และการตายของเซลล์ monocyte เพาะเลี้ยงของคน (THP-1) กระตุ้นการสร้าง cytokines IL-6 และ IL-12 ของเซลล์ THP-1

ระเบียบวิธีวิจัย

1. **การศึกษาผลของตัวเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ต่อเซลล์ THP-1**

1.1 เลี้ยง cell line ชนิด THP-1 (human macrophage) ใน RPMI ที่ผสม 10% fetal bovine serum จนเซลล์เจริญดีแล้วจึงขูดเซลล์ออกจากขวดเลี้ยง ทำการปั่นล้าง นำมานับ แล้วแบ่งให้ได้เป็น 10^5 เซลล์/มล

1.2 เติม เชื้อ *B. pseudomallei* หรือ *B. thailandensis* ที่ ratio ระหว่างเชื้อกับเซลล์ 1:1 และ 1:100 ทิ้งไว้ 0-48 ชั่วโมง ศึกษา morphology change ที่เกิดขึ้น

2. **ศึกษาผลของ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* (live และ heat-killed) และ 200 kDa antigen ต่อการผลิต cytokine โดย THP-1 macrophage cell line**

2.1 ทำ growth curve ของเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยง *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ในอาหาร LB Broth โดยใช้ 1% inoculum เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1% มาถ่ายลง 25 มล ของ LB broth ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล เขย่าที่ 37 องศา 200 รอบต่อนาที จนถึง stationary phase โดยเก็บเชื้อมาทำ growth curve พร้อมกับ plate count

2.2 ทำการเลี้ยง *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* อีกครั้งเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่ต้องการ โดยเทียบกับค่า optical density (OD) จาก growth curve แบ่งมาทำ plate count เพื่อนับจำนวนยืนยัน และแบ่งไปเตรียม heat-killed โดยให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทดสอบโดยการนำไปเพาะเลี้ยงบน LB-agar เพื่อดูการรอดชีวิต

2.3 ทำการเลี้ยง *B. pseudomallei* จนถึง late log phase จากนั้นปั่นเชื้อที่ 8,000 รอบ/นาที เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอน นำส่วนใสที่มี 200 KDa ของ exopolysaccharide เป็นองค์ประกอบมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.4 เลี้ยง THP-1 ใน RPMI ที่ผสม 10% Fetal bovine serum ทำการปั่นล้าง นำมานับ แล้วแบ่งให้ได้เป็น 10^5 เซลล์/มล เติมตัวเชื้อ *B. pseudomallei* หรือ *B. thailandensis* (ทั้ง live และ heat-killed) ในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:100 หรือ 10% และ 30% ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 200 kDa ของ *B. pseudomallei* เพื่อดูการกระตุ้นการสร้าง cytokine ในระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งตรวจสอบโดยการนำ supernatant จาก cell culture มาตรวจสอบชนิดของ cytokine IL-6 และ IL-12 ที่ผลิตได้โดยใช้ MAb ที่จำเพาะต่อ cytokine ต่าง ๆ โดยวิธี ELISA

2.5 นำส่วนใสที่มี 200 KDa ของ exopolysaccharide เป็นองค์ประกอบมาต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ 10% และ 30% ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 200 kDa ที่ต้มนี้