แล้วคำนวณอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อตัวอย่างที่ให้ผลลบ (P/N ratio) พบว่าค่าความเข้มข้นที่มีค่าอัตราส่วนมากที่สุดได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 8) จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ต่อไป

ตาราง 8 แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

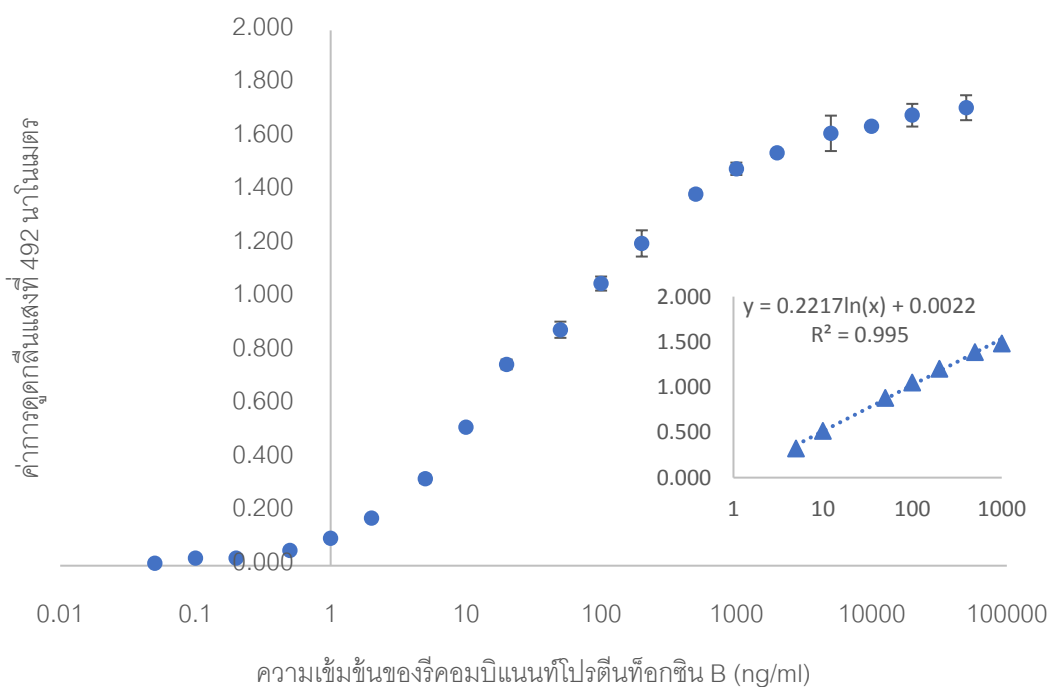
P/N ratio	ความเข้มข้นของพอลิโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจสอบ ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	20	10	5	2.50	1.25	0.63	3.12	0.16	
ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จริงบนผิวหลอด ( $\mu\text{g/ml}$ )	20	4.818	6.228	6.487	6.343	5.597	4.088	3.011	2.178
	10	4.993	6.174	6.993	7.137	5.843	4.464	3.248	2.295
	5	5.655	7.650	7.997	8.143	6.781	5.306	3.574	2.522
	2.50	7.977	10.913	11.509	11.555*	9.621	6.851	4.247	3.028
	1.25	7.347	8.729	9.024	9.300	6.419	4.536	3.596	2.504
	0.63	4.299	4.907	5.521	4.888	3.767	2.987	2.230	1.830
	3.12	2.663	2.563	3.075	3.235	2.576	2.089	1.787	1.375
	0.16	1.786	1.884	1.936	1.768	1.773	1.600	1.429	1.242

หมายเหตุ: \* คือค่าความเข้มข้นที่ให้อัตราส่วนการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อตัวอย่างที่ให้ผลลบมากที่สุด



## 5.2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจสอบที่อกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> แล้ว ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย 1% blotto เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B (ภาพประกอบ 23 ●) เลือกช่วงที่เป็นเส้นตรงสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาพประกอบ 23 ▲) สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือ  $y = 0.2217\ln(x) + 0.0022$  โดยมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.995



ภาพประกอบ 23 กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B (●) กราฟมาตรฐาน (▲) สมการเส้นตรง และค่า  $R^2$

### 5.3 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ sandwich ELISA ที่ใช้สำหรับ ตรวจสอบทีออกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub>

#### 5.3.1 การทดสอบความไวของวิธีการ sandwich ELISA

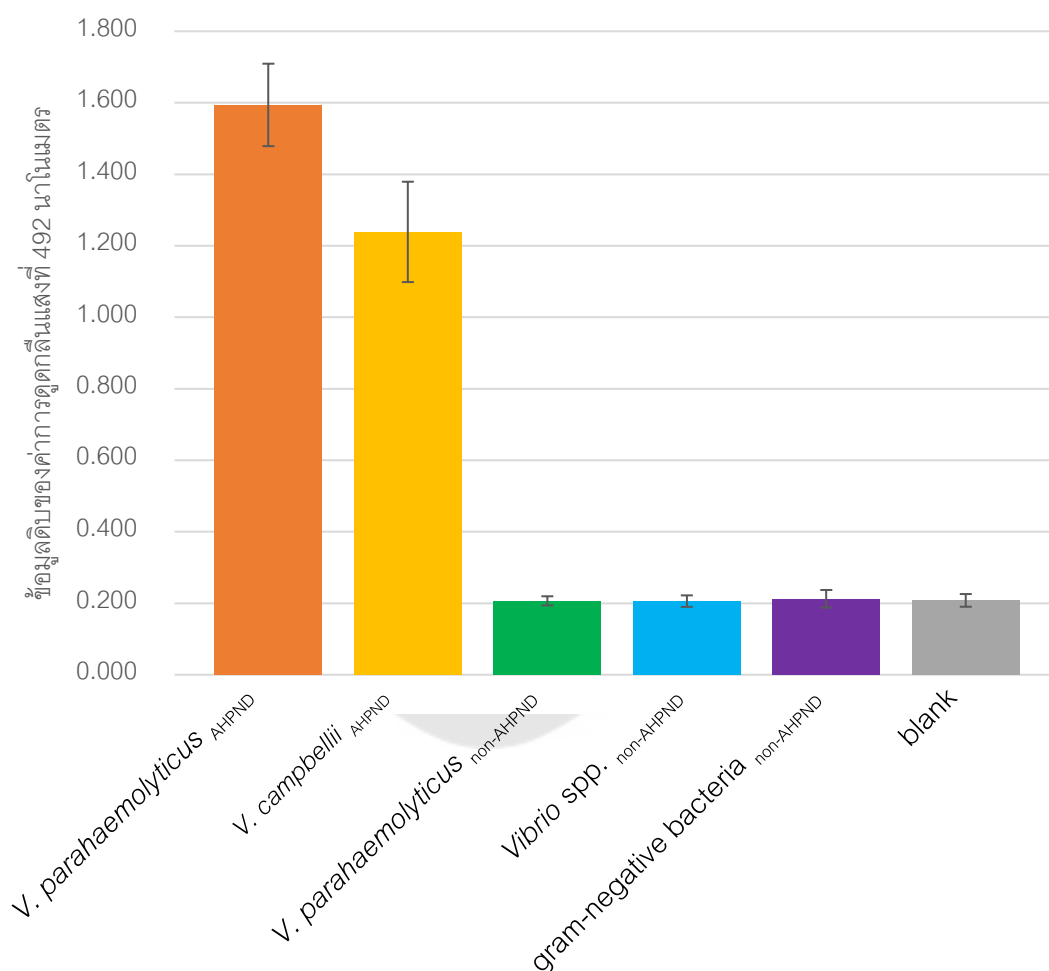
จากการตรวจสอบความไวของวิธี sandwich ELISA โดยทำการเจือจางรีคอม-  
บิแนนท์โปรตีนทีออกซิน B ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005 ถึง 50,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร  
พบว่าสามารถตรวจสอบปริมาณโปรตีนทีออกซิน B ได้ในช่วง 1-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร  
และเมื่อคำนวณค่าดูดกลืนแสงของปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ( $LOD_{OD}$ ) และปริมาณ  
สารต่ำสุดที่สามารถวัดในเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้อง ( $LOQ_{OD}$ ) พบว่ามีค่าเป็น 0.186 และ 0.213  
ตามลำดับ และเมื่อคำนวณความเข้มข้นของปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ( $LOD_{conc.}$ )  
และปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถวัดในเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้อง ( $LOQ_{conc.}$ ) เป็น 1.122 และ  
1.454 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตาราง 9

ตาราง 9 แสดงค่าที่ได้จากการทดสอบความไวของวิธีการ sandwich ELISA

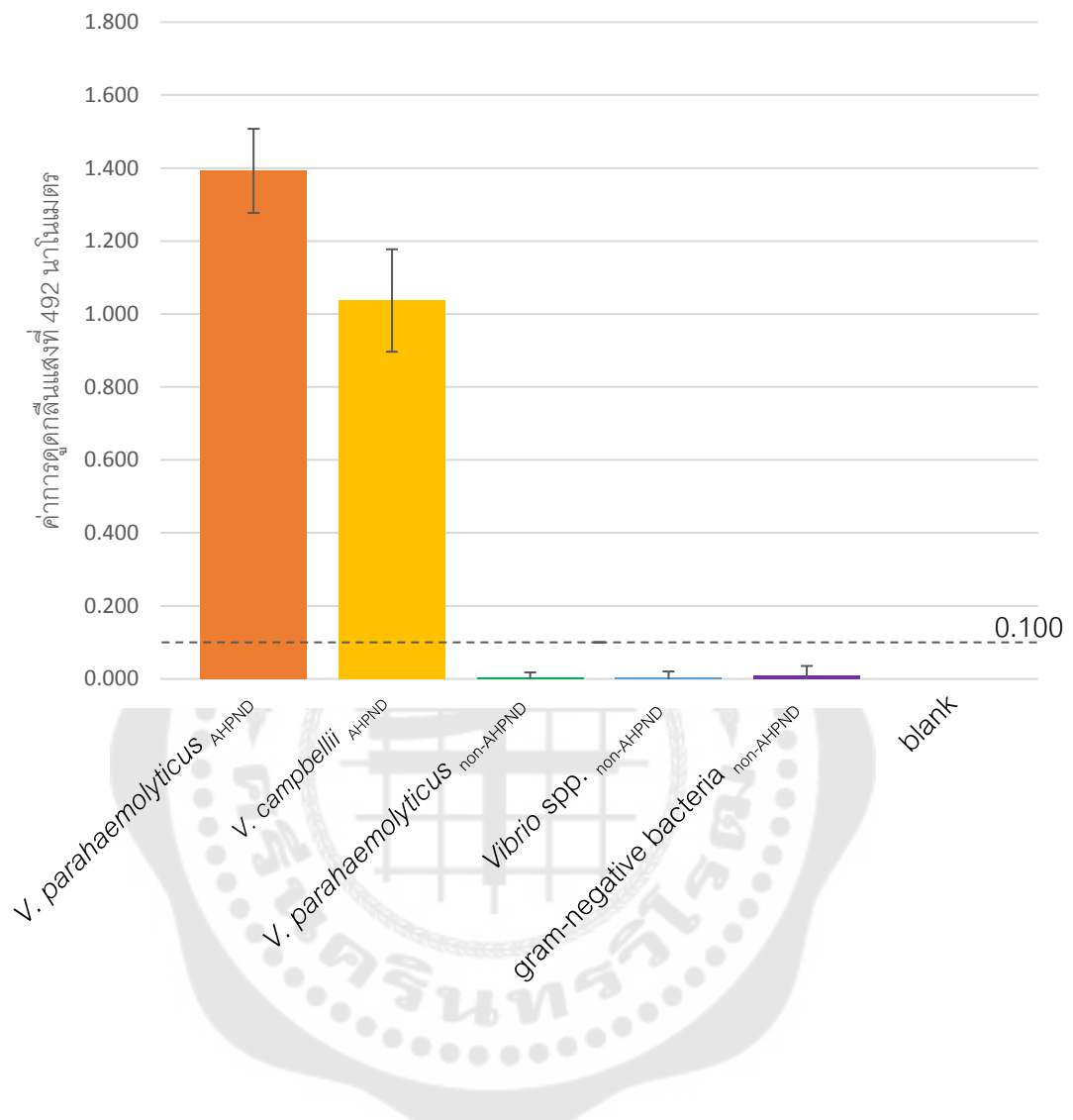
ค่าการดูดกลืนแสง ของ blank ที่ 492 นาโนเมตร	Mean <sub>blank</sub>	SD	LOD <sub>OD</sub>	LOQ <sub>OD</sub>	LOD <sub>conc.</sub> (ng/ml)	LOQ <sub>conc.</sub> (ng/ml)
0.172						
0.178						
0.179						
0.172	0.174	0.004	0.186	0.213	1.122	1.454
0.169						
0.175						

### 5.3.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของวิธีการ sandwich ELISA

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังตาราง 5 มาทดสอบ พบว่าวิธีการ sandwich ELISA สามารถแสดงปฏิกิริยาต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* สปีชีส์อื่นที่ก่อโรค AHPND เท่านั้น โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ไม่ก่อโรค *Vibrio* กลุ่มที่ไม่ก่อโรค และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และกำหนดให้ค่า cutoff ของค่าการดูดกลืนแสงหลังตัดค่า blank ออกจากแต่ละตัวอย่างอยู่ที่ 0.100 (ภาพประกอบ 24-25 และตาราง 10)



ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบที่ออกซิน B จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี sandwich ELISA



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงหลังตัดค่า blank ออกจากแต่ละตัวอย่างของการตรวจสอบที่อกซิน B จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี sandwich ELISA

ตาราง 10 แสดงการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของวิธีการ sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้น

No.	แบคทีเรีย	ปฏิกิริยา	ค่าดูดกลืนแสง (ข้อมูลดิบ)	ค่าดูดกลืนแสง (หลังตัดค่า blank)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่ก่อโรค AHPND (VP <sub>AHPND</sub> )				
1	<i>V. parahaemolyticus</i> CN (China)	+	1.478	1.276
2	<i>V. parahaemolyticus</i> 3HP (Thailand)	+	1.457	1.255
3	<i>V. parahaemolyticus</i> F2 (Thailand)	+	1.775	1.573
4	<i>V. parahaemolyticus</i> F6 (Thailand)	+	1.739	1.538
5	<i>V. parahaemolyticus</i> TR (Thailand)	+	1.593	1.392
6	<i>V. parahaemolyticus</i> XN82 (Vietnam)	+	1.530	1.328
7	<i>V. parahaemolyticus</i> XN83 (Vietnam)	+	1.758	1.556
8	<i>V. parahaemolyticus</i> XN84 (Vietnam)	+	1.492	1.290
9	<i>V. parahaemolyticus</i> XN86 (Vietnam)	+	1.493	1.291
10	<i>V. parahaemolyticus</i> XN88 (Vietnam)	+	1.611	1.409
11	<i>V. parahaemolyticus</i> XN89 (Vietnam)	+	1.700	1.498
12	<i>V. parahaemolyticus</i> 2983MCO (Vietnam)	+	1.493	1.291
13	<i>V. parahaemolyticus</i> SE-B2 (Malaysia)	+	1.605	1.403
<i>V. campbellii</i> ที่ก่อโรค AHPND				
14	<i>V. campbellii</i> VH-639	+	1.338	1.136
15	<i>V. campbellii</i> VH-Surat	+	1.140	0.938

## ตาราง 10 (ต่อ)

No.	แบคทีเรีย	ปฏิกิริยา	ค่าดูดกลืนแสง (ข้อมูลดิบ)	ค่าดูดกลืนแสง (หลังตัดค่า blank)
<i>V. parahaemolyticus</i> ที่ไม่ก่อโรค AHPND (VP <sub>non-AHPND</sub> )				
16	<i>V. parahaemolyticus</i> VPV	-	0.237	0.035
17	<i>V. parahaemolyticus</i> VPB	-	0.214	0.012
18	<i>V. parahaemolyticus</i> 45034	-	0.214	0.012
19	<i>V. parahaemolyticus</i> 5665	-	0.204	0.002
20	<i>V. parahaemolyticus</i> 15285	-	0.194	-0.008
21	<i>V. parahaemolyticus</i> 20245	-	0.204	0.002
22	<i>V. parahaemolyticus</i> 21243	-	0.207	0.005
23	<i>V. parahaemolyticus</i> 21296	-	0.197	-0.005
24	<i>V. parahaemolyticus</i> 21308	-	0.204	0.002
25	<i>V. parahaemolyticus</i> 24318	-	0.193	-0.009
<i>Vibrio</i> spp. และแบคทีเรียอื่นๆ				
26	<i>V. alginolyticus</i> 24049	-	0.225	0.023
27	<i>V. vulnificus</i> 22441	-	0.218	0.017
28	<i>V. campbellii</i> 21362	-	0.197	-0.005
29	<i>V. harveyi</i> H1	-	0.193	-0.009
30	<i>V. fluvialis</i> 22086	-	0.193	-0.009
31	<i>V. mimicus</i> 24053	-	0.192	-0.010
32	<i>V. cholerae</i> 22137	-	0.233	0.032
33	<i>V. ordalii</i>	-	0.210	0.008
34	<i>V. shilonii</i>	-	0.193	-0.009
35	<i>Aeromonas hydrophila</i> 04082	-	0.192	-0.009
36	<i>Flavobacterium columnare</i> CUVET 1201	-	0.252	0.050
37	<i>Flavobacterium columnare</i> AT	-	0.221	0.020
38	<i>Shigella dysenteriae</i>	-	0.210	0.008
39	<i>Salmonella</i> Typhi	-	0.234	0.032
40	<i>Morganella morganii</i>	-	0.188	-0.014
41	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	0.190	-0.012

### 5.3.3 การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการ sandwich ELISA

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์ที่ออกซิน B ความเข้มข้น 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างเนื้อกึ่งและนำไปทดสอบด้วยวิธีการ sandwich ELISA พบว่ามีค่าความถูกต้องในการตรวจสอบปริมาณที่ออกซิน B อยู่ในช่วง 87 - 105% และเมื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของวิธีการพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของทั้ง intra และ inter-assay ไม่เกิน 15% (ตาราง 11 และ 12)

ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและแม่นยำแบบ intra-assay

ครั้งที่	ปริมาณที่ออกซิน ที่เติมลงในตัวอย่าง เนื้อกึ่ง (ng/ml)	Intra-assay (n=6)		
		ปริมาณที่วัดได้ (ng/ml)	%RC	%CV
1	10	9.093±0.561	91	6.168
	20	18.013±1.632	90	9.058
	50	49.016±3.791	98	7.733
2	10	8.850±0.940	88	10.586
	20	18.317±1.262	92	6.889
	50	47.472±5.015	95	10.564
3	10	9.081±0.893	91	9.831
	20	17.471±2.340	87	13.391
	50	45.29±6.445	91	14.230
4	10	9.147±0.992	91	10.844
	20	21.029±2.390	105	11.362
	50	48.314±3.351	97	6.936
5	10	9.437±0.518	94	5.483
	20	17.504±0.742	88	4.240
	50	46.058±5.230	92	11.355
6	10	9.190±0.674	92	7.338
	20	19.479±2.565	97	13.168
	50	45.304±4.099	91	9.048

หมายเหตุ: n คือจำนวนครั้งที่ทดสอบ; %RC คือ %recovery และ %CV คือ ค่า สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน

ตาราง 12 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องและแม่นยำแบบ inter-assay

ปริมาณที่อกซึน ที่เติมลงในตัวอย่าง เนื้อกึ่ง (ng/ml)	Inter-assay (n=6)		
	ปริมาณที่วัดได้ (ng/ml)	%RC	%CV
10	9.133±0.190	91	2.082
20	18.635±1.383	93	7.422
50	46.909±1.591	94	3.391

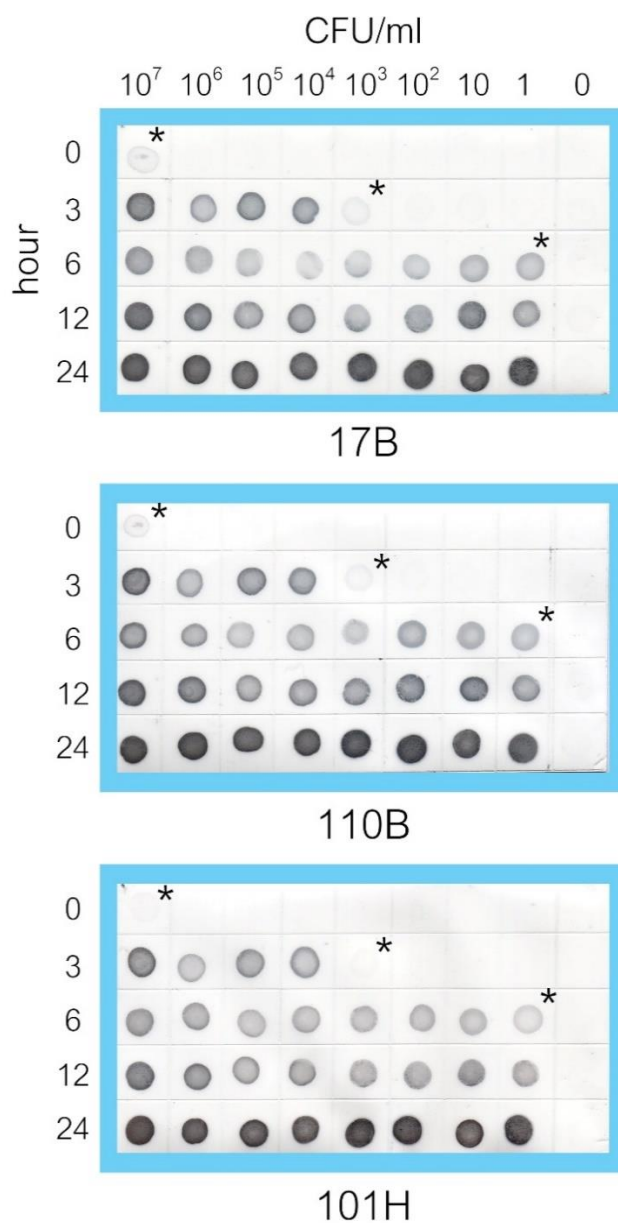
หมายเหตุ: n คือจำนวนครั้งที่ทดสอบ; %RC คือ %recovery และ %CV คือ ค่า สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน

#### 5.3.4 การตรวจสอบที่อกซึน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกึ่ง

เมื่อนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรค AHPND ความเข้มข้น  $10^7$  ถึง  $10^0$  CFU ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกึ่งผสมอยู่ และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปทำให้เชื้อตายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำมาหยดกระดาษไนโตรเซลลูโลส เพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B, 110B, 101H และ 136D อีกส่วนนำมาผสมกับ lysis buffer และทดสอบด้วยวิธี sandwich ELISA โดยมีค่า cutoff ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ระหว่างการให้ผลเป็นบวกหรือผลเป็นลบอยู่ที่ 0.100 พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดี 136D แสดงปฏิกิริยาอ่อนมาก (ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ) ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B, 110B และ 101H สามารถตรวจสอบที่อกซึน B ของเชื้อ ความเข้มข้น  $1 \times 10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 (ภาพประกอบ 26) ส่วนวิธี sandwich ELISA ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 สามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่  $1 \times 10^3$  CFU ต่อมิลลิลิตร โดยมีปริมาณที่อกซึนที่ตรวจสอบได้เป็น 11.63 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อบ่มเชื้อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง วิธี dot blotting สามารถตรวจสอบที่อกซึน B ของเชื้อความเข้มข้นเริ่มต้น  $1 \times 10^3$  CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่วิธี sandwich ELISA สามารถตรวจสอบได้ที่  $1 \times 10^2$  CFU ต่อมิลลิลิตร และปริมาณที่อกซึนที่ตรวจสอบได้เป็น 72.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และทั้ง 2 วิธีสามารถตรวจสอบที่อกซึน B ของเชื้อความเข้มข้น 1 CFU ต่อมิลลิลิตรได้ เมื่อบ่มเชื้อในอาหารไปแล้ว 6 ชั่วโมง



โดยปริมาณที่ออกซินที่ตรวจสอบได้จากวิธี sandwich ELISA เป็น 599.16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพประกอบ 26 และ ตาราง 13 และ 14)



ภาพประกอบ 26 การตรวจสอบที่ออกซิน B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> หลังบ่มเชื้อในอาหาร TSB ที่มี

ตัวอย่างเนื้อกุ้ง ด้วยวิธี dot blotting

โดยนำเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ความเข้มข้น 10<sup>7</sup> ถึง 1 CFU ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้งผสมอยู่ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง นำมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ก่อนบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (17B, 110B และ 101H)

ตาราง 13 ผลการตรวจสอบที่อกซิม B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี sandwich ELISA หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง ที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> (CFU/ml)								
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	1	0
ปริมาณที่อกซิมที่วัดได้ด้วยวิธี sandwich ELISA (ng/ml)									
0	453.45	48.39	11.90	11.60	11.63	ND	ND	ND	-
3	625.58	532.92	518.12	412.36	320.61	72.89	ND	ND	-
6	746.99	650.62	662.22	721.26	662.42	671.21	619.73	599.16	-
12	882.92	704.38	611.67	809.93	756.22	741.41	651.01	603.66	-
24	1378.94	973.22	935.20	916.34	1086.67	1245.39	970.02	951.31	-

หมายเหตุ: ND คือ not detected

ตาราง 14 การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบที่อกซิม B ของเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> หลังการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้ง ด้วยวิธี sandwich ELISA และวิธี dot blotting

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเชื้อ VP <sub>AHPND</sub> (CFU/ml)								
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	1	0
ปฏิกิริยาจากวิธี sandwich ELISA / dot blotting									
0	+/+	+/ND	+/ND	+/ND	+/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	-/-
3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/ND	ND/ND	ND/ND	-/-
6	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
24	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-

หมายเหตุ: ND คือ not detected

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และที่ออกซิน B โดยใช้ IPTG กระตุ้นแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *ToxA-pET-15b* หรือ *ToxB-pET-15b* พบว่ามีการแสดงออกอย่างชัดเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A (His-ToxA) และที่ออกซิน B (His-ToxB) ขนาดประมาณ 16 และ 50 กิโลดาลตันตามลำดับซึ่งมีขนาดตรงกับโปรตีนที่ออกซิน A (ToxA) และที่ออกซิน B (ToxB) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับผู่เฉียบพลัน (VP<sub>AHPND</sub>) ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Sirikharin et al., 2015) โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนของที่ออกซินที่ผลิตได้นี้เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ metal ion affinity column HisTrap FF พบว่าได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำไปใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองสำหรับการผลิตแอนติบอดีในรูปพอลิโคลนอลแอนติบอดีหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานสำหรับการใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อวัดปริมาณที่ออกซินที่สร้างจากเชื้อแต่ละชนิดที่มีการสร้างโปรตีนที่ออกซินทั้งสองชนิดนี้ต่อไป

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B บริสุทธิ์ไปปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่ายเพื่อผลิตเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซิน A และ B โดยการเก็บแอนติซีรัมของกระต่ายมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 2 ชนิด มีความจำเพาะและความไวสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจนกับโปรตีนที่ออกซิน A หรือที่ออกซิน B ขนาดประมาณ 16 และ 50 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทั้งในรูปแบบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและที่ออกซินที่สร้างจากเชื้อ VP<sub>AHPND</sub> ได้ และเมื่อทดสอบความไวด้วยวิธี dot blotting พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อที่ออกซิน A และ B สามารถตรวจจ็บริคอมบิแนนท์ที่ออกซินได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความไวต่ำกว่ารายงานก่อนหน้านี้ที่สามารถผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อที่ออกซิน B ที่มีความไวในการตรวจจ็บริคอมบิแนนท์ที่ออกซินได้ที่ความเข้มข้น 6.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการปลูกภูมิคุ้มกันกระต่ายด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B เป็นจำนวน 4 ครั้ง (Duong et al., 2021)

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B บริสุทธิ์ไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวและเก็บแอนติซีรัมจากหนูขาวมาทดสอบความจำเพาะ พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน A และ B จึงเลือกตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอล

แอนติบอดี แต่ไม่สามารถผลิตเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน A ได้ คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่ที่อกซิน A เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลค่อนข้างเล็ก ทำให้มีความเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ค่อนข้างต่ำ อาจส่งผลให้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่มากนัก (ไพศาล สติธิกรกุล, 2548) ทำให้มีปริมาณบีเซลล์ที่หลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะกับที่อกซิน A จำนวนไม่มาก เมื่อนำไปหลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมาจึงอาจมีโอกาสไม่มากนักในการที่บีเซลล์ที่หลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะกับที่อกซิน A จะหลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมากลายเป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี ทำให้ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่อกซิน A ได้ อย่างไรก็ตามสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน B ได้จำนวน 4 โคลน ได้แก่ 17B, 110B, 101H และ 136D ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่ผลิตได้เป็นคลาส IgG โดยมี subclass เป็น IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>2b</sub> ส่วน light chain เป็น kappa (K) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B, เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. campbellii* ไอโซเลตที่ก่อโรคทั้ง 5 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ได้ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ใช้ในการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีน, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio* spp. และแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ก่อโรคอีก 25 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ และจากการทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับโปรตีนขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตันของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ซึ่งตรงกับขนาดของที่อกซิน B

จากการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน คือ 17B, 110B และ 101H มีความจำเพาะต่ออิพิโทปตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 136D น่าจะมีความจำเพาะต่ออิพิโทปที่ต่างออกไป และจากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B ด้วยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B, 110B และ 101H มีความไวในการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B ได้ที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน 136D ตรวจสอบได้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อที่อกซิน B พบว่าสามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ที่อกซิน B ได้ที่ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Wangman et al., 2017; Wangman et al., 2020) อย่างไรก็ตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อกซิน B ที่ใช้ทดสอบในรายงานก่อนหน้านี้เชื่อมต่อกับโปรตีน Glutathione S-transferase (GST) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 26 กิโลดาลตันทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-ToxB มีขนาดรวมเป็น 76 กิโลดาลตัน ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ใช้ทดสอบใน

การศึกษานี้เชื่อมต่อกับโปรตีน histidine (His) จำนวน 6 โมเลกุลซึ่งมีขนาดเล็กกว่าทำให้ขนาดโดยรวมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน His-ToxB ยังคงเป็น 50 กิโลดาลตันเท่ากับขนาดของท็อกซิน B ตามธรรมชาติ ดังนั้นในการนำมาทดสอบความไวของแอนติบอดีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เชื่อมต่อกับ GST จึงอาจมีความเข้มข้นของท็อกซิน B ที่แท้จริงในตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบไม่เท่ากับโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ histidine เนื่องจากขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ GST อาจทำให้ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการออกแบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้เชื่อมต่อกับ GST มักเกิดการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมาก ทำให้สามารถผลิตโปรตีนได้คราวละมากๆ แต่การแสดงออกในปริมาณมากก็อาจส่งผลให้เกิดการรวมตัวของโปรตีนเกิดเป็น inclusion bodies ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ละลายได้น้อยลงหรือตกตะกอน และยังทำให้โปรตีนที่ผลิตได้มีลักษณะการพับตัวของโครงสร้างสามมิติ (three-dimensional folding) เปลี่ยนแปลงไปจากสภาพธรรมชาติ ซึ่งส่งผลต่อขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการ affinity chromatography นอกจากนี้ด้วยขนาดที่ใหญ่ของโปรตีน GST และความสามารถในการเกิดเป็น dimer จึงส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ อีกทั้งตัว GST เองยังเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง จึงอาจรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่สนใจ ดังนั้นอาจต้องเพิ่มขั้นตอนของการตัด GST ออกหลังการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน (Kimple, Brill, & Pasker, 2013) ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ระบบการออกแบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้เชื่อมต่อกับ histidine เนื่องจากเป็นโปรตีนที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ผ่าน metal ion affinity column chromatography ได้แม้โปรตีนจะอยู่ในรูปแบบที่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ histidine ยังเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กจึงแทบไม่รบกวนคุณสมบัติรวมถึงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโปรตีนที่ถูกนำมาเชื่อมต่อกับ GST จึงสามารถนำไปใช้ปลูกภูมิคุ้มกันได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนของการตัด histidine ออกจากโปรตีนดังกล่าว (GE-Healthcare, 2016; Kimple et al., 2013)

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17B ซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดจากการตรวจสอบอิมูโนโบลอตด้วยการจับกับท็อกซิน B ด้วยวิธี ELISA และจับกับท็อกซินได้ทั้งในรูปแบบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและรูปแบบท็อกซินธรรมชาติที่ถูกสร้างโดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน จึงถูกนำมาใช้ควบคู่กับพอลิโคลนอลแอนติบอดีในการพัฒนาเป็นวิธี sandwich ELISA สำหรับตรวจสอบท็อกซิน B โดยวิธี sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบ

รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ออกซิน B ได้ในช่วง 1-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของปริมาณที่ออกซิน B ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถวัดในเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้อง (LOQ) อยู่ที่ 1.1 และ 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ก่อนหน้านี้มีรายงานการพัฒนา indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่ออกซิน A และ B พบว่ามีความไวในการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนของที่ออกซินอยู่ที่ 8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Mai et al., 2020) ซึ่งมีความไวต่ำกว่าวิธี sandwich ELISA ประมาณ 8 เท่า นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบที่ออกซิน B ด้วยวิธี ELISA ซึ่งมีความความเข้มข้นของปริมาณที่ออกซิน B ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เป็น 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Duong et al., 2021) ซึ่งสูงกว่าวิธี sandwich ELISA จากการศึกษานี้ประมาณ 10 เท่า อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปริมาณของที่ออกซิน B ที่ทำให้เกิดการตายของกุ้งคือ 5 ไมโครกรัมต่อกรัมของกุ้ง (Sirikharin et al., 2015) และปริมาณของที่ออกซิน B ที่ตกตะกอนได้จากการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ก่อโรคที่ทำให้กุ้งตายได้นั้นมีความเข้มข้นอยู่ที่ 4.8 ไมโครกรัมต่อกรัมของโปรตีนรวม (Phiwsaiya et al., 2017) ดังนั้นความไวของวิธี sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ น่าจะเพียงพอสำหรับการตรวจสอบที่ออกซิน B ที่ทำให้เกิดโรคตับฝ่อเฉียบพลัน และทำให้เกิดการตายของกุ้งได้

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของวิธี sandwich ELISA ในการตรวจสอบที่ออกซิน B สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. campbellii* ไอโซเลตที่ก่อโรคทั้ง 15 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบได้ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. parahaemolyticus*, *Vibrio* spp. และแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ก่อโรคอีก 26 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ และเมื่อทดสอบความถูกต้องของการทดสอบพบว่าวิธี sandwich ELISA มี %recovery อยู่ในช่วง 87 - 105% ซึ่งถือเป็นช่วงที่ยอมรับได้ (Lugos et al., 2019) และเมื่อทดสอบความแม่นยำของการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-assay) และการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (inter-assay) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ไม่เกิน 15%

จากการนำวิธี sandwich ELISA ไปใช้ในการตรวจสอบที่ออกซินหลังการบ่มเชื้อในอาหารที่มีตัวอย่างเนื้อกุ้งผสมอยู่พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อความเข้มข้น  $1 \times 10^3$  CFU ต่อมิลลิลิตรได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และเมื่อบ่มเชื้อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบได้ที่  $1 \times 10^2$  CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจสอบเชื้อปริมาณ 1 CFU ต่อมิลลิลิตรได้เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทั้งนี้จากคู่มือการตรวจโรคสัตว์น้ำด้วยเทคนิค PCR ของกรมประมงได้แนะนำการตรวจเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน โดยการบ่มตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็น

เวลา 3 - 18 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะมีลักษณะขุ่น (กรมประมง, 2561) ดังนั้นวิธี sandwich ELISA สำหรับตรวจสอบที่อกซินของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันนี้อาจสามารถนำมาใช้ตรวจสอบที่อกซินของเชื้อก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ควบคู่ไปกับการตรวจสอบสารพันธุกรรมของที่อกซินด้วยเทคนิค PCR ได้ เนื่องจากใช้เวลาในการบ่มเชื้ออยู่ในช่วงเดียวกัน และยังเป็นที่ยืนยันว่าเชื้อที่มีสารพันธุกรรมดังกล่าว สามารถผลิตที่อกซินที่เป็นสาเหตุของโรคตับฝ่อเฉียบพลันที่สมบูรณ์ออกมาได้ เนื่องจากมีการพบสายพันธุ์กลายของเชื้อที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของที่อกซิน แต่ไม่สามารถผลิตที่อกซินที่สมบูรณ์ออกมาได้ จึงไม่สามารถก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน และไม่ทำให้เกิดการตายของกุ้ง (Aranguren Caro et al., 2020) และเนื่องจากมีรายงานว่าความรุนแรงของโรคตับฝ่อเฉียบพลันนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนของยีน (gene copy) แต่ขึ้นอยู่กับปริมาณของที่อกซิน (Tinwongger et al., 2016) การตรวจวัดปริมาณที่อกซินด้วยเทคนิค sandwich ELISA นี้จึงอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับโรคตับฝ่อเฉียบพลันต่อไปได้

นอกจากนี้เทคนิค sandwich ELISA ยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูง ทำให้ลดความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างลงได้ อีกทั้งสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละหลายตัวอย่างพร้อมกัน จึงลดค่าใช้จ่ายในการตรวจแต่ละตัวอย่างลงได้ ข้อได้เปรียบเหล่านี้จึงอาจเป็นประโยชน์สำหรับการนำไปใช้ตรวจติดตามโรคในอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง ซึ่งต้องมีการสุ่มตัวอย่างคราวละมากๆ ได้

อย่างไรก็ตามมีการคาดการณ์ว่าที่อกซิน B ที่สร้างโดยเชื้อ *Vibrio* spp. ไอโซเลตที่ก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลันน่าจะมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคและทำให้เกิดการตายของกุ้ง เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายกับโดเมน I ที่ทำให้เกิดรูพรุน (pore-forming domain I) และโดเมน II ที่จับกับโปรตีนตัวรับ (receptor-binding domain II) ของที่อกซิน Cry ที่สร้างโดยเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นที่อกซินที่ก่อโรคและทำให้เกิดการตายของแมลง (Lin et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมื่อแยกฉีดที่อกซิน A กับที่อกซิน B และที่อกซิน A ผสมกับ B เข้าสู่กุ้ง แล้วตรวจสอบเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งพบว่าที่อกซิน A เพียงอย่างเดียวก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ที่อกซิน B เพียงอย่างเดียว และที่อกซิน A ผสมกับ B สามารถชักนำให้เกิดลักษณะของโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ซึ่งมีการหลุดลอกของเซลล์บุท่อตับและตับอ่อนได้ (Lee et al., 2015) แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานว่าการใช้ที่อกซิน A และ B ร่วมกันอย่างละ 10 ไมโครกรัมต่อกรัมของกุ้งทำให้เกิดการตายสะสม 100% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ที่อกซิน B ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกรัมของกุ้งเพียงอย่างเดียวทำให้เกิดการตายได้ 10% ดังนั้นการมีทั้งที่อกซิน A ร่วมกับที่อกซิน B น่าจะมีส่วนสำคัญในการส่งเสริม

ความรุนแรงของโรคตับฝ่อเฉียบพลัน (Sirikharin et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรตีนชนิดอื่นที่พบในเชื้อก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ที่อาจช่วยส่งเสริมความรุนแรงในการก่อโรคได้ (Prachumwat et al., 2019) ดังนั้นในอนาคตจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมหรือพัฒนาวิธีตรวจสอบโปรตีนชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคตับฝ่อเฉียบพลัน ก็อาจทำให้สามารถป้องกันการระบาดและลดความเสียหายที่เกิดขึ้นต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีสาเหตุมาจากโรคตับฝ่อเฉียบพลันได้ดียิ่งขึ้น





## บรรณานุกรม

- Aranguren Caro, L. F., Mai, H. N., Kanrar, S., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2020). A Mutant of *Vibrio parahaemolyticus* pirABVP (+) That Carries Binary Toxin Genes but Does Not Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Microorganisms*, 8(10), 1549.
- Arunrut, N., Kampeera, J., Sirithammajak, S., Sanguanrut, P., Proespraiwong, P., Suebsing, R., & Kiatpathomchai, W. (2016). Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA-functionalized gold nanoparticles as probes. *PloS one*, 11(3), e0151769.
- Bailey-Brock, J. H., & Moss, S. M. (1992). Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. *Developments in aquaculture and fisheries science*, 23, 9-27.
- Briggs, M. (2021). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]*. Retrieved from [https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/en](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en)
- Cowley, J. A., Dimmock, C. M., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V., Panyim, S., & Walker, P. J. (1999). Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of aquatic organisms*, 36(2), 153-157.
- Cruz-Flores, R., Mai, H. N., & Dhar, A. K. (2019). Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of Photobacterium Insect-Related (Pir) toxin genes pirA and pirB. *Molecular and cellular probes*, 43, 20-28.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., . . . Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158-162.
- Dugassa, H., & Gaetan, D. (2018). Biology of white leg shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 10(2), 5-17.
- Duong, N.-D., Nguyen-Phuoc, K.-H., Do, K.-Y. T., Nguyen, N.-T. T., Tran, T. L., & Tran-Van,

- H. (2021). Production of polyclonal antibody against the recombinant PirB<sup>VP</sup> protein of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-8.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and techniques *Hybridoma technology in the Biosciences and Medicine* (pp. 3-41): Springer.
- Flegel, T., & Lo, C. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand*. <http://www.enaca.org/modules/library/publication.php>.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., & Ueho, T. (1953). On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*, 4(2/3), 299-304.
- GE-Healthcare. (2016). Affinity Chromatography Vol. 2 Tagged Proteins: Affinity.
- Han, J. E., Tang, K., Aranguren, L., & Piamsomboon, P. (2017). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, *pirABvp* (-) *V. parahaemolyticus*, and *pirABvp* (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 470, 84-90.
- Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015). *Photothabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 113(1), 33-40.
- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., & Limsuwan, C. (1994). Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(1), 27-35.
- Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of affinity tags for protein purification. *Current protocols in protein science*, 73(1), 9.9. 1-9.9. 23.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology*, 6(7), 511-519.
- Koiwai, K., Kodera, T., Thawonsuwan, J., Kawase, M., Kondo, H., & Hirono, I. (2018). A

- rapid method for simultaneously diagnosing four shrimp diseases using PCR-DNA chromatography method. *J Fish Dis*, 41(2), 395-399.
- Koiwai, K., Tinwongger, S., Nozaki, R., Kondo, H., & Hirono, I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of fish diseases*, 39(5), 603-606.
- Kongrueng, J., Tansila, N., Mitraparp-arthorn, P., Nishibuchi, M., Vora, G. J., & Vuddhakul, V. (2015). LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquaculture international*, 23(5), 1179-1188.
- Kumar, B. K., Raghunath, P., Devegowda, D., Deekshit, V. K., Venugopal, M. N., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2011). Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *International journal of food microbiology*, 145(1), 244-249.
- Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H. C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1867-1880.
- Lee, C.-T., Chen, I.-T., Yang, Y.-T., Ko, T.-P., Huang, Y.-T., Huang, J.-Y., . . . Lin, S.-S. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10798-10803.
- Li, Y., Wang, Q., Bergmann, S. M., Zeng, W., Wang, Y., Ren, Y., . . . Gu, D. (2019). Preparation of monoclonal antibodies against KHV and establishment of an antigen sandwich ELISA for KHV detection. *Microbial pathogenesis*, 128, 36-40.
- Lightner, D., Redman, R., Pantoja, C., Noble, B., & Tran, L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 15(1), 40-42.
- Lin, S.-J., Hsu, K.-C., & Wang, H.-C. (2017). Structural insights into the cytotoxic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA<sup>vp</sup> and PirB<sup>vp</sup> Toxins. *Marine drugs*, 15(12), 373.
- Liu, L., Jiang, L., Yu, Y., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2017). Rapid diagnosis of

- Vibrio owensii* responsible for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease with isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Molecular and cellular probes*, 33, 4-7.
- Liu, L., Xiao, J., Zhang, M., Zhu, W., Xia, X., Dai, X., . . . Wang, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of invertebrate pathology*, 153, 156-164.
- Lo, C.-F., & Kou, G.-H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathology*, 33(4), 365-371.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Thammapalerd, N., Sithigorngul, W., & Menasveta, P. (2000). Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. *Invertebrate Reproduction & Development*, 37(3), 211-221.
- Lugos, M. D., Damulak, O. D., Perikala, V., Davou, G. I., Obeta, U. M., Banda, J. M., . . . Okwori, J. A. (2019). Assay Linearity and Spike-Recovery Assessment in Optimization protocol for the analysis of Serum Cytokines by Sandwich ELISA Platform. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 3(2), 178-183.
- Mai, H. N., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2020). Development of an indirect Enzyme Linked Immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against Photorhabdus insect related toxins, PirAVp and PirBVp released from *Vibrio* spp. *Journal of microbiological methods*, 176, 106002.
- Mosmann, T. R., Baumal, R., & Williamson, A. R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. *European journal of immunology*, 9(7), 511-516.
- OIE. (2021). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2021. *World Organisation for Animal Health*.
- Perez Farfante, I., & Kensley, B. (1997). *Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera*: Editions du Museum national d'Histoire naturelle.
- Phiwsaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H. T., Sangsuriya, P., Nguyen, G.

- T., . . . Taengchaiyaphum, S. (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus*  $\Delta$  pirA Vp pirB Vp<sup>+</sup> mutant kills shrimp but produces neither Pir Vp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and environmental microbiology*, 83(16), e00680-00617.
- Prachumwat, A., Taengchaiyaphum, S., Mungkongwongsiri, N., Aldama-Cano, D. J., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2019). Update on early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(1), 5-17.
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Muñoz, A. R. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- Schmidt, S. D., Mazzella, M. J., Nixon, R. A., & Mathews, P. M. (2012). A $\beta$  measurement by enzyme-linked immunosorbent assay *Amyloid Proteins* (pp. 507-527): Springer.
- Scotcher, M. C., Cheng, L. W., & Stanker, L. H. (2010). Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD50 levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. *PloS one*, 5(6), e11047.
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98-C101.
- Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of young scientists*, 2(1), 21-25.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., . . . Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PloS one*, 10(5), e0126987.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T. W., Mavichak, R., & Proespraiwong, P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific*

(NACA), 7-9.

- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(5), 1689-1699.
- Sritunyalucksana, K., Dangtip, S., Sanguanrut, P., Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, R., Thitamadee, S., . . . Flegel, T. W. (2015). A two-tube, nested PCR detection method for AHPND bacteria. *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA)*(<http://www.enaca.org/modules/news/article.php>).
- Sucharitha, V., & Jyothi, S. (2013). An identification of penaeid prawn species based on histogram values. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, 3(7), 807-811.
- Tang, K. F., Bondad-Reantaso, M. G., Arthur, J. R., MacKinnon, B., Hao, B., Alday-Sanz, V., . . . Dong, X. (2020). Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*(No. 1190), 1-65.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., . . . Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69-87.
- Tinwongger, S., Nochiri, Y., Thawonsuwan, J., Nozaki, R., Kondo, H., Awasthi, S., . . . Hirono, I. (2016). Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease Pir AB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1755-1765.
- Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Thawonsuwan, J., Sriwanayos, P., Kongkumnerd, J., Chaweepack, T., . . . Kondo, H. (2014). Development of PCR diagnosis for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *魚病研究*, 49(4), 159-164.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., . . . Withyachumnarnkul, B. (2009). Enterocytozoon hepatopenaei sp.

- nov.(Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of invertebrate pathology*, 102(1), 21-29.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105(1), 45-55.
- Wakida-Kusunoki, A. T., Amador-del Angel, L. E., Alejandro, P. C., & Brahm, C. Q. (2011). Presence of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in the Southern Gulf of Mexico. *Aquatic Invasions*, 6(1), S139-S142.
- Wang, H.-C., Lin, S.-J., Mohapatra, A., Kumar, R., & Wang, H.-C. (2020). A review of the functional annotations of important genes in the AHPND-causing pVA1 plasmid. *Microorganisms*, 8(7), 996-1009. doi:10.3390/microorganisms8070996
- Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Senapin, S., Pengsuk, C., . . . Longyant, S. (2017). Development of monoclonal antibodies specific to ToxA and ToxB of *Vibrio parahaemolyticus* that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 474, 75-81.
- Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Taengchaiyaphum, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2020). Development of a rapid immunochromatographic strip test for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* toxin B that cause acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of fish diseases*, 43(2), 207-214.
- Wangman, P., Longyant, S., Taengchaiyaphum, S., Senapin, S., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2018). PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks. *Aquaculture*, 497, 494-502.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., . . . Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific reports*, 7, 42177.
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.

*The Journal of clinical investigation*, 39(7), 1157-1175.

Yang, Y.-T., Chen, I.-T., Lee, C.-T., Chen, C.-Y., Lin, S.-S., Hor, L.-I., . . . Thitamadee, S. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, 2(5), e00816-00814.

Zhang, Q., Liu, Q., Liu, S., Yang, H., Liu, S., Zhu, L., . . . Wang, X. (2014). A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 95(12), 2700-2709.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์ศึกษาระดับปริญญาโทสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

กรมประมง, ห้องปฏิบัติการPCR, ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา, กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ. (2561). คู่มือการตรวจโรคสัตว์น้ำด้วยเทคนิค PCR (*Manual for Aquatic Animal's Disease Diagnosis Using PCR Techniques*). Retrieved from [https://www4.fisheries.go.th/local/file\\_document/20200128151951\\_1\\_file.pdf](https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200128151951_1_file.pdf)

จิตรลดา ศรีตระกูล, & พัชรินทร์ ลังกาปอน (2563). สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ปี 2563. กลุ่มเศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง, กรมประมง. Retrieved from <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/pages/fish%20shrimp.html>







ข้อมูลดิบของการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการ sandwich  
ELISA

ความเข้มข้นของทีออกซิน B ที่วัดได้ในตัวอย่างที่เติมทีออกซิน B ลงไปในเนื้อกุ้ง

ตัวอย่างที่ 1 ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

		Well No.						AVG	SD	%
		1	2	3	4	5	6			
Plate No.	1	9.177	8.524	8.481	8.950	9.909	9.520	9.093	0.561	6.168
	2	10.150	8.753	8.102	8.022	8.206	9.864	8.850	0.937	10.586
	3	10.843	9.010	8.697	8.966	8.460	8.509	9.081	0.893	9.831
	4	10.009	9.284	9.816	9.901	8.267	7.609	9.147	0.992	10.844
	5	10.153	8.821	9.779	9.059	9.102	9.710	9.437	0.517	5.483
	6	8.658	8.618	8.703	9.707	9.189	10.267	9.190	0.674	7.338
							9.133	0.190	2.082	

ตัวอย่างที่ 2 ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

		Well No.						AVG	SD	%
		1	2	3	4	5	6			
Plate No.	1	17.500	17.260	17.067	16.652	21.094	18.505	18.013	1.632	9.058
	2	20.451	18.449	17.412	18.245	18.603	16.741	18.317	1.262	6.889
	3	21.670	18.529	17.104	16.091	16.169	15.262	17.471	2.339	13.391
	4	23.203	21.260	23.203	20.512	16.705	21.289	21.029	2.389	11.362
	5	17.736	16.228	17.328	17.419	17.855	18.459	17.504	0.742	4.240
	6	22.457	17.914	22.881	16.694	18.771	18.159	19.479	2.565	13.168
							18.635	1.383	7.422	

ตัวอย่างที่ 2 ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

		Well No.						AVG	SD	%
		1	2	3	4	5	6			
Plate No.	1	51.962	45.263	44.607	52.506	47.052	52.704	49.016	3.790	7.733
	2	51.090	50.356	41.409	48.757	40.933	52.287	47.472	5.015	10.564
	3	58.098	43.623	40.622	41.357	43.602	44.434	45.289	6.445	14.230
	4	49.869	53.064	44.912	44.245	47.811	49.983	48.314	3.351	6.936
	5	46.357	41.558	55.795	46.867	42.235	43.539	46.058	5.230	11.355
	6	48.335	45.466	41.479	40.780	51.516	44.246	45.304	4.099	9.048
							46.909	1.591	3.391	



## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	7.5	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic soy agar (TSA)

Tryptone	17.0	กรัม
Soytone	3.00	กรัม
Dextrose	2.50	กรัม
NaCl	5.00	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.50	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.3 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB)

Tryptone	17.0	กรัม
Soytone	3.00	กรัม
Dextrose	2.50	กรัม
NaCl	5.00	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.50	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.3 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที





## บัฟเฟอร์และสารเคมี

### 1. IPTG ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

IPTG	238.00	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.00	มิลลิลิตร

### 2. PMSF ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

PMSF	17.40	มิลลิกรัม
Isopropanol	1.00	มิลลิลิตร

### 3. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.20	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

### 4. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

Skimmed milk	5.00	กรัม
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.00	มิลลิลิตร
Merthiolate 1% (Sigma)	1.00	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.10	มิลลิลิตร

### 5. Merthiolate ความเข้มข้น 1%

Thimerosal (Sigma)	1.00	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.00	มิลลิลิตร



## 6. lysis buffer (30 mM Tris, 336 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 9.3)

Tris (BIO-RAD)	3.6342	กรัม
NaCl	19.6358	กรัม
EDTA	2.9224	กรัม
Triton X-100	10.00	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร





## สารเคมีที่ใช้ในการผลิตไฮบริโดมา

### 1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.40	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.60	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
Sodium pyruvate (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na) (Sigma)	1.1005	กรัม
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	2.0160	กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) (Sigma)	5.5925	กรัม
Penicillin G	20,000	unit
Streptomycin G	200.00	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่าน sterilized Millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

### 2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80.00	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.00	มิลลิลิตร
100 x HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.00	มิลลิลิตร

### 3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเม้าส์ 1% ใน RPMI medium (1)	80.00	มิลลิลิตร
FBS RPMI medium (1)	20.00	มิลลิลิตร
100 x HT supplement RPMI medium (1)	1.00	มิลลิลิตร
50 x Aminopterin (Sigma) RPMI medium (1)	2.00	มิลลิลิตร

4. สารละลายเพื่อใช้ในการหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol ความเข้มข้น 40%)

Polyethylene glycol 5.00 กรัม

RPMI medium (1) 5.00 มิลลิลิตร

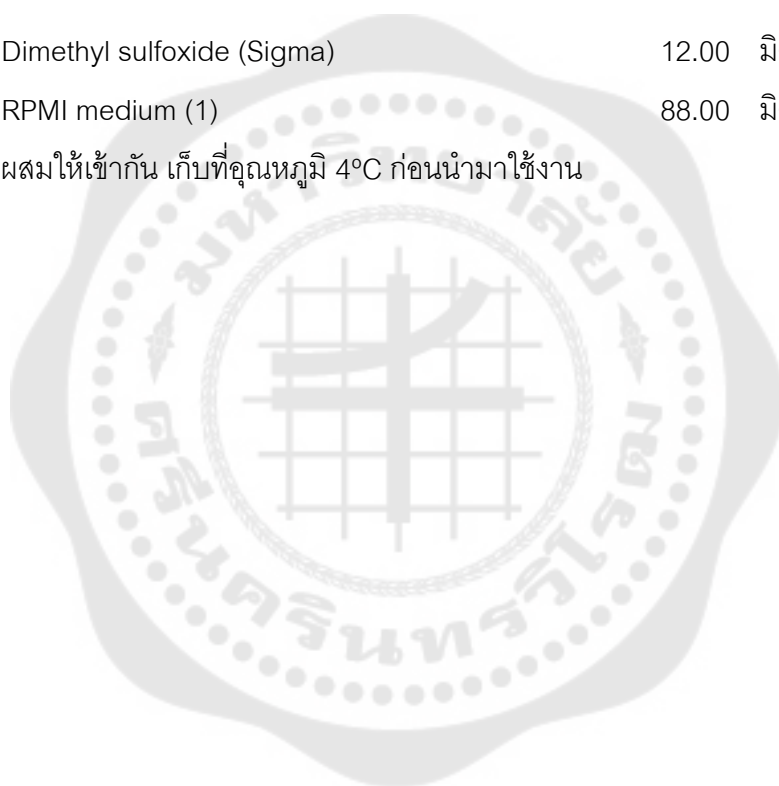
เติม RPMI medium (1) ลงใน Polyethylene glycol ที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนนำมาใช้งาน

5. สารละลายเพื่อใช้ในการแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethyl sulfoxide ความเข้มข้น 12%)

Dimethyl sulfoxide (Sigma) 12.00 มิลลิลิตร

RPMI medium (1) 88.00 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำมาใช้งาน





บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้ในงาน Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 สารละลายโมโนเมอร์ (30% T, 2.7% C<sub>Bis</sub>)

Acrylamide	58.40	กรัม
N, N'-methylene-bis-acrylamide	1.60	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.00	มล.
ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C		

1.2 4x running gel buffer (tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

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

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

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มล.

1.4 SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10%

Sodium dodecyl sulfate	50.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มล.

1.5 Ammonium persulfate ความเข้มข้น 10%

Ammonium persulfate	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1.0	มล.

1.6 Running gel overlay

Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	25.0	มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	1.0	มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มล.

### 1.7 2x treatment buffer

Tris ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	4.0 มล.
Glycerol	2.0 มล.
$\beta$ -mercaptoethanol	1.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	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<sub>Bis</sub>)

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15.0 มล.
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3 มล.
น้ำกลั่น	0.75 มล.
10% Ammonium persulfate (1.5)	150.0 ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	20.0 ไมโครลิตร

### 2.2 การเตรียม stacking gel สำหรับ SDS-PAGE 4% gel (4% T, 2.7% C<sub>Bis</sub>)

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66 มล.
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.2 มล.
น้ำกลั่น	12.2 มล.
10% Ammonium persulfate (1.5)	100.0 ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	10.0 ไมโครลิตร

ตาราง ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15% T 2.7% C <sub>Bis</sub>	4% T 2.7% C <sub>Bis</sub>
30% T, 2.7% C <sub>Bis</sub>	15 มล.	2.66 มล.
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มล.	-
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3 มล.	0.2 มล.
น้ำกลั่น	6.75 มล.	12.2 มล.
10% Ammonium persulfate (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
(TEMED)	20 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร

### 3. Running buffer

#### 3.1 SDS-PAGE Tank buffer

Tris	12.0 กรัม
Glycine	57.6 กรัม
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	40.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	4,000.0 มล.

### 4. สารละลายย้อมโปรตีน และล้างสีส่วนเกิน

#### 4.1 สารละลายย้อมโปรตีน (Coomassie blue)

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

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

##### 4.1.2 Stain (สี Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01%)

Stain stock	50.0 มล.
Methanol	250.0 มล.
Acetic acid	50.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0 มล.



#### 4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain)

##### 4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

Methanol	550.0 มล.
Acetic acid	100.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0 มล.

##### 4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

Methanol	50.0 มล.
Acetic acid	70.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0 มล.

ทำการย้อมเจลโดยถอดเจลออกจากกระจก แฉ่งลงในสีย้อม Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01% (4.1.2) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างสีส่วนเกินโดยนำเจลลงแช่ใน สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ย้ายเจลลงแช่ใน สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2 (4.2.2) จนสีพื้นของเจลใสปราศจากสี

#### 5. Towbin transfer buffer pH 8.8 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Western blotting

Tris	3.03 กรัม
Glycine	14.4 กรัม
Methanol	200.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	800.0 มล.
แซ่บฟเฟอร์ให้เย็นจัดก่อนนำไปใช้	



## สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ class และ Subclass ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

1. Rabbit anti-Mouse IgG<sub>1</sub> ( $\gamma$ 1 chain specific)
2. Rabbit anti-Mouse IgG<sub>2a</sub> ( $\gamma$ 2a chain specific)
3. Rabbit anti-Mouse IgG<sub>2b</sub> ( $\gamma$ 2b chain specific)
4. Rabbit anti-Mouse IgG<sub>3</sub> ( $\gamma$ 3 chain specific)
5. Rabbit anti-Mouse IgA ( $\alpha$  chain specific)
6. Rabbit anti-Mouse IgM ( $\mu$  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 IgG<sub>1</sub> (Mouse IgG<sub>1</sub> ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
11. Substrate buffer, concentrated (10x) (1M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
12. ABTS substrate, concentrated (50x) (2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid))
13. Blocking solution, concentrated (50x) (25% BSA and 0.05% NaN<sub>3</sub>)
14. HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), concentrated (50x)
15. Goat anti- Mouse IgGAM, concentrated (50x) (0.5 mg/ml containing 10% glycerol and 0.05% NaN<sub>3</sub>)
16. 50% Tween 20



## บัฟเฟอร์และสารเคมีในงาน Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 1. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

Skimmed milk	5.0 กรัม
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0 มล.
Merthiolate 1% (Sigma)	1.0 มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.1 มล.

### 2. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 0.5%

สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%	50.0 มล.
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	950.0 มล.

### 3. Citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

Sodium citrate	29.41 กรัม
Merthiolate 1% (Sigma)	10.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0 มล.
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N	

### 4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

Sulfuric acid	27.0 มล.
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0 มล.

### 5. O-Phenylenediamine (OPD)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธมลวรรณ พูลสมบูรณ์ผล
วัน เดือน ปี เกิด	22 พฤศจิกายน 2536
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วท.บ. ชีววิทยาประยุกต์ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่ปัจจุบัน	47/379 นิคมใหม่ 40 ถนนนิคมใหม่ แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กรุงเทพฯ 10510
ผลงานตีพิมพ์	ธมลวรรณ พูลสมบูรณ์ผล, ประดิษฐ์ หวังมาน, ไพศาล สิทธิกรกุล และศิวาพร ลงยันต์. (2564). การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนของทีออกซิน A และทีออกซิน B ของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่ก่อโรคตับและตับอ่อนฝ่อเฉียบพลันในกุ้ง. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ 14. หน้า 248-259. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
รางวัลที่ได้รับ	1) รางวัลระดับ 3 ดาวในการนำเสนอเอกสารเชิงแนวคิด/ผลงานสิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรมในระดับที่มีคุณภาพ ในกิจกรรมการเพิ่มศักยภาพและมาตรฐานบุคลากรอุดมศึกษา: บ่มเพาะและแลกเปลี่ยนเรียนรู้เพื่อพัฒนาสิ่งประดิษฐ์และนวัตกรรม ประจำปี 2563 โดยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ 2) รางวัลระดับเหรียญเงิน ในกิจกรรมประกวดผลงานนวัตกรรมสายอุดมศึกษา ประจำปี 2563 โดยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ