

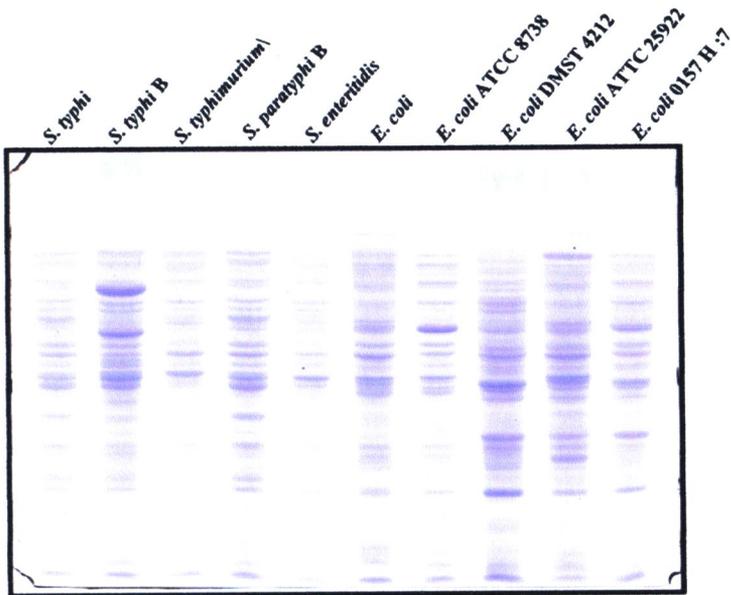
บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

1. วิธีการใช้แอนซีรัมในการตรวจจำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อ *Salmonella*

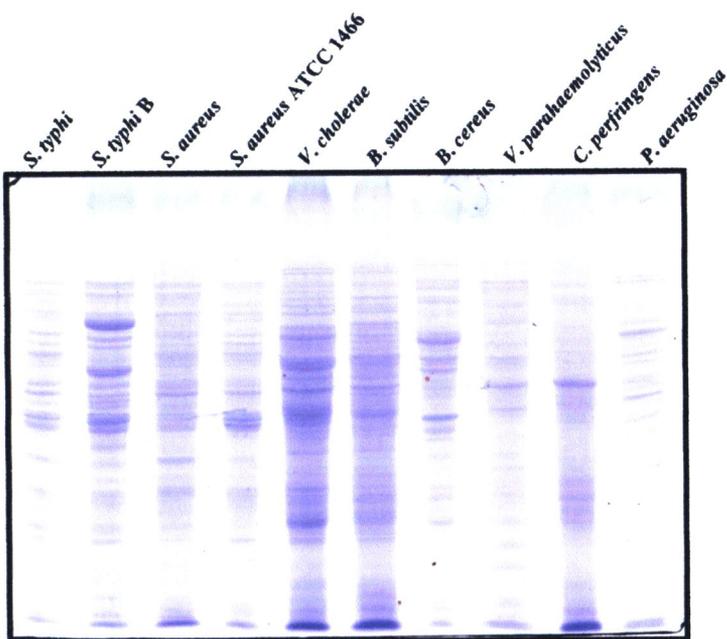
จากการศึกษาชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียทั้ง 18 ชนิด คือ *Salmonella typhi*, *S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, *S. enteritidis*, *E. coli*, *E. coli* ATCC 8738, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157 H:7, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 1466, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Clostridium perfringens* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ประกอบด้วย BHI broth, RVS broth และ nutrient broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 วัน พบว่า RVS broth มีการเพิ่มปริมาณของเชื่อน้อยมาก แต่ข้อดีของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ คือ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งยากต่อการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth และ nutrient broth มีการเพิ่มปริมาณของเชื้อสูงใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ nutrient broth เนื่องจากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกและสามารถเลี้ยงเชื้ออื่นได้

จากนั้นทำการสกัดโปรตีน โดยการใช้คลื่นเสียงด้วยเครื่อง sonicate และนำตัวอย่างมาวัดหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford method จากนั้นนำไปแยกโปรตีนตามขนาด โดยเทคนิค SDS-PAGE รูปแสดงให้เห็นปริมาณโปรตีนที่ปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ผลการแยกโปรตีนในเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue R250

พบว่า ปริมาณโปรตีนในเชื้อแต่ละชนิดมีปริมาณพอๆ กัน ก่อนที่จะนำเชื้อเหล่านี้ไปตรวจต่อด้วยวิธี western immunoblotting กับแอนติบอดีชนิดต่างๆ



ภาพที่ 2 ผลการแยกโปรตีนในเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue R250

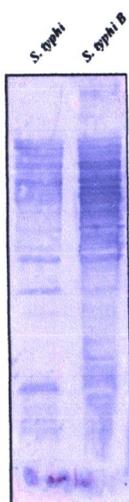
พบว่าปริมาณโปรตีนในเชื้อแต่ละชนิดมีปริมาณพอๆ กัน ก่อนที่จะนำเชื้อเหล่านี้ไปตรวจสอบด้วยวิธี western immunoblotting กับแอนติบอดีชนิดต่างๆ

โดยการใช้แอนติบอดีจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดขอนแก่น โดยมีแอนติบอดีดังนี้ Anti - Salmonella O polyvalent A-I และ Anti-Salmonella O group B ทำการทดสอบการจับของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. typhi* ว่ามีความไวและความจำเพาะ หลังจากนั้นทำการทดสอบด้วยเชื้อทั้งหมด 18 ชนิด และทำการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting และ dot blotting

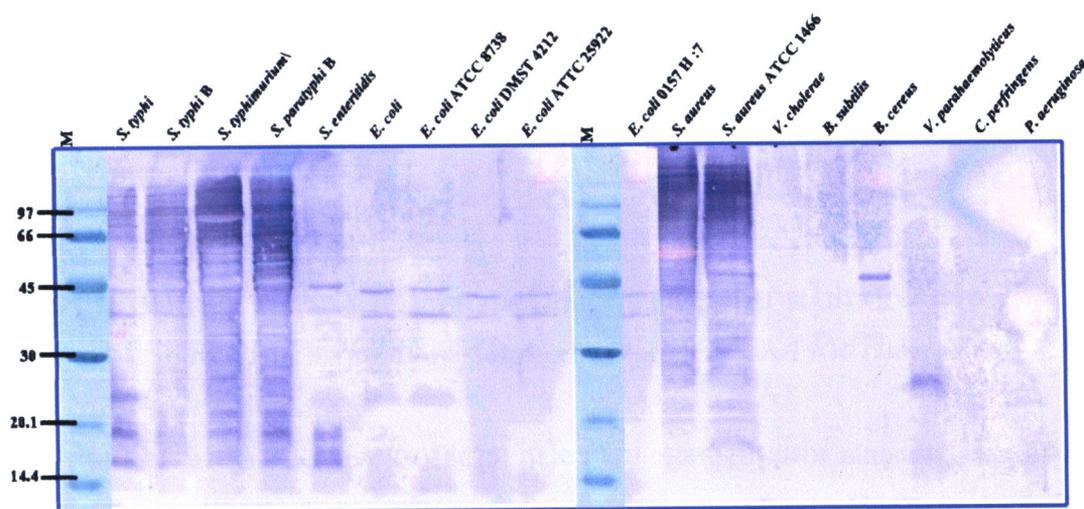
1.1 การตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ต่อเชื้อ *Salmonella* และเชื้ออื่นๆ ด้วยวิธี western immunoblotting และ dot blotting

ก่อนที่จะนำ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ที่ซื้อมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ไปพัฒนาเป็น Salmonella Strip เพื่อใช้ตรวจเชื้อ *Salmonella* จำเป็นต้องมีการตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ต่อเชื้อ *Salmonella* และเชื้ออื่นๆ ด้วยวิธี western immunoblotting เสียก่อน

ผลการตรวจความจำเพาะด้วยวิธี western immunoblotting สกัดโปรตีนโดยการใช้คลื่นเสียงด้วยเครื่อง sonicate นำโปรตีนปริมาณเท่ากันมาแยกด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้น transfer ไปยังแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) บ่มด้วย Anti-Salmonella O polyvalent A-I แล้วนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* และ *S. typhi* B ได้ (ภาพที่ 3) โดยพบแถบโปรตีนจำนวนมาก จากนั้นเมื่อนำไปตรวจความจำเพาะกับเชื้อต่างๆ ด้วยวิธี western immunoblotting (ภาพที่ 4) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับได้กับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi*, *S. typhi* B, *S. typhimurium* และ *S. paratyphi* B แต่อย่างไรก็ตาม พบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. aureus* ATCC 1146 สูงมาก แต่ยังคงเกิด cross reaction กับเชื้ออื่นๆ อยู่บ้าง เช่น *S. enteritidis*, *E. coli* หลาย strain *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* และไม่พบ cross reaction กับเชื้อต่อไปนี้เลย คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. perfringens* และ *P. aeruginosa*



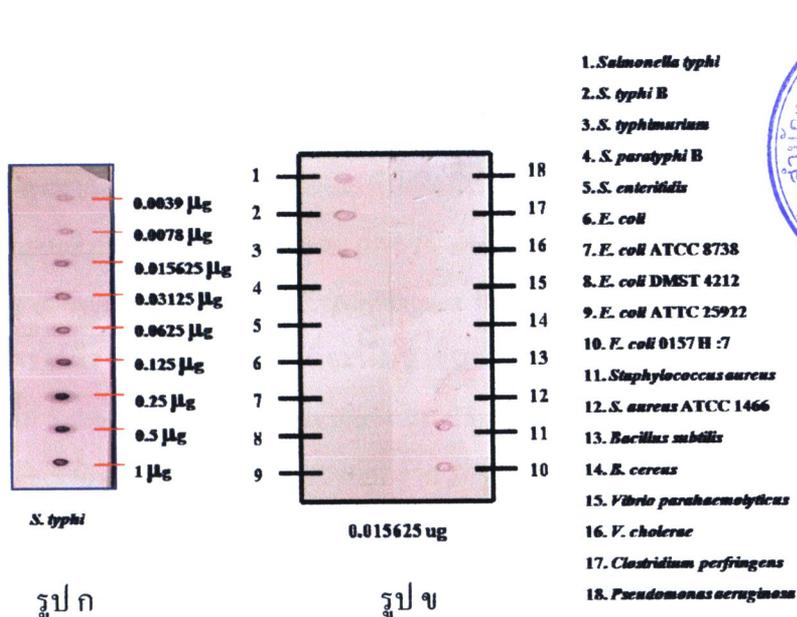
ภาพที่ 3 การตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ต่อเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี western immuno blotting โดยแยกโปรตีนของเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น PVDF แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี



ภาพที่ 4 การตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ต่อเชื้อต่าง ๆ ด้วยวิธี western immunoblotting โดยแยก โปรตีนของเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น PVDF แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี

การทดสอบปริมาณโปรตีนของ *S. typhi* ที่ปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่ปริมาณ 1 ไมโครกรัม หลังจากนั้นทำการทำ dilution จนไปถึงปริมาณ 0.0039

ไมโครกรัม ตามลำดับจากนั้นนำ Anti-Salmonella O polyvalent A-I แล้วนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (ภาพที่ 5) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับ โปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ที่ปริมาณ 0.015625 ไมโครกรัม (ภาพที่ 5 รูป ก) และนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิด ที่มีปริมาณ 0.015625 ไมโครกรัม นำมาบ่มด้วย Anti-Salmonella O polyvalent A-I โดยให้ผลคือแสดงความจำเพาะต่อ *S. typhi*, *S. typhi* B, และ *S. typhimurium* แต่อย่างไรก็ตาม พบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. aureus* ATCC 1146 สูงมาก (ภาพที่ 5 รูป ข)



ภาพที่ 5 ปริมาณโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ปริมาณโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีความจำเพาะต่อ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ด้วยวิธี dot blotting

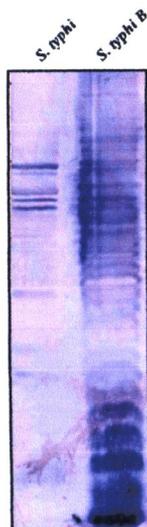
โดยใช้ปริมาณเชื้อ *S. typhi* 0.015625 ไมโครกรัม หยดลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี จากผลการทดลองทั้งของ western immunoblotting และ dot blotting น่าจะพอคาดเดาได้ว่า Salmonella Strip ที่จะพัฒนาขึ้นจากแอนติบอดีนี้ อาจใช้ตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจาก *Bacillus*, *Clostridium* แล *Pseudomonas* ได้เด่นชัด แต่อาจแยกจาก *E. coli* และ *Vibrio* ได้ยาก และแยกจาก *Staphylococcus* ไม่ได้เลย

1.2 การตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella group B ต่อเชื้อ *Salmonella* และเชื้ออื่นๆ ด้วยวิธี western immunoblotting

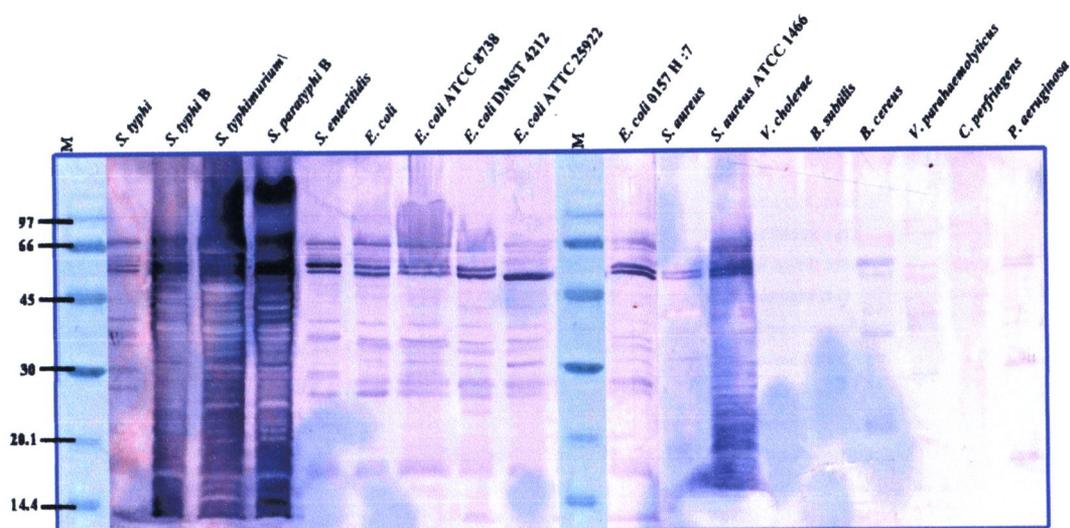
ก่อนที่จะนำ Anti-Salmonella group B ที่ชื่อมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ไปพัฒนาเป็น Salmonella Strip เพื่อใช้ตรวจเชื้อ *Salmonella* จำเป็นต้องมีการตรวจความจำเพาะของ

Anti-Salmonella group B ต่อเชื้อ *Salmonella* และเชื้ออื่นๆ ด้วยวิธี western immunoblotting เสียก่อน

ผลการตรวจความจำเพาะด้วยวิธี western immunoblotting สกัดโปรตีนโดยการใช้น้ำเกลือล้างด้วยเครื่อง sonicate นำโปรตีนปริมาณเท่ากันมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้น transfer ไปยังแผ่น PVDF บ่มด้วย Anti-Salmonella group B แล้วนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (ภาพที่ 6 และ 7) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* B ได้ดีมาก (ภาพที่ 6) โดยพบแถบโปรตีนจำนวนมากและจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ได้บ้าง จากนั้น เมื่อนำไปตรวจความจำเพาะกับเชื้อต่างๆ ด้วยวิธี western immunoblotting (ภาพที่ 7) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับได้กับโปรตีนของเชื้อ *S. typhimurium* และ *S. paratyphi* B แต่อย่างไรก็ตาม พบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus* สูงมากและเกิด cross reaction กับเชื้ออื่น ๆ อยู่บ้าง เช่น *S. enteritidis*, *E. coli* หลาย strain, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *P. aeruginosa* และไม่พบ cross reaction กับเชื้อต่อไปนี้เลย คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. perfringens* และ *P. aeruginosa* ซึ่งจากผลการทดลอง น่าจะพอคาดเดาได้ว่า Salmonella Strip ที่จะพัฒนาขึ้นจากการใช้ Anti-Salmonella group B นี้ อาจใช้ตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจาก *Bacillus* และ *Clostridium* ได้เด่นชัด แต่อาจแยกจาก *E. coli*, *Vibrio* และ *Pseudomonas* ได้ยาก และตรวจแยกจาก *Staphylococcus* ไม่ได้เลย

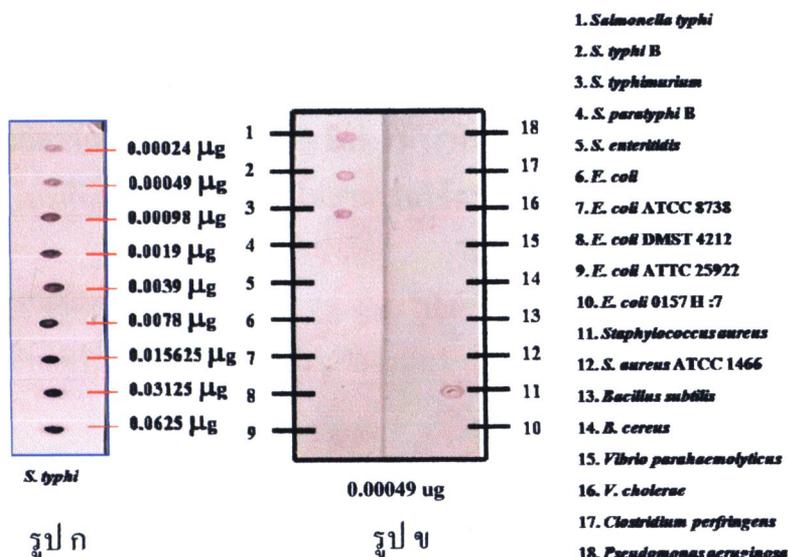


ภาพที่ 6 การตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella group B ต่อเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี western immuno blotting โดยแยกโปรตีนของเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น PVDF แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี



ภาพที่ 7 การตรวจความจำเพาะของ Anti-Salmonella group B ต่อเชื้อต่าง ๆ ด้วยวิธี western immuno blotting โดยแยกโปรตีนของเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น PVDF แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี

การทดสอบปริมาณโปรตีนของ *S. typhi* B ที่ปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่ปริมาณ 0.0625 ไมโครกรัม หลังจากนั้นทำการ dilution จนไปถึงปริมาณ 0.00024 ไมโครกรัม ตามลำดับจากนั้นนำ Anti-Salmonella group B แล้วนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (ภาพที่ 8) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ที่ปริมาณ 0.00049 ไมโครกรัม (ภาพที่ 8 รูป ก) และ นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิด ที่มีความเข้มข้น 0.00049 ไมโครกรัม นำมาบ่มด้วย Anti-Salmonella group B มีความจำต่อ *S. typhi*, *S. typhi* B, และ *S. typhimurium* แต่อย่างไรก็ตาม พบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 1146 สูงมาก (ภาพที่ 8 รูป ข)



ภาพที่ 8 ปริมาณ โปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ปริมาณ โปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีความจำเพาะต่อ Anti-Salmonella group B ด้วยวิธี dot blotting

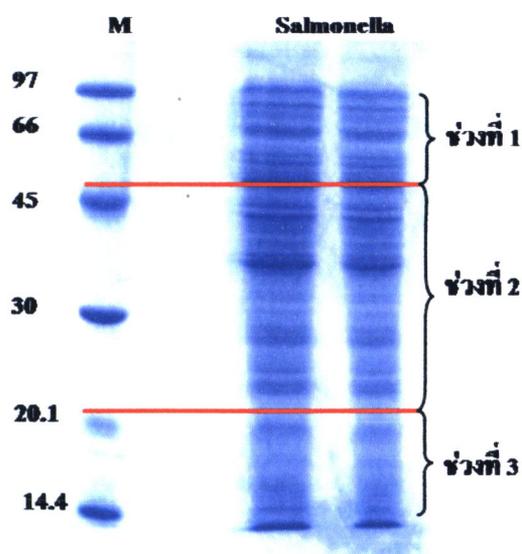
2. การผลิตแอนติบอดี

2.1 เตรียมโปรตีนเพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักร โดยทำการแยกโปรตีนของเชื้อ การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้แบ่งปริมาณโปรตีน ออกเป็น 3 ช่วง (ภาพที่ 9)

ผลการตรวจความจำเพาะด้วยวิธี western immunoblotting สกัดโปรตีน โดยการใช้คลื่นเสียงด้วยเครื่อง sonicate นำโปรตีนปริมาณเท่ากันมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้น transfer ไปยังแผ่น nitrocellulose บ่มด้วย mouse anti-salmonella antibody ที่นำมารวมกันทั้ง 3 ช่วง แล้วนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (ภาพที่ 10) พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ในช่วงที่ 1 ได้ดีที่ความไวที่ 1:100 เท่าในไตรมาสที่ 3 (ภาพที่ 10 รูป ก) จากนั้นนำไปทดสอบต่อการจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ในช่วงที่ 2 ได้ดีที่ความไวที่ 1:100 เท่าในไตรมาสที่ 3 (ภาพที่ 10 รูป ข) และทำการทดสอบต่อการจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ในช่วงที่ 3 ได้ดีที่ความไวที่ 1:100 เท่าในไตรมาสที่ 3 (ภาพที่ 10 รูป ค) โดยพบแถบโปรตีนจำนวนมากและจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ได้บ้าง จากนั้นเมื่อนำไปตรวจความจำเพาะกับเชื้อต่างๆ ด้วยวิธี western immunoblotting โดยนำแอนติบอดีที่ผลิตได้นำมารวมกันทั้ง 3 ช่วง

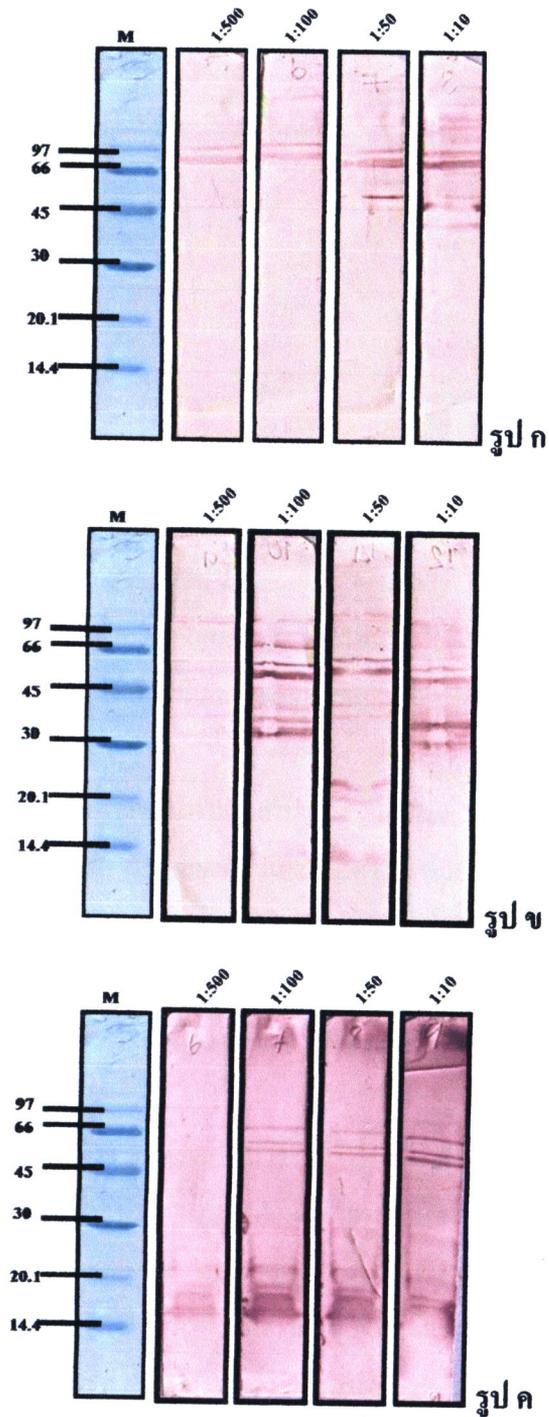
พบว่าแอนติบอดีสามารถจับได้กับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* แต่อย่างไรก็ตามพบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ ทั้ง 18 ชนิดสูงมาก (ภาพที่ 11) ซึ่งจากผลการทดลองน่าจะพอสาคะได้ว่า Salmonella Strip ที่จะพัฒนาขึ้นจากการใช้ mouse anti-salmonella antibody จากโปรตีนทั้ง 3 ช่วงนี้อาจไม่สามารถใช้ตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจากเชื้อต่างๆ ได้เลย

จากนั้นนำเชื้อ *Salmonella* spp. ไปแยกแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE เพื่อนำไปสร้างเป็นแอนติบอดีในหนูถีบจักร โดยจะแสดงแถบของเชื้อ *Salmonella* spp. ดังนี้

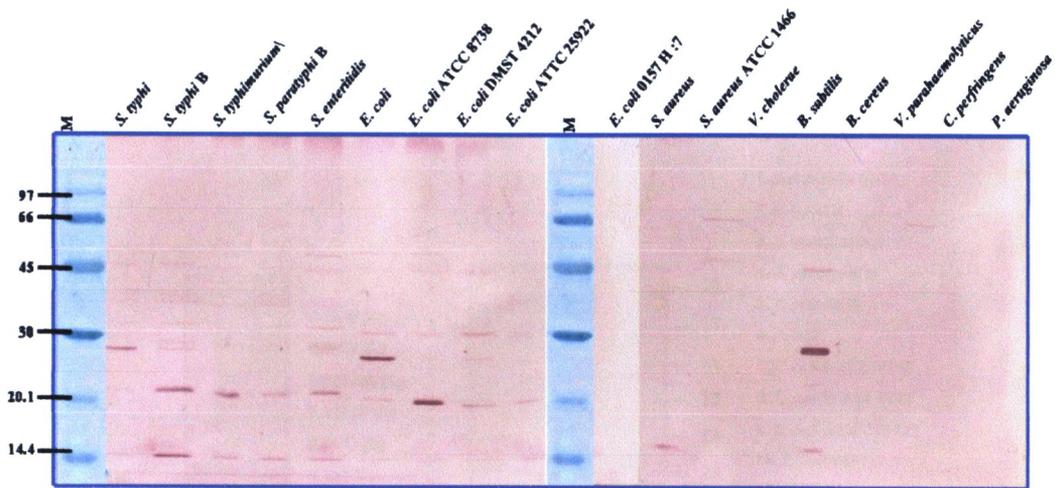


ภาพที่ 9 ผลการแยกโปรตีนในเชื้อ *S. typhi* ด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue R250 โดยแบ่งเจลออกเป็น 3 ช่วง

การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting พบว่ามีความจำเพาะของ anti-salmonella ของ *salmonella* spp. ในช่วงที่ 1, ช่วงที่ 2 และในช่วงที่ 3 สามารถตรวจความไวได้ที่ 1:50 เท่า



ภาพที่ 10 แสดงความจำเพาะของ mouse anti-salmonella antibody ในช่วงที่ 1 (รูป ก), แสดงความจำเพาะของ anti-salmonella ในช่วงที่ 1 (รูป ข), แสดงความจำเพาะของ anti-salmonella ในช่วงที่ 1 (รูป ค) หลังจากนั้นทดสอบการจับของแอนติบอดีต่อเชื้อทั้งหมด 18 ชนิด

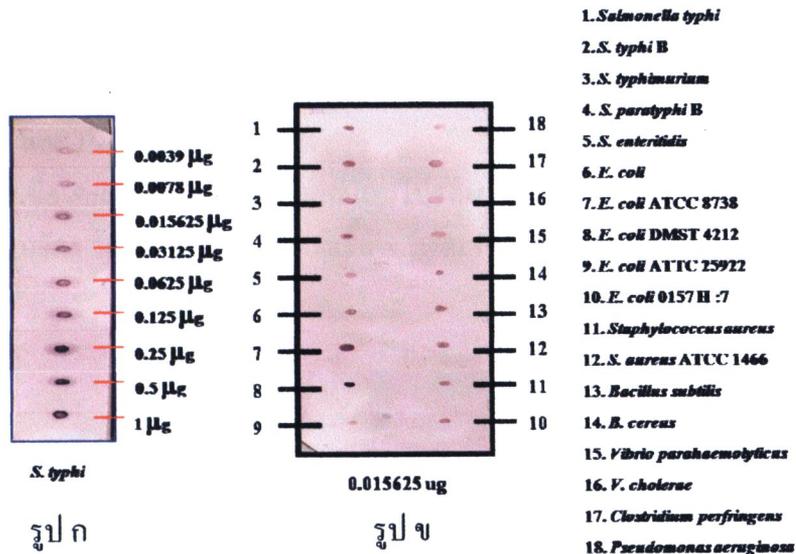


ภาพที่ 11 ทดสอบความจำเพาะของ mouse anti-salmonella antibody ในช่วงที่ 1, 2 และ 3 ต่อเชื้อ 18 ชนิด ด้วยวิธี western immunoblotting โดยแยกโปรตีนของเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose แล้ว บ่มด้วยแอนติบอดี

เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการจับกันของ mouse anti-salmonella antibody ในช่วงที่ 1, 2 และ 3 กับโปรตีนจากเชื้อ *Salmonella* และเชื้อต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting เริ่มจากการตรวจหาปริมาณเชื้อ *Salmonella* ที่พอเหมาะต่อการวิเคราะห์ โดยใช้เชื้อ *Salmonella* ปริมาณต่างๆ หยดลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วบ่มด้วย mouse anti-salmonella antibody ในช่วงที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase แล้วทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (รูปที่ 12)

การทดสอบปริมาณโปรตีนของ *S. typhi* ที่ปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม หลังจากนั้นทำการ dilution จนไปถึงปริมาณ 0.0039 ไมโครกรัม ตามลำดับจากนั้นนำ mouse anti-salmonella antibody ไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (ภาพที่ 12) พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ที่ปริมาณ 0.015625 ไมโครกรัม (ภาพที่ 12 รูป ก) และ นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิดให้มีปริมาณ 0.015625 ไมโครกรัม แล้วบ่มต่อด้วย mouse anti-salmonella antibody มีความจำต่อ *S. typhi*, *S. typhi* B, และ *S. typhimurium* แต่อย่างไรก็ตามพบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อทั้งหมด 18 ชนิด (ภาพที่ 12 รูป ข) ซึ่งให้ผลคล้ายกับการตรวจด้วย western immunoblotting

จากผลการทดลองทั้งของ western immunoblotting และ dot blotting น่าจะพอคาดเดาได้ว่า Salmonella Strip ที่จะพัฒนาขึ้นจากแอนติบอดีนี้ไม่อาจใช้ตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างได้เลย



ภาพที่ 12 ปริมาณ โปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ปริมาณ โปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีความจำเพาะต่อ mouse anti-salmonella antibody ด้วยวิธี dot blotting

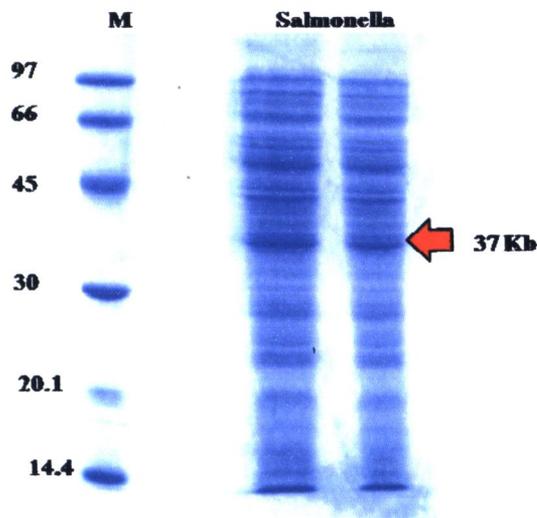
2.2 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ โปรตีนแฟกเจลลาในซีรัมของหนู ด้วยวิธี western immunoblotting (mouse anti-flagella antibody)

เตรียม โปรตีนเพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักร โดยทำการแยกโปรตีนของเชื้อ การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting 37 kDa (ภาพที่ 13)

ผลการตรวจสอบความจำเพาะด้วยวิธี western immunoblotting สกัดโปรตีนโดยการใช้คลื่นเสียงด้วยเครื่อง sonicate นำโปรตีนปริมาณเท่ากันมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้น transfer ไปยังแผ่น nitrocellulose บ่มด้วย mouse anti-flagella antibody แล้วนำไปตรวจการจับกันด้วย anti- mouse IgG linked with alkali phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ได้ดีที่ความไวที่ 1:1000 เท่าในไตรมาสที่ 3 (ภาพที่ 14) โดยพบแถบโปรตีนจำนวนเข็มบริเวณโปรตีนที่มีขนาด 37 kDa และจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi* ได้ จากนั้น เมื่อนำไปตรวจความจำเพาะกับเชื้อต่างๆ ด้วยวิธี western immunoblotting สามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, *S. typhi* B และ

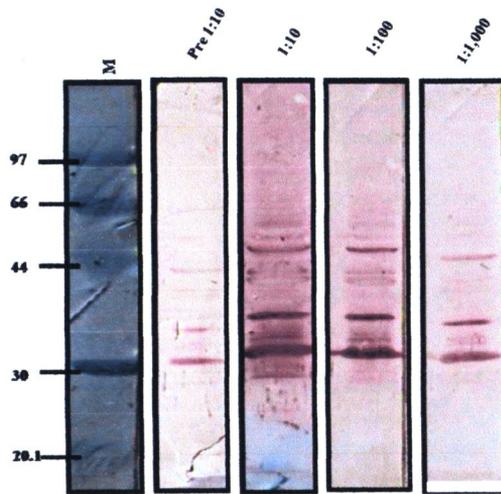
S. enteritidis ได้ดีมาก (ภาพที่ 15) โดยพบแถบโปรตีนบริเวณ 37 kDa แต่พบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* หลาย strain, *V. cholerae* กับเชื้ออื่นๆ อยู่บ้างและไม่พบ cross reaction กับเชื้อต่อไปนี้เลย คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. perfringens* *Vibrio* และ *Pseudomonas* ซึ่งจากผลการทดลอง น่าจะพอสืบเสาะได้ว่า mouse anti-salmonella 37 kDa antibody นี้จะพัฒนาขึ้นจากการใช้อาจอ้างใช้ตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจาก *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. perfringens* *Vibrio* และ *Pseudomonas* ได้บ้าง

จากนั้นนำเชื้อ *Salmonella* spp. ไปแยกแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE เพื่อนำไปสร้างเป็นแอนติบอดีในหนูถีบจักร โดยจะแสดงแถบของเชื้อ *S. typhi* ดังนี้

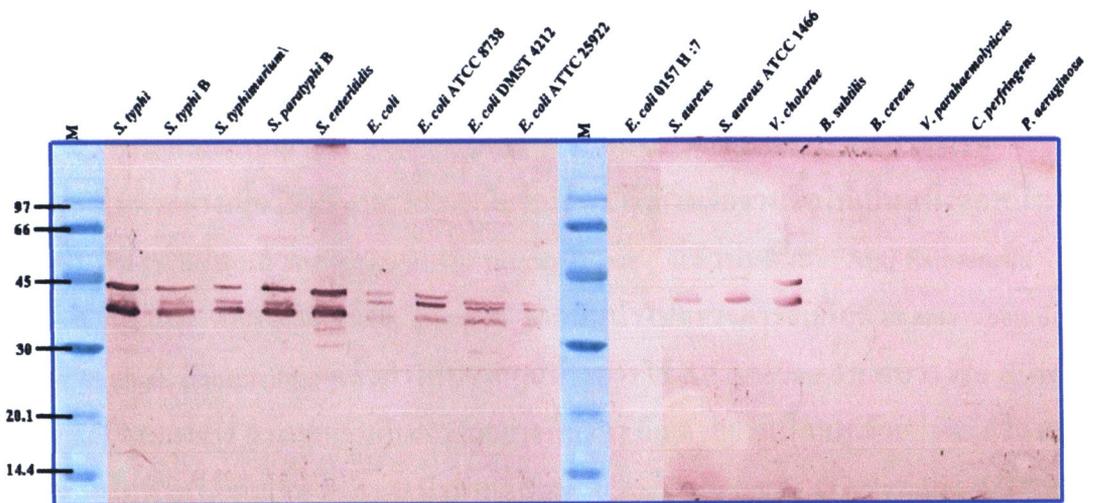


ภาพที่ 13 ผลการแยกโปรตีนในเชื้อ *Salmonella typhi* ด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue R250 โดยตัดเจลเป็นที่ขนาดซึ่งเป็นโปรตีนแฟกเจลลา 37 kDa

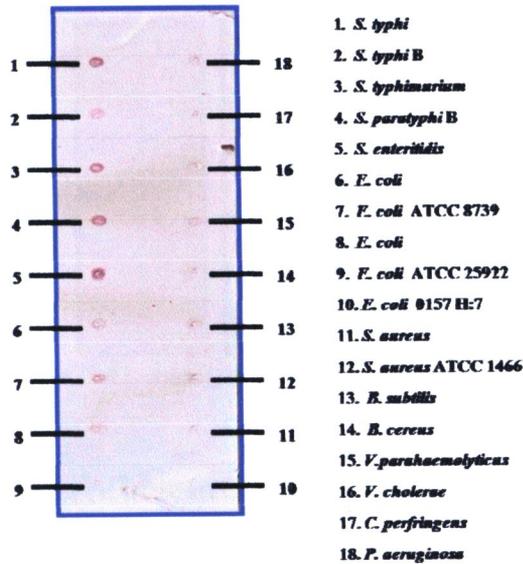
การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting พบว่ามีความจำเพาะของ anti-salmonella ของ *Salmonella* spp. โดยใช้ขนาดที่ 37 kDa สามารถตรวจความไวได้ที่ 1:1000 เท่า



ภาพที่ 14 ทดสอบความจำเพาะของ mouse anti-flagella antibody ต่อปริมาณโปรตีนที่ 37 kDa ต่อเชื้อ *S. typhi* ด้วยวิธี western immunoblotting โดยแยกโปรตีนของเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี



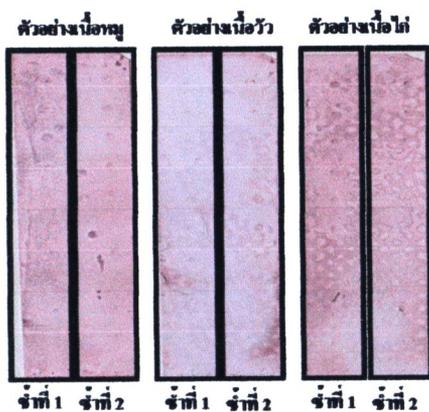
ภาพที่ 15 ทดสอบความจำเพาะของ mouse anti-flagella antibody ต่อปริมาณโปรตีนที่ 37 kDa ต่อเชื้อ 18 ชนิด ด้วยวิธี western immunoblotting โดยแยกโปรตีนของเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose แล้วบ่มด้วยแอนติบอดี



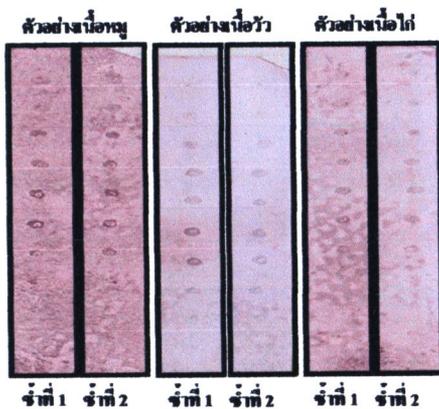
ภาพที่ 16 ทดสอบความจำเพาะของ mouse anti- mouse anti-flagella antibody ต่อปริมาณ โปรตีน *Salmonella* ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ต่อเชื้อแบคทีเรีย 18 ชนิด ด้วยวิธี dot blotting

3. นำสิ่งส่งตรวจมาทดสอบกับแอนติซีรัม

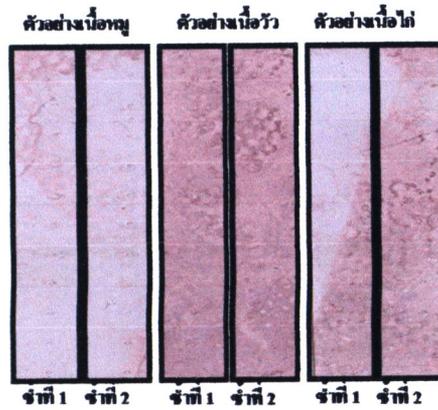
ทดสอบการให้ตัวอย่างจริงโดยการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ ชั่งมา 25 กรัม และเตรียมเชื้อ *S. typhi* ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 McFaland standard เดิมเชื้อ *S. typhi* ลงในตัวอย่างเนื้อไปปริมาณ 10000 ไมโครลิตร ทำการเจือจางเชื้อให้เป็นหนึ่งต่อหนึ่งเท่าในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วหยดลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วบ่มด้วย Anti-Salmonella O polyvalent A-I และ Anti-Salmonella group B จากนั้นนำไปตรวจการจับกันด้วย anti-rabbit IgG linked with alkali phosphatase แล้วทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit พบว่า เชื้อ *S. typhi* ปริมาณ 0.5 McFaland สามารถจับกันกับตัวอย่างที่นำมา คือ ตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* นำมาทดสอบกับ Anti-Salmonella O polyvalent A-I พบว่า strip จะไม่เกิดจุดสีม่วงเกิดขึ้นบน strip ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 17) จากนั้นทำตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดที่ได้เติม *S. typhi* พบว่าเกิดจุดสีม่วงอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 18) และทำการทดสอบด้วย Anti-Salmonella group B พบว่า strip ในตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* จะไม่เกิดจุดสีม่วงเกิดขึ้นบน strip ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 19) จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดที่ได้เติม *S. typhi* พบว่าเกิดจุดสีม่วงอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 20)



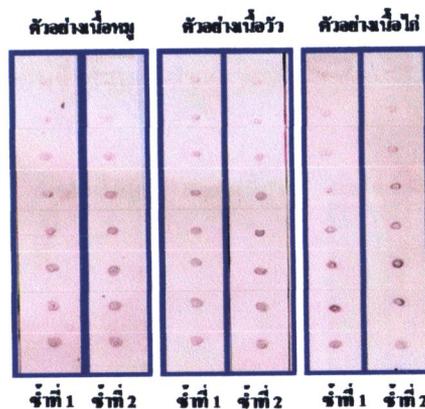
ภาพที่ 17 การตรวจความเป็นไปได้ของการพัฒนา Salmonella Strip ของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ในการตรวจตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* โดยการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ



ภาพที่ 18 การตรวจความเป็นไปได้ของการพัฒนา Salmonella Strip ของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I ในการตรวจตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* โดยการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ



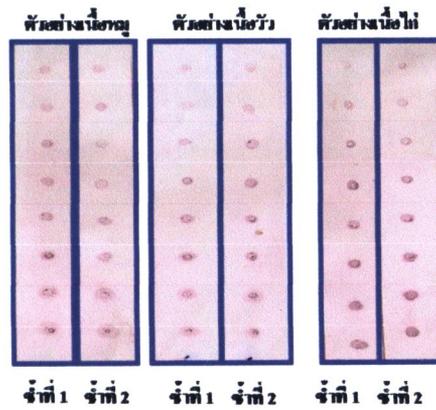
ภาพที่ 19 การตรวจความเป็นไปได้ของการพัฒนา Salmonella Strip ของ Anti-Salmonella group B ในการตรวจตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* โดยการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ



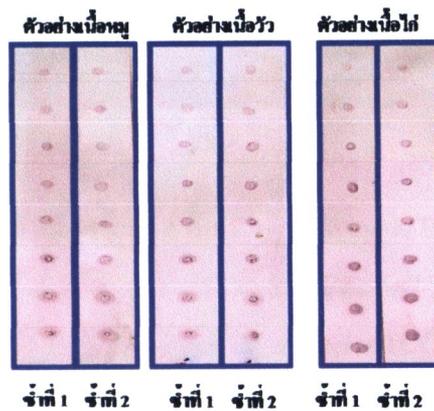
ภาพที่ 20 การตรวจความเป็นไปได้ของการพัฒนา Salmonella Strip ของ Anti-Salmonella group B ในการตรวจตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* โดยการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ

ทดสอบการให้ตัวอย่างจริงโดยการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ ชั่งมา 25 กรัม และเตรียมเชื้อ *S. typhi* ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 McFaland standard เติมเชื้อ *S. typhi* ลงในตัวอย่างเนื้อไปประมาณ 10000 ไมโครลิตร ทำการเจือจางเชื้อ ให้เป็นหนึ่งต่อหนึ่งเท่า ในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ แล้วหยดลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วบ่มด้วย mouse anti-flagella antibody พบว่า strip เกิดจุดสีม่วงเกิดขึ้นบน strip ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 21) จากนั้นทำตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดที่ได้เติม *S. typhi*, ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 McFaland standard พบว่าเกิดจุดสีม่วงอย่างเห็นได้ชัดเจน

(ภาพที่ 22) จากการทดสอบการใช้งานของ strip ต่อ mouse anti-flagella antibody ไม่สามารถแยกตัวอย่างที่มีเชื้อ *S. typhi* ได้



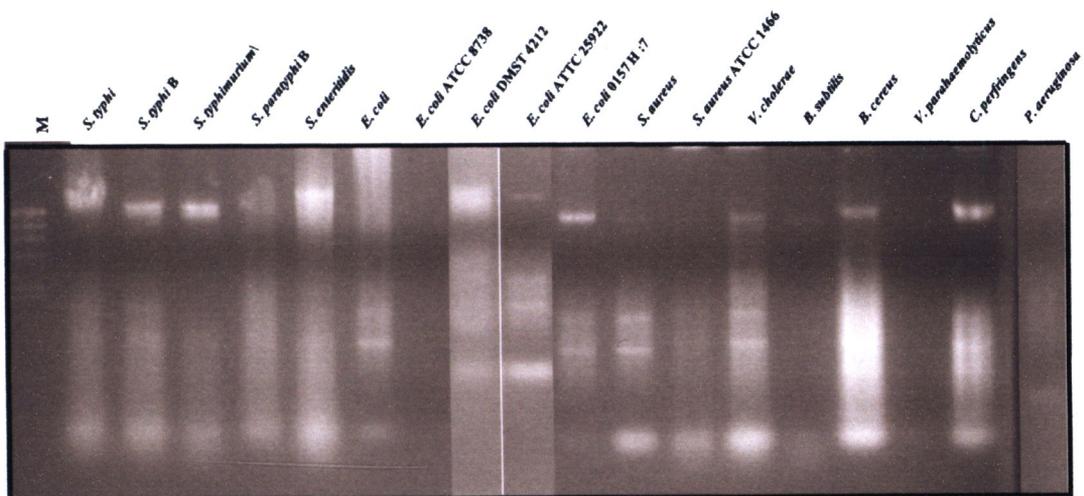
ภาพที่ 21 การตรวจความเป็นไปได้ของการพัฒนา Salmonella Strip ของ mouse anti-salmonella antibody ในการตรวจตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* โดยการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ



ภาพที่ 22 การตรวจความเป็นไปได้ของการพัฒนา Salmonella Strip ของ mouse anti-salmonella antibody ในการตรวจตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ได้เติมเชื้อ *S. typhi* โดยการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ

4. การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิด คือ *S. typhi*, *S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, *S. enteritidis*, *E. coli*, *E. coli* ATCC 8738, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157 H:7, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 1466, *B. subtilis*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *C. perfringens* และ *P. aeruginosa* ทำการสกัดโดยใช้ phenol: chloroform ทำการวิเคราะห์ DNA ของโครโมโซมของเชื้อทั้ง 18 สายพันธุ์บน agarose gel electrophoresis (0.8 เปอร์เซ็นต์) และย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 DNA จากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ชนิด คือ *S. typhi*, *S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, *S. enteritidis*, *E. coli*, *E. coli* ATCC 8738, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157 H:7, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 1466, *B. subtilis*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *C. perfringens* และ *P. aeruginosa*

5. วิธีการใช้ DNA probe

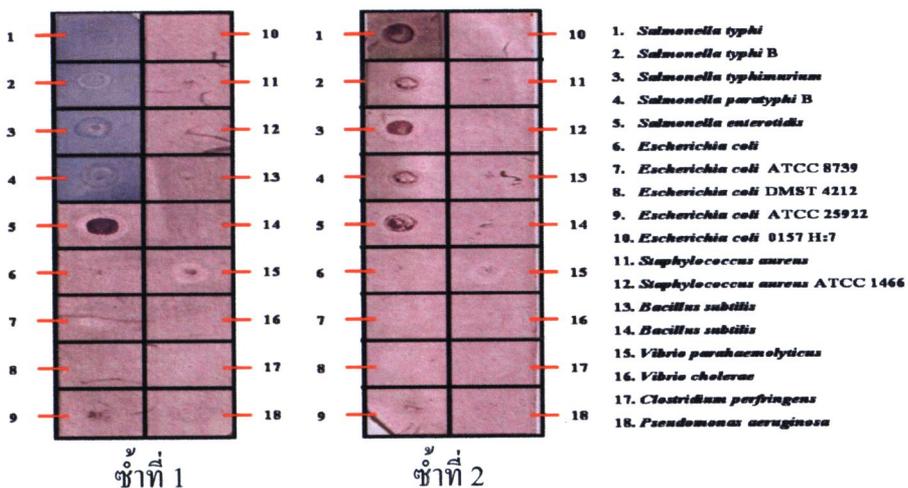
การออกแบบ DNA probe ให้มีความจำเพาะสูงสุดกับ DNA ของเชื้อ โดยทำการสืบค้นข้อมูล DNA ของเชื้อ *Salmonella* ที่มีความยาวราว 50 bp จากฐานข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://au.expasy.org/> พบว่า *Salmonella typhi* strain T9 gyrase B gene ลำดับเบส 50 คู่เบส ถัดจากลำดับเบสที่ 61, 121 และ 181 มีความจำเพาะสูงสุดกับ DNA ของเชื้อ *Salmonella* ดังนี้

61 tccggtgggc tgcacggggg gggcgtctcg gtagtcaacg ctctgtcgca
 121 ctggttatcc agcagatggg caaaattcac cgtcagatct acgagcacggg
 181 gcaccctggg ccgtcactgg cgataccgat aaaaccggca cgatggtacg

จากการนำลำดับเบสข้างต้นไปเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ต่างๆ โดยมีจำนวน max score = 99.6 ได้แก่ *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella choleraesuis* ซึ่งเมื่อนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากแบคทีเรีย พบว่ามีจำนวน max score < 36.2

5.1 วิธีการใช้ DNA probe เพื่อตรวจจับ DNA ของเชื้อ *Salmonella*

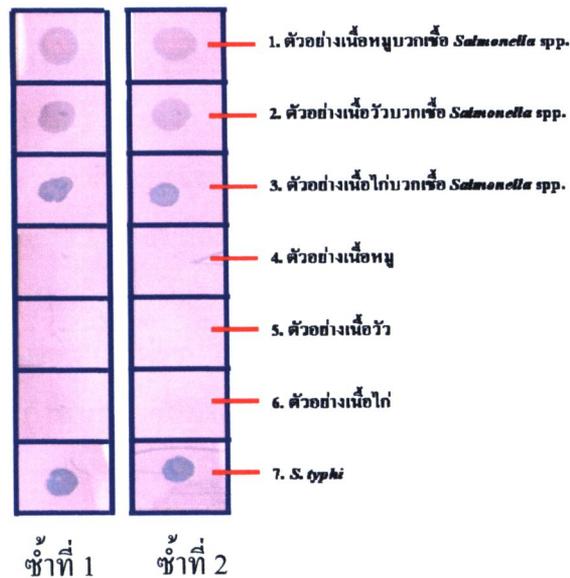
จากสังเคราะห์ SalI DNA probe ให้มีความยาวราว 50 bp และติด probe ไปด้วยสาร biotin ทำการนำแผ่น nitrocellulose ชนิด hybrid ทำการหยด DNA ที่สกัดได้นำไปหยดจำนวน 1 ไมโครลิตร ทำให้แห้งด้วยความร้อนแห้ง ทำการ Fix ด้วยรังสี UV เป็นเวลา 2 นาที ทำการ pre-hybridization และ hybridization ด้วย ที่มี SalI DNA probe แล้วนำ streptavidin-alkaline phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit (ภาพที่ 18) พบว่า SalI DNA probe สามารถจับกับ DNA ของเชื้อ *S. typhi*, *S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, และ *S. enteritidis* (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ผลการใช้ DNA probe เพื่อตรวจจับ DNA ของเชื้อ *Salmonella* และเชื้อแบคทีเรียต่างๆ 18 ชนิด โดยทำการ pre-hybridization และ hybridization ด้วย ที่มี SalI DNA probe แล้วนำ streptavidin-alkaline phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit

6. นำสิ่งส่งตรวจมาทดสอบกับ DNA strip

ทดสอบการให้ตัวอย่างจริงโดยการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ ชั่งมา 25 กรัม และเตรียมเชื้อ *Salmonella* spp. ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 McFaland standard เติมเชื้อ *Salmonella* spp. ลงในตัวอย่างเนื้อไปประมาณ 10000 ไมโครลิตร ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่แล้วหดย DNA ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น nitrocellulose ชนิด hybond ทำให้แห้งด้วยความร้อนแห้ง ทำการ Fix ด้วยรังสี UV เป็นเวลา 2 นาที ทำการ Pre-hybridization และ Hybridization ด้วย ที่มี Sal1 DNA probe แล้วบ่มด้วย streptavidin-alkaline phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit พบว่า Sal1 DNA probe สามารถจับกับ DNA ของเชื้อ *S. typhi* ที่เป็นตัวควบคุม อย่างเห็นได้ชัด จากการ DNA จาก ตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ ที่ไม่มีเชื้อ *S. typhi* ปรากฏว่าไม่เกิดเป็นจุดสีม่วงขึ้นในแผ่น nitrocellulose ชนิด hybond และพบว่า จะปรากฏว่า เกิดเป็นจุดสีม่วงขึ้นในแผ่น nitrocellulose ชนิด hybond ที่ทำการเติมเชื้อ *S. typhi* อย่างเห็นได้ชัดเจน(ภาพที่ 25) ดังนั้น แสดง Sal1 DNA probe สามารถแยกตัวอย่างที่มีเชื้อ *S. typhi* ออกจากตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อได้



ภาพที่ 25 ผลการใช้ Sal1 DNA probe เพื่อตรวจจับ DNA ของเชื้อ *Salmonella* และตัวอย่างเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ โดยทำการ pre-hybridization และ hybridization ด้วย ที่มี Sal1 DNA probe แล้วนำ streptavidin-alkaline phosphatase ทำให้ปรากฏสีด้วยการใช้ AP substrate kit