รายงานวิจัย

การสร้างไฮบริโดมาเซลล์ไลน์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโซมาติก (O) และ แฟลกเจลลา (H) แอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Weltevreden

Establishment of hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies against somatic (O) and flagella (H) antigens of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Weltevreden

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. มณฑล เสิศวรปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

อาจารย์สุภารัตน์ สุทธิมุสิก

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

อาจารย์กำชัย ตันติกาพงศ์

คณะเทคโนโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2561

มหาวิทยาลัยทักษิณ

คำรับรองคุณภาพ

รายงานวิจัยเรื่อง **การสร้างไฮปริโดมาเซลล์ไลน์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโซมาติก (O) และแฟซกเจลลา (H) แอนติเจนของเชื้อ** Salmonella Typhimurium **และ** Salmonella Weltevreden

ผู้วิจัย มณฑล เลิศวรปรีชา

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอรับรองว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว มีความเห็นว่าผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☑ ดี
- ☐ ปานกลาง
- ☐ พอใช้
- ☐ ควรปรับปรุง

(อาจารย์ ดร.ตั้ม บุญรอด)
รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
รักษาการแทน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
วันที่ 11 ธันวาคม 2562

บทคัดย่อ

Salmonella เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร การติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน เชื้อ *Salmonella* แบ่งออกได้หลายซีโรวาร์ ตามคุณสมบัติที่แตกต่างกันของ O และ H แอนติเจน การจัดจำแนกซีโรวาร์ทำโดยการตกตะกอนของแอนติเจนกับแอนติบอดี ดังนั้นการวินิจฉัยที่รวดเร็วจึงจำเป็นต้องอาศัยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเซลล์ไฮบริโดมา สำหรับการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* และพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับการคัดเลือกไฮบริโดมาโคลน การสร้างเซลล์ไฮบริโดมา ทำโดยฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแฟลกเจลลาและลิโพโพลิแซคคาไรด์แอนติเจน ของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden c จากนั้นเก็บสปีโนไซต์มาหลอมรวมกับเซลล์ Sp2/0-Ag14 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (myeloma) ของหนู ทำการคัดแยกและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ O และ H แอนติเจน ด้วยวิธี Western blot ผลการศึกษาสามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ H แอนติเจนของเชื้อ *S.* Typhimurium จำนวน 6 โคลน และโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อ O ของเชื้อ *S.* Typhimurium จำนวน 1 โคลน ไม่สามารถตรวจพบโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ S. Weltevreden

การเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยการใช้สารให้ความหนืดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าสูตรที่ดีที่สุดของอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ช่วยให้เซลล์แพร่กระจายและเจริญเป็น 3 มิติ คือ 1.5 % เมธิลเซลลูโลส, 0.25 % เจลาติน, 1 % คอลลาเจน, 0.05 mM 2-mercaptoethanol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม 10 % FBS ผลการเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากกระบวนการพัฒนาและอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปพบมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

Key words: ซัลโมเนลลา, โมโนโคลนอล แอนติบอดี, เซลล์ไฮบริโดมา, อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

Abstract

Salmonella enterica is a pathogen that causes infection in the intestinal tract. Infection caused by eating of contaminated food. *Salmonella enterica* can be divided into several serovars according to the different antigenic properties of O and H antigens. The identification of the serovars can perform by specific serum agglutination assay. Rapid identification of *Salmonella enterica,* therefore, requires monoclonal antibodies specific to O and H antigen of these bacteria. In this study, the objectives are to generate the hybridoma cell line for the production of monoclonal antibodies and develop a semi-solid culture media for the selection of hybridoma clone. Establishment of hybridoma cell line initiate by immunized BALB/C mice with the flagella and lipopolysaccharide antigens of *S.* Typhimurium and *S.* Weltevreden. After that, the sphenocytes were collected and fused with the Sp2/0-Ag14 myeloma cells line. Selection of hybridoma cells that produce monoclonal antibodies specific to O and H antigens was performed by Western blot method. The results showed that 6 hybridoma cell line clones produced monoclonal antibodies against flagella antigen of *S.* Typhimurium and 1 clone produced monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigen of *S.* Typhimurium and unable to establish hybridoma cell line clone specific to flagella and lipopolysaccharide antigens of *S.* Weltevreden

Comparison of hybridoma cell line growth in semi-solid medium by using viscosity substances and different concentrations found that the best formulas of the semi-solid medium that allow the cells to spread and form 3 dimensional colony was 1.5 % methyl cellulose, 0.25 % gelatin, 1 % collagen, 0.05 mM 2-mercaptoethanol in the DMEM medium supplemented with 10% FBS. Comparison of the semi-solid medium derived from the development process and commercially available semi-solid medium were found to have closely effectiveness.

Key words: *Salmonella enterica*, Monoclonal antibody, Hybridoma cell, Semisolid media

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2561 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา เลิศวัชระสารกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและเอื้อเฟื้อเซลล์มะเร็งเพื่อการศึกษาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือสำหรับการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโทสาขาชีววิทยา คุณจิตกร ทองนันท์ ผู้ช่วยวิจัยในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณฑล เลิศวรปรีชา
อาจารย์ ศุภารัตน์ สุทธิมุสิก
อาจารย์กำชัย ตันติกาพงศ์

สารบัญ

บทที่	เรื่อง	หน้า
	บทคัดย่อ	I
	Abstract	Ii
	กิตติกรรมประกาศ	iii
	สารบัญ	iv
	สารบัญรูป	Vi
	สารบัญตาราง	vii
1	ที่มาและความสำคัญ	1
	ที่มาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์	3
2	ทบทวนวรรณกรรม	4
	โรค Salmonellosis และระบาดวิทยา	4
	จุลชีววิทยาของ *Salmonella enterica*	5
	การตรวจวินิจฉัย	7
	การสร้างเซลล์ไฮบริโดมา	8
	การผลิตแอนติบอดีต่อ *Salmonella enterica*	11
	ขอบเขตของโครงการวิจัย	13
3	การสร้างเซลล์ไฮบริโดมาและการคัดเลือกโคลน	15
	วิธีการทดลอง	15
	การเตรียมหนูทดลอง	15
	การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา	15
	การสกัด cell wall (lipopolysaccharide)	15
	การเตรียมแฟลกเจลลาแอนติเจน	16
	การวัดความเข้มข้นของแอนติเจน	16
	การตรวจสอบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE	16
	การ immunize หนูทดลอง	17
	การเตรียมสปีโนไซต์	17
	การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา	18
	การสร้างเซลล์ไฮบริโดมาโดยชุด ClonaCell™-HY Hybridoma Kit	18
	การคัดเลือกโคลนไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot	18
	การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	19

บทที่	เรื่อง	หน้า
	ผลการทดลอง	20
	การเตรียม O และ H แอนติเจน	20
	ความเข้มข้นของแอนติเจน	20
	การคัดเลือกโคลนโดยชุด ClonaCell™-HY Hybridoma kit	21
	การคัดเลือกโคลนไฮบริโดมา และการทดสอบปฏิกิริยา cross reaction	22
4	การทดสอบสูตรอาหารกึ่งแข็งก่งเหลวที่เหมาะสมสำหรับการเจริญในรูแบบ 3 มิติ	24
	เซลล์ไฮบริโดมา	24
	การเปรียบเทียบการเจริญเป็นโคโลนีในสารให้ความหนืดที่ต่างกัน	24
	การศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับอาหารทดสอบ	24
	ความเข้มข้นของเจลาตินและคอลลาเจนที่มีผลต่อการเจริญเป็น 3 มิติ	24
	การเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป	25
	ผลการทดลอง	25
	การเปรียบเทียบการเจริญเป็นโคโลนีในสารให้ความหนืดที่ต่างกัน	25
	การศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับอาหารทดสอบ	27
	ความเข้มข้นของเจลาตินและคอลลาเจนที่มีผลต่อการเจริญเป็น 3 มิติ	27
	การเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป	30
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
	เอกสารอ้างอิง	34

สารบัญรูป

รูป	เรื่อง	หน้า
1	แอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium	6
2	กระบวนการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาและการคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	9
3	แผนผังการดำเนินการวิจัยในส่วนที่ 1	13
4	แผนผังการดำเนินการวิจัยในส่วนที่ 2	14
5	ผลการทดสอบการสกัดแยก O และ H แอนติเจน จากเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden	20
6	กราฟมาตรฐานใช้สำหรับคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD_{595}	21
7	ลักษณะของโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว	22
8	ผลการทดสอบเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่สร้างแอนติบอดี และผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี western blotting	23
9	ลักษณะโคโลนีในอาหารแต่ละชนิด	26
10	ลักษณะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญเป็น 3 มิติ	28
11	ลักษณะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของคอลลาเจน	29
12	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว	31

สารบัญตาราง

ตาราง	เรื่อง	หน้า
1	ตัวอย่างการจัดจำแนกเชื้อ *S. enterica* ที่จัดอยู่ใน group B	6
2	การฉีด O และ H แอนติเจน ของ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden ในหนูทดลอง	17
3	ปริมาณแอนติเจนที่สกัดได้จากตัวอย่างเชื้อ	21
4	ผลการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญเป็นโคโลนี้ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ClonaCell™-HY Hybridoma Kit	23
5	แสดงผลการทดลองของอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร	26
6	แสดงจำนวนโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเซลล์	27
7	แสดงผลการใช้เจลาตินเพื่อให้เซลล์เจริญเป็น 3 มิติ	28
8	แสดงผลการใช้คอลลาเจนกระตุ้นการเจริญของเซลล์	29
9	ผลการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว	30

บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ

ที่มาและความสำคัญ

เชื้อ *Salmonella enterica* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถก่อโรคในมนุษย์และสัตว์และบางชนิด พบได้ในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียกลุ่มนี้มีหลายจีนัส ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียพบอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ถูกขับออกมาทางอุจจาระและมักปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำ โดยเฉพาะในเนื้อสัตว์ เช่น สุกร ไก่ โคและกระบือ เชื้อ *S. enterica* มีความหลายหลายในระดับซีโรวาร์ (serovar) ค่อนข้างสูง ความแตกต่างในระดับซีโรวาร์เป็นผลจากแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ เรียกว่า O: แอนติเจน และแอนติเจนของแฟลกเจลลา เรียกว่า H: แอนติเจน

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. enterica* สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีมาตรฐาน คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture based) ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยเวลาในการตรวจวินิจฉัยที่นาน ในขณะที่การตรวจวินิจฉัยทางอณูชีวโมเลกุล เช่น การตรวจหาสารพันธุกรรม โดยเทคนิค PCR มีความไวและความจำเพาะที่สูง แต่ก็มีข้อจำกัด คือ ต้องอาศัยเครื่องมือที่ราคาสูง และผู้ปฏิบัติการต้องมีความชำนาญ นอกจากนี้การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไม่สามารถยืนยันว่าแบคทีเรียนั้นมีชีวิต หรือเป็นแบคทีเรียที่ตายไปแล้ว การตรวจวินิจฉัยอีกแนวทางหนึ่ง คือ การตรวจทางซีรัมวิทยา โดยการตรวจหาระดับแอนติบอดีในผู้ป่วยหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ เช่นเทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay หรือ ELISA วิธีการดังกล่าวช่วยให้การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยมีความรวดเร็วมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การตรวจพบระดับแอนติบอดีไม่ได้ยืนยันสถานะของโรค ทั้งนี้เพาะระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบ อาจเกิดจากการที่ร่างกายเคยได้รับเชื้อมาก่อน และการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวเป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีในมนุษย์หรือสัตว์ป่วย ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจหาการปนเปื้อน *S. enterica* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ที่อาศัยการตรวจพบเชื้อเป็นสำคัญ การตรวจในตัวอย่างเนื้อสัตว์ต้องการผลการตรวจที่รวดเร็ว ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยแบบเร็ว ซึ่งใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ *S. enterica* กระบวนการผลิตชุดทดสอบดังกล่าวอาศัยการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนส่วนต่าง ๆ ของ *S. enterica*

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อบริเวณ antigenic determinant หรือ epitope เพียงชนิดเดียว ที่สร้างโดยบี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) เพียงโคลนเดียว กระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เริ่มต้นด้วยการสร้างเซลล์ลูกผสมระหว่างบี-ลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีและมัยอิโลมา (myeloma cell) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง (B-cell cancer) เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นเรียกว่าเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) จากนั้นจึงคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ epitope ที่ต้องการ นำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น ข้อดีคือ เซลล์ไฮบริโดมาสามารถเลี้ยงต่อไปได้อย่างไม่จำกัด เนื่องจากคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งที่หลอมรวมเข้าไป

การสร้างเซลล์ไฮบริโดมา เริ่มต้นจากการสกัดแอนติเจนจากเชื้อ (whole cell) และฉีดเข้าหนูทดลอง จากนั้นเก็บตัวอย่างม้าม (spleen) จากหนูที่ได้รับการฉีดแอนติเจน เพื่อแยกเอาสปีโนไซต์

(splenocyte) มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมาของหนู จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดพิเศษเรียกว่า HAT medium (hypoxanthine, aminopterin and thymidine medium) ในการคัดเลือกให้ได้โคลนที่ต้องการ ทำโดยการเจืองจางเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ในจานหลุม 96 หลุม (96 well plate) และตรวจสอบที่ละโคลนว่าโคลนใด คือ เซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการ การคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลที่ต้องการ เป็นกระบวนการที่ยุ่งยากมากที่สุด สิ้นเปลืองทรัพยากร และต้องใช้เวลานาน

แม้ว่าปัจจุบันมีชุดอาหารสำเร็จรูปสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจำหน่ายช่วยให้การผลิตและคัดเลือกไฮบริโดมาทำได้ง่ายมาก โดยอาศัยหลักการการเจริญของเซลล์เป็น 3 มิติ (3D) ในตัวอย่างอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ข้อจำกัดประการหนึ่งของการใช้ชุดอาหารกึ่งเข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป คือ ราคาอาหารที่สูงมาก โดยเฉพาะส่วนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับการคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมาโคลน ซึ่งเป็นอาหารผสมกับ HAT medium ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ราคาประมาณ 30,000 บาท อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวใช้เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose) เป็นสื่อเติมลงในอาหารเพื่อให้เกิดความหนืดในอาหาร แต่จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าการใช้เมทิลเซลลูโลสตามความเข้มข้นที่กำหนดเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ (3D) ได้ แสดงให้เห็นว่าต้องมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเป็นและไม่ได้เปิดเผย นอกจากนี้การฉีดกระตุ้นด้วย whole cell ทำให้ได้โคลนจำนวนมาก และยากแก่การคัดเลือกโคลนไฮบริโดมา ถ้าหากแอนติเจนเป้าหมายมีจำนวนน้อยหรือไม่ใช่ epitope ที่เด่น อาจไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการเลย แนวทางแก้ไขอาจต้องใช้วิธีการสกัดเฉพาะแอนติเจนชนิดนั้นออกมาแทนการใช้ whole cell ช่วยให้มีโอกาสคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้มากขึ้น

ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมีแนวทางผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden ซึ่งทั้งสองซีโรวาร์ เป็นซีโรวาร์ที่พบได้มากเป็นอันดับต้น ๆ ในประเทศไทย โดยแนวทางการสร้างเซลล์ไฮบริโดมา ใช้วิธีการสกัดแอนติเจนเฉพาะส่วน O: แอนติเจน และ H: แอนติเจนของเชื้อ เพื่อนำไปฉีดในหนูทดลอง และใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับการสร้างและคัดเลือกไฮบริโดมา นอกจากนี้ในการศึกษาจะพัฒนาอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวขึ้นมาเพื่อใช้ทดแทนอาหารสำเร็จรูปที่มีราคาสูง

วัตถุประสงค์หลัก

1) สร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ O และ H แอนติเจนของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.*Weltevreden
2) คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ O และ H แอนติเจน ของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden
3) พัฒนาอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

โรค Salmonellosis และระบาดวิทยา

Salmonella enterica เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญ พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา การติดเชื้อ *S. enterica* บางซีโรวาร์อาจทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ได้ ประมาณ 95% ของผู้ป่วยติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหาร โดยเฉพาะเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อ (Mead *et al.* 1999, Foley *et al.* 2007) โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. enterica* เรียกว่า Salmonellosis อาการที่พบคืออุจจาระร่วง ถ่ายเหลวเป็นน้ำซุป จนถึงการถ่ายเหลวเป็นน้ำ และเกิดภาวะขาดน้ำ (dehydration) บางกรณีผู้ติดเชื้อมีอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ไข้สูงปานกลางและหนาวสั่น โดยทั่วไปอาการปรากฏนานประมาณ 2-5 วัน แม้ว่าอาการที่พบในผู้ป่วยบางครั้งไม่รุนแรง สามารถหายได้เอง แต่โรค Salmonellosis ยังคงเป็นเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก ด้วยรายงานทางระบาดวิทยาพบว่าการติดเชื้อ *S. enterica* ซีโรวาร์ต่าง ๆ เพิ่มสูงขึ้น ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อ *S. enterica* ทั่วโลกประมาณ 93.8 ล้านคน และในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตประมาณ 155,000 คน (Majowicz *et al.* 2010, Hendriksen *et al.* 2011) นอกจากอุบัติการของโรคที่สูงขึ้น ยังพบการติดเชื้อที่มีความรุนแรง รวมทั้งการดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Aarestrup *et al.* 2003, Wybot *et al.* 2004, Chuanchuen *et al.* 2008, Lertworapreecha *et al.* 2013, Lunguya *et al.* 2013) สาเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้พบแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวาง คือ สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้หลายชนิด ทำให้ *S. enterica* ถูกขับออกมาปนเปื้อนกับมูลสัตว์ลงสู่สิ่งแวดล้อมต่าง ๆ แพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมและติดเชื้อในสัตว์อื่นต่อไป (Dargatz *et al.* 2000, Corry *et al.* 2002, Natvig *et al.* 2002, Coburn *et al.* 2007, Lertworapreecha *et al.* 2013) ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา พบว่า *S. enterica* เป็นสาเหตุหลักที่สำคัญของโรคติดเชื้อที่เกิดจากอาหารและน้ำเป็นสื่อ โดยในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อประมาณ 2-3 ล้านคน เป็นสาเหตุให้เสียชีวิตประมาณปีละ 500-2,000 คน (Braden&Tauxe 2013) ซีโรวาร์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อมากที่สุด คือ *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden และ *S.* Enteritidis (Herikstad *et al.* 2002, Galanis *et al.* 2006) สำหรับข้อมูลอุบัติการของโรค ในแต่ละภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก พบอุบัติการเกิดโรคต่อประชากรที่แตกต่างกัน เช่น North Africa และ Middle East อัตราการเกิดโรคเท่ากับ 140 อัตราการเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา และประเทศยังไม่พัฒนา เช่น Sub-Saharan Africa พบอุบัติการการเกิดโรคอยู่ที่ 470 คนต่อประชากรแสนคน ใน Southeast Asia พบอุบัติการการเกิดโรคที่สูงมากถึง 3,980 คนต่อประชากรแสนคน (Majowicz *et al.* 2010) ข้อมูลทางระบาดวิทยาในประเทศไทย โดยสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค พ.ศ. 2558 พบเชื้อ *S. enterica* เป็นสาเหตุสำคัญอันดับสองของโรคอาหารเป็นพิษที่พบในผู้ป่วยรองจากการติดเชื้อ *Vibrio parahemolyticus* (สำนักระบาดวิทยา 2558) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาหลายรายงานพบว่า *S. enterica* เป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อ

ที่เกิดจากอาหารและน้ำเป็นสื่อ (Bangtrakulnonth *et al.* 2004, Vaeteewootacharn *et al.* 2005, Padungtod&Kaneene 2006, Bernbom *et al.* 2009, ธงชัย เฉลิมชัยกิจ *et al.* 2544)

โรคติดเชื้อ *S. enterica* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบตามลักษณะอาการทางคลีนิค คือ

1. Enteric fever หรือ Typhoid fever เป็นโรคที่รุนแรงเกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, B และ C โดยเชื้อในกลุ่มนี้มีคนเป็นโฮสต์เท่านั้นและไม่พบการติดเชื้อในสัตว์

2. Non-typhoidal *Salmonella* เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาในข้างต้น เชื้อในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่มีอาหารเป็นสื่อ (food-borne disease)

จุลชีววิทยาของ *Salmonella enterica*

เชื้อ *S. enterica* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogens) สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์พบแพร่กระจายทั่วโลก จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลา (flagella) *Salmonella* มีความหลากหลายในระดับซีโรวาร์สูง ดังนั้นจึงมีระบบการจัดแบ่งเชื้อเพื่อลดความสับสนในการสื่อสารข้อมูล ส่วนใหญ่ยอมรับและนิยมใช้วิธีการจัดแบ่งตามแนวทางของ World Health Organization (WHO) Collaborating Center of Reference and Research on *Salmonella* (Institute Pasteur, Paris) โดยจัดแบ่ง *Salmonella* ออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ *S. enterica* และ *S. bongori* (Kauffmann 1973, Brenner *et al.* 2000) ใน *S. enterica* สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ซับสปีชีส์ ได้แก่

subspecies I : *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

subspecies II : *Salmonella enterica* subsp. *salamae*

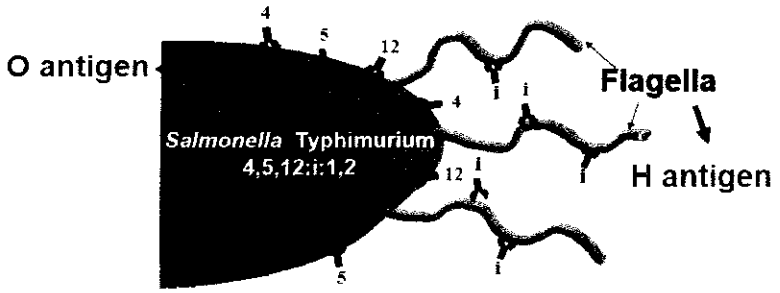
subspecies IIIa : *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*

subspecies IIIb : *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*

subspecies IV : *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*

subspecies VI : *Salmonella enterica* subsp. *Indica*

สำหรับซับสปีชีส์ V (*Salmonella enterica* subsp. *bongori*) จากเดิมได้เปลี่ยนเป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *S. bongori* การจัดจำแนกสปีชีส์ และซับสปีชีส์อาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันทางชีวเคมี ส่วนการจัดจำแนกซีโรวาร์ของเชื้ออาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของแอนติเจนบนผนังเซลล์ (O) และแอนติเจนที่แตกต่างกันของแฟลกเจลลา (H) (รูปที่ 1) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนทำปฏิกิริยากับเชื้อที่แยกได้ โดย O แอนติเจนที่แตกต่างกันทำให้แบ่งเชื้อ *S. enterica* ออกเป็น group A-Z และ group O:51-O:67 และในแต่ละ group มีซีโรวาร์ที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 แอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการจัดจำแนกเชื้อ *S. enterica* ที่จัดอยู่ใน group B

Group O:4 (B)

Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen		
		Phase 1	Phase 2	Other
Kisangani	1,4,[5],12	a	1,2	
Hessarek[1]	4,12,27	a	1,5	
Fulica[1]	4,[5],12	a	[1,5]	
Arechavaleta	4,[5],12	a	1,7	
Bispebjerg	1,4,[5],12	a	e,n,x	
Tinda	1,4,12,27	a	e,n,z_{15}	
II	1,4,[5],12,27	a	e,n,x	
Huettwilen	1,4,12	a	l,w	
Nakuru	1,4,12,27	a	z_6	
II	1,4,12,27	a	z_{39}	
Paratyphi B[2]	1,4,[5],12	b	1,2	[z_5],[z_{33}]
Limete	1,4,12,27	b	1,5	
II	4,12	b	1,5	
Canada	4,12,27	b	1,6	
Uppsala	1,4,12,27	b	1,7	
Abony	1,4,[5],12,27	b	e,n,x	
II	1,4,[5],12,27	b	[e,n,x]	
Wagenia	1,4,12,27	b	e,n,z_{15}	
Wien	1,4,12,27	b	l,w	
Tripoli	1,4,12,27	b	z_6	
Schleissheim[3]	4,12,27	b	–	
Legon	1,4,12,27	c	1,5	
Abortusovis	4,12	c	1,6	
Altendorf	4,12,27	c	1,7	
Bissau	4,12	c	e,n,x	
Jericho	1,4,12,27	c	e,n,z_{15}	
Hallfold	1,4,12,27	c	l,w	
Bury	4,12,27	c	z_6	
Stanley	1,4,[5],12,27	d	1,2	

ที่มา : (Kauffmann 1973)

ปัจจุบันพบ *S. enterica* ประมาณ 2,500 ซีโรวาร์ โดยซีโรวาร์ที่พบติดเชื้อทั้งในมนุษย์และสัตว์มากที่สุด ได้แก่ *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden การตรวจวินิจฉัยและจำแนกซีโรวาร์ของเชื้อนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งทางด้านการระบาดวิทยา

การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อและการปนเปื้อน *S. enterica* สามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีมาตรฐาน คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture based) จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ เช่น อาหาร หรือตัวอย่างจากผู้ป่วย การตรวจวินิจฉัยโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อก็มีหลายวิธี แต่ละวิธีอาจมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันไป (Yue *et al.* 2014, Rodriguez *et al.* 2018) แม้ว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความถูกต้องสูง แต่ปัญหาของการตรวจวินิจฉัยโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ การใช้ระยะเวลาที่นานหลายวัน ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงและเป็นวิธีที่ใช้แรงงาน ในการตรวจวินิจฉัยที่มีวัตถุประสงค์เพื่อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่ส่งออก เพื่อการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ การวินิจฉัยการติดเชื้อในผู้ป่วย หรือในสัตว์ จึงต้องการผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อจึงอาจไม่ใช่วิธีที่เหมาะสม เทคนิคการตรวจวินิจฉัยแบบเร็ว จึงมีบทบาทสำคัญมากขึ้นในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อและการปนเปื้อน *S. enterica*

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจวินิจฉัย *S. enterica* อย่างเร็วหลายวิธี เช่น เทคนิค PCR และ real time PCR โดยการใช้ specific primers ที่จำเพาะกับเชื้อ และจำเพาะกับซีโรวาร์ในการตรวจวินิจฉัย (Heymans *et al.* 2018, Noorlis *et al.* 2018, Ozyurt *et al.* 2019, Sahu *et al.* 2019, Vinayaka *et al.* 2019) ข้อดีของวิธีการดังกล่าว คือ ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ข้อเสียของเทคนิคดังกล่าว คือ โอกาสปนเปื้อนตัวอย่าง DNA ทำให้เกิดเป็นผลบวกเทียม และเทคนิคดังกล่าวเป็นการตรวจ DNA ดังนั้นในตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ อาจทำให้ตัดสินว่าตัวอย่างอาหารไม่ได้มาตรฐานได้และต้องทำลายทิ้ง โดยที่ความเป็นจริงเชื้อที่ตรวจพบนั้นอาจตายแล้ว และไม่มีผลต่อผู้บริโภค นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยทางอณูชีวโมเลกุล ต้องอาศัยเครื่องมือที่ราคาสูง ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์

เทคนิคทางซีรัมวิทยา (serology) เป็นการตรวจวินิจฉัยโดยอ้อม คือ ตรวจหาระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อ การตรวจหาระดับแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย เป็นวิธีการที่รวดเร็วและมีความจำเพาะสูง ตัวอย่างวิธีการดังกล่าว เช่น Enzyme Linked Immunosorbent Assay หรือ ELISA เป็นการใช้ปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของแอนติบอดีและแอนติเจน โดยใช้เอนไซม์ เช่น peroxidase หรือ alkaline phosphatase ช่วยสังเกตเห็นสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับ substrate และความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณของแอนติบอดีที่ปรากฏในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย การวินิจฉัยโดยวิธี ELISA ทำให้ลดเวลาในการวินิจฉัยลงได้ ซึ่งอาจใช้เวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง โดยทั่วไปวิธี ELISA ใช้เวลาประมาณ 90 นาที แต่ยังต้องมีขั้นตอน pre-enrichment และ enrichment เช่นเดียวกับการวิเคราะห์จุลินทรีย์โดยวิธีดั้งเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากจนถึงระดับที่ตรวจนับได้อย่างน่าเชื่อถือ (ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งทำให้ใช้เวลารวมทั้งสิ้นเร็วกว่าวิธีดั้งเดิมประมาณ 2 วัน

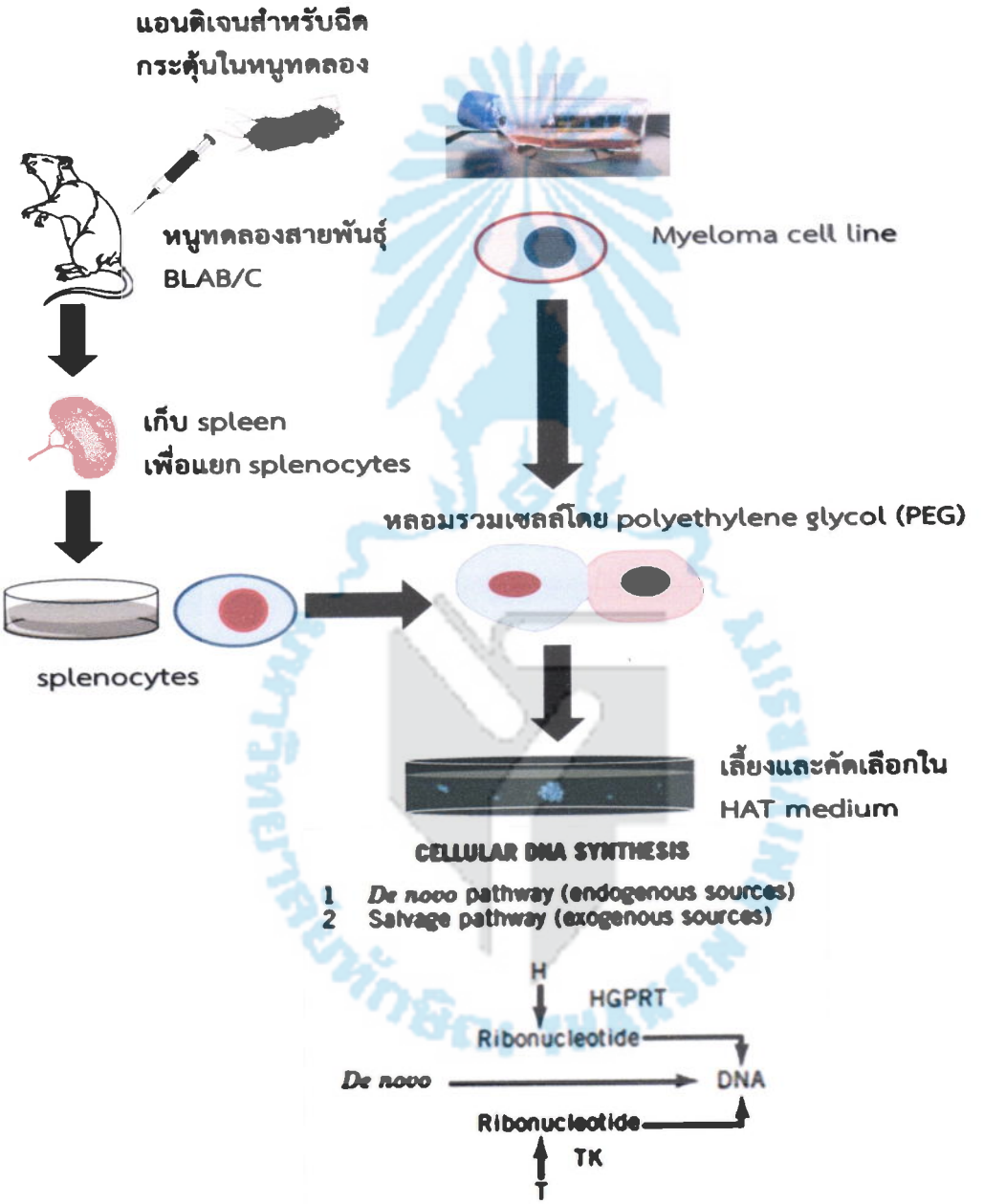
นอกจากนั้นยังมีวิธีการอื่นๆ ในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลที่รวดเร็วมากยิ่งขึ้นไปอีก เช่น ระบบที่ใช้วิธีจับยึดเซลล์ของ *Salmonella* ไว้บนแท่งสำหรับจุ่ม (dipstick) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด pre-enrichment จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่อาหารที่ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนจนสามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธี ELISA ได้ ซึ่งการใช้เทคนิคอุปกรณ์ดังกล่าวทำให้ร่นระยะเวลาที่ต้องใช้ลงได้อีกประมาณ 1 วัน (Prusaksochaczewski&Luong 1989, Farzan *et al.* 2007) อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิคดังกล่าว ยังมีข้อจำกัดการนำมาใช้สำหรับการตรวจหาตัวเชื้อ การประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อในตัวอย่างอาหารทำได้ยาก การตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่าง ต้องอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยแบบเร็ว ที่ใช้แอนติบอดีสำหรับตรวจหาแอนติเจนของ *S. enterica* ชุดตรวจวินิจฉัยแบบเร็วที่ตรวจหาแอนติเจนของ *S. enterica* ซึ่งมีหลายรูปแบบ เช่น ELISA และ lateral flow test strip (Chaicumpa *et al.* 1995, Schneid *et al.* 2006, Cam&Oktem 2019) กระบวนการผลิตชุดทดสอบดังกล่าวอาศัยการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่าง ๆ ของ *S. enterica*

การสร้างเซลล์ไฮบริโดมา

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์หรือโคลน (clone) ที่มีต้นกำเนิดมาจากบี-ลิมโฟไซต์ เพียงเซลล์เดียว แอนติบอดีทุกโมเลกุลที่สร้างออกมาจากบี-ลิมโฟไซต์ เซลล์ดังกล่าวจำเพาะต่อ epitope ตำแหน่งเดียวกัน และในทุกโมเลกุลมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทำให้มีความจำเพาะที่สูง เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัย อย่างไรก็ตามบี-ลิมโฟไซต์ โคลนที่สร้างแอนติบอดีมีอายุสั้น ไม่สามารถเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนได้ตลอดไป แนวทางแก้ปัญหาประการหนึ่ง คือ การสร้างเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งเป็นเซลล์ลูกผสมระหว่างบี-ลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีและเซลล์มัยอิโลมา เซลล์ลูกผสมดังกล่าวสามารถเลี้ยงต่อไปได้อย่างไม่จำกัด โดยไม่ต้องสร้างขึ้นมาใหม่

หลักการสำคัญในการการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เริ่มต้นจากการเตรียมแอนติเจนที่ต้องการฉีดเข้าสู่หนูทดลอง ตามปริมาณและจำนวนครั้งตามกำหนด หลังจากนั้นจึงทำการุณยฆาต (sacrifice) หนูทดลอง แยกเซลล์ สปีโนไซต์จากม้ามหนู นำไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา เพื่อให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสม เรียกว่า เซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดพิเศษเรียกว่า HAT medium (hypoxanthine, aminopterin and thymidine medium) การคัดเลือกโดยอาหาร HAT อาศัยหลักการ คือ เซลล์ทั่วไปสามารถสังเคราะห์ DNA ได้ใน 2 pathway หลัก คือ *De novo* synthesis และ salvage pathway เซลล์ทั่วไปเริ่มการสังเคราะห์ด้วย *De novo* synthesis แต่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT มีสาร aminopterin ซึ่งยับยั้งการกระบวนการสังเคราะห์ DNA ผ่านทาง *De novo* synthesis เซลล์จึงเปลี่ยนไปใช้ salvage pathway เพื่อสังเคราะห์ DNA แทน กระบวนการสังเคราะห์ DNA ผ่านทาง salvage pathway จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ thymidine kinase (TK) และ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) โดยเซลล์มัยอิโลมาไม่มีเอนไซม์ TK และ/หรือ HGPRT ดังนั้นเซลล์มัยอิโลมาที่ไม่มีการหลอมรวมกับบี-ลิมโฟไซต์ จะตายไปเนื่องจากไม่สามารถ

สังเคราะห์ DNA ได้ ส่วนบี-ลิมโฟไซต์ ที่ไม่ได้ถูกหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมาจะตายตามอายุขัยของเซลล์ไปในระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ (รูปที่ 2) ดังนั้นเซลล์ที่สามารถเจริญได้ใน HAT medium ก็คือเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดขึ้นจากการหลอมร่วมกันระหว่างบี-ลิมโฟไซต์ และเซลล์มัยอิโลมาโดยเซลล์ไฮบริโดมาได้รับเอนไซม์ TK และ HGPRT มาจากบี-ลิมโฟไซต์ จึงสามารถสังเคราะห์ DNA ผ่านทาง salvage pathway ได้ (Singh *et al.* 2018)



รูปที่ 2 กระบวนการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาและการคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมา ต้องคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ การคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเป็นกระบวนการที่ยุ่งยากมากที่สุด สิ้นเปลืองทรัพยากรและต้องใช้เวลานานมาก การคัดเลือกทำโดยการเจือจางเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุม 96 หลุ่ม (96 well plate) โดยการเจือจางเพื่อให้แต่ละหลุ่มมีเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญขึ้นมาจากเซลล์เพียงโคลนเดียว กระบวนการเจือจางทำให้ได้เซลล์หลายพันโคลน วิธีที่ใช้คัดเลือก เช่น ELISA, dot-blotting, Western blotting, immunohistochemistry การเลือกใช้วิธีการต่าง ๆ นั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและประสบการณ์ของห้องปฏิบัติการ เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการแล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (re-clone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป โอกาสคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการมากขึ้น อาจอยู่ที่วิธีการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ในระยะเวลา ช่องทางและปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้หนูได้รับการกระตุ้นและสร้างแอนติบอดีในประมาณสูง มีรายงานว่าการใช้เทคนิค Neonatal subtractive immunization ชักนำให้หนูทดลองเกิดภาวะ tolerance ด้วยโปรตีนพาหะ (carrier protein) โปรตีนบางชนิดก่อน ในช่วงแรกเกิด เมื่อหนูเจริญขึ้นจึงฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน epitope ที่จำเพาะซึ่งนำไปเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะที่เคยฉีดให้หนูในช่วงแรกเกิด ช่วยให้หนูถูกกระตุ้นด้วย epitope ที่จำเพาะได้สูง และมีโอกาสได้บี-ลิมโฟไซต์ โคลนที่ต้องการสูงมากขึ้น เมื่อนำมาสร้างเป็นเซลล์ไฮบริโดมา ช่วยให้สามารถคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้ง่ายขึ้น (de Almeida *et al.* 2018) แต่วิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัด แอนติเจนที่ใช้เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะส่วนใหญ่เป็นแฮปเทน (hapten) และปัญหาเรื่องห้องปฏิบัติการที่ต้องสามารถดำเนินการเพาะเลี้ยงหนูทดลองได้ ยังมีแนวทางอื่น ๆ ที่ช่วยให้มีโอกาสกระตุ้นให้เกิดบี-ลิมโฟไซต์ โคลนที่จำเพาะมากขึ้น โดยการใช้แอนติเจนที่มีความจำเพาะสูง หรือสกัดเอาเฉพาะส่วนของแอนติเจนที่จำเพาะมาใช้สามารถช่วยกระตุ้นให้เกิดบี-ลิมโฟไซต์ โคลนที่ต้องการได้มากขึ้น (Zimmermann *et al.* 2019) นอกจากนี้การนำสปีโนไซต์จากหนูดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงใน tissue culture flask โดยกระบวนการเลี้ยงเซลล์มีการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ใช้ฉีดหนูผสมลงไปเพื่อให้บี-ลิมโฟไซต์โคลนที่ต้องการเพิ่มจำนวนมากขึ้นก่อนที่นำไปหลอมรวมกับเซลล์ไฮบริโดมา (Siraganian *et al.* 1983) ช่วยเพิ่มโอกาสให้สร้างเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการมากขึ้น การเลี้ยงเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งแหลว ซึ่งใช้สารเมทิลเซลลูโลส เป็นสื่อให้เกิดความหนืดเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยให้โอกาสการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการทำได้ง่ายมากขึ้น โดยอาหาร HAT ที่เตรียมอยู่ในสื่อกึ่งแข็งกึ่งแหลวช่วยให้เซลล์เจริญขึ้นมาเป็นกลุ่มโคโลนีแบบ 3 มิติ จึงทำการคัดเลือกได้ง่ายขึ้น (Lou *et al.* 2009) ปัจจุบันมีชุดอาหารสำเร็จรูปสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจำหน่าย ชุดอาหารสำเร็จรูปช่วยให้การผลิตและคัดเลือกไฮบริโดมา โดยอาศัยหลักการการเจริญของเซลล์เป็น 3 มิติ (3D) ในตัวอย่างอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Stemcell 2009, Wilson *et al.* 2016) อย่างไรก็ตามปัจจุบันชุดอาหารสำเร็จรูปยังคงมีราคาที่สูงมาก หากมีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้เอง ช่วยทำให้ต้นทุนในกระบวนการสร้างไฮบริโดมาราคาถูกลงได้

การผลิตแอนติบอดีต่อ *Salmonella enterica*

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยการปนเปื้อนของ *S. enterica* เป็นแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่สำคัญสองส่วน คือ 1) ลิโพโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ของ *S. enterica* ซึ่งเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค (virulence factor) ของเชื้อ และบริเวณดังกล่าวยังเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละซีโรวาร์ สามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้ แอนติเจนในส่วนนี้เรียกว่า O: แอนติเจน แอนติบอดีต่อส่วน O: แอนติเจนช่วยในการจำแนก *S. enterica* 2) แฟลกเจลลา (flagella) เป็นรยางค์ ลักษณะคล้ายขน ยื่นออกมานอกผนังเซลล์โดยมีจุดตั้งต้นจากเบซัลบอดี (basal body) ที่อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ในไซโทพลาสซึม แฟลกเจลลาเป็นอวัยวะที่ *S. enterica* ใช้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณเซลล์เป้าหมาย และจัดเป็นแอนติเจนที่มีความหลากหลายใน *S. enterica* สามารถใช้เป็นแอนติเจนที่จัดจำแนก *S. enterica* ออกเป็นซีโรวาร์ต่าง ๆ

แอนติบอดีที่ผลิตใช้เป็นการค้าในปัจจุบันผลิตโดยการเตรียมแอนติเจน (whole cell) จากเชื้อ *S. enterica* แล้วฉีดเข้าในสัตว์ทดลอง ซึ่งนิยมใช้กระต่าย (Schlecht&Westphal 1968, Ibebuike *et al.* 2008, Schrader *et al.* 2008) จากนั้นเก็บเลือดจากกระต่ายทั้งตัวเพื่อแยกซีรัมที่ประกอบด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ ซึ่งเป็น polyclonal antibody ต่อแอนติเจนที่หลากหลายของ *S. enterica* นำไปแยกแอนติบอดีต่อแอนติเจนอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการวิธีดูดซับกับแอนติเจน โดยเติมแอนติเจนต่อแอนติบอดีที่ต้องการแยกออกลงไปนำไปปั่นตกตะกอน แอนติบอดีที่ไม่ต้องการจะถูกแยกออกไปคงเหลือแต่แอนติบอดีที่ต้องการ แล้วนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี chromatography แอนติบอดีที่ได้จัดเป็นโพลิโคลนอลแอนติบอดี มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ (titer) จากการฉีดกระตุ้นโดยวิธีนี้ค่อนข้างต่ำ แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะ (specificity) ต่ำ การผลิตแต่ละครั้งได้ผลไม่คงที่ นอกจากนี้กระบวนการผลิตต้องใช้กระต่ายจำนวนมากเพื่อการผลิตแอนติบอดี ทำให้ต้องมีพื้นที่สำหรับการเลี้ยงสัตว์เป็นต้นทุนการผลิตที่สูง แอนติบอดีมีราคาสูง

ดังนั้นถ้าใช้แนวทางการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ *S. enterica* ช่วยลดข้อจำกัดจากการต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากลงได้ อย่างไรก็ตามการใช้ whole cell เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นในหนูทดลอง อาจทำให้ได้บี-ลิมโฟไซต์โคลนที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อ *S. enterica* มากเกินไป และอาจทำให้การคัดเลือกโคลนที่ต้องการ โดยเฉพาะโคลนที่จำเพาะต่อ O และ H แอนติเจนทำได้ยาก โดยเหตุนี้หากใช้แนวทางการสกัดแยกส่วนประกอบของเซลล์ ได้แก่ ลิโพโพลิแซคคาไรด์และแฟลกเจลลา คาดว่าทำให้ได้บี-ลิมโฟไซต์โคลนที่จำเพาะจำนวนมากขึ้น โดยการศึกษานี้ได้ศึกษาเริ่มต้นในเชื้อ *S.* Typhimurium ซึ่งจัดอยู่ในกรุ๊ป B ประกอบด้วยแอนติเจน คือ O:1, 4, 5, 12 และ H แอนติเจน คือ i, 1,2 และ *S.* Weltevreden ซึ่งจัดอยู่ในกรุ๊ป E ประกอบด้วยแอนติเจน คือ O:3, 10, 15 และ H แอนติเจน คือ r, z_6 เป็นโมเดลต้นแบบสำหรับการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. enterica*

แม้ว่าปัจจุบันมีรายงานการสร้างที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. enterica* ซีโรวาร์ต่าง ๆ จำนวนมาก (Schneid *et al.* 2005, Rementeria *et al.* 2009, Nalbantsoy *et al.* 2010) แต่ส่วนใหญ่เป็นการพัฒนาเพื่อใช้งานเองเป็นหลัก (in house) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พัฒนาส่วนใหญ่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่จำกัดเฉพาะแอนติเจนบางชนิด นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

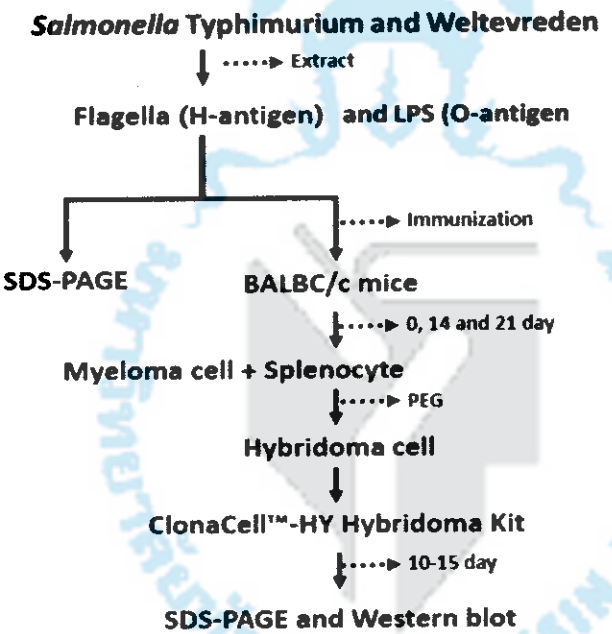
ที่จำหน่ายทางการค้า ก็จำกัดเฉพาะแอนติเจนเฉพาะบางซีโรวาร์ เพื่อใช้สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น immunofluorescence และ ELISA ซึ่งแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบางชนิดของเชื้อ ไม่เพียงพอที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกเชื้อได้ ในการศึกษานี้เป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella enterica* ซีโรวาร์ต่าง ๆ ต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วน คือ

1. การสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อแอนติเจน O และ H ของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden

เริ่มจากการสกัดส่วนลิโพโพลิแซคคาไรด์และแฟลกแจลลาจากเชื้อ *S. enterica* ทั้งสองซีโรวาร์ นำแอนติเจนมาเตรียมผสมกับ complete freund's adjuvant สำหรับฉีดในหนู (BALB/c) โดยทำการฉีดจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างม้ามของหนูแยกเอาส่วนของสปีโนไซต์มาหลอมรวมกับเซลล์มายอิโลมา ด้วย polyethylene glycol หลังจากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้อาหารชนิดพิเศษ (ClonaCell™-HY Hybridoma Kit) เซลล์ไฮบริโดมาทุกโคลนที่ได้นำมาคัดเลือกหาโคลนที่สร้างแอนติบอดีโดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับแอนติเจนของเชื้อโดยวิธี western blot hybridization (รูปที่ 3) ทุกโคลนที่ให้ผลบวกจะนำมาเพิ่มจำนวน และเก็บรักษาไว้ใน -80 °C และใน liquid nitrogen

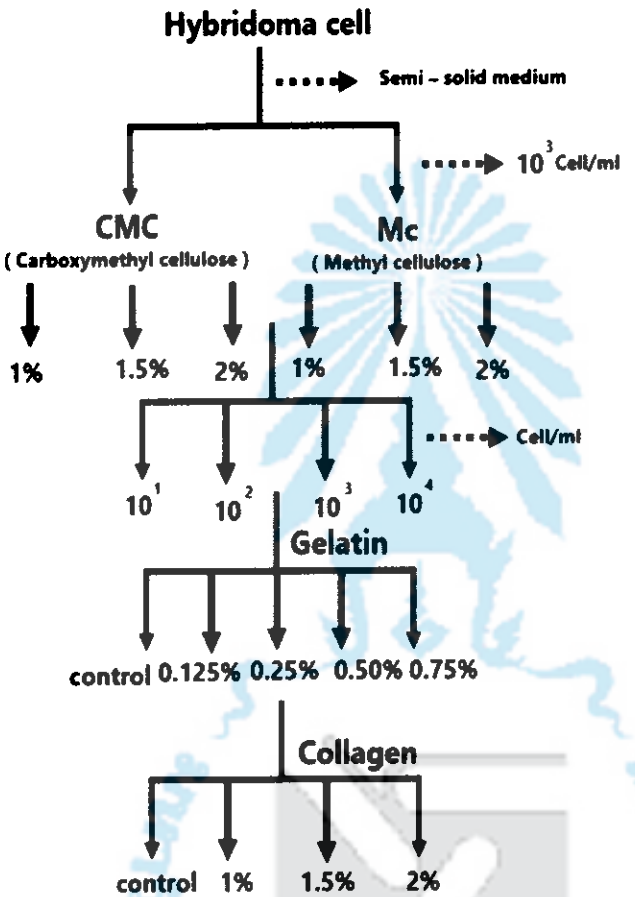


รูปที่ 3 แผนผังการดำเนินการวิจัยในส่วนที่ 1

2. การทดสอบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งแหลวที่เหมาะสมสำหรับการเจริญในรูป 3 มิติของเซลล์ไฮบริโดมา

การศึกษานี้ได้ดำเนินการทดลองโดยใช้สารต่าง ๆ ที่ให้ความหนืดนำมาเป็นส่วนประกอบเพื่อใช้สำหรับการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญขึ้นมาเป็นโคโลนีแบบ 3 มิติ โดยศึกษาสัดส่วนของสาร

ให้ความหนืดที่เหมาะสม ได้แก่ เมทิลเซลลูโลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เจลลาติน คอลลาเจน ที่เหมาะสม ในอาหาร HAT ที่เสริมด้วย 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แผนผังการดำเนินการวิจัยในส่วนที่ 2

บทที่ 3 การสร้างเซลล์ไฮบริโดมาและการคัดเลือกโคลน

วิธีการทดลอง

การเตรียมหนูทดลอง

หนูทดลองที่ใช้ในการศึกษาใช้หนู mice สายพันธุ์ BALB/cAJcl (จากบริษัทโนมุระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล LOT: 3-33) การศึกษานี้ใช้หนูทดลองประมาณ 10 ตัว อายุประมาณ 4-6 สัปดาห์

การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา

ใช้เซลล์มะเร็งมัยอิโลมา Sp2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581™) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งมัยอิโลมาจากหนู *Mus musculus* นำมาปั่นล้าง 1500 RPM เป็นเวลา 7 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 5 mL ย้ายลงใน cell culture flask บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) เลี้ยงเพิ่มจำนวนและเก็บเข้า -80 °C

การสกัด cell wall (lipopolysaccharides)

ทำโดยใช้ชุดสกัด LPS Extraction Kit (iNTRON BIOTECHNOLOGY CO., LTD) มีรายละเอียดดังนี้ นำเชื้อ *Salmonella* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) อายุ 18-24 ชั่วโมง ปริมาตร 50 mL นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 RPM ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป จากนั้นเติม lysis buffer 2 mL ลงในส่วนตะกอนของเซลล์ นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex จนไม่พบเห็นตะกอนของเซลล์ เติม chloroform 200 µL ลงไป และนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 30 วินาที แล้วนำไป incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นนำ ไปปั่นแยกชั้นโปรตีนที่ความเร็ว 13,000 RPM ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant) ทั้งหมด แยกใส่ลงในหลอด micro centrifuge tube 1.5 mL หลอดละ 400 µL เติม purification buffer หลอดละ 800 µL แล้วนำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็น -80 °C นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 RPM ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนที่ได้มาปั่นล้างด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 1 mL หลังจากปั่นล้าง เทส่วนเอทานอลทิ้งไป นำหลอดไปทำให้แห้งสนิท โดยใช้ vacuum desiccator หลังจากนั้นเติม Tris-HCL buffer pH8 ปริมาตร 200 µL นำไปแช่ใน ultrasonic bath ประมาณ 1 ชั่วโมง ตัวอย่าง LPS ที่ได้ นำไปตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ LPS มาตรฐาน (sigma) ตัวอย่างที่เตรียมได้จะเก็บไว้ที่ -20 จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

การเตรียมแฟลกเจลลาแอนติเจน (Nalbantsoy *et al.* 2010)

เลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร semi-solid beef extract agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อ *Salmonella* สร้างแฟลกเจลลา จากนั้นเก็บเชื้อใส่ลงใน 0.85 % normal saline ปริมาตร 5 mL นำมาปั่นล้างที่ 13,000 RPM ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 40 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติม 0.85 % normal saline ปริมาตร 5 mL และเติม glass beads ขนาดเล็กลงไปพอประมาณ นำเชื้อไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 4,000 RPM ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 40 นาที แยกเก็บส่วนใส นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 RPM ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 40 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วเติม 0.85% normal saline ปริมาตร 500 µL นำไปตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีน flagellin มาตรฐาน (sigma) ของ *S.* Typhimurium ตัวอย่างที่เตรียมได้จะเก็บไว้ที่ -20 จนกว่าจะนำมาใช้

วัดความเข้มข้นของแอนติเจน

เตรียมโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน (albumin) 0.01 % เจือจางในน้ำกลั่น 1:100 และปรับความเข้มข้นที่ต้องการ ปิเปตมา 800 µL ผสมกับ bio rad protein assay dye reagent concentrate 200 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595} ด้วย Spectrophotometer เตรียมโปรตีนตัวอย่างและปิเปตโปรตีนมา 800 µL ผสมกับ bio rad protein assay dye reagent concentrate 200 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595} ด้วย spectrophotometer และเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจสอบโปรตีนโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE)

ทำความสะอาดแผ่นกระจก (glass plates) ที่วาง (casting stand) กรอบวาง (casting frames) ให้สะอาดและแห้งก่อนทำการประกบแผ่นกระจก ประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้บน spacer plate นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่น วางลงใน casting frame โดยวางแผ่นสั้น (short plate) ไว้ด้านหน้า casting frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อย ๆ กดล็อคด้วย pressure cams เช็คการรั่วของแผ่นกระจก โดยการใช้น้ำกลั่นทดสอบการรั่วของแผ่นกระจกทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ดูดสารละลายเตรียม polyacrylamide gel ส่วน separating gel ลงในบีกเกอร์ ซึ่งประกอบด้วย distilled water, 1.5 M tris HCl pH 8.8, 10 % SDS, 30 % acrylamide-bis เติม 10 % ammonium persulfate และ TEMED จากนั้นเติม ammonium persulfate และ TEMED ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ปิเปตสารละลายใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จนกระทั่งมีความสูงเท่ากับระยะที่มีเครื่องหมายไว้สำหรับส่วน separating gel เติมน้ำกลั่น (distilled water) เบา ๆ บนผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ปิดผิวหน้าของเจลทิ้ง ปิเปตสารละลายเตรียม polyacrylamide gel ส่วน stacking gel ลงในบีกเกอร์ ซึ่งประกอบด้วย distilled water, 0.5 M tris HCl pH 6.8, 10 % SDS, 30 % acrylamide-bis เติม 10 % ammonium persulfate และ TEMED หลังจากใส่ polyacrylamide gel ส่วน stacking gel ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกจนกระทั่งท่วมฟัน

ของ comb วาง comb อย่าให้มีฟองอากาศ และตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (polymerize) ประมาณ 30-45 นาที จากนั้นทำไปต่อกับ chamber และเติม running buffer การเตรียมสารละลาย standard proteins และสารละลายตัวอย่างโดยใส่ sample buffer นำไป heat ที่ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายประมาณ 5 µL หยอดลงใน sample well ที่มี running buffer ท่วมอยู่ เปิดเครื่อง power supply กำหนดกระแสไฟฟ้าที่ 200 V, 120 mA ต่อ 2 เจล นาน 2 ชั่วโมง เมื่อกระบวนการแยกเสร็จ นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกใช้ plastic gel releaser ช่วยในการแยกแผ่นกระจกสองแผ่นออกจากกัน ตัดส่วน stacking gel ทิ้งไป นำส่วน separating gel ไปตรึง (fixing) และย้อมสีด้วยสีย้อม coomassie blue R-250 นาน 30 นาที ล้างสีย้อมด้วย destaining reagent

การ immunization หนูทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้หนูสายพันธุ์ BALB/cAJcl mice เพศผู้ อายุประมาณ 8 สัปดาห์ ใช้หนูกลุ่มละ 3 ตัว สำหรับการฉีดด้วยแอนติเจนแต่ละชนิด (ตารางที่ 2) ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดในหนูทดลองคือ 20 µg/200 µL ก่อนการฉีดกระตุ้นจะเก็บตัวอย่างเลือดจากหนูทุกตัวเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมในการทดสอบการสร้างแอนติบอดี หลังจากการฉีดกระตุ้น (boost) ในครั้งที่ 3 จะเก็บตัวอย่างเลือดจากหนูในทุกตัวเพื่อตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีโดยวิธีการ Western blot และเก็บตัวอย่างสปีโนไซต์ในวันที่ 30

ตารางที่ 2 การฉีด O และ H แอนติเจน ของ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden ในหนูทดลอง

กลุ่มที่ (3 ตัว/กลุ่ม)	ครั้งที่ 1 Day 0 (subcutaneous injection)	ครั้งที่ 2 Day 14 (subcutaneous injection)	ครั้งที่ 3 Day 21 (intraperitoneal injection)
1	LPS antigen from *S.* Typhimurium with Freund's complete adjuvant	LPS antigen from *S.* Typhimurium with Freund's incomplete adjuvant	LPS antigen from *S.* Typhimurium with Freund's incomplete adjuvant
2	LPS antigen from *S.* Weltevreden with Freund's complete adjuvant	LPS antigen from *S.* Weltevreden with Freund's incomplete adjuvant	LPS antigen from *S.* Weltevreden with Freund's incomplete adjuvant
3	flagellin (Phase 1+2) antigen from *S.* Typhimurium with Freund's complete adjuvant	flagellin (Phase 1+2) antigen from *S.* Typhimurium with Freund's incomplete adjuvant	flagellin (Phase 1+2) antigen from *S.* Typhimurium with Freund's incomplete adjuvant
4	flagellin (Phase 1+2) antigen from *S.* Weltevreden with Freund's complete adjuvant	flagellin (Phase 1+2) antigen from *S.* Weltevreden with Freund's incomplete adjuvant	flagellin (Phase 1+2) antigen from *S.* Weltevreden with Freund's incomplete adjuvant

การเตรียมสปีโนไซต์ splenocytes

เตรียมสปีโนไซตจากหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนครบทั้ง 3 ครั้ง โดยทำการ sacrificed หนู โดยใช้ยาสลบ (thiopental) ในขนาด over dose จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องเก็บม้ามของหนูนำมาทำให้ม้ามแตก กรองผ่าน straner 70 µm เพื่อแยกเก็บ splenocytes ของหนูแต่ละตัว และปั่นล้าง

1500 RPM เป็นเวลา 7 นาที 3 ครั้ง และนับสปีโนโซต์ ด้วย hemocytometer ให้ได้เซลล์ประมาณ 10^8 cell/mL เก็บไว้ที่ตู้ CO_2 incubator เพื่อรอการทำหลอมรวม (fusion) กับเซลล์มัยอิโลมา

การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา

เตรียมเซลล์มัยอิโลมา Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581; LOT: 62129996) โดยนำมาเลี้ยงใน medium A บ่ม 37 °C 24 - 48 ชั่วโมง โดยเก็บเซลล์ที่เลี้ยงนำมาปั่นล้าง 1500 RPM เป็นเวลา 7 นาที เติม medium B 5 ml และนับเซลล์ด้วย hemocytometer ให้ได้ประมาณ $2x10^7$ cell/mL เก็บไว้ที่ตู้ CO_2 Incubator เพื่อรอการนำไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา

การสร้างเซลล์ไฮบริโดมาโดยชุด ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (StemcellTM technologies, Canada)

การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) โดยนำเซลล์มัยอิโลมาประมาณ $2x10^7$ cell/mL ใส่รวมกับสปีโนไซต์ 10^8 cell/mL ทำการหลอมรวมเซลล์ โดยใช้สาร polyethylene glycol (PEG) (เติมลงไปในหลอดช้า ๆ โดยเคาะก้นหลอดเบา ๆ ตลอดเวลา) บ่มอุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังจากนั้นปั่น 1,500 RPM เป็นเวลา 7 นาที เพื่อล้าง PEG ออกจากเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ทำหลอมรวมแล้วไป บ่มใน medium C อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงใน medium D บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10-15 วัน ใน CO_2 incubator จากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญเป็นโคโลนีใน medium D แยกเลี้ยงใน medium E 96 well plate บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-5 วัน และตรวจสอบการสร้างแอนตีบอดีของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี Western blot

การคัดเลือกโคลนไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot

นำตัวอย่างโปรตีนซึ่งได้จากการสกัดแยกส่วนแอนติเจน O และ H ของเชื้อ *Salmonella* มาแยกโปรตีนแต่ละชนิด ตามขนาดด้วย 10 % SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนด้วยเครื่อง trans blot ใน 1X towbin buffer โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน blockig buffer 5 % ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายลงในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน (น้ำเลี้ยงเซลล์) ที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละโคลน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 7 นาที นำมาใส่ใน hybridization bag จากนั้นเติม conjugate antibody (Horseradish Peroxidase-Conjugates Goat Anti Mouse IgG: Biocompare) ซึ่งเจือจางด้วย blockig buffer 5 % (1 : 1000) บ่มนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้ว ล้างออกด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงใน สารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine (DAB) (Thermofisher Scientific: USA) ที่เจือจางใน stable peroxide substrate buffer (Thermofisher Scientific: USA) จนกระทั่งเห็นแถบสีเกิดขึ้น แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* และเก็บเข้าตู้ -80 °C

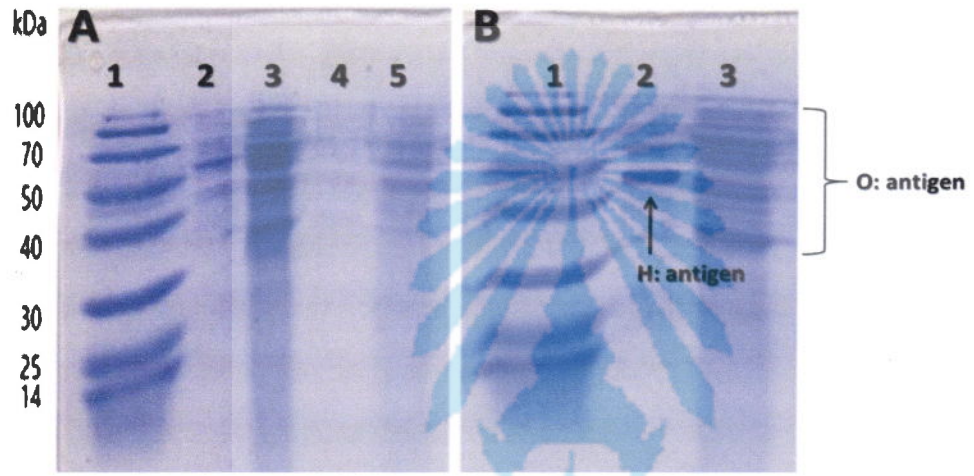
การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำตัวอย่างโปรตีนซึ่งได้จากการสกัดแยกส่วนของ O และ H แอนติเจนของเชื้อ *S.* Typhimurium, แฟลกเจลลาของ *S.* Weltevreden และ O และ ของ *E.coli* มาแยกโปรตีนแต่ละชนิดตามขนาดด้วย วิธี SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยเครื่อง mini Trans blot Electrophoretic transfer cell (Bio-rad) ใน 1X towbin buffer โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน blockig buffer 5 % ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายลงในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน (น้ำเลี้ยงเซลล์) ที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละโคลน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 7 นาที นำมาใส่ใน hybridization bag จากนั้นเติม conjugate antibody (Horseradish Peroxidase-Conjugates Goat Anti Mouse IgG: Biocompare) ซึ่งเจือจางด้วย blockig buffer 5 % (1 : 1000) บ่มนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้ว ล้างออกด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงใน สารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine (DAB) (Thermofisher Scientific: USA) ที่เจือจางใน stable peroxide substrate buffer (Thermofisher Scientific: USA) จนกระทั่งเห็นแถบสีเกิดขึ้น แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* และเก็บเข้าตู้ -80 ℃

ผลการทดลอง

การเตรียม O และ H แอนติเจน

นำ O และ H แอนติเจนของ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden ที่สกัดได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) โดยแฟลกเจลลาที่สกัดได้มีขนาดโปรตีนประมาณ 50 kDa ในขณะที่ O แอนติเจนประกอบด้วยแถบแอนติเจนมากกว่า 1 แถบ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลการทดสอบการสกัดแยก O และ H แอนติเจน จากเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden

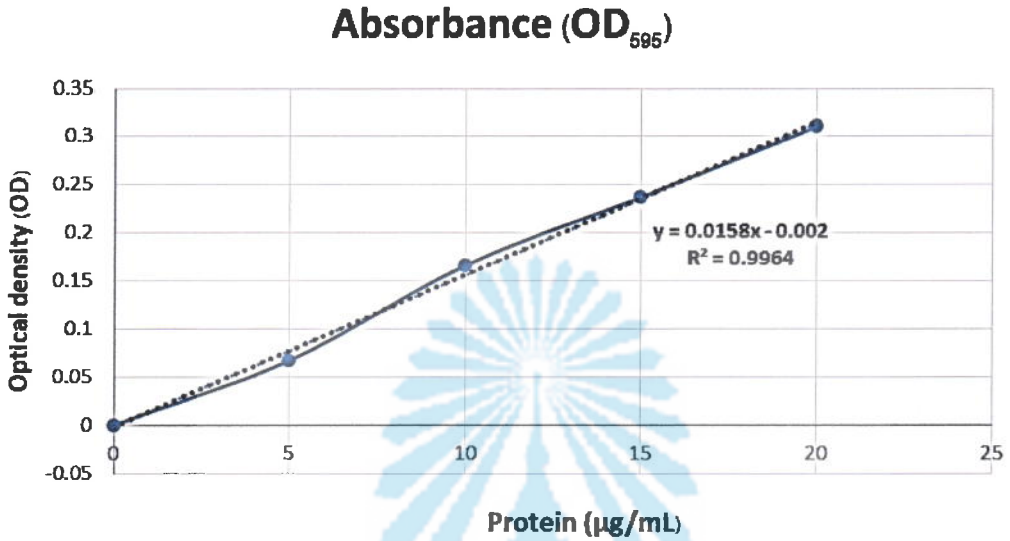
A) Lane 1. Standard protein marker
Lane 2. H: antigen from *S.* Typhimurium
Lane 3 O: antigen from *S.* Typhimurium
Lane 4. H: antigen from *S.* Weltevreden
Lane 5 O: antigen from *S.* Weltevreden

B) Lane 1. Standard protein marker
Lane 2. Standard H: antigen from *Salmonella*
Lane 3 Standard O: antigen from *Salmonella*

ความเข้มข้นของแอนติเจน

เพื่อให้ทราบปริมาณของแอนติเจนที่ใช้สำหรับการฉีดกระตุ้นในหนูทดลอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวัดปริมาณของแอนติเจน ซึ่งดำเนินการโดยใช้การวัดโปรตีน เริ่มต้นด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียมโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน 0.01 % เจือจาง 1: 100 ในน้ำกลั่น และปรับความเข้มข้นที่ต้องการปิเปตมา 800 µL ผสมกับ bio rad protein assay dye reagent concentrate 200 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595} ด้วย Spectrophotometer จากนั้นใช้ตัวอย่างแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ โดยปิเปตมา 800 µL ผสมกับ bio rad protein assay dye reagent concentrate 200 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595} ด้วย spectrophotometer และ

เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 6) ผลการทดสอบปริมาณของแอนติเจนที่สกัดได้จากตัวอย่างเชื้อแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานใช้สำหรับคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD_{595}

ตารางที่ 3 ปริมาณแอนติเจนที่สกัดได้จากตัวอย่างเชื้อ

ชนิดของโปรตีน (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD_{595}	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg /mL)
Protein standard 5 µg/mL	0.067	5
Protein standard 10 µg/mL	0.166	10
Protein standard 15 µg/mL	0.237	15
Protein standard 20 µg/mL	0.310	20
H-antigen *Salmonella* Typhimurium	0.297	18.80
H-antigen *Salmonella* Weltreveden	0.302	19.13
O-antigen *Salmonella* Typhimurium	0.492	31.14
O-antigen *Salmonella* Weltreveden	0.522	33.05

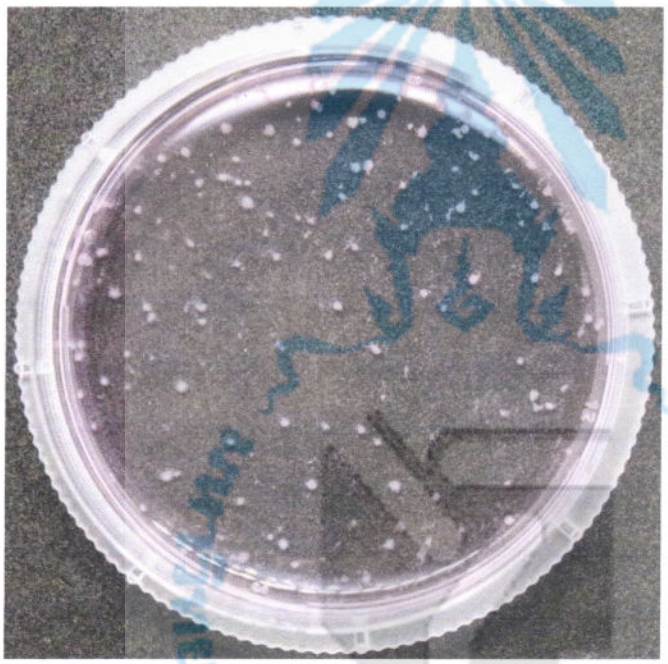
การคัดเลือกโคลนโดยชุด ClonaCell™-HY Hybridoma kit

หลังจากฉีดกระตุ้นหนูทดลองครบ 3 ครั้ง sacrificed หนู โดยใช้ยาสลบในขนาด over dose จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องเก็บสปีนโนไซต์ของหนูนับเซลล์สปีนโนไซต์และมัยอีโลมาด้วย hemocytometer จากนั้นนำมัยอีโลมาและสปีนโนไซต์หลอมรวมด้วย PEG (polyethylene glycol) ในอัตราส่วน 1 : 5 โดยใช้ชุด ClonaCell™-HY Hybridoma Kit จากนั้นย้ายลงในจานอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish) นำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 10-15 วัน พบว่าได้สามารถสร้างเซลล์ไฮบริโดมาโคลนต่อ O และ H แอนติเจน ซึ่งเจริญเป็นโคโลนีดังแสดงรูปที่ 7

การคัดเลือกโคลนไฮบริโดมา และการทดสอบปฏิกิริยา cross reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี western blot

การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี Western blot โดยนำ O และ H แอนติเจน ของ *Salmonella* มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) แล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ จากโคลนที่ต้องการทดสอบ พบว่ามีไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ O และ H แอนติเจน ของ *Salmonella* แสดงดังตารางที่ 4 (รูปที่ 8 A)

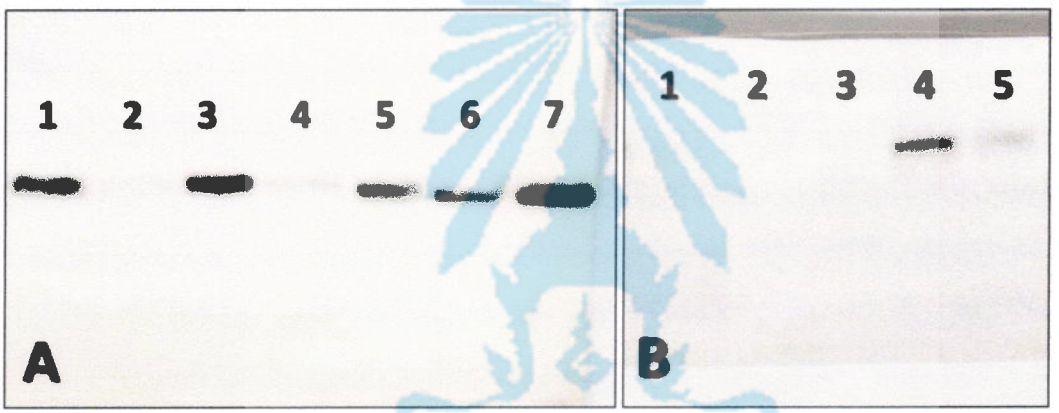
การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ O และ H แอนติเจน ของ *E. coli* ด้วยวิธี western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับเฉพาะแอนติเจนของ *Salmonella* เท่านั้นไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนของ *E. coli* และแอนติเจน H ของ *S.* Weltevreden (รูปที่ 8 B)



รูปที่ 7 ลักษณะของโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (ClonaCell™-HY Hybridoma Kit)

ตารางที่ 4 ผลการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญเป็นโคโลนี้ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ClonaCell™-HY Hybridoma Kit

Hybridoma clone NO.	Positive clone	total
H: antigen of *S.* Typhimurium	1	107
O: antigen of *S.* Typhimurium	6	159
H: antigen of *S.* Weltevreden	0	102
O: antigen of *S.* Weltevreden	0	96



รูปที่ 8 ผลการทดสอบเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่สร้างแอนติบอดี และผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี western blotting

A) ผลการการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ไฮบริโดมาต่อแอนติเจน H ของเชื้อ *S.* Typhimurium ทั้ง 6 โคลนที่ให้ผลบวก

Lane ที่ 1 – 6 โคลนที่ให้ผลบวก

Lane ที่ 7 โปรตีน flagellin มาตรฐาน (sigma) ของ *S.* Typhimurium

B) ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา (น้ำเลี้ยงเซลล์จากโคลนที่ 3 ในรูป 8A) ทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจน H ของ *E. coli*, และ *S.* Weltevreden

Lane ที่ 1 แอนติเจน H ของเชื้อ E. coli

Lane ที่ 2-3 แอนติเจน H ของเชื้อ *S.* Weltevreden

Lane ที่ 4 แ แอนติเจน H ของเชื้อ *S.* Typhimurium

Lane ที่ 5 โปรตีน flagellin มาตรฐาน (sigma) ของ *S.* Typhimurium

บทที่ 4 การทดสอบสูตรอาหารกึ่งแข็งก่งเหลวที่เหมาะสมสำหรับการเจริญในรูแบบ 3 มิติ

เซลล์ไฮบริโดมา

ใช้เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการทดลองที่ 1 (โคลนที่จำเพาะต่อแอนติเจน H ของ S. Typhimurium)

การเปรียบเทียบการเจริญเป็นโคโลนีในสารให้ความหนืดที่ต่างกัน

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 ชุดการทดลอง โดยชุดแรกประกอบด้วยเมธิลเซลลูโลส (Sigma, USA) 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 1.5 และ 2 % ผสมกับ 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Bio basic inc, Canada), ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin (Bio basic inc, Canada) ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL ในอาหาร DMEM (Gibco, USA) และชุดที่ 2 ประกอบด้วยคาร์บอกซิลเมธิลเซลลูโลส (Himedia, India) 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 1.5 และ 2 % ผสมกับ 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL ในอาหาร DMEM จากนั้นเติมเซลล์ไฮบริโดมาปริมาณ 10^3 cell/mL นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ โดยปรับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เป็นเวลา 10 -15 วัน เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละชุดการทดลอง

การศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับอาหารทดสอบ

นับเซลล์ด้วย hemocytometer เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเมธิลเซลลูโลส 1.5 %, 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลองควบคุมปริมาณของเซลล์ต่อจานอาหารเลี้ยงเซลล์ (45 mm^3) เป็น 10^1, 10^2, 10^3 และ 10^4 cell/mL นำไปบ่ม 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 10 -15 วัน

ความเข้มข้นของเจลาตินและคอลลาเจนที่มีผลต่อการเจริญเป็น 3 มิติ

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 4 ชุดการทดลอง โดยผสม 0.125, 0.25, 0.50 และ 0.75 % เจลลาติน (food grade) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเมธิลเซลลูโลส 1.5 %, 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL ในอาหาร DMEM จากนั้นเติมเซลล์ไฮบริโดมา 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 10 -15 วัน

สำหรับคอลลาเจนทำการทดสอบโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 4 ชุดการทดลอง โดยผสมคอลลาเจน (Himedia, india) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 1.75 % ในเจลลาติน 0.25 %, เมธิลเซลลูโลส 1.5 %, 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความ

เข้มข้น 100IU/100 µg/mL ในอาหาร DMEM ปริมาณของเซลล์ 10^2 cell/mL นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 -15 วัน

การเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป (ClonaCell™-HY Hybridoma Kit)

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์โดยมีผสมเจลลาติน 0.25 %, คอลลาเจน 1 %, 1.5% เมธิลเซลลูโลส 1.5 %, 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL ในอาหาร DMEM จากนั้นเติมเซลล์ไฮบริโดมา 10^2 cell/mL นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 10 -15 วัน เปรียบเทียบการเจริญกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (StemcellTM technologies, Canada) ใช้เซลล์ไฮบริโดมา 10^2 cell/mL นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ปรับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เป็นเวลา 10 -15 วัน

ผลการทดลอง

การเปรียบเทียบการเจริญเป็นโคโลนีในสารให้ความหนืดที่ต่างกัน

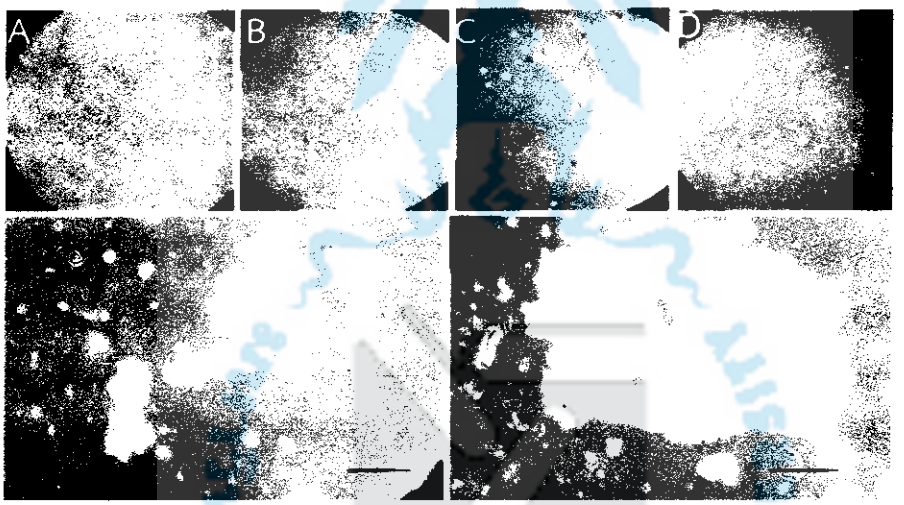
จากการทดลองพบว่าการผสมอาหารด้วยคาร์บอกซิลเมธิลเซลลูโลสที่ระดับความเข้มข้น 1 %, 1.5 % และ 2 % ในอาหาร DMEM ที่มี 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL ไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีแบบ 3 มิติได้ แต่การใช้เมธิลเซลลูโลลสที่ระดับความเข้มข้น 1.5 % กับ 2 % ในอาหาร DMEM ที่มี 10 % FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, ยาต้านจุลชีพ penicillins/treptomycin ความเข้มข้น 100IU/100 µg/mL สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในอาหารที่มี 1.5 และเมธิลเซลลูโลลส 2 % เจริญเป็นโคโลนีได้ แต่ก็พบว่าเซลล์เจริญอยู่เพียงในระนาบ 2 มิติ โดย โคโลนีแผ่ขยายออกด้านข้างและมีขนาดใหญ่ แต่ไม่เจริญและเซลล์ไม่เกาะกลุ่มเป็นลักษณะทรงกลมแบบ 3 มิติ จากการเจริญเป็นโคโลนีเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับพบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ประกอบด้วยเมธิลเซลลูโลส 1.5 % เซลล์ไฮบริโดมาสามารถเจริญเป็นโคโลนีที่ใหญ่กว่า มีขนาด 1.32 X 1.76 mm. ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเมธิลเซลลูโลลส 2 % เนื่องจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเมธิลเซลลูโลลส 2 % มีเซลล์บางส่วนของโคโลนีที่ตายไปทำให้มองเห็นลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีขนาดประมาณ 0.66 X 0.80 mm. (ตารางที่ 5 และรูปที่ 9)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดลองของอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร

สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์	ความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนี	ขนาดของเซลล์ (กว้าง x ยาว) mL
1 % CMC	ไม่พบโคโลนี	-
1.5 % CMC	ไม่พบโคโลนี	-
2 % CMC	ไม่พบโคโลนี	-
1 % MC	ไม่พบโคโลนี	-
1.5 % MC	เจริญเป็น 2 มิติ, โคโลนีใหญ่, ไม่กลม	1.32 X 1.76
2 % MC	เจริญเป็น 2 มิติ, และโคโลนีเล็ก,ไม่กลม	0.66 X 0.80

CMC= carboxylmethylcellulose

MC= Methylcellulose



รูปที่ 9 ลักษณะโคโลนีในอาหารแต่ละชนิด A คือ เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสม CMC ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายต่ำ B, C และ D คือ เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสม 1% , 1.5% และ 2% MC ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายสูง E และ F คือ ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสม 1.5% และ 2% MC ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา14 ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (scale bars 100 μm)

การศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับอาหารทดสอบ

จากการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 45 mm^3 พบว่าเซลล์เริ่มต้นที่ปริมาณ 10 cell/mL เกิดจำนวนโคโลนีน้อย โคโลนีมีขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ เมื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^3 cell/mL พบว่าจำนวนโคโลเพิ่มมากขึ้น และมากเกินไปจนไม่สามารถแยกโคโลนีได้ ซึ่งยากต่อการคัดแยกเป็น

โคโลนีเดียว จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 45 mm^3 คือ 10^2 cell/mL พบเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 170 โคโลนี ซึ่งทำให้ได้จำนวนโคโลนีที่เหมาะสมสามารถคัดแยกได้ง่าย ไม่แน่นจนเกินไป (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเซลล์

จำนวนเซลล์เริ่มต้น (cell/mL)	พบจำนวนโคโลนี			เฉลี่ย
	ชุดทดลองที่ 1	ชุดทดลองที่ 2	ชุดทดลองที่ 3	
10^1	18	23	27	23
10^2	156	182	171	170
10^3	> 300	> 300	> 300	-
10^4	ไม่สามารถนับได้	ไม่สามารถนับได้	ไม่สามารถนับได้	-

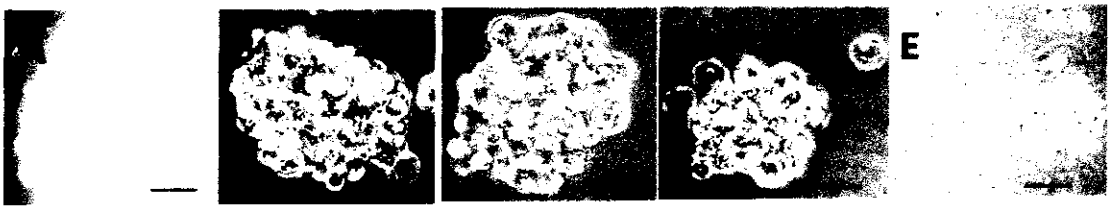
ความเข้มข้นของเจลาตินและคอลลาเจนที่มีผลต่อการเจริญเป็น 3 มิติ

การศึกษาความเข้มข้นของเจลาติน

เนื่องจากโคโลนีที่เกิดขึ้นเจริญเป็น 2 มิติ และไม่เป็นทรงกลม จึงใช้เจลลาตินเป็นตัวช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเป็น 3 มิติ โดยใช้ปริมาณของเจลลาติน 4 ความเข้มข้น คือ 0.125, 0.25, 0.50, และ 0.75 % พบว่าการใช้เจลลาติน 0.125 % ไม่เพียงพอที่ทำให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ และการใช้เจลลาติน 0.50 % ขึ้นไปมีผลทำให้เซลล์ตาย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลลาติน ที่ช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเป็นทรงกลม 3 มิติ คือ 0.25% แต่โคโลนีมีขนาดเล็ก มีขนาดประมาณ 0.11 X 0.15 mm มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 132 โคโลนี (ตารางที่ 7 และรูปที่ 10)

ตารางที่ 7 แสดงผลการใช้เจลาตินเพื่อให้เซลล์เจริญเป็น 3 มิติ

ความเข้มข้นของเจลาติน	จำนวนโคโลนี			จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	ขนาดโคโลนี (กว้าง X ยาว) mm.
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3		
ไม่เติมเจลาติน	133	126	139	133	0.71 X 0.94
0.125%	135	142	129	135	0.05 X 0.14
0.25%	126	132	138	132	0.11 X 0.15
0.50%	56	64	52	57	0.05 X 0.06
0.75%	16	22	19	19	0.02 X 0.02



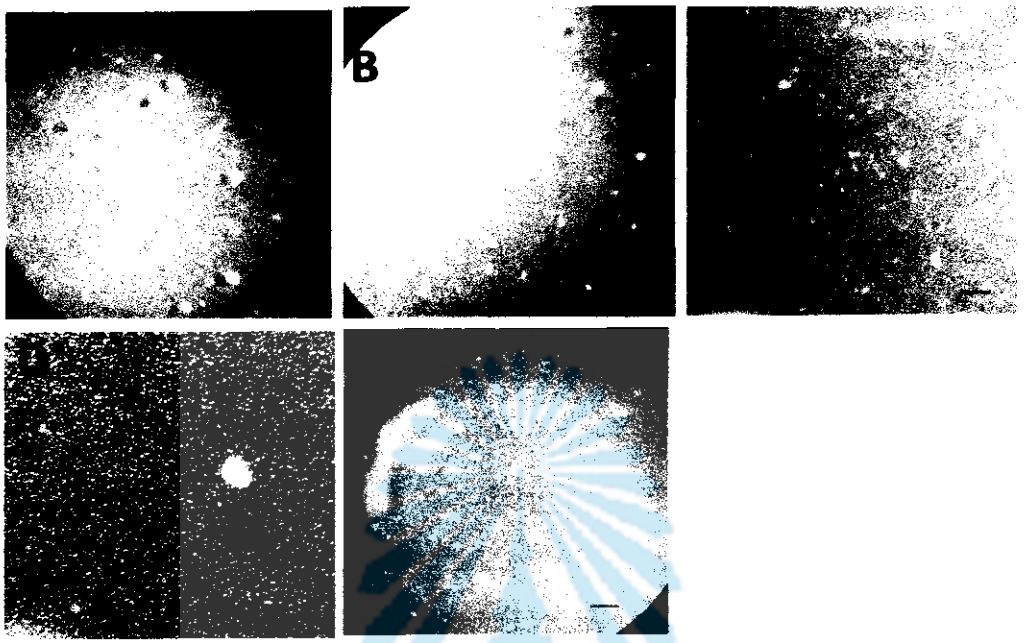
รูปที่ 10 แสดงลักษณะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญเป็น 3 มิติในอาหารที่มีส่วนประกอบของเจลลาตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ A-D คือ เซลล์ไฮบริโดมาในอาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.125%, 0.25% 0.50% และ 0.75% เจลลาติน ตามลำดับ E คือ ชุดควบคุมที่ไม่เติมเจลลาติน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (scale bars A-D: 50 μm, E: 100 μm)

การศึกษาความเข้มข้นของคอลลาเจน

จากการทดลองพบว่าการเติมคอลลาเจน สามารถช่วยกระตุ้นให้เซลล์เจริญดีขึ้น โดยใช้ปริมาณของคอลลาเจน 4 ความเข้มข้น คือ 0.5 %, 1 %, 1.5 % และ 2 % ช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ พบว่าการใช้ 0.5 % คอลลาเจน ไม่เพียงพอที่ทำให้เซลล์เจริญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และการใช้ คอลลาเจน 1.5 % ขึ้นไป มีผลทำให้เซลล์ตาย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลลาตินทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ดี ได้โคโลนีใหญ่ ทรงกลมและเป็น 3 มิติ คือ คอลลาเจน 1 % เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนี พบว่าการเติมคอลลาเจน 1 % ช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 205 โคโลนี มีขนาดประมาณ 0.76 X 0.80 mm. (ตารางที่ 8 และรูปที่ 11)

ตารางที่ 8 แสดงผลการใช้คอลลาเจนกระตุ้นการเจริญของเซลล์

ความเข้มข้นของคอลลาเจน	จำนวนโคโลนี			จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	ลักษณะโคโลนี	ขนาดของโคโลนี (กว้าง X ยาว) mm.
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3			
ไม่เติมคอลลาเจน	118	126	122	122	กลม ขนาดเล็ก	0.11 X 0.13
0.5%	166	156	169	164	กลม ขนาดกลาง	0.32 X 0.34
1%	211	205	198	205	กลม ขนาดใหญ่ เป็น 3 มิติ	0.76 X 0.80
1.5%	130	121	129	127	กลม ขนาดกลาง มีเซลล์ตาย	0.38 X 0.41
2%	86	70	77	78	กลม ขนาดเล็ก มีเซลล์ตาย จำนวนมาก	0.15 X 0.16



รูปที่11 แสดงลักษณะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของคอลลาเจน ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ A, B, C และ D คือ สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.5%, 1%, 1.5% และ 2% คอลลาเจน ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ส่วน E คือ สูตรอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีส่วนประกอบของคอลลาเจน (scale bars 1mm)

การเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป (ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (StemcellTM technologies, Canada))

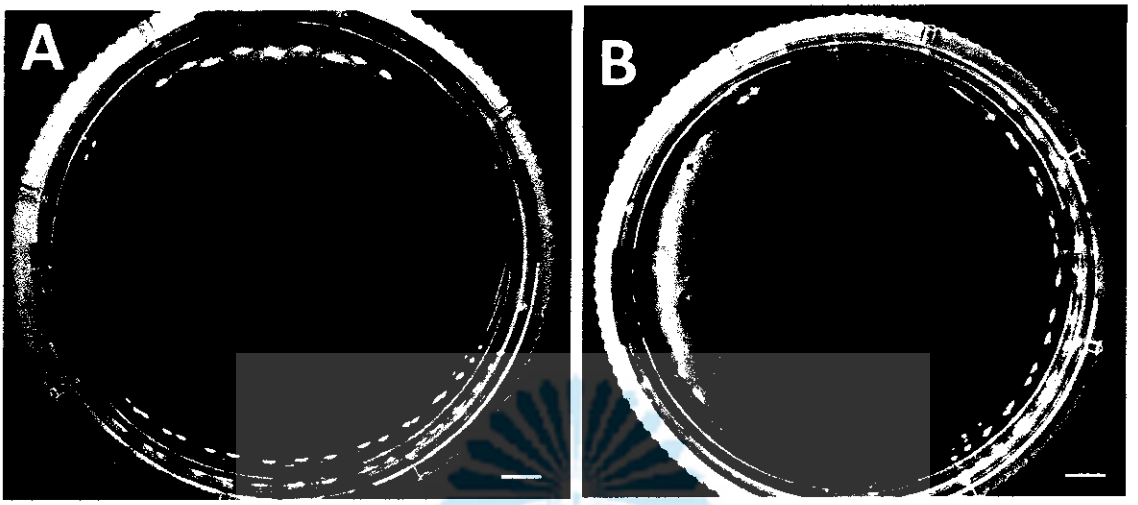
สูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนา ควบคุมปริมาณของเซลล์ที่ 10^2 cell/mL นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ปรับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% เป็นเวลา 14 วัน มีจำนวนเซลล์เฉลี่ย 197 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเซลล์ 45 mm^3 เซลล์มีขนาดประมาณ 0.62 X 0.70 mm. และอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปควบคุมปริมาณของเซลล์ที่ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 14 วัน พบ จำนวนเซลล์เฉลี่ย 206 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเซลล์ 45 mm^3 เซลล์มีขนาดประมาณ 0.81 X 0.88 mm.จากการทดลองพบว่า สูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 9 และรูปที่ 12)

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนากับอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป

ชุดทดลอง	จำนวนโคโลนี			จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	ขนาดโคโลนี (กว้าง X ยาว) mm.
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3		
A	187	208	197	197	0.62 X 0.70
B	196	217	206	206	0.81 X 0.88

A: สูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนา

B: อาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป



รูปที่ 12 เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนากับอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ A คือ ลักษณะของเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนา เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และ B คือ ลักษณะของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (scale bars 1 mm)

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองการสร้างเซลล์ไฮบริโดมา ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ แอนติเจน O และ H ของ *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden พบว่าการศึกษานี้สามารถสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน H ของเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ทั้งหมด 107 โคลน แต่เมื่อคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกต่อแอนติเจนด้วยวิธี Western blot พบเพียง 6 โคลน ที่จำเพาะต่อแอนติเจน H ของ *S.* Typhimurium ส่วนแอนติเจน O ของเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ทั้งหมด 159 โคลน แต่เมื่อคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกต่อแอนติเจนด้วยวิธี Western blot พบเพียง 1 โคลนเท่านั้นที่ให้ผลบวก สำหรับกรณีของเชื้อ *S.* Weltevreden แม้ว่าสามารถสร้างเซลล์ไฮบริโดมาได้หลายโคลน แต่ในการทดสอบไม่พบโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการ (ตารางที่ 4) ทั้งนี้เป็นเพราะมีจานอาหารเลี้ยงเซลล์บางส่วนในการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาของเชื้อ S. Weltevreden มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย ทำให้มีเซลล์บางส่วนสูญเสียไปและไม่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้ นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าแอนติเจน O ของเชื้อ *Salmonella* มีจำนวนแอนติเจนรวมทั้งบริเวณ epitope ที่มากกว่าในแอนติเจน H มาก รวมทั้งกระบวนการสกัดอาจได้ outer memebrane protein (OMP) อื่น ๆ ปนมาในการสกัด ซึ่งโปรตีนที่ปะปนมาเป็น strong epitope และมีความทนมากกว่าส่วน LPS (Jaradat&Zawistowski 1998) ดังนั้น จึงกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ได้ดีกว่า กรณีดังกล่าวพบได้ในการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่นกัน (Bowden *et al.* 1995, Hellman *et al.* 1997)

การตรวจสอบโคลนที่ได้ให้ผลบวกที่ชัดเจนต่อแอนติเจน H ของเชื้อ *S.* Typhimurium โดยเฉพาะโคลนที่ 3 ให้ผลบวกชัดเจนที่สุด (รูปที่ 8) ในขณะที่โคลนที่ 2 ให้ผลบวกไม่ชัดเจน การได้โคลนที่สร้างแอนติบอดีตต่อแอนติเจน H อาจเนื่องจากคุณสมบัติของแอนติเจนที่แรง และกระบวนการสกัดแฟลกเจลลาโดยนำมาปั่นกับ glass beads เขย่าด้วยความแรงเพื่อให้แฟลกเจลลาหลุดออกมาจากเซลล์ นำแฟลกเจลลาของ *S.* Typhimurium ที่สกัดได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) พบว่า สามารถสกัดแยกแฟลกเจลลาออกมาได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ เมื่อเทียบกับ whole cell และการตรวจสอบแอนติเจนที่สกัดได้ กับซีรัมที่จำเพาะต่อแอนติเจน polyvalent-H-anti-serum (i) พบว่าเกิดปฏิกิริยา agglutination ที่ชัดเจนมาก แฟลกเจลลาที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับแฟลกเจลลามาตรฐาน (sigma) ของ *S.* Typhimurium (รูปที่ 5B) การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแฟลกเจลลาของ *S.* Typhimurium พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับแฟลกเจลลาของ *S.* Typhimurium ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนแฟลกเจลลาของ *E. coli* และแฟลกเจลลาของ *S.* Weltevreden (รูปที่ 8)

การเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยการใช้สารให้ความหนืดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าสูตรที่ดีที่สุดของอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ช่วยให้เซลล์แพร่กระจายและเจริญเป็น 3 มิติ คือ 1.5 % เมธิลเซลลูโลส, 0.25 % เจลาติน, 1 % คอลลาเจน, 0.05 mM 2-mercaptoethanol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม 10 % FBS ผลการเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากกระบวนการพัฒนาควบคุมปริมาณของเซลล์ที่ 10^2 cell/mL เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน มีจำนวนเซลล์เฉลี่ย 197 โคโลนี เซลล์มีขนาด

ประมาณ 0.62 X 0.70 mm. และอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปควบคุมปริมาณของเซลล์ที่ 10^2 cell/mL เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน พบ จำนวนเซลล์เฉลี่ย 206 โคโลนี เซลล์มีขนาดประมาณ 0.81 X 0.88 mm. ซึ่งมีขนาดและจำนวนโคโลนีที่ใกล้เคียงกัน

การสร้างเซลล์ลูกผสมไฮบริมาเป็นกระบวนการที่สำคัญมากสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในอดีตการคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมาสามารถทำได้โดยวิธีการเจือจาง (limiting dilution) แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่นใน 1 หลุมของจานอาหาร 96 หลุม อาจไม่ได้มาจากเซลล์เดียว อีกทั้งการเจือจางมีกระบวนการทำที่ยุ่งยาก และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง (Maher 2007, Brezski *et al.* 2014) ในปัจจุบันวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเป็นวิธีที่ทำได้สะดวกและง่ายมากขึ้น โดยมีการพัฒนาชุดอาหารสำเร็จรูปทางการค้าแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว แต่ในประเทศไทยชุดอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวมีราคาที่ค่อนข้างสูง การพัฒนาชุดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับการใช้งานเอง สามารถช่วยลดงบประมาณการวิจัย จากผลการทดลองในการเปรียบเทียบความสามารถของการเจริญเป็นโคโลนีในสารความหนืดและความเข้มข้นที่ต่างกัน พบว่าการใช้เมทิลเซลลูโลสในความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้เซลล์สามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่ได้เป็นลักษณะโคโลนีเป็น 2 มิติ ซึ่งข้อเสียของโคโลนีที่เป็น 2 มิติ คือ มีลักษณะแบน แผ่ขยายกว้าง หากมีโคโลนีที่อยู่ใกล้กัน ทำให้คัดแยกได้ยาก แสดงว่าการใช้เมทิลเซลลูโลสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็น 3 มิติ จำเป็นต้องมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ การเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ ช่วยให้ง่ายต่อกี่คัดแยก เนื่องจากเซลล์เป็นโคโลนีเดียว กระจายอยู่ในอาหาร ไม่แผ่กว้างติดโคโลนีอื่น ซึ่งการเติมเมทิลเซลลูโลสในความเข้มข้นที่เหมาะสมช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติเป็นเจล ยืดหยุ่น กึ่งแข็งกึ่งเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้ระยะเวลาที่นานจำเป็นต้องเติม mercaptoethanol เพื่อช่วยลดสารพิษจากเซลล์ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Liu *et al.* 2014) การใช้เจลาตินเป็นสารลดแรงตึงช่วยให้อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวมีคุณสมบัติหนืดขึ้น ทำให้เซลล์เป็นทรงกลม 3 มิติ แบ่งตัวทุกระนาบ แต่ได้โคโลนีที่ค่อนข้างเล็ก การเติมเจลาตินในความเข้มข้นที่มากเกินไปทำให้อาหารหนืดมากเกินไป ส่งผลให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีได้ยาก ส่วนการเติมคอลลาเจนที่มีคุณสมบัติเป็น extracellular matrix ซึ่งช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (Kubow *et al.* 2015) ทำให้เซลล์เจริญ มีลักษณะเป็นโคโลนีที่ใหญ่ สมบูรณ์และสามารถมองเห็นได้ชัด และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนาขึ้น เช่น ความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ การกระจายตัวของเซลล์และขนาดของโคโลนี พบว่ามีคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน แต่อาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนาขึ้นมีต้นทุนที่ต่ำกว่า ซึ่งในระยะยาวเป็นการช่วยลดงบประมาณการวิจัย รวมทั้งลดขั้นตอน ทำให้ง่าย สะดวก รวดเร็วขึ้นในการทำวิจัยทางด้านการเลี้ยงเซลล์ และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เอกสารอ้างอิง

Aarestrup FM, Lertworapreecha M, Evans MC, Bangtrakulnonth A, Chalermchaikit T, Hendriksen RS, Wegener HC. (2003). "Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among Salmonella enterica serovar Weltevreden from different countries." *J Antimicrob Chemother* 52(4): 715-718.

Bangtrakulnonth A, Pornreongwong S, Pulsrikarn C, Sawanpanyalert P, Hendriksen RS, Lo Fo Wong DM, Aarestrup FM. (2004). "Salmonella serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002." *Emerg Infect Dis* 10(1): 131-136.

Bernbom N, Ng YY, Paludan-Muller C, Gram L. (2009). "Survival and growth of Salmonella and Vibrio in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product." *Int J Food Microbiol* 134(3): 223-229.

Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. (1995). "Outer-Membrane Protein-Specific and Rough Lipopolysaccharide-Specific Monoclonal-Antibodies Protect Mice against Brucella-Ovis." *Journal of Medical Microbiology* 43(5): 344-347.

Braden CR, Tauxe RV. (2013). "Emerging Trends in Foodborne Diseases." *Infectious Disease Clinics of North America* 27(3): 517-+.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. (2000). "Salmonella nomenclature." *J Clin Microbiol* 38(7): 2465-2467.

Brezski RJ, Kinder M, Grugan KD, Soring KL, Carton J, Greenplate AR, Petley T, Capaldi D, Brosnan K, Emmell E, Watson S, Jordan RE. (2014). "A monoclonal antibody against hinge-cleaved IgG restores effector function to proteolytically-inactivated IgGs in vitro and in vivo." *Mabs* 6(5): 1265-1273.

Cam D, Oktem HA. (2019). "Development of rapid dipstick assay for food pathogens, Salmonella, by optimized parameters." *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 56(1): 140-148.

Chaicumpa W, NgrenNgarmlert W, Kalambaheti T, Ruangkunaporn Y, ChongsaNguan M, Tapchaisri P, Desakorn V, Suthienkul O. (1995). "Monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for the detection of Salmonella in foods." *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 13(2): 159-166.

Chuanchuen R, Padungtod P, Pathanasophon P. (2008). "Antimicrobial Resistance Genes among Salmonella enterica isolates from Poultry and Swine in Thailand." *International Journal of Infectious Diseases* 12: E117-E117.

Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. (2007). "Salmonella, the host and disease: a brief review." *Immunol Cell Biol* 85(2): 112-118.

Corry JE, Allen VM, Hudson WR, Breslin MF, Davies RH. (2002). "Sources of Salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control." *J Appl Microbiol* 92(3): 424-432.

Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Ferris KE. (2000). "Survey of Salmonella serotypes shed in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns." *J Food Prot* 63(12): 1648-1653.

de Almeida R, Nakamura CN, Fontes MD, Deffune E, Felisbino SL, Kaneno R, Favaro WJ, Billis A, Cerri MO, Fusco-Almeida AM, Giannini MJM, Moroz A. (2018). "Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies." *Mabs* 10(1): 46-54.

Farzan A, Friendship RM, Dewey CE. (2007). "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining Salmonella status of a pig herd." *Epidemiology and Infection* 135(2): 238-244.

Foley SL, Zhao S, Walker RD. (2007). "Comparison of molecular typing methods for the differentiation of Salmonella foodborne pathogens." *Foodborne Pathog Dis* 4(3): 253-276.

Galanis E, Wong DMALF, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC, Surv WGS. (2006). "Web-based surveillance and global Salmonella distribution, 2000-2002." *Emerg Infect Dis* 12(3): 381-388.

Hellman J, Zanzot EM, Loiselle PM, Amato SF, Black KM, Ge YM, Kurnick JT, Warren HS. (1997). "Antiserum against Escherichia coli J5 contains antibodies reactive with outer membrane proteins of heterologous gram-negative bacteria." *Journal of Infectious Diseases* 176(5): 1260-1268.

Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM. (2011). "Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007." *Foodborne Pathog Dis* 8(8): 887-900.

Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. (2002). "Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping." *Epidemiol Infect* 129(1): 1-8.

Heymans R, Vila A, van Heerwaarden CAM, Jansen CCC, Castelijn GAA, van der Voort M, Biesta-Peters EG. (2018). "Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR." *Plos One* 13(10).

Ibebuike CC, Yah SC, Eghafona NO. (2008). "Production of high polyvalent antisera against Salmonella." *Scientific Research and Essays* 3(5): 204-208.

Jaradat ZW, Zawistowski J. (1998). "Antigenically stable 35 kDa outer membrane protein of Salmonella." *Food and Agricultural Immunology* 10(3): 259-270.

Kauffmann F. (1973). "[The classification and nomenclature of salmonella-species]." *Zentralbl Bakteriol Orig A* 223(4): 508-512.

Kubow KE, Vukmirovic R, Zhe L, Klotzsch E, Smith ML, Gourdon D, Luna S, Vogel V. (2015). "Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix." *Nature Communications* 6.

Lertworapreecha M, Sutthimusik S, Tontikapong K. (2013). "Antimicrobial Resistance in Salmonella enterica Isolated From Pork, Chicken, and Vegetables in Southern Thailand." *Jundishapur Journal of Microbiology* 6(1): 36-41.

Liu Y, Wang YD, Liu J, Zuo W, Hao L, Zhang LL, Zhen B. (2014). "High throughput monoclonal antibody generation by immunizing multiple antigens." *Science China-Life Sciences* 57(7): 710-717.

Lou Y, Yang FL, Zhu XX, Liu FQ. (2009). "Production of a specific monoclonal antibody against mercury-chelate complexes and its application in antibody-based assays." *Food and Agricultural Immunology* 20(1): 23-33.

Lunguya O, Lejon V, Phoba MF, Bertrand S, Vanhoof R, Glupczynski Y, Verhaegen J, Muyembe-Tamfum JJ, Jacobs J. (2013). "Antimicrobial resistance in invasive non-typhoid Salmonella from the Democratic Republic of the Congo: emergence of decreased fluoroquinolone susceptibility and extended-spectrum beta lactamases." *PLoS Negl Trop Dis* 7(3): e2103.

Maher A. (2007). Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Springer Science & Business Media.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. (2010). "The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis." *Clin Infect Dis* 50(6): 882-889.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. (1999). "Food-related illness and death in the United States." *Emerg Infect Dis* 5(5): 607-625.

Nalbantsoy A, Karaboz I, Gurhan ID. (2010). "Production of Monoclonal Antibody Against Salmonella H: g,m Flagellar Antigen and Potential Diagnostic Application." *Hybridoma* 29(5): 419-423.

Nalbantsoy A, Karaboz I, Ivanova R, Deliloglu-Gurhan I. (2010). "Isolation and purification of O and H antigens from Salmonella Enteritidis as diagnostic tool." *Annals of Microbiology* 60(3): 565-571.

Natvig EE, Ingham SC, Ingham BH, Cooperband LR, Roper TR. (2002). "Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure." *Appl Environ Microbiol* 68(6): 2737-2744.

Noorlis A, Ain HN, Suwaibah M. (2018). "Duplex PCR for the detection of Salmonella spp. and Salmonella Typhimurium in fresh coconut milk." *International Food Research Journal* 25(5): 2138-2142.

Ozyurt OK, Bertocco ALFVB, Pereira LAB, Jimenes LP, Yazisiz H, Ozhak B, Ogunc D, Donmez L, Gunseren F, Yilmaz A, Ongut G. (2019). "Detection of Salmonella, Campylobacter, Shiga toxin-producing E. coli and Shigella/EIEC by culture and a multiplex PCR panel in pediatric patients with acute diarrheal illness." *Journal of Laboratory Medicine* 43(4): 211-215.

Padungtod P, Kaneene JB. (2006). "Salmonella in food animals and humans in northern Thailand." *Int J Food Microbiol* 108(3): 346-354.

Prusaksochaczewski E, Luong JHT. (1989). "An Improved Elisa Method for the Detection of Salmonella-Typhimurium." *Journal of Applied Bacteriology* 66(2): 127-135.

Rementeria A, Vivanco AB, Ramirez A, Hernando FL, Bikandi J, Herrera-Leon S, Echeita A, Garaizar J. (2009). "Characterization of a Monoclonal Antibody Directed against Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Serovar [4,5,12: i:-]." *Applied and Environmental Microbiology* 75(5): 1345-1354.

Rodriguez FI, Procura F, Bueno DJ. (2018). "Comparison of 7 culture methods for Salmonella serovar Enteritidis and Salmonella serovar Typhimurium isolation in poultry feces." *Poultry Science* 97(11): 3826-3836.

Sahu B, Singh SD, Behera BK, Panda SK, Das A, Parida PK. (2019). "Rapid detection of Salmonella contamination in seafoods using multiplex PCR." *Brazilian Journal of Microbiology* 50(3): 807-816.

Schlecht S, Westphal O. (1968). "[Production of antisera against somatic (O) antigens of Salmonella. 3. Investigations on precipitating antisera]." *Zentralbl Bakteriol Orig* 207(3): 317-333.

Schneid AD, Ludtke CB, Diel C, Aleixo JAG. (2005). "Production and caracterization of monoclonal antibodies for the detection of Salmonella enterica in chicken meat." *Brazilian Journal of Microbiology* 36(2): 163-169.

Schneid AD, Rodrigues KL, Chemello D, Tondo EC, Ayub MAZ, Aleixo JAG. (2006). "Evaluation of an indirect ELISA for the detection of Salmonella in chicken meat." *Brazilian Journal of Microbiology* 37(3): 350-355.

Schrader KN, Fernandez-Castro A, Cheung WK, Crandall CM, Abbott SL. (2008). "Evaluation of commercial antisera for Salmonella serotyping." *J Clin Microbiol* 46(2): 685-688.

Singh S, Tank NK, Dwivedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, Chugh VK. (2018). "Monoclonal Antibodies: A Review." *Current Clinical Pharmacology* 13(2): 85-99.

Siraganian RP, Fox PC, Berenstein EH. (1983). "Methods of Enhancing the Frequency of Antigen-Specific Hybridomas." *Methods in Enzymology* 92: 17-26.

Stemcell T. (2009). "Technical manual: Hybrodoma cloning kit ".

Vaeteewootacharn K, Sutra S, Vaeteewootacharn S, Sithigon D, Jamjane O, Chomvarin C, Hahnvajanawong C, Thongskulpanich N, Thaewnon-giew K. (2005). "Salmonellosis and the food chain in Khon Kaen, northeastern Thailand." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36(1): 123-129.

Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi MA, Wolff A, Bang DD. (2019). "Rapid detection of Salmonella enterica in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR." *Biosensors & Bioelectronics* 129: 224-230.

Wilson JR, Guo Z, Reber A, Kamal RP, Music N, Ganseborn S, Bai YH, Levine M, Carney P, Tzeng WP, Stevens J, York IA. (2016). "An influenza A virus (H7N9) anti-neuraminidase monoclonal antibody with prophylactic and therapeutic activity in vivo." *Antiviral Research* 135: 48-55.

Wybot I, Wildemauwe C, Godard C, Bertrand S, Collard JM. (2004). "Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human Salmonella in Belgium: trends for the period 2000-2002." *Acta Clin Belg* 59(3): 152-160.

Yue H, Zhang B, Zhu XX, Zhang HR, Tang C. (2014). "Comparison of Culture Methods for Isolation of Salmonella in Yak Fecal Samples." *Indian Journal of Microbiology* 54(2): 223-226.

Zimmermann M, Rose N, Lindner JM, Kim H, Goncalves AR, Callegari I, Syedbasha M, Kaufmann L, Egli A, Lindberg RLP, Kappos L, Traggiai E, Sanderson NSR, Derfuss T. (2019). "Antigen Extraction and B Cell Activation Enable Identification of Rare Membrane Antigen Specific Human B Cells." *Frontiers in Immunology* 10.

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, จิโรจน์ ศศิปรียจันทร์, ชาญณรงค์ รอดคำ, มณฑล เลิศวรปรีชา (2544). รายงานผลการวิจัย เรื่อง "การเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียเอ็นเทอโรค็อคคัส และซาลโมเนลล่าที่ดื้อยาในไก่เนื้อ", จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักระบาดวิทยา. (2558). "รายงานการเฝ้าระวังโรค ", from http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y58/d03_2458.pdf.