รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA KIT ต้นแบบ เพื่อตรวจหาสารพิษ Microcystin ในน้ำ

Development of ELISA Kit Prototype for Rapid Detection of Microcystin in Water

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
นางสุวรรณา กลัดพันธุ์	ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร....4
บทคัดย่อ....6
Abstract....9
คำนำ....12
1. ความเป็นพิษและผลกระทบของสารพิษไมโครซิสติน....13
2. ผลของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียต่อสุขอนามัยของคนและสัตว์....13
3. ผลของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ....14
4. โครงสร้างทางเคมีและลักษณะจำเพาะของสารพิษไมโครซิสติน....15
5. ความคงตัวของสารพิษไมโครซิสติน....15
6. การขจัดสารพิษไมโครซิสตินโดยกระบวนการบำบัดน้ำ....16
7. กระบวนการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน....17
8. ระบบภูมิคุ้มกัน....19
9. การทำปฏิกิริยาระหว่างแฮปเตนกับ carrier....21
10. Zero-length Cross-linkers....24
11. การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง....28
12. ไตเตอร์....32
13. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)....33
14. Horseradish peroxidase (HRP)....35
15. การเชื่อมแอนติบอดีกับ HRP....35
16. การผลิตแอนติซีรัมของไมโครซิสติน....36
17. การเลือก carrier ที่เหมาะสมเพื่อการผลิตแอนติซีรัม....38
วัตถุประสงค์ของโครงการ....39
อุปกรณ์และวิธีการ....40
1. แหล่งของไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis*....40
2. การจัดจำแนกชนิดของ *Microcystis*....40
3. วิธีการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Microcystis*....43
4. การเพาะเลี้ยง *Microcystis*....45
5. การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน....47
6. การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของ *Microcystis*....48
7. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินโดย *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA ที่ปรับปรุงใหม่....50
8. การเพาะเลี้ยง *Microcystis* เพื่อผลิตสารพิษไมโครซิสตินบริสุทธิ์สำหรับใช้เป็น antigen....50

9. การเตรียม antiserum จากไมโครซิสติน....53
10. การฉีดสารพิษเข้าสู่สัตว์ทดลอง....57
11. การทดสอบหาคุณภาพของแอนติซีรัม....58
12. การทดสอบด้วยวิธี direct competitive....59
ผลและวิจารณ์....62
1. การสำรวจการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียใน ยีนัส *Microcystis* จากแหล่งน้ำ....62
2. การตรวจสอบชนิดของสารพิษไมโครซิสตินใน ยีนัส *Microcystis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สำรวจจากแหล่งน้ำในประเทศไทย....66
3. การปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของ *M. aeruginosa*....69
4. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินโดย *M. aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA ที่ปรับปรุงใหม่....97
5. การเพาะเลี้ยง *Microcystis* เพื่อผลิตสารพิษไมโครซิสติน....102
6. การเตรียม antiserum จากไมโครซิสติน....104
7. การฉีดสารพิษเข้าสู่สัตว์ทดลอง....112
8. การทดสอบหาคุณภาพของแอนติซีรัม – กระต่ายชุดที่ 1....112
9. การทดสอบหาคุณภาพของแอนติซีรัม – กระต่ายชุดที่ 2....152
10. กราฟมาตรฐานและการคำนวณความเข้มข้นของสารพิษไมโครซิสติน....181
11. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ของแอนติบอดีต่อสารพิษมาตรฐานชนิดอื่น....182
12. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ....183
13. การหา % recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำกลั่น....183
14. การหา % recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำประปา....184
15. เปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธี ELISA และวิธี HPLC....185
16. ELISA Kit ต้นแบบสำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ....187
ภาคผนวก....191
เอกสารอ้างอิง....196

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อเนื้อเยื่อตับและกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง สารพิษนี้สร้างโดยไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย ในหน้าแล้ง *Microcystis* จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและหนาแน่นมองเห็นเป็นชั้นสีเขียวบนผิวน้ำ วิธีการวิเคราะห์สารพิษนี้ส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่มีความไวสูง สามารถใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามได้ เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังและเป็นระบบเตือนภัยสำหรับเกษตรกรและสัตว์เลี้ยงที่ต้องอาศัยแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการคัดเลือก *Microcystis aeruginosa* ทั้งหมด 66 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ M50058 มีการสะสมสารพิษ MCYST-RR มากที่สุด เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารพิษ สำหรับใช้เป็น antigen ในผลิต polyclonal antibody ต่อไป

ภายหลังจากการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ พบว่าสูตรอาหารดัดแปลง modified MA ส่งเสริมให้ *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 มีการเจริญและและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญในห้องปฏิบัติการของ M50058 ยังต่ำมาก ทำให้การผลิตสารพิษไมโครซิสตินต้องใช้ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ จึงทำให้สามารถผลิต MCYST-RR ได้ในปริมาณมากและและสามารถผลิตสารพิษที่มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการเตรียมเป็น antigen เพื่อการผลิตแอนติซีรัม

ในการเตรียม antiserum จากไมโครซิสตินได้เลือก antigen ที่เตรียมจาก protein carrier ชนิด cBSA จำนวน 20 มิลลิกรัม เชื่อมเข้ากับ MCYST-RR จำนวน 10 มิลลิกรัม ซึ่งซึ่งเมื่อฉีดเข้าสัตว์ ทดลองได้ค่าไตเตอร์สูงกว่า 100,000 และยังให้ผลในการทำปฏิกิริยากับ free MCYST-RR ได้สูงด้วย

ในการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่าง % of binding (%B/B_0) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน MCYST-RR ที่มีความเข้มข้น 0.2-20 ppb ได้ค่า correlation (R^2 = 0.9889) และพบว่าความเข้มข้นของ MCYST-RR ตั้งแต่ 0.5 ppb ขึ้นไปสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีได้ด้วยตาเปล่า นั่นแสดงว่าระดับความไวนี้สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้โดยไม่ต้องการเครื่องตรวจวัด ELISA Reader

สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) กับสารพิษมาตรฐานไมโครซิสตินชนิดอื่น ได้แก่ MCYST-YR และ MCYST-LR ให้ผล 86.3% และ 94.2% ตามลำดับซึ่งหมายถึงว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในแหล่งน้ำได้ นอกจากนี้การทดลองหา %recovery ในน้ำชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่น และน้ำประปา โดยการเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไป ในอัตรา 0.5, 1, 5 และ 10 ppb แล้วทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA ให้ค่า %recovery เท่ากับ 96.67, 90.73, 98.6, 89.2% และ 92.0, 85.0, 102.3, 88.7, 85.1% ตามลำดับ

ในการทดสอบหา limit of detection (LOD) ด้วยเทคนิค direct competitive ELISA ใน น้ำกลั่น น้ำประปา และน้ำบ่อธรรมชาติ ได้ค่า 0.2 ppb ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb โดยต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb

รหัสโครงการ : RDG4530022

ชื่อโครงการ : การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA KIT ต้นแบบเพื่อตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

ชื่อนักวิจัย : วิเชียร ยงมานิตชัย[1], สุวรรณา กลัดพันธุ์[2]
[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
[2]สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail address : fsciwcy@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : กรกฎาคม 2545 – มิถุนายน 2547

บทคัดย่อ

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงสูงต่อเนื้อเยื่อตับและกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งต่อไป สารพิษนี้สร้างโดยบางสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหน้าแล้ง *Microcystis* จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและหนาแน่นมองเห็นเป็นชั้นสีเขียวบนผิวน้ำ วิธีการวิเคราะห์สารพิษนี้ส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่มีความไวสูง สามารถใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามได้ เพื่อใช้เป็นเฝ้าระวังและเป็นระบบเตือนภัยสำหรับเกษตรกรและสัตว์เลี้ยงที่ต้องอาศัยแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินจาก *Microcystis aeruginosa* ทั้งหมด 66 สายพันธุ์ ที่ได้จาก ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 54 สายพันธุ์ และที่คัดแยกเพิ่มเติมจากแหล่งน้ำภาคตะวันออกและภาคใต้ อีก 12 สายพันธุ์ พบว่าสารพิษส่วนใหญ่ ประกอบด้วย MCYST-RR และพบ MCYST-LR และ MCYST-YR โดยสายพันธุ์ M50058 มีการสะสม MCYST-RR มากที่สุด จึงได้คัดเลือกไว้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ สำหรับใช้เป็น antigen ในผลิต polyclonal antibody ต่อไป นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกสายพันธุ์ M50020 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ เพื่อทดสอบสภาวะที่อาจเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารพิษ

จากการศึกษาเพื่อปรับปรุงสูตรอาหาร MA ได้ดัดแปลงให้มีส่วนประกอบดังนี้ $Ca(NO_3)_2$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, KNO_3 150 มิลลิกรัมต่อลิตร, $NaNO_3$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, β-sodium-glycerophosphate 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Bicine 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนประกอบของแร่ธาตุอื่น ๆนั้นคงเดิม สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสติน *M.*

aeruginosa สายพันธุ์ M50058 ได้แก่ pH เริ่มต้นที่ 9.2 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับการเจริญ และ 25 องศาเซลเซียส สำหรับการสร้างสารพิษ ความเข้มแสงที่ 250 - 300 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีและพบว่าไม่สามารถเหนี่ยวนำให้สายพันธุ์ M50020 สร้างสารพิษในห้องทดลอง

จากการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการเจริญ และการผลิตสารพิษไมโครซิสตินของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA และ modified MA สรุปได้ว่า M50058 สามารถเจริญและผลิตสารพิษไมโครซิสตินในอาหาร modified MA ได้ดีกว่าในอาหาร MA สูตรเดิม โดยได้สารพิษที่ประกอบด้วย MCYST–RR 2.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง MCYST–YR 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ MCYST–LR 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญในห้องปฏิบัติการของ *Microcystis* ยังต่ำมาก ทำให้การผลิตสารพิษไมโครซิสตินต้องใช้ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ จึงทำให้สามารถผลิต MCYST-RR ได้ในปริมาณมากและสามารถผลิตสารพิษที่มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการเตรียมเป็น antigen เพื่อการผลิตแอนติซีรัม

ในการเตรียม antiserum จากไมโครซิสตินได้เลือก antigen ที่เตรียมจาก protein carrier ชนิด cBSA หรือ BSA จำนวน 20 มิลลิกรัม เชื่อมเข้ากับ MCYST-RR จำนวน 10 มิลลิกรัม โดยการเชื่อมใช้วิธี water-soluble carbodiimide (EDPC) ใช้สารจำนวน 600 มิลลิกรัม และการใช้ 10%EDA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีความเหมาะสมกับการวิธีการที่จะนำไปเชื่อมกับ MCYST-RR ได้ ทั้งนี้การเตรียม protein carrier- cBSA ได้ทดลองยืนยันแล้วว่า protein carrier ได้มีการเชื่อมโมเลกุลกับ MCYST-RR แล้วจริง ด้วยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 238 และ 278 nm ซึ่ง immungen ที่เตรียมได้จะนำไปฉีดกระตุ้นเข้าสัตว์ทดลองต่อไป ซึ่งพบว่าแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับแอนติเจนที่ใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม จากการทดสอบหาค่าไตเตอร์ที่ได้จากกระต่ายแต่ละตัวพบ กระต่ายบางตัวมีค่าไตเตอร์สูงกว่า 100,000 และยังให้ผลในการทำปฏิกิริยากับ free MCYST-RR ได้สูงด้วย

ในการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่าง % of binding (%B/B_0) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน MCYST-RR ที่มีความเข้มข้น 0.2-20 ppb ได้ค่า correlation (R^2 = 0.9889) และพบว่าความเข้มข้นของ MCYST-RR ตั้งแต่ 0.5 ppb ขึ้นไปสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีได้ด้วยตาเปล่า นั่นแสดงว่าระดับความไวนี้สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้โดยไม่ต้องการเครื่องตรวจวัด ELISA Reader

สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) กับสารพิษมาตรฐานไมโครซิสตินชนิดอื่น ได้แก่ MCYST-YR และ MCYST-LR โดยการเทียบกับ MCYST-RR พบว่า MCYST-RR ได้ค่า correlation (R^2=0.9911) และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=66.005e^{-0.5355x}$ ส่วน MCYST-YR และ MCYST-LR ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9792 และ 0.9771 ตามลำดับ และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=68.292e^{-0.5186x}$ และ $y=66.115e^{-0.5072x}$ ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีต่อสารพิษมาตรฐาน MCYST-YR ได้ 86.3% และ 94.2%

สำหรับสารพิษ MCYST-LR ทำให้การใช้วิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในแหล่งน้ำได้

ในการทดลองเพื่อหา %recovery ในน้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น และน้ำประปา โดยการเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไป ในอัตรา 0.5, 1, 5 และ 10 ppb แล้วทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA พบว่า %recovery ของน้ำกลั่นเท่ากับ 96.67, 90.73, 98.6 และ 89.2% ในส่วนของน้ำประปาได้เท่ากับ 92.0, 85.0, 102.3, 88.7 และ 85.1% ตามลำดับ

จากการทดสอบหา limit of detection (LOD) โดยการเติมสารพิษ MCYST-RR 0.2 ppb ลงในน้ำกลั่น น้ำประปา และน้ำบ่อธรรมชาติ แล้วทำการตรวจวัดปริมาณสารพิษด้วยวิธี direct competitive ELISA ได้ค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารพิษที่ได้เติมลงไปนั่นแสดงว่า วิธีการนี้ให้ผลในการตรวจวัดได้ค่อนข้างแม่นยำ ในขณะที่วิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb เมื่อวัดด้วย ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb

ซึ่งจากผลสำเร็จของโครงการ จึงควรจะทำการผลิตชุดตรวจสอบนี้ในเชิงพาณิชย์ เพื่อนำไปใช้ในหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและดูแลคุณภาพน้ำ เช่น การประปานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค การไฟฟ้าฝ่ายผลิต และกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เป็นต้น อย่างไรก็ตามควรจะมีการวิจัยต่อเนื่องเพิ่มอีกเล็กน้อยในด้านปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบอีไลซา ไมโครซิสติน โพลีโคนอลแอนติบอดี ประเทศไทย

Project Code : RDG4530022

Project Title : Development of ELISA Kit Prototype for Rapid Detection of Microcystin in Water

Investigators : Yongmanitchai W.[1] and Cladpan S.[2]
[1]Faculty of Science, Kasetsart University
[2]Research and Development Institute, Kasetsart University

E-mail address : fsciwcy@ku.ac.th

Project Duration : July 2002 – June 2004

Abstract

Microcystin is a highly toxic hepta-cyclic peptide affects liver tissue, tumor promoter and leads to liver cancer. It is produced by most strains of a cyanobacterium in the genus *Microcystis.* They are commonly found in reservoirs all over the kingdom, particularly in dry season. *Microcystis* blooms is recognized by scum of cells on the surface of water. The toxin is usually analyzed by HPLC which is not adequately sensitive at the safe limit recommended by World Health Organization. This project is aiming at developing the prototype of an ELISA kit for detection of microcystin in water. The technique is very sensitive at very low microcystin concentration and can be used at site without any special equipment. Therefore, the kit can be used to monitor and warning system of danger from this toxin for farmers and their livestocks.

Analysis of microcystin content in 66 strains of *Microcystis aeruginosa*, including 54 strains from the collection at the Bioresource Laboratory, Department of Microbiology, Kasetsart University and 12 newly isolates from reservoirs in the Eastern and Southern regions revealed that MCYST-RR was the major toxin while MCYST-LR and MCYST-YR were minor variants. The strain M50058 accumulated largest amounts of MCYST-RR, therefore it was selected for further studies on growth and toxin production which would be used as antigen for polyclonal antibody production. In addition a non-toxic strain, M50020 was chosen for induction of microcystin in laboratory conditions.

Studies on modification of MA culture medium showed that the optimal concentrations of some ingredients should be adjusted, i.e. $Ca(NO_3)_2$ 50 mg/L, KNO_3 150

mg/L, $NaNO_3$ 10 mg/L, β-sodium-glycerophosphate 150 mg/L and Bicine 300 mg/L. Other compounds in the medium remained unchanged. Optimal conditions for growth and toxin production of M50058 were initial pH at 9.2, temperature at 35°C for growth and 25°C for toxin production and light intensity at 250-300 $\mu E/m^2/s$. It is also found that toxin production by the strain M50020 was not inducible under laboratory conditions.

Comparison on kinetics growth and toxin accumulation showed that *Microcystis aeruginosa* strain M50058 grew and produced toxin better in modified MA medium as compare to the original formulae. Toxin yields consisted of MCYST–RR, MCYST–LR and MCYST–YR at 2.22, 0.18 and 0.24 mg/g dry weight. However, it should be noted that growth rate of *Microcystis* in the laboratory was still very low, as well as the amounts of toxin obtained. Therefore, to attain sufficient MCYST-RR for use as antigen at milligrams level, biomass of *Microcystis* was collected from blooming reservoirs for toxin extraction and purification.

Preparation of antiserum from microcystin was done by using antigen obtained from conjugating 20 mg cBSA or BSA to 10 and 15 mg. Conjugation was performed using 600 mg of water-soluble carbodiimide (EDPC) and 1 ml of 10%EDA. Before selecting protein carrier, it was confirmed that cBSA attached to MCYST-RR by comparing changes of absorbance at 238 and 278 nm. The immunogen obtained will be used later for immunization to experimental animals (New Zealand white rabbit). Antibodies reacted well with antigen prepared from 10 mg MCYST-RR by observing titer values which showed that several animals gave the titer higher than 100,000 and also reacted very well with free microcystin.

The relationship between % of binding ($\%B/B_0$) and standard MCYST-RR at various concentrations from 0.2 – 20 ppb yielded very high correlation coefficient ($R^2 = 0.9889$). It is also noted that changes of color could be noticed by naked eye at MCYST-RR concentrations higher than 0.5 ppb which indicated that the sensitivity was sufficiently high to be used in field applications without the needs of ELISA Reader.

Tests on cross reactivity of the antibody with other variants of microcystins, i.e., MCYST-YR and MCYST-LR as compare to MCYST-RR revealed that MCYST-RR gave R^2 at 0.9911 and exponential correlation with the equation of $y=66.005e^{-0.5355x}$. On the other hand, MCYST-YR and MCYST-LR yields R^2 at 0.9792 and 0.9771, respectively which resulted in the correlation equations of $y=68.292e^{-0.5186x}$ and $y=66.115e^{-0.5072x}$, respectively. In conclusion the cross reactivities of antibody to standard MCYST-YR and MCYST-LR

were at 86.3% and 94.2%, respectively suggested that this method could be used effectively for determining total microcystin content of water.

Recovery rates of MYCST-RR at the concentrations of 0.5, 1, 5 และ 10 ppb in distilled water and tap water resulted in surprisingly high values of 96.67, 90.73, 98.6, 89.2% and 92.0, 85.0, 102.3, 88.7, 85.1%, respectively. In addition, determination of limit of detection (LOD) using direct competitive ELISA techniques by spiking 0.2 ppb of standard microcystin in distilled water, tap water and natural pond water revealed the detection values close to the actual amounts and indicated the accuracy while HPLC technique could not detect the toxin at all.

From the results of the above experiments, prototype of an ELISA kit for detection of microcystin in water was successfully developed. The kit could detect toxin at the level as low as 0.2 ppb (by ELISA Reader) or at the level of 0.5 ppb (by naked eye). Both levels were far below safety limit recommended by World Health Organization at 1 ppb.

From the success in development of the kit, commercial production of this kit should be implemented. The product can be used by several organizations that involve in production and monitoring of water quality, for example, Metropolitan Waterwork Authority, Provincial Waterwork Authority, Electric Generating Authority of Thailand and Ministry of Natural Resources and Environment. However, further research on factors affecting efficiency, accuracy and limitation of the kit should be carried out.

Keywords : ELISA Kit, Microcystin, polyclonal antibody, Thailand

คำนำ

ปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์และการตายของสัตว์เลี้ยงหลายแห่งทั่วโลก เช่น การปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ในประเทศไทย (อาภารัตน์และคณะ 2542) การเกิดโรคตับอักเสบระบาดอย่างรุนแรงในประชากรใน Palm Island รัฐ Queens land ประเทศออสเตรเลีย (Baurke et. al., 1983) การเกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้น ของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979 and Yu, 1989) เป็นต้น ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษนี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* และ *Nodularia* โดยสามารถเจริญเติบโตรวดเร็วในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งมีผลกระทบต่อนิเวศน์วิทยาอย่างกว้างขวาง

ปัญหาการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียที่สารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำจึงเป็นปัญหาใหม่ที่หน่วยงานต่างๆ กำลังให้ความสนใจและเร่งดำเนินการแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำเพื่อการบริโภคให้ปลอดจากสารพิษเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่จำเป็นต้องเร่งศึกษา เนื่องจากสารพิษถูกกำจัดได้ยากในกระบวนการการผลิตน้ำประปา มีรายงานว่าสามารถตรวจพบสารพิษไมโครซิสติน (microcystin, MCYST) จากไซยาโนแบคทีเรียนี้ได้ในน้ำประปาของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย ด้วยการใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC, ELISA และทดสอบความเป็นพิษกับหนู (Chorus and Bartram, 1999) ซึ่งในปี ค.ศ. 1997 องค์การอนามัยโลก (WHO) จึงได้มีข้อกำหนดค่าความปลอดภัยสำหรับการปนเปื้อนของสารพิษ microsystin LR และสารเทียบเท่า ได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำดื่ม

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียผลิตสารพิษสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Microcystis aeruginosa* โดยตรวจพบในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำจากเขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสระน้ำเลี้ยงเป็ดหน้าเรือนจำคลองเปรมกรุงเทพฯ และยังได้สรุปว่าแหล่งน้ำภายในประเทศขณะนี้กำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรม ก่อให้เกิดอันตราย หากประชากรมีการบริโภคน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษนี้เป็นประจำ (อาภารัตน์และคณะ 2542) นอกจากนี้การสำรวจของ วิเชียร และคณะ (2001) ยังพบว่ามีการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการเกษตร อุปโภค-บริโภค และเพื่อการพักผ่อน

จากปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษนี้แนวทางหนึ่งที่จักช่วยหลีกเหลี่ยงการใช้น้ำที่มีสารพิษปนเปื้อน คือการหาวิธีตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ผ่านมาการวิเคราะห์หาสารพิษกลุ่มนี้จะใช้เทคนิคทาง HPLC ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษ microcystin หลักได้แก่ MCYST-LR, MCYST-RR และ MCYST–YR ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวไม่เพียงพอในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนระดับต่ำ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีความชำนาญ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจหาสารพิษได้ครอบคลุมกว้างขวาง มีความไวสูง ไม่เจาะจงชนิดของไมโครซิสตินที่มีอยู่มากชนิด และยังสะดวกในการตรวจหาสารพิษจากตัวอย่างจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีอย่างยิ่งในการช่วยตรวจหาสารพิษในระยะปฐมภูมิ ปัจจุบันบริษัทในต่างประเทศได้ผลิต ELISA KIT ขายในราคา KIT ละ 396 เหรียญดอลลาห์สหรัฐ ราคาต่อตัวอย่างคิดเป็น 9 เหรียญ ซึ่งเป็นราคาวิเคราะห์ต่อตัวอย่างที่ค่อนข้างสูงมากอีกทั้งน่ามีความจำเพาะต่อตัวอย่างในประเทศสหรัฐอเมริกา

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนา ELISA Kit ต้นแบบเพื่อใช้ตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินโดยการผลิตแอนติซีรัมแบบ polyclonal antibody ให้มีคุณภาพดี และพัฒนาให้เป็น ELISA kit ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งผลจากการวิจัยจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อแนวทางการหลีกเลี่ยงและป้องกันกำจัดการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่อไป

1. ความเป็นพิษและผลกระทบของไมโครซิสติน

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย ในแหล่งน้ำก่อให้เกิดผลกระทบอย่างกว้างขวางทั้งทางสิ่งแวดล้อม สังคม เศรษฐกิจ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ลอยตัวอยู่บนผิวน้ำนอกจากจะทำให้ทัศนียภาพโดยรวมต้องเสียไปและส่งกลิ่นที่น่ารังเกียจแล้ว ยังทำให้รสของน้ำดื่มที่ผ่านการบำบัดแล้วเปลี่ยนไปอีกด้วย การย่อยสลายของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมาก ทำให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำลดน้อยลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อความสามารถในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำต่าง ๆได้ ที่น่าเป็นห่วงที่สุดในแง่ของสุขอนามัยของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงก็คือ การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นพิษอย่างสูง ซึ่งสารทุติยภูมิเหล่านี้มีทั้งชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxin) และชนิดที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (biotoxin) (Carmichael, 1992) สารพิษกลุ่มดังกล่าวนั้นจะประกอบด้วยสาร alkaloid ที่เป็นพิษต่อระบบประสาทเช่น anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin และสารพิษที่ทำให้สัตว์น้ำชนิดมีเปลือกเกิดอาการอัมพาต โดยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อตับในสัตว์ชั้นสูงที่พบเห็นได้บ่อย เช่น ไมโครซิสติน และ nodularins เป็นสารพวก cyclic peptide ส่วนสารพิษ cylindrospermopsin เป็นสารพวก alkaloid (Anderson et. al., 1993)

สารไมโครซิสตินนั้นถูกสร้างโดย ไซยาโนแบคทีเรียทั้งชนิดที่เป็นเส้นสาย (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, และ *Hapalosiphon*) หรือชนิดที่เป็นกลุ่มโคโลนีอย่าง *Microcystis* เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบสารที่มีโครงสร้างคล้ายไมโครซิสตินในแหล่งน้ำทะเล (Anderson et. al., 1993) แต่ยังไม่สามารถระบุถึงชนิดของจุลชีพที่สร้างสารพิษนี้

2. ผลต่อสุขอนามัยของคนและสัตว์

จากการรวบรวมหลักฐานการเจ็บป่วยของคนที่ได้รับสารพิษจาก ไซยาโนแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสารไมโครซิสตินส่วนใหญ่เกิดจากการท่องเที่ยวตามทะเลสาบและแม่น้ำ (การสัมผัสทางปากและทางผิวหนัง) การดื่มน้ำหรือกินอาหารเสริมที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย (การสัมผัสทางปาก) และการใช้ท่อฝักบัวอาบน้ำ (การสัมผัสทางการสูดดม) ระยะเวลาที่ร่างกายจะมี

โอกาสสัมผัสกับสารพิษนั้นจะขึ้นอยู่กับที่ตั้ง ทางภูมิศาสตร์ของสถานที่ (3-5 เดือนในหนึ่งปีสำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา จนถึง 6-10 เดือนสำหรับประเทศออสเตรเลียและสหภาพอัฟริกาใต้) ประเทศจีนได้มีการศึกษาทางระบาดวิทยาที่อาจพบความสัมพันธ์ระหว่างอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งกับการได้รับสารอาหาร และน้ำดื่มที่ปนเปื้อนสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย (Falconer et. al., 1994)

การวิจัยทางด้านระบาดวิทยาที่กระทำการอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปีในประเทศจีนได้แสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับในมนุษย์นั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับแหล่งของน้ำดื่ม โดยจะเห็นจากข้อมูลว่า ในกลุ่มประชากรชนบทที่ดื่มน้ำจากแหล่งน้ำบนผิวดินจะมีโอกาสเป็นโรคมะเร็งได้มากกว่ากลุ่มที่ดื่มน้ำจากบ่อน้ำ (Yu, 1989) การศึกษาของ Carmichael (1992) ได้ตั้งข้อสังเกตไว้ว่าความสัมพันธ์นี้น่าจะสืบเนื่องมาจากการที่แหล่งน้ำดื่มบนผิวดินนั้นมีการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียซึ่งความเกี่ยวพันกันของข้อมูลนั้นได้มาจากการศึกษาผลทางชีวภาพของสารพิษไมโครซิสติน คนที่ได้รับสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียจะมีอาการระคายเคืองตาและผิวหนัง อาการไข้ละอองฟาง มึนงง เหนื่อยง่าย และกระเพาะลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ซึ่งอาการเจ็บป่วยที่กล่าวมานี้ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเกิดขึ้นจากสารพิษจำพวก hepatotoxins หรือ neurotoxins

การตายและการเจ็บป่วยของ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และปลา รวมทั้งนก เนื่องจากการกลืนกินเอาสารพิษทั้งชนิด neurotoxins และ hepatotoxins ลงไปในปริมาณ 90% ของความเข้มข้นที่เป็นอันตรายถึงชีวิตลงไป กลับไม่ปรากฏผลที่เลวร้ายแต่ประการใด ขนาดและชนิดของสัตว์มีส่วนในการทำลายความเป็นพิษของสารที่กลืนกินลงไปภายในร่างกาย โดยปกติพบว่า สัตว์ที่มีกระเพาะเดียวจะมีความสามารถต้านทานสารพิษได้ดีกว่าสัตว์ที่มีสองกระเพาะ สาเหตุการตายของหนูที่ได้รับสารพิษนั้นเกิดจากการช็อคเนื่องจากเลือดไหลไม่หยุดและตับวาย (Theiss et. al., 1988)

Falconer et. al. (1988) ได้ทำการทดลองให้หนูดื่มน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Microcystis aeruginosa* ในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่า lethal concentration เป็นเวลาติดต่อกันนาน 1 ปี ผลการศึกษาสรุปได้ว่า หนูที่ดื่มน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษจะมีอัตราการตายสูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับสารพิษ และหนูเพศผู้จะมีอัตราการตายสูงกว่าหนูเพศเมีย นอกจากนี้ หนูที่ได้รับสารพิษแบบเรื้อรังยังมีการเกิดโรคปอดบวมสูงขึ้นตามอายุอีกด้วย

นอกจากนี้ไมโครซิสตินยังมีความคงทนต่อสภาพพีเอช ที่เป็นกรดเท่ากับ 2-4 และทนต่อความร้อน ดังนั้นความเข้มข้นของสารพิษในแหล่งน้ำจึงอาจสะสมเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาในแหล่งน้ำได้นาน (Fitzgeorge et. al., 1994)

3. ผลของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

มีรายงานเกี่ยวกับสารพิษที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่หลายแห่งพบความเข้มข้นของสารพิษอยู่ในช่วงน้อยกว่า 1 จนถึง 8,600 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งและมักจะพบสารพิษมากกว่า 1 ชนิด โดยความเข้มข้นของสารพิษมีผลต่อ plankton และจุลินทรีย์ในธรรมชาติหลายชนิดพบว่ามีความไวต่อสารพิษและทำให้เกิดการสะสมสารพิษในห่วงโซ่อาหาร

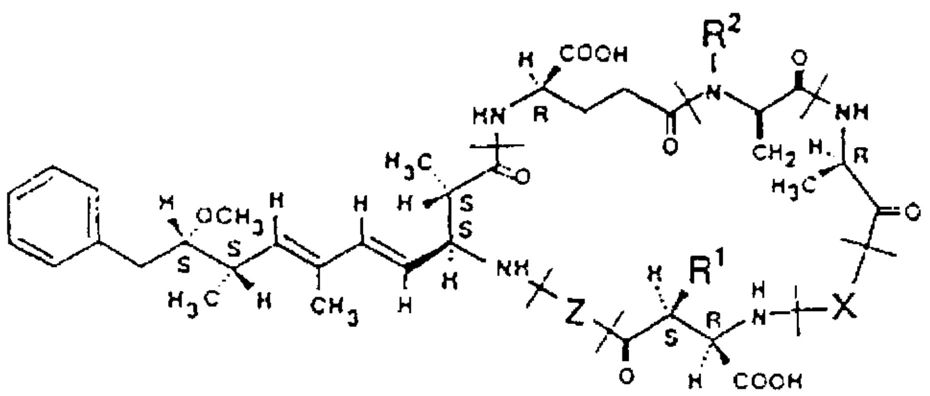
จากการศึกษาความเป็นพิษของสารพิษไมโครซิสตินในปลา (Philips et. al., 1985) พบว่า สารพิษนี้มีผลต่อปลาเช่นกัน สำหรับ การศึกษาในปลาคาร์ป (Rabergh et. al.,1991) และในปลาทอง (Sugaya et. al.,1990) พบว่า ปลามีความสามารถในการทนต่อสารพิษได้สูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น มีการศึกษาถึงการสะสมสารพิษไมโครซิสตินในสิ่งมีชีวิตที่เป็นห่วงโซ่อาหารอยู่ 2 รายงานด้วยกัน คือ การสะสมในหอย *Anadonta cygnea* (Eriksson et. al.,1989) และในแพลงค์ตอนสัตว์ *Bosmina fatalis* (Watanabe et. al.,1992) นอกจากนี้ ยังพบว่าไมโครซิสตินยังเป็นพิษต่อยุง (Turell and Middlebrook,1988) และไรน้ำ (daphnia) (Nizan et. al., 1986)

4. โครงสร้างทางเคมีและลักษณะจำเพาะของสารพิษไมโครซิสติน

Botes et. al. (1982) พบว่าไมโครซิสตินมีโครงสร้างเป็นวงแหวนวงเดียวที่ประกอบขึ้นจากกรดอะมิโนมาตรฐาน 5 ตัวและกรดอะมิโนพิเศษ 2 ตัว กรดอะมิโนมาตรฐาน 5 ตัวนี้แบ่งออกเป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่ในไมโครซิสตินทุกชนิดจำนวน 3 ตัวได้แก่ D-alanine (Ala), *erythro*- β-methylaspartic acid (β-Me-Asp), และ γ-linked glutamic acid (Glu) และกรดอะมิโนคู่ที่แตกต่างออกไปตามชนิดของสารพิษอีกจำนวน 2 ตัว ซึ่งเท่าที่มีการค้นพบมีจำนวนมากกว่า 50 ชนิด แต่ที่พบบ่อยมีอยู่ 3 ชนิด คือ arginine และ arginine (RR), leucine และ arginine (RR), tyrosine และ arginine (YR) สำหรับกรดอะมิโนพิเศษทั้ง 2 ตัวนั้น ได้แก่ 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2, 6, 8, - trimethyldeca-4, 6-dienoic acid (Adda) และ *N*-methyldehydroalanine (Mdha)

5. ความคงตัวของสารพิษไมโครซิสติน

สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินเป็นสารประกอบจำพวก heptapeptide ชนิดวงแหวนที่เสถียรต่อปฏิกิริยาเคมีสูง โดยสารพิษนี้จะมีครึ่งชีวิตประมาณ 3 สัปดาห์ภายใต้สภาวะที่พีเอชเท่ากับ 1 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การทำลายสารพิษนี้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องใช้การกลั่นด้วยกรดที่มีฤทธิ์



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารพิษไมโครซิสติน Cyclo-(D-Ala^1-X^2-D-$MeAsp^3$-Z^4-$Adda^5$-D-Glu^6-$Mdha^7$)

กัดกร่อนสูงมากเช่น 6N hydrochloric acid หรือ trifluoroacetic acid และสารกลุ่มนี้ยังทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปอย่างเช่น trypsin ได้มีการศึกษาถึงการสลายตัวของสารไมโครซิสตินด้วยรังสี โดยใช้แสง fluorescence และแสงอาทิตย์ ผลการทดลองพบว่ารังสีไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสลายตัวของสารนี้ เมื่อตั้งสารละลายของสารนี้ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ทิ้งไว้นาน 26 วัน และตั้งสารละลายของสารพิษนี้ในน้ำที่มีส่วนผสมของรงควัตถุภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น chlorophyll a, β-carotene, และ phycocyanins ภายใต้แสงอาทิตย์เป็นเวลานาน 15 วัน พบว่าปริมาณของไมโครซิสตินจะลดลง แสดงว่ารงควัตถุเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไมโครซิสติน แต่การทดลองทำนองเดียวกันนี้โดยใช้แสง fluorescence กับสาร MCYST-LR พบว่าแสงไม่มีผลต่อการสลายตัวแต่ประการใด

จากการศึกษาผลของรงควัตถุที่มีต่อการเกิด isomerization สรุปได้ว่า ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ กระบวนการสลายตัวด้วยแสงและกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงเรขาคณิตของสารให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษจะเกิดขึ้นพร้อมๆกัน การสลายตัวจะเกิดขึ้นเร็วกว่าหากมีความเข้มข้นของรงควัตถุสูง นอกจากนี้รงควัตถุยังส่งผลต่อการเกิด isomerization ของสาร โดยที่อัตราการเกิด isomerization จะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของรงควัตถุ (Tsuji et. al., 1994)

6. การขจัดสารพิษไมโครซิสตินโดยกระบวนการบำบัดน้ำ

กระบวนการบำบัดน้ำเพื่อใช้ในการบริโภคที่มีอยู่นั้นสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆได้ 3 ประเภทด้วยกันคือ กระบวนการจับตัวเป็นก้อนของแข็งและการกรอง กระบวนการใช้สารที่เป็น oxidant และกระบวนการดูดซับโดยผงถ่าน จากการศึกษาพบว่าไมโครซิสติน และ nodularins สามารถถูกทำลายอย่างรวดเร็วด้วย aqueous chlorine และ calcium hypochlorite โดยสารทั้งสองมีประสิทธิภาพในการขจัดอยู่ที่ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ sodium hypochlorite กลับมีประสิทธิภาพในการขจัดทั้งสองชนิดต่ำกว่า calcium hypochlorite มาก (ประมาณ 40 เปอร์เซนต์) (Nicholson et. al., 1994)

ผลการศึกษาการขจัดสารพิษด้วย ozone พบว่าสามารถขจัดไมโครซิสติน, nodularins และ anatoxin-a ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้โดยสิ้นเชิง (Keijola et. al., 1988) และประสิทธิภาพในการขจัดนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของ ozone ที่ใช้ (Himberg et. al., 1989) ถึงแม้ว่ากระบวนการ ozonolysis ของ microcystin-LR และ nodularins จะให้สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไม่เป็นอันตราย (Namikoshi et. al.,1992) แต่มันก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาดูว่าสาร intermediate ที่เกิดขึ้นในระหว่างการสลายตัวนั้นมีสารใดบ้างที่อาจเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงได้

ผงถ่านสามารถดูดซับสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำรวมทั้งสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดออกจากน้ำอย่างได้ผล (Himberg et. al., 1989) อย่างไรก็ดีการทำงานของผงถ่านนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของผงถ่าน และวิธีการเติมผงถ่านลงในน้ำที่ต้องการบำบัด

7. กระบวนการวิเคราะห์สารพิษ

7.1 การสกัด

วิธีการสกัดสารไมโครซิสตินโดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม methanol-*n*-butanol-water ในอัตราส่วน (1:4:15) ได้รับการยอมรับว่าให้ผลการสกัดที่ดี (Meriluoto and Eriksson, 1988) แต่การใช้ 5% acetic acid ในการสกัดเซลล์ที่ถูก lyophilized ก็ให้ผลดี อีกทั้งผลิตภัณฑ์จากการสกัดสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนของการขจัดสิ่งปลอมปนได้โดยตรง (Harada et. al., 1988) อย่างไรก็ตาม การแยกสกัดไมโครซิสตินประเภทที่เป็น hydrophobic ออกจากเซลล์โดยกรรมวิธีนี้อาจให้ผลลัพธ์ที่ไม่ดีเท่าที่ควร (Lawton et. al., 1994) ได้มีการเสนอว่า 100%methanol น่าจะเป็นสารเคมีที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสกัดไมโครซิสตินอีกทั้งยังมีความสะดวกในขั้นตอนของการเพิ่มความเข้มข้นของสารเนื่องจาก methanol เป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำสามารถระเหยง่าย แต่ประสิทธิภาพในการสกัดไมโครซิสตินประเภทที่มีขั้วสูงก็อาจให้ผลลัพธ์ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งข้อจำกัดนี้ก็สามารถแก้ไขได้ง่ายโดยการเติมน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยลงไปในตัวสกัด ได้พิสูจน์ว่า การใช้ตัวทำละลายผสม methanol : water (75 : 25 w/w) จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดไมโครซิสตินสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำไปใช้กับ lyophilized cell ของ *Microcystis*

7.2 การขจัดสิ่งปลอมปน

ขั้นตอนการขจัดสิ่งปลอมปนที่อยู่ในสารตัวอย่างออกโดยที่ไม่รบกวนสารพิษที่ต้องการ โดยเฉพาะสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก นอกจากนั้นกระบวนการขจัดสิ่งปลอมปนจะมีข้อดีคือสามารถทำให้ได้สารพิษที่มีความเข้มข้นขึ้น ซึ่งขั้นตอนนี้จะจำเป็นหรือไม่ขึ้นอยู่กับความแม่นของการตรวจวัด และปริมาณของสารที่มีอยู่ (Lawton et. al., 1994)

ขั้นตอนการขจัดสิ่งปลอมปนออกจากสารไมโครซิสตินที่ต้องการนั้นส่วนใหญ่มักจะใช้วิธี solid phase extraction ซึ่งให้ผลที่มีประสิทธิภาพและ reproducibility สูง อีกทั้งยังมีผลิตภัณฑ์ทางการค้าสำเร็จรูปแบบ C-18 cartridge (ODS siliga gel) (Harada et. al., 1988)

7.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์

7.3.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

การใช้เทคนิค TLC ทั้งประเภท normal phase และ reversed phase ในการสกัดและทำให้สารพิษที่เป็นสายเปปไทด์บริสุทธิ์ขึ้นนั้นเป็นสิ่งที่ไม่ยุ่งยากและไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่สลับซับซ้อน และทั้งสองวิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายผสม chloroform-methanol-water เป็น mobile phase (Al-Lay et. al., 1988) การใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยนั้นมีข้อดีอีกประการหนึ่งคือ น้ำจะช่วยลดการทำงานของสารประกอบจำพวก silanols บนผิวของแผ่น TLC สำหรับสารไมโครซิสตินนั้น พบว่าสามารถใช้ระบบตัวทำละลายผสม 2 ระบบด้วยกันคือ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4 : 6 : 1) และ ethyl acetate-isopropanol-water ในอัตราส่วน (4 : 3 : 7) (Harada et. al., 1988) ซึ่งระบบตัวทำละลายผสมชนิดหลังนี้ใช้ในการแยก desmethylated MCYST-LR (Harada et. al., 1991) นอกจากนี้ยังมีการใช้ระบบตัวทำละลายผสมอีกระบบหนึ่งคือ *n*-

butanol-acetic acid-water เป็น mobile phase นอกเหนือจากการใช้ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4:6:1) ในการแยก MCYST-YR และ MCYST-LR ด้วย normal phase TLC (Kungswan et. al., 1988) และในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค TLC ให้สามารถแยกสารพิษไมโครซิสตินให้บริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิมโดยใช้เทคนิค high performance thin layer chromatography (HPTLC) หลักการคือ ใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่มีขนาดอนุภาคที่ละเอียดมาก ใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็น chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4:6:1) และตรวจดูสารพิษภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

7.3.2 Gas Chromatography (GC)

เทคนิคการวิเคราะห์หาไมโครซิสตินด้วยการใช้ gas chromatography นั้นสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณของไมโครซิสตินทั้งหมดในสารตัวอย่างได้เท่านั้น เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ Adda ตัวหนึ่งคือ 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) (Tanaka et. al., 1993) เทคนิคใหม่ที่มีผู้นำมาใช้วิเคราะห์หาไมโครซิสติน คือ capillary zone electrophoresis และตรวจจับด้วย laser fluorescence (Wright et. al., 1989)

7.3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินโดยใช้วิธี reversed phase HPLC ในการคัดแยกและทำให้สารพิษบริสุทธิ์ขึ้น เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณของไมโครซิสตินเซลล์ที่ผ่านการ lyophilized หลังจากที่สารพิษผ่านการขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกแล้ว นำมาแยกส่วนของสารพิษด้วย ODS siliga gel โดยใช้ 26%acetonitrile ต่อ 10mM ammonium acetate เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) (Krishnamurthy et. al., 1986) และแม้ว่าวิธีการนี้จะถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางก็ตาม แต่ก็พบว่าไม่สามารถแยก MCYST-LR และ -YR ออกจากกันได้ (Harada et. al., 1988) จากการศึกษาต่อมาพบว่าการใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็น methanol ต่อ 0.1%TFA จะสามารถแยกไมโครซิสตินทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้ (Kungswan et. al., 1987) ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนาการใช้ระบบสารละลายเคลื่อนที่แบบผสมของ methanol ต่อ 0.05%TFA, methanol ต่อ 0.05M-phosphate buffer pH3 ในอัตราส่วน (60:40), และ methanol ต่อ 0.05M sodium sulfate โดยใช้ ODS column และใช้ UV detector ในการตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานทำให้การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Harada et. al., 1988)

7.3.4 การตรวจวัดโดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยา

การใช้เทคนิคด้าน ELISA มาใช้ตรวจวัดปริมาณของสารพิษไมโครซิสตินนับว่าเป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในกรณีที่ต้องการตรวจสอบหาสารพิษในสารตัวอย่างจำนวนมากอย่างรวดเร็วเนื่องจากวิธีการนี้มีความไว ความจำเพาะ และความสะดวก Kfir et. al. (1986) เป็นผู้

บุกเบิกการใช้ ELISA ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินโดยการใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ MCYST-LA

8. ระบบภูมิคุ้มกัน

สิ่งมีชีวิตสามารถสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายที่เรียกว่า "antigen" หรือ "immunogen" ซึ่งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมี 2 ชนิดคือ ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular immunity) หมายถึงภูมิคุ้มกันจำเพาะที่ใช้เซลล์ที่จำเพาะต่อแอนติเจน คือ T lymphocyte และภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immunity) หมายถึงภูมิคุ้มกันจำเพาะที่ใช้สารน้ำ คือ แอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติเจนในการกำจัดแอนติเจน (สุทธิพันธ์, 2537)

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย B lymphocyte จะเข้าจับกับสิ่งแปลกปลอมและทำงานร่วมกับ major histocompatibility complex (MHC) เพื่อนำเสนอแอนติเจนออกสู่ผิวเซลล์ โดยจะนำเสนอให้กับ T-helper (T_h) cell ที่มี receptor ต่อโครงสร้างของแอนติเจนนั้น T_h จะเกิดการเพิ่มจำนวนและหลั่งลิมโฟไคน์ (lymphokine) ออกมากำจัดแอนติเจน และยังหลั่งลิมโฟไคน์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ B cell ทำให้ B cell เปลี่ยนเป็น plasma cell และผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนออกมา (Germain, 1986)

แอนติเจนคือสารซึ่งสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีหรือ T lymphocyte ชนิดจำเพาะได้ (immunogenicity) และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีหรือ T lymphocyte นั้นๆ (specific reactivity) ดังนั้นแอนติเจนจะต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการนี้ โดยทั่วไปแล้วแอนติเจนจะประกอบด้วย epitope หรือ antigenic determinant คือ ตำแหน่งย่อยๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีหรือ T lymphocyte ที่จำเพาะ แอนติเจน 1 โมเลกุลจะมี epitope ได้มากมายและแอนติเจนชนิดหนึ่งๆ จะมีจำนวน epitope อยู่บนโมเลกุลไม่เท่ากัน เช่น โมเลกุลของไข่ขาว (albumin) ของไข่ไก่มี 5 epitope ส่วนโมเลกุลของ thyroglobumin มี 40 epitope เป็นต้น แอนติบอดีหรือ T lymphocyte ชนิดจำเพาะที่เกิดจากการกระตุ้นของ epitope ใดจะมีความจำเพาะต่อ epitope นั้นเท่านั้น (สุทธิพันธ์, 2537)

สำหรับสารโมเลกุลเล็กๆ ที่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) แต่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีหรือ T lymphocyte แบบจำเพาะได้ (specific reactivity) เรียกว่าแฮปเตน (hapten) แต่ถ้านำไปจับกับสารพาหะที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (carrier) ก็จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ (Hermanson, 1996)

สารพาหะที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (carrier) ที่นำมาใช้จับกับแฮปเตนแบ่งเป็น 3 ชนิดคือ

1. Protein carrier

1.1 Keyhole limpet haemocyanin (KLH)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 4.5×10^5-1.3×10^7 ประกอบด้วย primary amine ซึ่งได้จาก lysine, sulfhydryl ซึ่งได้จาก cystein และ tyrosine เนื่องจาก KLH เตรียมได้จาก

สิ่งมีชีวิตในทะเลจำพวกหอยและปลาหมึก (mollusk) คือ *Megathura crenulata* จึงทำให้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีเกลือสูง โดยจะตกตะกอนและสูญเสียสภาพ (denature) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ sodium chloride (NaCl) น้อยกว่า 0.6 M

1.2 Bovine serum albumin (BSA) และ cationized BSA (cBSA)

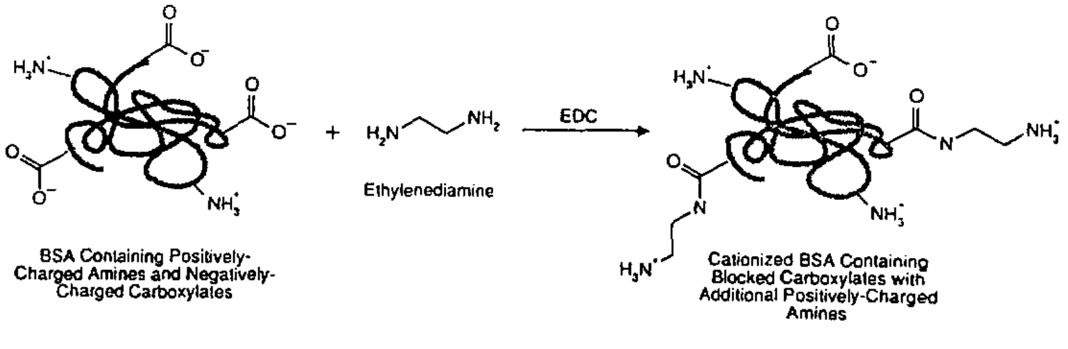
BSA มีน้ำหนักโมเลกุล 67000 ประกอบด้วย lysine 59 หมู่ แต่จะมีเพียง 30-35 หมู่เท่านั้นที่สามารถทำปฏิกิริยาควบคู่ (coupling) ได้, cystein 35 หมู่, tyrosine 19 หมู่, aspartic acid 39 หมู่ และ glutamic acid 59 หมู่ (Harlow and Lane, 1988) เนื่องจากประกอบด้วยหมู่ carboxylate group มากมายจึงทำให้ BSA มีประจุสุทธิเป็นลบ คือ มีค่า pI 5.1 (Cohn, 1947)

BSA และ cBSA เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดีและมีขนาดใหญ่ cBSA เตรียมได้จากการดัดแปลง (modification) หมู่ carboxylate ที่อยู่บน BSA ด้วยหมู่ amine ที่อยู่บน ethylenediamine (EDA) โดยใช้ water-soluble carbodiimide EDC เป็นตัวเชื่อม (cross-linking agent) ทำให้เกิดการสร้างพันธะ amide ระหว่าง carboxylate กับ primary amine ประจุลบของหมู่ carboxylate ก็จะถูกบดบัง (mask) ด้วยประจุบวกของ amine ทำให้ค่า pI สูงขึ้น โดยปกติแล้ว cBSA จะมีค่า pI สูงกว่า 11 (Muckerheide, 1987b)

การที่ cBSA มีประจุบวกสูงขึ้นจะส่งผลให้มี immunogenicity สูงขึ้นด้วย เนื่องจากสภาวะที่มีประจุบวกทำให้สามารถจับกับ antigen presenting cells (APC) ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มี pH ต่ำ ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เร็วกว่าและเกิดการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะได้ดีกว่าด้วย (Muckerheide, 1987a; Domen et. al., 1987; Apple et. al., 1988; Domen and Hermanson, 1992)

1.3 Thyroglobulin และ Ovalbumin (OVA)

Thyroglobulin และ Ovalbumin ไม่นิยมนำมาใช้เป็น carrier แต่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA เพื่อหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฮปเตน สารที่นำมาใช้เคลือบบน microplate จะต้องไม่ใช่ carrier ที่ใช้เชื่อมกับแฮปเตนและโครงสร้างจะต้องไม่คล้ายกับ carrier ด้วย สารทั้งสองชนิดนี้จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เคลือบบน microplate



ภาพที่ 2 การทำปฏิกิริยาระหว่าง BSA และ EDA ได้เป็น cBSA

OVA มีน้ำหนักโมเลกุล 43,000 เป็นโปรตีนที่ได้จากไข่ขาว ประกอบด้วย lysine 20 หมู่, tyrosine 10 หมู่, cysteine 6 หมู่, aspartic acid 14 หมู่ และ glutamic acid 33 หมู่ มีค่า pI 4.63 ไวต่ออุณหภูมิและละลายน้ำได้ยาก แต่สามารถละลายได้ใน 70%DMSO

Thyroglobulin มีน้ำหนักโมเลกุล 660,000 เป็น prohormone protein ที่สังเคราะห์ขึ้นมาและถูกเก็บไว้ที่ต่อม thyroid มีค่า PI 4.7

1.4 Tetanus Diphtheria Toxoid

Tetanus toxoid มีน้ำหนักโมเลกุล 150,000 ประกอบด้วยหมู่ amine 106 หมู่, sulfhydryl 10 หมู่, tyrosine 81 หมู่ และ histidine 14 หมู่ (Bizzini, 1970)

Diphtheria toxoid มีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ได้จาก แบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Corynebacterium diphtheriae* (Collier and Kandel, 1971)

2. Liposome carrier

สังเคราะห์ได้จาก phospholipid bilayer ประกอบด้วยส่วนหางเป็น hydrophobic และส่วนหัวเป็น hydrophilic เป็นอนุพันธ์ของ glycerylphosphate ที่ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine ที่มี primary amine เป็นส่วนประกอบ ทำให้เหมาะต่อการจับกับแฮปเตนหรือโมเลกุลอื่นได้ (Shek and Heath, 1983)

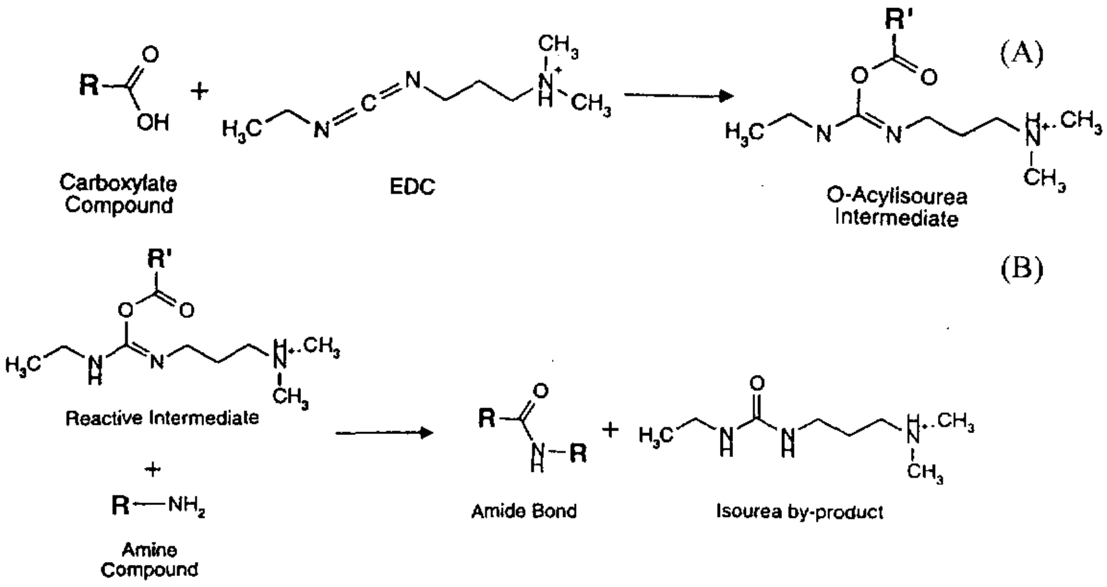
3. Synthetic carrier

ได้แก่ poly-L-lysine, poly-L-glutamic acid, Ficoll, dextran หรือ polyethylene glycol (Lee et. al., 1980; Fok et. al., 1982; Boyle et. al., 1983; Hopp, 1984; Wheat et. al., 1985) poly-L-lysine ประกอบด้วยหมู่ amine จึงสามารถจับกับสารโมเลกุลอื่นที่มี carboxylate เป็นส่วนประกอบ โดยใช้ carbodiimide เป็นตัวเชื่อม ทำให้สามารถจับกันได้ด้วยพันธะ amide ส่วน poly-L-glutamic acid ประกอบด้วยหมู่ carboxylate อาจจะจับกับสารโมเลกุลอื่นที่มีหมู่ amine ด้วยพันธะ amide โดยใช้ carbodiimide เป็นตัวเชื่อม สำหรับ Ficoll และ dextran ประกอบด้วยหมู่ aldehyde ซึ่งสามารถจับกับสารโมเลกุลอื่นที่มีหมู่ amine ได้

9. การทำปฏิกิริยาระหว่างแฮปเตนกับ carrier (Hermanson, 1996)

9.1 Carbodiimide-Mediated Hapten-Carrier Conjugation

ในการรวมสารตั้งแต่ 2 โมเลกุลเข้าด้วยกันจะต้องทำการเลือกตัวเชื่อม (cross-linker bridge) ที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการสร้างแอนติบอดีต่อตัวเชื่อม เพราะจะทำให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อแฮปเตนน้อยลง ซึ่งถ้าใช้ zero-length cross-linking โดยใช้ water-soluble carbodiimide EDC ก็สามารถกำจัดปัญหานี้ได้ เนื่องจากโมเลกุลของตัวเชื่อมจะหลุดออกไปหลังจากที่แฮปเตนกับ carrier ทำปฏิกิริยากันเสร็จแล้ว



ภาพที่ 3 แสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง carboxyl group และ amine โดยใช้ EDC carbodiimide เป็นตัวเชื่อม (A) คือ การทำปฏิกิริยาระหว่าง carboxyl group กับ EDC carbodiimide ได้ O-acylisourea intermediate (B) คือ การทำปฏิกิริยาระหว่าง O-acylisourea intermediate กับสารประกอบ amine เกิดการสร้างพันธะ amide ระหว่าง carboxyl group และสารประกอบ amine ได้ isourea ซึ่งเป็น by-product ออกมาด้วย

carbodiimide จะทำปฏิกิริยากับ carboxylate ได้ highly active O-acylisourea intermediate เมื่อ intermediate นี้ทำปฏิกิริยากับ primary amine ก็จะเกิดการสร้างพันธะ amide ระหว่างหมู่ carboxylate และหมู่ amine ขึ้น และจะปล่อย EDC mediator ออกมา คือ soluble isourea derivative (ภาพที่ 3)

EDC สามารถทำปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่เป็นกรดหรือกลาง แต่จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ pH 4.7

9.2 *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) Ester- Mediated Hapten-Carrier Conjugation

ใช้ homobifunctional reagent ที่ประกอบด้วย NHS ester ที่ปลายทั้ง 2 ข้างเป็นตัวเชื่อมหมู่ amine กับหมู่ amine เข้าด้วยกัน แล้วปล่อย NHS ออกมา

หรืออาจใช้ sulfo-NHS ester จับที่ปลาย carboxylate ของ carrier ก่อนโดยใช้ EDC เป็นตัวเชื่อม หลังจากนั้นก็ทำการเชื่อมหมู่ carboxylate กับ amine ด้วยพันธะ amide แล้วปล่อย sulfo-NHS ออกมา

9.3 *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) Ester- Maleimide Heterobifunctional Cross-linker-Mediated Hapten-Carrier Conjugation

ใช้เชื่อมปลาย primary amine กับหมู่ sulfhydryl group โดยใช้ sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) มีน้ำหนักโมเลกุล 436.37 การเชื่อมจะเริ่มจาก active sulfo-NHS ซึ่งอยู่ที่ปลาย sulfo-SMCC จะจับที่ primary amine บน carrier ก่อน จะเกิดการสร้างพันธะ amide ระหว่าง carrier และ cross-linker แล้วปล่อย sulfo-NHS ซึ่งเป็น by-product ออกมา และส่งผลให้หมู่ reactive maleimide group ที่อยู่บน sulfo-SMCC คือ thiol-reactive group จะเป็นตัวเชื่อมกับหมู่ sulfhydryl (เช่น cysteine) ที่อยู่บน peptide หรือแฮปเตนอื่น ส่งผลให้มีการสร้างพันธะ thioether ขึ้น เป็นพันธะที่มีความคงตัวสูง (stable)

9.4 Active-Hydrogen- Mediated Hapten-Carrier Conjugation

9.4.1 Diazonium conjugation

ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ และเป็นตัวเชื่อมของสารประกอบพวก hydrogen (Inman and Dintzis, 1969) สามารถจับกับแฮปเตนที่ประกอบด้วย phenolic หรือ lesser extent, imidazole group (Riordan and Vallee, 1972) ให้เชื่อมกับ sulfhydryl group หรือ primary amine (Glazer et. al., 1975) ส่วนใหญ่ใช้กับการเชื่อม hydrogen ที่อยู่ที่ปลาย tyrosine และ histidine residue แล้วสร้างพันธะ diazo เนื่องจาก diazonium ทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้บางครั้งเกิดการจับกับโมเลกุลของ carrier กันเองก่อนที่จะไปทำปฏิกิริยากับแฮปเตน ทำให้ควบคุมการ conjugate ยาก

9.4.2 Mannich condensation

ใช้เมื่อแฮปเตนไม่มีหมู่ functional group ร่วมกัน แต่มี active hydrogen โดยให้สารประกอบ hydrogen เกิดการ condensed กับ formaldehyde และ amine ในปฏิกิริยา mannich เป็นผลให้เกิดพันธะ alkylamine

9.5 Glutaraldehyde-Mediated Hapten-Carrier Conjugation

ทำปฏิกิริยากับ primary amine เพื่อสร้าง Schiff bases หรือ double-bond (Michael-type) ซึ่ง Schiff bases intermediate อาจจะสร้าง resonance-stabilized product กับ α, β-unsaturated aldehyde ของ glutaraldehyde polymer ซึ่งจะสัมพันธ์กับค่า pH (Korn et. al., 1972) ซึ่ง product นี้จะสามารถเชื่อมระหว่าง lysine 2 โมเลกุลเข้าด้วยกัน ใช้กับ carrier และแฮปเตนที่เกี่ยวกับ lysine ε–amine และ N-terminal α–amine group

9.6 Reductive-Amination-Mediated Hapten-Carrier Conjugation

เชื่อมโมเลกุลของแฮปเตนที่ประกอบด้วย aldehyde กับโมเลกุลของ carrier โดยวิธี reductive amination ที่ pH เป็นด่าง ที่หมู่ aldehyde group จะเกิดการสร้าง intermediate Schiff bases ที่เหมาะกับหมู่ amine ซึ่งอยู่บน carrier การ reduction ของ Schiff bases กับ sodium cyanoborohydride หรือ sodium borohydride ทำให้เกิดการ conjugate ที่คงตัว โดยเกิดพันธะที่ secondary amine

10. Zero-Length Cross-linkers (Hermanson, 1996)

คือสารที่มีขนาดเล็กที่สุดที่มีความสามารถในการทำให้สารตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปเชื่อมติดกันด้วยพันธะใดพันธะหนึ่ง แล้วตัวของมันเองก็จะหลุดออกมา ซึ่ง reagent ในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดการสร้างพันธะต่างๆ ได้ 3 ชนิดคือ พันธะ amide เกิดจากการเชื่อมหมู่ carboxylate กับหมู่ primary amine, พันธะ phosphoramidate เกิดจากการเชื่อมหมู่ organic phosphate กับหมู่ primary amine และพันธะ secondary หรือ tertiary amine เกิดจากการเชื่อมหมู่ primary หรือ secondary amine กับหมู่ aldehyde

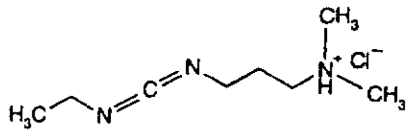
10.1 Carbodiimide

ใช้ในการสร้างพันธะ amide ระหว่าง carboxylate กับ amine หรือพันธะ phosphoramidate ระหว่าง phosphate กับ amine (Chu et. al., 1986; Ghosh et. al., 1990) แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ water-soluble และ water-insoluble

water-soluble สามารถละลายได้ในน้ำ และสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมเลกุลที่สามารถละลายน้ำได้ รวมทั้ง by-product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาคือ isourea ก็สามารถละลายน้ำได้เช่นกัน ทำให้สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ส่วน water-insoluble จะมีลักษณะตรงข้ามกัน คือ ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) จึงสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมเลกุลที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้ง by-product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาคือ isourea ก็ไม่สามารถละลายน้ำได้เช่นกัน

10.1.1 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC หรือ EDAC)

เป็น carbodiimide ที่นิยมใช้ในการทำ conjugation มากที่สุด เนื่องจากละลายน้ำได้ง่าย รวมทั้ง isourea ซึ่งเป็น by-product ของปฏิกิริยาก็สามารถละลายน้ำได้ จึงสามารถกำจัดออกด้วยวิธี dialysis หรือ gel filtration (Sheehan et. al., 1961; Sheehan et. al., 1965) สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของ EDC คือ pH 4.7-6



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้าง EDC

EDC สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ carboxylate ได้ intermediate คือ *O*-acylisourea ซึ่งintermediate นี้สามารถทำปฏิกิริยากับ nucleophile เช่น primary amine เกิดการสร้างพันธะ amide (Williams and Ibrahim, 1981) หรือสามารถทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl group เกิดการสร้างพันธะ thiol ester ถึงแม้ว่าพันธะนี้จะไม่ stable เท่ากับการทำปฏิกิริยากับ amine ก็ตาม

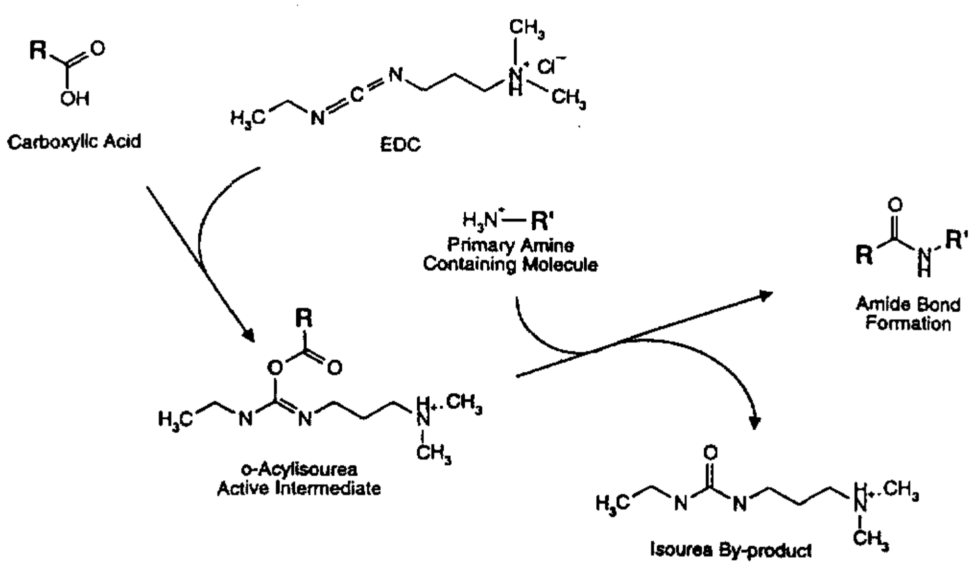
การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยน้ำจะไปแย่งจับ intermediate กลายเป็น isourea และเกิด carboxylate group ที่สามารถจับกับ amine ได้ด้วยพันธะ amide (Gilles et. al., 1990)

การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสามารถรักษา pH ให้คงที่โดยใช้กรด hydrochloric acid (HCl) แต่ถ้าทำการวัด pH ได้ยากก็สามารถใช้สารละลาย buffer แทน เช่น ถ้าต้องการทำปฏิกิริยาที่ pH ต่ำๆ สามารถใช้ 0.1 M MES (2-(*N*-morpholino) ethane sulfonic acid) buffer หรือถ้าต้องการทำปฏิกิริยาที่ pH เป็นกลางสามารถใช้ 0.1 M phosphate buffer ซึ่ง buffer เหล่านี้จะไม่รบกวนการทำปฏิกิริยา แต่ควรเลือก buffer ที่ไม่มี carboxylic acid, amine หรือ sulfhydryl เพราะอาจจะทำปฏิกิริยากับ EDC ได้

10.1.2 EDC plus Sulfo-NHS

EDC จะเข้าทำปฏิกิริยากับ carboxylate group เกิดเป็น active ester (*O*-acylisourea) สารประกอบนี้จะสลายตัวได้เร็วเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นน้ำ (Hoare and Koshland, 1967) ดังนั้นถ้า amine มีปริมาณน้อยหรือเติมลงไปช้า สารประกอบนี้ก็จะสลายตัวได้ การ conjugate ก็จะไม่เกิดขึ้น ดังนั้นการเติม sulfo-NHS ester โดยใช้หมู่ hydroxyl group ที่อยู่บน sulfo-NHS ทำปฏิกิริยากับ EDC active-ester complex จะช่วยยืดระยะเวลาความคงตัวของ activated carboxylate ได้นานขึ้น ส่วน amine ก็จะเข้าจับกับ carbonyl group ของ ester สร้างพันธะ amide ส่วน sulfo-NHS ก็จะหลุดออกอย่างรวดเร็ว (Staros, 1982; Anjaneyulu and Staros, 1987; Beth et. al., 1986; Kotite et. al., 1984; Donovan and Jennings, 1986; Denney and Blobel, 1984; Jennings and Nicknish, 1985) ส่วน sulfhydryl และ hydroxyl group ก็สามารถทำปฏิกิริยากับ active ester ได้เป็น thioester และ ester ตามลำดับ แต่จะเป็น product ที่ไม่คงตัว (unstable)

ปัญหาจากการใช้ EDC plus sulfo-NHS คืออาจจะเกิดการตกตะกอนของ conjugation complex ได้ เนื่องจากปริมาณของ EDC หรือ sulfo-NHS ที่ใช้ไม่เหมาะสม



ภาพที่ 5 แสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง carboxylic acid กับ pimary amine โดยใช้ EDC เป็นตัวเชื่อม

10.1.3 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide (CMC)

สังเคราะห์จาก metho *p*-toluene sulfonate salt เป็น water-soluble reagent ใช้เติมลงไปเพื่อช่วยสร้างพันธะ amide ระหว่าง carboxylate กับหมู่ amine นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ sulfhydryl group ได้โครงสร้างที่เป็น stable covalent complex หรือทำปฏิกิริยากับ phenol หรือ alcohol ก็ได้ กลไกการเกิดปฏิกิริยาเหมือนกับการใช้ EDC ทุกอย่าง แต่จะต่างกันที่ปริมาณของ CMC ที่เติมลงไปในสารละลายเพื่อใช้ทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ active ester ยังสามารถรวมตัวกับน้ำเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (hydrolysis) ได้เช่นกัน

10.1.4 Dicyclohexyl carbodiimide (DCC)

มีทั้ง water-soluble และ water-insoluble ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ หรือสังเคราะห์ peptide (Sheehan and Hess, 1955) อาจใช้ร่วมกับ NHS หรือ sulfo-NHS เพื่อสังเคราะห์พันธะ amide (Staros, 1982) แต่จะต่างจากการสังเคราะห์พันธะ amide โดยใช้ EDC/sulfo-NHS คือการสังเคราะห์ active ester ด้วย DCC จะทำในสารละลายอินทรีย์และจะไม่เกิดการรวมตัวกับน้ำ

DCC จะทำปฏิกิริยากับ carboxylate ได้เป็น O-acylisourea intermediate และเมื่อทำปฏิกิริยากับ amine ก็จะเกิดการสร้างพันธะ amide ขึ้นระหว่าง carboxylate และ amine แล้วปล่อย dicyclohexylisourea ออกมา แต่ถ้าไม่เติม amine ลงไป และมีปริมาณ DCC มากเกินพอ หมู่ carboxylate จะเข้าทำปฏิกิริยากับ intermediate เกิดเป็น symmetrical anhydride ทำให้ anhydride intermediate สามารถเกิดพันธะ amide กับ amine ภายใต้สภาวะที่มี anhydrous (Rebek and Feitler, 1974) การเติม DCC-activated carboxylate อาจจะทำปฏิกิริยากับ amino acid เกิดเป็น azlactone (Coleman et. al., 1990) ซึ่งทั้ง anhydride และ azlactone จะทำปฏิกิริยากับ amine เกิด

การสร้างพันธะ covalent amide และเมื่อ azlactone ทำปฏิกิริยากับ primary amine จะทำให้วงแหวนเปิดออก และเกิดการสร้างพันธะ amide

10.1.5 Diisopropyl carbodiimide (DIC)

เป็น water-insoluble ใช้ในการสร้างพันธะ amide การเกิดปฏิกิริยาคล้ายกับการใช้ DCC แต่จะมีข้อดีกว่าตรงที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่ DCC เป็นขี้ผึ้งแข็ง ไอระเหยเป็นอันตรายต่อตาและจมูก นอกจากนี้ยังแตกต่างกันที่ by-product ซึ่ง by-product จากการใช้ DIC คือ diisopropylurea และ diisopropyl-*N*-acylurea สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ง่ายกว่า DCU (dicyclohexylisourea) ซึ่งเป็น by-product จากการใช้ DCC

10.2 Woodward's reagent K (*N*-ethyl-3-phenylisoxazolium-3'-sulfonate)

เป็น zero-length cross-linking agent ที่สามารถสร้างพันธะ amide จาก carboxylate และ amine (Woodward et. al., 1961; Woodward and Olofson, 1961) ในสภาวะที่เป็นด่างจะเปลี่ยนเป็น reactive ketoketenimine ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ carboxylate เกิดเป็น enol ester ที่มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับ amine เกิดการสร้างพันธะ amide และปลดปล่อย inactive diketo derivative สารชนิดนี้จะสลายตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (Dunn and Affinsen, 1974)

10.3 *N, N'*-Carbonyldiimidazole (CDI)

เป็น highly active carbonylating agent ที่ประกอบด้วย acylimidazole 2 หมู่ เมื่อ CDI ทำปฏิกิริยากับ carboxylic acid group ได้เป็น *N*-acylimidazole ที่มี high reactivity สูง ซึ่งการสร้าง intermediate จะเกิดการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์และ imidazole (Anderson, 1958) active carboxylate จะทำปฏิกิริยากับ amine เกิดการสร้างพันธะ amide หรือทำปฏิกิริยากับ hydroxyl group เกิดการสร้างพันธะ ester (Paul and Anderson, 1960; 1962) แต่ถ้า CDI ทำปฏิกิริยากับ hydroxyl group เกิดการสร้าง intermediate คือ imidazolyl carbamate ซึ่งทำปฏิกิริยากับ amine แล้วปล่อย imidazole ออกมา ส่วน active hydroxylate จะทำปฏิกิริยากับ amine เกิดการสร้าง stable urethane (*N*-alkyl carbamate) linkage

CDI ทำปฏิกิริยาได้ดีในสารละลายที่ไม่ใช้น้ำ (nonaqueous) เพื่อป้องกันการสลายตัวของ CDI โดยกระบวนการ hydrolysis ถ้ามีน้ำ CDI จะรวมตัวกับน้ำอย่างรวดเร็วได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และ imidazole ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาควรจะให้มีน้ำได้ไม่เกิน 0.1% หรืออาจทำปฏิกิริยาใน dry organic solvent เช่น acetone, dioxane, DMSO, THF DMF

10.4 Schiff base formation and reductive amination

aldehyde และ ketone สามารถทำปฏิกิริยากับ primary และ secondary amine ได้เป็น Schiff bases โดยจะเกิดการสร้างพันธะ alkylamine ส่วน Schiff bases จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ใน aqueous solution หลังจากนั้น Schiff bases จะเกิดปฏิกิริยา reduction โดยใช้ reducing agent เช่น sodium cyanoborohydride เกิดการสร้างพันธะได้เป็น secondary amine

11. การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง (Harlow and Lane, 1988)

11.1 การเลือกสัตว์ทดลอง

การเลือกสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการทดลองควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ คือ ปริมาณ serum ที่ต้องการ, แหล่งของแอนติเจน, ต้องการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ด้วยหรือไม่, ปริมาณของแอนติเจนมีมากน้อยเพียงใด

11.1.1 ชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง

สัตว์มีกระดูกสันหลังที่นิยมใช้ในการผลิต antisera มี 5 ชนิด คือ กระต่าย, หนู mice, หนู rats, หนู hamsters และหนูตะเภา (guinea pigs) ปกติสามารถเจาะเลือดจากกระต่ายได้ serum ครั้งละ 25 มิลลิลิตร ในขณะที่ หนู mice สามารถเจาะได้ 100-200 ไมโครลิตร ส่วนหนู rats, หนู hamsters หรือหนูตะเภาสามารถเจาะได้ 1-2 มิลลิลิตร แต่ถ้าต้องการ serum ปริมาณมากกว่านี้ควรเลือกใช้สัตว์ที่มีขนาดใหญ่ เช่น หมู, ม้า, แกะ หรือลา

สำหรับกระต่ายนิยมใช้ในการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เนื่องจากมีขนาดใหญ่ หาซื้อง่าย ราคาถูก สามารถฉีดสารหรือเก็บเลือดได้ง่าย แอนติบอดีที่ได้มีลักษณะดีสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย และสามารถเก็บ serum จากกระต่ายได้มากถึง 500 มิลลิลิตร

ส่วนหนู mice, หนู rats, หนู hamsters และหนูตะเภาไม่นิยมใช้ในการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี เพราะว่าได้ปริมาณ serum น้อย แต่หนู (mice) สามารถสร้างแอนติบอดีได้มากในน้ำช่องท้อง (ascited fluid) ซึ่งทำให้มีไตเตอร์สูงเท่ากับที่ผลิตใน serum และสามารถเก็บน้ำช่องท้องได้มากถึง 10 มิลลิลิตร พวก small rodent ส่วนใหญ่จะใช้ในการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี เมื่อต้องการปริมาณแอนติบอดีน้อยๆ หรือปริมาณแอนติเจนมีจำกัด เพราะว่าถ้ามีแอนติเจนน้อยๆ จะเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าสัตว์ใหญ่ ส่วนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) นิยมใช้หนู mice และหนู rats

อายุของสัตว์ที่เหมาะสมต่อการทดลองคือ หนู mice 6 สัปดาห์ หนู rats อายุ 6-8 สัปดาห์ กระต่ายอายุ 12 สัปดาห์

11.1.2 จำนวนสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

สัตว์แต่ละตัวจะมีระบบทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงควรใช้สัตว์ทดลองมากกว่า 1 ตัว เพื่อเลือกตัวที่สามารถสร้าง

ภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด สำหรับกระต่ายควรใช้อย่างน้อย 2 ตัว แต่ปกติจะนิยมใช้ถึง 3-4 ตัว ส่วนหนู mice หรือพวก small rodent นิยมใช้ 3-6 ตัว

11.2 Adjuvant

นิยมใช้ร่วมกับ soluble antigen เพื่อกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น แต่จะไม่นิยมใช้กับแอนติเจนที่เป็น whole-cell หรือ particulate กลไกในการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัดแต่ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ป้องกันไม่ให้แอนติเจนถูกย่อยสลายด้วยกระบวนการ catabolism ภายในร่างกายเร็วเกินไป ส่วนใหญ่จะใช้สารพวก mineral oil หรือ aluminium hydroxide precipitate (Glenny et. al., 1926) และกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยกระตุ้นให้มีการหลั่งลิมโฟไคน์ (lymphokine) ซึ่งจะไปกระตุ้น activity ของ antigen presenting cell นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการอักเสบ (inflammatory) บริเวณที่ฉีด จึงควรเลือก adjuvant ที่เป็น heat-killed bacteria (Dienes, 1936) หรือ lipopolysaccharide (LPS) (Johnson et. al., 1956) เนื่องจาก LPS มีพิษเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตจึงนำมาใช้ในรูปของ lipid A ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำกว่าแต่เป็น adjuvant ที่มีคุณสมบัติดีเท่ากับ LPS โดย liposome จะทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านสารประกอบของ lipid A เข้าไปในเซลล์

แบคทีเรีย 2 ชนิดที่นิยมใช้เป็น adjuvant คือ *Bordetella pertussis* และ *Mycobacterium tuberculosis* จะนำแบคทีเรียทั้งเซลล์มาฆ่าด้วยความร้อน (heat-killed) *B. pertussis* ประกอบด้วยส่วนที่เป็น LPS และ pertussis toxin ส่วน *M. tuberculosis* นิยมใช้กับ complete Freund's adjuvant ส่วนที่จะไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันคือ muramyl dipeptide (MDP) (Ellouz et. al., 1974)

Freund's adjuvant ใช้เมื่อมีปริมาณแอนติเจนน้อยๆ แต่ถ้ามีปริมาณแอนติเจนมากหรือทราบส่วนประกอบของแอนติเจนว่าจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีอยู่แล้วก็ควรเลือกใช้ adjuvant ตัวอื่น เนื่องจาก Freund's adjuvant จะทำให้เกิดการอักเสบ ทำให้ไม่สามารถฉีดเข้าเส้นเลือด และไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับคน Freund's adjuvant มี 2 ประเภทคือ complete Freund's adjuvant (CFA) เป็น water-in-oil emulsion คือจะมีส่วนผสมของน้ำและน้ำมัน และ *M. tuberculosis* ที่ฆ่าให้ตายแล้ว และ incomplete Freund's adjuvant (IFA) เป็น water-in-oil emulsion ประกอบด้วยน้ำและน้ำมันเท่านั้น

aluminum hydroxide adjuvant เป็นการห่อหุ้มแอนติเจนด้วย aluminum salt การใช้ adjuvant ชนิดนี้อาจจะทำการเติม *B. pertussis* ที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อน aluminum hydroxide adjuvant สามารถฉีดเข้าร่างกายได้ทุกจุด ยกเว้นเมื่อเติม *B. pertussis* ห้ามฉีดเข้าเส้นเลือด

11.3 ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีด

ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดพิจารณาจากปัจจัย 2 อย่าง คือ ปริมาณที่เหมาะสมที่จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด และปริมาณแอนติเจนที่น้อยที่สุดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ยังควรพิจารณาปัจจัยอื่นๆ ประกอบ ได้แก่ สัตว์ทดลองที่ใช้ (host factor) ตำแหน่งที่ฉีด การเลือก adjuvant และปัจจัยภายในของแอนติเจนเอง

สัตว์แต่ละชนิดต้องการปริมาณแอนติเจนที่แตกต่างกัน เช่น กระต่ายใช้ 0.5-1 มิลลิกรัมในการฉีดแต่ละครั้ง ส่วนหนู mice ลดลงจากกระต่าย 10 เท่า คือ 50-100 ไมโครกรัม นิยมฉีดแอนติเจนในปริมาณต่ำก่อนแล้วค่อยฉีดกระตุ้นด้วยปริมาณที่สูงกว่าเดิม

11.4 รูปแบบของแอนติเจน

รูปแบบของแอนติเจนที่ใช้มีความสำคัญต่อการทดลองมาก ซึ่ง particulate antigen จะเป็น immunogen ที่ดีกว่า soluble antigen

11.5 ตำแหน่งที่ฉีด

พิจารณาจากชนิดและปริมาณของแอนติเจน รวมทั้งความต้องการที่จะให้แอนติเจนถูกปลดปล่อยเข้าในระบบหมุนเวียนได้รวดเร็วมากน้อยเท่าใด โดยตำแหน่งที่ใช้ฉีดมีดังนี้

11.5.1 Subcutaneous injections (sc)

เป็นการฉีดเข้าที่ใต้ผิวหนัง นิยมใช้โดยเฉพาะในกระต่าย หลังจากที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนังแอนติเจนจะเข้าไปอยู่ที่ต่อมน้ำเหลืองอย่างรวดเร็ว สัตว์ใหญ่เช่นกระต่ายจะทำการฉีด sc บนหลังหลาย ๆ จุด ในขณะที่หนู mice จะฉีดที่ด้านหลังคอเพียงจุดเดียว การฉีดแต่ละครั้งจะใช้ปริมาณแอนติเจนที่แตกต่างกัน เช่น หนู mice ใช้ 50-100 ไมโครลิตร หนู rat อาจสูงถึง 400 ไมโครลิตร ในขณะที่กระต่ายสามารถฉีดได้สูงถึง 800 ไมโครลิตร ในการฉีดปริมาณมากและผสมกับ Freund's adjuvant ไม่ควรฉีดตำแหน่งเดียวเพราะว่าจะทำให้เกิดการอักเสบ ควรแบ่งฉีดหลาย ๆ จุด ในกระต่ายอาจสูงถึง 10 จุด

11.5.2 Intramuscular injections (im)

เป็นการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ นิยมใช้เมื่อต้องการปลดปล่อยแอนติเจนเข้าสู่ระบบการไหลเวียนอย่างช้า ๆ แอนติเจนจะเข้าสู่กล้ามเนื้อแล้วส่งต่อไปยังช่องว่างใกล้ ๆ interstitial spaces แล้วไหลเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) สามารถใช้ particulate antigen ที่ผสมหรือไม่ผสม adjuvant ก็ได้ สำหรับในกระต่ายจะทำการฉีดที่กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง และสามารถฉีดได้ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อครั้ง (รัชนี, 2541; Harlow and Lane, 1988)

11.5.3 Intradermal injection (id)

เป็นการฉีดเข้าผิวหนัง ใช้เมื่อต้องการปลดปล่อยแอนติเจนเข้าสู่ระบบการไหลเวียนอย่างช้ามาก ๆ โดยทำการฉีดแอนติเจนเข้าระหว่างชั้นผิวหนัง ร่างกายจะดูดซับแอนติเจนเข้าไปอย่างช้า ๆ อาจใช้ particulate antigen ผสมกับ adjuvant ก็ได้ วิธีการนี้นิยมเมื่อมีแอนติเจนปริมาณน้อยแต่ความเข้มข้นสูงจึงควรฉีดหลาย ๆตำแหน่ง

11.5.4 Intravenous injection (iv)

ฉีดเข้าเส้นเลือด ไม่นิยมใช้ในการฉีดแอนติเจนเข้าไปเป็นครั้งแรกเพราะว่าแอนติเจนจะเข้าสู่ระบบการไหลเวียนโลหิตโดยตรงทำให้แอนติเจนถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างรวดเร็ว แต่จะนิยมใช้ในการฉีดเป็นครั้งที่ 2 หรือฉีดกระตุ้นครั้งต่อๆไป เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ระบบการไหลเวียนโลหิตก็จะถูกส่งต่อไปที่ตับ, ปอด และม้าม ไม่ควรฉีด toxin เข้าสู่เส้นเลือดเพราะว่าจะทำให้สัตว์ช้อคและตายได้ ห้ามใช้ Freund's adjuvant ฉีดเข้าสู่เส้นเลือดเป็นอันขาด แอนติเจนที่จะฉีดควรละลายอยู่ใน physiological buffer หรือ physiological salt ถ้าจำเป็นต้องมีสารพวก detergent ผสมอยู่ก็ควรควบคุมให้มีความเข้มข้นไม่เกิน 0.1% สำหรับ ionic detergent หรือ 0.2% สำหรับ nonionic detergent

11.5.5 Intraperitoneal injection (ip)

ฉีดเข้าช่องท้องเป็นวิธีที่ง่ายและเหมาะสำหรับ small rodent แอนติเจนจากช่องท้องจะไหลเข้าไปอยู่ที่ต่อมน้ำเหลือง เหมาะสำหรับ particulate antigen หรือแอนติเจนที่ผสมกับ adjuvant ส่วนใหญ่ใช้ในการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีในหนู mice เพราะว่าจะมีการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีมากมายอยู่ในน้ำช่องท้อง แต่การผสมแอนติเจนกับ complete Freund's adjuvant ไม่เหมาะสำหรับการผลิต hybridoma เพราะว่าจะทำให้เกิดฝี (granulomas) และทำให้เกิดการจับกันของเม็ดเลือดภายในช่องท้องส่งผลให้เกิดการทำลายม้าม การฉีดเข้าช่องท้องไม่นิยมในกระต่ายเพราะว่ามีขนาดใหญ่และสามารถเลือกฉีดที่ตำแหน่งอื่นที่สามารถทำได้ง่ายกว่า เช่น ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง, ผิวหนัง หรือเข้ากล้ามเนื้อ

11.6 การฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง

หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งแรกเข้าไป 5-6 วัน พบว่า B cell ที่มี receptor ต่อแอนติเจนจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเริ่มผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนโดยจะตรวจพบแอนติบอดีอยู่ใน serum หลังจากที่ทำการฉีดแอนติเจนครั้งแรกเข้าไป 7 วัน แต่พบว่ามีแอนติบอดีในระดับต่ำเนื่องจากแอนติเจนถูกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำลายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องให้สัตว์ทดลองรับแอนติเจนเข้าไปอีกอย่างน้อย 2-3 สัปดาห์หลังจากได้รับครั้งแรกเข้าไป แต่ไม่ควรเว้นระยะห่างมากกว่านี้ หนู mice และกระต่ายระบบภูมิคุ้มกันสามารถจดจำแอนติเจนได้นานเป็นปี เมื่อฉีดแอนติเจนครั้งที่ 2 เข้าไป B cell จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วภายใน 3-4 วัน และสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ในช่วงเวลานี้เช่นกัน แต่จะสูงขึ้นในวันที่ 10-14 ระดับแอนติบอดีจะยังคงอยู่ในระดับสูงประมาณ 2-4 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งที่ 2 เข้าไป การตอบสนองต่อแอนติเจนที่ได้รับเข้าไปเป็นครั้งที่ 3 หรือมากกว่านั้นจะทำให้เกิดการผลิตแอนติบอดีที่สูงขึ้นเรื่อยๆ สำหรับกระต่ายหลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งแรกควรทิ้งระยะเวลาในการฉีดครั้งต่อๆไปให้ห่างกันครั้งละ 4-6 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ตำแหน่งต่างๆ ที่ใช้ฉีดแอนติเจนในกระต่าย (Harlow and Lane, 1988)

ตำแหน่ง	ปริมาตรสูงสุด	adjuvant	Immunogen ที่ใช้	หมายเหตุ
subcutaneous (sc)	800 ไมโครลิตร ต่อจุด, 10 จุดต่อกระต่าย 1 ตัว	+/-	soluble หรือ insoluble	ฉีดง่าย
intramuscular (im)	0.5 มิลลิลิตร	+/-	soluble หรือ insoluble	ปล่อยเข้าสู่ร่างกายอย่างช้าๆ
intradermal (id)	100 ไมโครลิตร ต่อจุด, 40 จุดต่อกระต่าย 1 ตัว	+/-	soluble หรือ insoluble	ฉีดยาก, ปล่อยเข้าสู่ร่างกายอย่างช้าๆ
intravenous (iv)	1 มิลลิลิตร	ไม่ใช้ Freund's adjuvant	soluble, ionic detergent<0.2%, nonionic detergent<0.5%, salt<0.3M, urea<1M	ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการฉีดแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายเป็นครั้งแรก
lymph node	special uses	ไม่ใช้ Freund's adjuvant	soluble หรือ insoluble	เหมาะสำหรับผู้มีประสบการณ์สูง

12. ไตเตอร์

ในการทดสอบหาระดับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจโดยใช้การทดสอบที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้น วิธีการที่นิยมคือ การตรวจหาความเจือจางสูงสุดของสิ่งส่งตรวจที่ยังคงให้ผลบวกในการทดสอบนั้น และอ่านระดับความเจือจางนั้นเป็น "ไตเตอร์" หรือ "ติเตอร์" (titre, titer) ของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการตรวจ ตัวอย่างเช่น การตรวจหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดหนึ่งในเซรุ่ม ก และ ข เมื่อเจือจางเซรุ่ม ก 1:10, 1:20, 1:40 ....จนถึง 1:640 และทำการทดสอบพบว่าเซรุ่มที่เจือจาง ก 1:10, 1:20, 1:40 ให้ผลบวก แต่เซรุ่มที่เจือจาง 1:80 ให้ผลลบ ดังนั้นค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในเซรุ่ม ก เท่ากับ 1:40 ส่วนการทดสอบเซรุ่ม ข ซึ่งมีแอนติบอดีในระดับสูงกว่าเซรุ่ม ก จะพบได้ว่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในเซรุ่ม ข สูงกว่าในเซรุ่ม ก เช่นอาจจะเท่ากับ 1:160 หรือมากกว่าเป็นต้น (สุทธิพันธ์, 2537)

13. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

วิธี ELISA เป็นเทคนิค immunoassay ที่อาศัยหลักการทำงานระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยการติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยอาจจะติดฉลากเอนไซม์กับแอนติเจนหรือแอนติบอดีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับ substrate จนเกิดสี ทำให้สามารถอ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้จากสีที่ปรากฏ เอนไซม์ที่ใช้ต้องสามารถเข้าไปรวมตัวได้กับโมเลกุลของแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยไม่ทำให้แอนติเจน แอนติบอดี หรือเอนไซม์นั้นสูญเสียคุณสมบัติทางด้านภูมิคุ้มกัน และคุณสมบัติเฉพาะตัวอื่นๆ และต้องเป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับ substrate แล้วให้สารละลายที่มีสีเกิดขึ้นได้ เอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ peroxidase, alkaline phosphatase, glucose oxidase, β-galactosidase แต่ที่นิยมใช้มากคือ peroxidase เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง และสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง (ปราโมทย์, 2530)

เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ substrate ได้หลายโมเลกุล ดังนั้นการใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดสอบนั้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังมีความคงทนสามารถเก็บไว้ได้นานในสภาวะต่าง ๆ เอนไซม์ที่นำมาใช้ได้หลายชนิด ปฏิกิริยาของเอนไซม์กับ substrate ทำให้เกิดผลิตผลที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่ายชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ (นภาธร, 2530)

ชนิดของ ELISA (นภาธร, 2530)

<u>13.1 Competitive ELISA</u>

ใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดยอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (antigen-enzyme conjugate) หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (antibody-enzyme conjugate) เป็นตัวกระทำ (reagent) ในการทดสอบก็ได้

13.1.1 Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

วิธีนี้มีหลักการคือทำการเคลือบ microwell ด้วยแอนติบอดีในปริมาณจำกัดคงที่ปริมาณหนึ่ง เติมแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีซึ่งได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้ว หรืออาจจะเติมแอนติเจนนี้พร้อมกับสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐานซึ่งทราบว่าจำเพาะต่อแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และใช้แอนติเจนมาตรฐานนี้ในปริมาณต่าง ๆ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา ล้างแอนติเจนส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออก เติม substrate ลงไปแล้วดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ถ้าในตัวอย่างมีปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีมากสีที่เกิดขึ้นจะลดลงเนื่องจากแอนติเจนที่อยู่เป็นอิสระจะสามารถแย่งจับแอนติบอดีได้ดีกว่าแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

13.1.2 Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

เคลือบ microwell ด้วยแอนติเจน เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปในปริมาณจำกัดและคงที่แต่เพียงอย่างเดียว หรือเติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจน หรือแอนติเจนมาตรฐานปริมาณต่างๆ ลงไปด้วยพร้อมกับแอนติบอดีนั้น แอนติเจนจะแย่งจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ทำให้แอนติบอดีนั้นจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บน microwell ได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกไปแล้วเติม substrate การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจหรือแอนติเจนมาตรฐานที่เติมลงไปนั้น

การทดสอบนี้มีข้อที่ควรคำนึงถึง คือ ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้เคลือบ microwell อยู่ด้วย แอนติบอดีนี้สามารถจับกับแอนติเจนดังกล่าวและจะขัดขวางมิให้แอนติเจนจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นผลบวกเท็จขึ้นได้

ในทางปฏิบัติสามารถดัดแปลงวิธีการทดสอบนี้ให้สะดวกยิ่งขึ้นได้โดยการใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วใช้แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme-labelled anti-immunoglobulin) เป็นตัวกระทำอีกตัวหนึ่งในการทดสอบสำหรับตรวจหาปริมาณของแอนติบอดีจำเพาะที่ทำปฏิกิริยาอยู่กับแอนติเจนซึ่งเคลือบอยู่บน microwell อีกทีหนึ่ง ในกรณีเช่นนี้จะทำให้สามารถตรวจหาปริมาณของแอนติเจนได้หลายชนิดโดยไม่ต้องติดฉลากแอนติบอดีจำเพาะทุกๆ ชนิดที่ต้องนำมาใช้ในการทดสอบนั้น

<u>13.2 Non-competitive ELISA</u>

การทดสอบนี้สามารถตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีแต่มีข้อจำกัด คือ แอนติเจนที่จะตรวจหาด้วยวิธีนี้ได้จะต้องมี epitope อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง

13.2.1 การตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA

เป็นการทดสอบที่ดัดแปลงวิธี direct ELISA ให้มีความสะดวกในทางปฏิบัติมากขึ้น โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะตัวที่สองที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นตัวกระทำเพิ่มเติมในการทดสอบเพื่อวัดปริมาณของแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา ซึ่งจะเป็นการวัดปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจโดยทางอ้อม การทดสอบแบบนี้อาจเรียกชื่อว่า double antibody sandwich antiglobulin ELISA

ในการทดสอบวิธีนี้แอนติบอดีจำเพาะตัวแรก (แอนติบอดีที่ใช้เคลือบบน microwell) และแอนติบอดีจำเพาะตัวที่สองจะต้องเป็นอิมมูโนโกลบุลินของสัตว์ต่างชนิด (species) กัน ทั้งนี้เพื่อป้องกันมิให้เกิดการทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างการเชื่อม (conjugate) กับแอนติบอดีตัวแรกซึ่งจะทำให้เกิดผลบวกเท็จขึ้น

13.2.2 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

เคลือบ microwell ด้วยแอนติเจน เติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีลงไป ตรวจดูแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์โดยอาศัยดูการเปลี่ยนแปลงของ substrate ที่เติมลงไปในขั้นตอนสุดท้าย การเปลี่ยนแปลง substrate จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดีที่ตรวจสอบนั้น

14. Horseradish peroxidase (HRP)

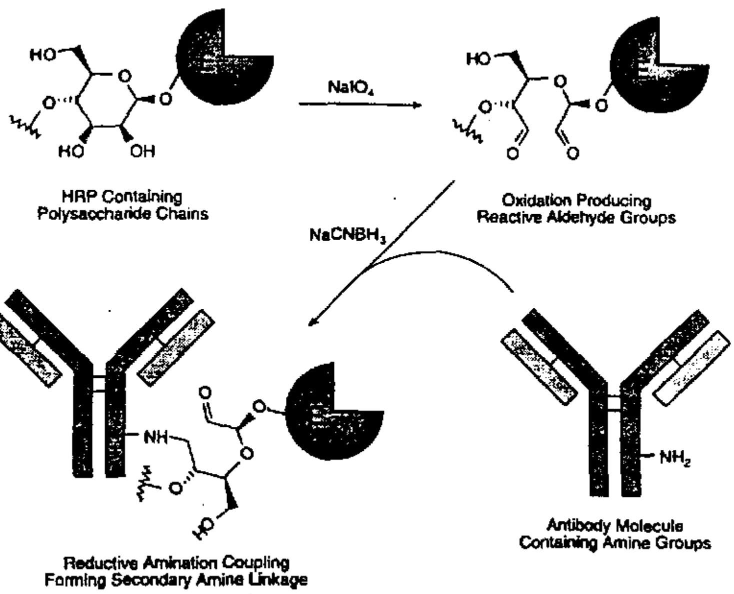
เตรียมจาก horseradish roots มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40,000 ดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร สามารถทำปฏิกิริยากับ substrate โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) เป็นตัวให้อิเลคตรอนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ได้ intermediate ที่มีสี (Hermanson, 1996) HRP เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยสายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ใช้ในการทำปฏิกิริยา cross-linking โดยจับกับโปรตีนผ่านทาง sodium borohydride (Nakane and Kawaoi, 1974) หรือ glutaraldehyde เนื่องจาก HRP มีอัตราการย่อยสลาย (catalytic) อย่างรวดเร็วดังนั้นจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของ substrate โดยใช้เวลาสั้น การเลือก substrate จะมีผลต่อความไวของการวิเคราะห์ ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ substrate ที่มีสี (chromogenic substrate) ได้แก่ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), ortho-phenylenediamine (OPD) และ 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) หรืออาจเลือกใช้สารพวก chemiluminescent substrate เช่น luminol-based product (Shepherd and Dean, 2000)

ข้อดีของ HRP คือ มีความคงตัว (stability) สูงแม้จะผ่านสภาวะที่ใช้ในการ cross-linking เกิดเป็นหมู่ aldehyde บนสายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ก็ตาม สามารถเก็บในสภาวะ freeze-dried ได้นานเป็นปี หรือจะเก็บเอนไซม์นี้ไว้ในรูปสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานหลายเดือนโดยไม่สูญเสียกิจกรรม (activity) (Hermanson, 1996)

ข้อเสียของ HRP คือ ประกอบด้วยหมู่ primary amine เพียง 2 หมู่ ดังนั้นจึงเป็นการจำกัดความสามารถในการทำปฏิกิริยากับหมู่ amine นี้ เนื่องจากมีความไวต่อสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial agent) โดยเฉพาะ azide จึงไม่เหมาะที่จะเติมสารชนิดนี้ในการทำปฏิกิริยาโดยใช้ HRP (Hermanson, 1996) นอกจากนี้ cyanide และ sulfide ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นกัน (Theorell, 1951) เนื่องจาก substrate จะมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ปฏิกิริยาการเกิดสี (development) จะสั้น และ substrate ที่ใช้บางตัวจะเป็นอันตรายจึงต้องใช้อย่างระมัดระวัง (Shepherd and Dean, 2000)

15. การเชื่อมแอนติบอดีกับ HRP

เนื่องจากโมเลกุลของ HRP มี polysaccharide เป็นองค์ประกอบ ในการเชื่อมแอนติบอดีกับ HRP จึงจำเป็นต้องใช้ periodate ไปตัดพันธะระหว่าง carbon-carbon ที่อยู่ติดกับหมู่ hydroxyl ของ



ภาพที่ 6 แสดงรูปแบบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับเอนไซม์ HRP

polysaccharide ที่อยู่บน glycoprotein ทำให้เกิดการ oxidize หมู่ –OH ของ polysaccharide ได้ reactive aldehyde (Bobbitt, 1956; Rothfus and Smith, 1963) ซึ่งสามารถใช้ในการเชื่อมกับโมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ amine หรือ hydrazide ได้โดยอาศัย sodium cyanoborohydride หรือ sodium borohydride เป็นตัวเชื่อม ดังภาพที่ 6

16. การผลิตแอนติซีรัมของไมโครซิสติน

Chu et. al. (1989) ได้ผลิตแอนติซีรัมของ MCYST-LR-EDA และ MCYST-LR-PLL แบบ polyclonal antibody โดยใช้กระต่าย ผลิตโดยละลายไมโครซิสติน 500 ไมโครกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร 0.1 M PBS (pH7.4) ผสมกับ Freund's complete adjuvant จำนวน 2 มิลลิลิตร ฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนัง (intradermal) ของกระต่าย แล้ว Booster อีกครั้ง ด้วยการผสมกับ incomplete Freund's adjuvant หลังจากฉีดกระตุ้นแล้วเก็บแอนติซีรัมมาตรวจหาคุณภาพด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA) และ ELISA เมื่อตรวจหาค่า titer ด้วยวิธี RIA และ direct ELISA แล้วพบว่า แอนติซีรัมของทั้งสองชนิดมีปฏิกิริยา cross reaction กับไมโครซิสตินชนิดอื่นได้ดี ได้แก่ MCYST-RR, MCYST-LR, MCYST -YR และ nodularin ซึ่งเป็นสารพิษกลุ่มหลัก โดยที่มี cross reaction ต่ำกับ MCYST-LY และ MCYST-LA นอกจากนี้ Chu et. al. (1990) ยังพบว่าสามารถใช้วิธี direct competitive ELISA ตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำและไซยาโนแบคทีเรียประสิทธิภาพจะสูงขึ้นหากได้ผ่านขั้นตอนการ clean up ด้วย Sep-Pak

นอกจากนี้ Chu et. al. (1990) ยังได้นำตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct competitive ELISA ที่ได้ทำการเติม MCYST-LR 1-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถตรวจพบ MCYST-

LR 83.4% ถึงแม้จะยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า epitope ของ antibody ชนิดนี้จะอยู่ตรงตำแหน่งใด แต่มีหลักฐานพอที่จะทำให้เข้าใจว่าโครงสร้างของ Adda มีส่วนจำเป็นต่อการเข้าเกาะยึดสารพิษของ antibody

Chu et. al. (1990) ได้ทำการสกัดไมโครซิสตินจากไซยาโนแบคทีเรียด้วย 0.1 M ammonium bicarbonate แล้วนำมาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) ให้มีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร นำ toxin ไปผ่าน C-18 reverse-phase Sep-Pak cartridges แล้วชะด้วย 20%, 60%, และ 100% methanol จากนั้นจึงนำไปทดสอบด้วยวิธี Direct competitive ELISA เปรียบเทียบกับ toxin ที่ไม่ได้ผ่าน C-18 cartridges พบว่าเมื่อไม่ผ่าน cartridges จะตรวจพบไมโครซิสตินมากกว่า 90% สำหรับ toxin ที่ผ่าน cartridges จะตรวจพบไมโครซิสติน 88-99% เมื่อทำการชะด้วย 60% methanol นั่นคือ cartridges treatment จะช่วยกำจัดสิ่งรบกวนที่ติดมากับ toxin ได้ และการชะล้างสามารถทำให้ไมโครซิสตินบริสุทธิ์ขึ้น จึงควรนำตัวอย่างไปผ่าน cartridges ก่อนทำ ELISA ซึ่งพบว่าสิ่งรบกวนจะถูกชะออกมากับ 20% methanol

Jia-Rong Lin and Chu (1994) ได้ทำการผลิต polyclonal antibody ต่อ MCYST-LR เพื่อนำไปตรวจหาสารพิษ MCYST-LR ที่อยู่ใน serum และ liver cytosol ของหนู โดยวิธี Direct competitive ELISA พบว่า หลังจากฉีดสารพิษ MCYST-LR ผ่านไป 15 นาที - 24 ชั่วโมง จะตรวจพบ MCYST-LR ใน serum 4.4-35.2% และ 16-89.5% ใน liver cytosol ซึ่งการทดลองนี้จะเป็นการนำเอาวิธี ELISA มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหา MCYST-LR ใน serum และ liver cytosol ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย, สะดวก, รวดเร็ว และมีความไวสูง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี ELISA น่าจะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาผลของไมโครซิสตินต่อคนหรือสัตว์ได้เช่นกัน โดยอาจจะทำการยืนยันด้วยวิธี immunochromatography เพื่อตรวจหา MCYST-LR และ metabolite ใน body fluids และเนื้อเยื่อ

Shinji et. al. (1994) ทำการผลิต monoclonal antibodies ต่อ MCYST-LR โดยใช้ purified MCYST-LR conjugate กับ ethylenediamine modified bovine serum albumin (EDA-BSA) เป็น protein carrier ผสมกับ Freund's complete adjuvant แล้วฉีดเข้าไปใน intraperitoneal (ip) ของหนู แล้วนำเซลล์ตับมารวมกับ P3U1 myeloma cells ตามวิธีของ Kfir et. al. (1986) hybridoma cell lines จะทำการผลิต antibody ต่อ MCYST-LR แต่ไม่ผลิต antibody ต่อ BSA ซึ่งจะได้ monoclonal antibodies 4 ชนิด คือ IgG1x-type monoclonal antibodies, S35-5, S55-1, S55-3 และ S55-4 นำไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีของ Chu (1989) โดยให้ทำปฏิกิริยากับ MCYST-LR, -RR, 3,7-didesmethylMCYST (MCYST-3,7-dDMLR), 7-desmethylmicro-cystin (MCYST-7-DMLR), cell-extracts ที่เป็นพิษ และไม่เป็นพิษของ *Microcystis aeruginosa* strains พบว่า monoclonal antibodies นี้มีความสามารถในการจดจำโครงสร้างทั่วๆไปของไมโครซิสตินแต่ไม่สามารถจดจำโครงสร้างเฉพาะได้ (variant-specific structure)

จากการทดลองของ Nagata et. al. (1997) ได้ทำการตรวจหาไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำธรรมชาติ โดยการผลิต monoclonal antibody ต่อสารพิษ MCYST-LR แล้วนำมาตรวจด้วยวิธี

ELISA พบว่าสามารถตรวจพบไมโครซิสตินในช่วง 20-500 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร เขาจึงได้สรุปลักษณะของ ELISA ไว้ดังนี้

1. วิธี ELISA สามารถทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับไมโครซิสตินได้หลายสายพันธุ์ ทั้งยังเป็นวิธีที่มีความไวสูง และไม่ต้องนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนการชะล้างใด ๆ ดังนั้นวิธี ELISA จึงเป็นวิธีที่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจหาไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบ MCYST-LR 20 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำประปา และ 50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ในแหล่งน้ำจืด ซึ่งจะมีความไวในการตรวจสอบสูงกว่าวิธี LC-UV method ถึง 1,000 เท่า

2. เนื่องจากไมโครซิสตินที่แยกได้กว่า 50 ชนิด ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างที่คล้ายกัน คือมี Adda (3-amino-9-methxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นวิธี ELISA จะเลือกทำปฏิกิริยากับ Adda ซึ่งทำให้วิธีนี้มีความจำเพาะในการทดสอบสูง

Duncan et. al. (2000) ทำการเก็บไซยาโนแบคทีเรียที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วจาก Upper Klamath Lake (UKL) ใน Southern Oregon ทำการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินด้วยวิธี ELISA พบว่ามีสารพิษไมโครซิสติน 85 ตัวอย่าง จากการทดสอบทั้งหมด 87 ตัวอย่าง และยังพบว่า 63 ตัวอย่าง (72%) มีสารพิษไมโครซิสตินความเข้มข้นมากกว่า 1 ไมโครกรัมต่อกรัม

จากรายงานของ Metcalf et. al. (2000) ได้ทำการผลิต polyclonal antibody ต่อ MCYST-LR-KLH โดยใช้กระต่าย ได้ทำการ conjugate MCYST-LR กับ keyhole limpet haemocyanin (KLH) โดยผ่านทาง methyl dehydroalanine นำ MCYST-LR-KLH conjugate ผสมกับ Freund's complete adjuvant แล้วฉีดที่บริเวณ subcutaneous แล้วทำการฉีดกระตุ้นซ้ำที่บริเวณ intravenous หลังจากนั้นจึงทำการเก็บ serum แล้วทำให้บริสุทธิ์ นำ polyclonal antibody นี้มาทำการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่าสามารถตรวจพบ MCYST-LR ในน้ำดื่มที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามข้อกำหนดของ WHO ซึ่งกำหนดให้ตรวจพบสารพิษ MCYST-LR ในน้ำดื่มได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตร (WHO, 1997) วิธีการนี้สามารถตรวจพบไมโครซิสตินได้หลายสายพันธุ์ เช่น MCYST-LR, -LW, -LF, -LA, -D-Asp^3-RR, -LY, -Asp^3-(Z)-Dhb^7-HtyR และ nodularin

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวัดสำเร็จรูปที่อาศัยเทคนิคของ competitive polyclonal ELISA จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ปริมาณของสารพิษสามารถตรวจหาได้จากการวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของสารพิษที่ต้องการจะตรวจวัดจะเป็นสัดส่วนผกผันกับสีที่เกิดขึ้น (Anonymous, 2001)

17. การเลือก carrier ที่เหมาะสมเพื่อการผลิตแอนติซีรัม

โดยทั่วไปแล้วแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่จะมีโครงสร้างซับซ้อน และมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 กิโลดาลตัน ซึ่งจะกระตุ้นให้ร่างกายของสิ่งมีชีวิตเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และเหนี่ยวนำให้มีการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะได้สูง แต่เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กมาก (ประมาณ 1,000-2,000

ดาลตัน) เมื่อนำไปผสมกับ adjuvant จะกระตุ้นให้ร่างกายของสิ่งมีชีวิตเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ต่ำมาก ซึ่งโมเลกุลที่มีขนาดเล็กนี้เรียกว่า haptens

ปกติเมื่อร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ก็จะมีการผลิตแอนติบอดี โดยการกระตุ้นของ T cell help ไปชักนำให้ B cells จดจำแอนติเจน แล้วทำการผลิตแอนติบอดีขึ้น ซึ่ง hapten หรือ peptide จะไม่มีคุณสมบัตินี้ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า hapten หรือ peptide เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลเล็ก เมื่อมี epitope ตั้งแต่ 2 epitope ขึ้นไป จะทำให้ epitope มีรูปร่างไม่ชัดเจน แต่ถ้านำ hapten หรือ peptideนี้ไปจับกับ carrier เหมาะสม ก็จะสามารถกระตุ้นให้ T และ B cell เกิดการจดจำรูปร่างของ epitope ได้ชัดเจนขึ้น และเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่ง carrier ที่นิยมใช้ได้แก่ keyhole limpet haemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin, mouse serum albumin (MSA), หรือ rabbit serum albumin (RSA) เนื่องจากมีขนาดใหญ่ KLH จึงตกตะกอนได้ง่ายระหว่างการ cross-link ส่วน BSA นั้นมีข้อได้เปรียบตรงที่มีความสามารถในการละลายได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ poly-lysine เป็น carrier ได้เช่นกัน โดยจะใช้กลุ่มของ amine พื้นฐาน 2 กลุ่ม (primary amine) ที่อยู่บน lysine ในการจับกับ peptide

นอกจากการเลือก carrier ที่เหมาะสมแล้ว ยังต้องคำนึงถึง reagent ที่จะใช้ในการ cross-link ด้วย เพราะ reagent ที่ไม่เหมาะสมจะไปบดบัง epitope บางส่วนไว้ ซึ่ง reagent ที่นิยมใช้มีดังนี้

1. Glutaraldehyde จะ cross-link กับกลุ่มอะทิโนพื้นฐาน (primary amino groups) ที่อยู่บนปลาย N-terminus ของ peptide และ/หรือ กลุ่มของ epsilon amino group ของ lysine

2. m-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester (MBS) ซึ่ง MBS จะเชื่อมกับ peptide โดยผ่านทาง -SH group หรือ cysteine to -NH_2 groups

3. Bis-diazotised tolidine (Bdt) ซึ่งจะเชื่อมกับ peptide โดยผ่านทาง aromatic side chain ของ tyrosine

4. Carbodiimides (CDI) ซึ่งจะเชื่อมกับ free carboxyl และ amino groups ที่ปลาย C- หรือ N-terminus หรือบน side chains (เช่น lysine, aspartic acid หรือ glutamic acid) ของ peptide ด้วยพันธะ amide

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตสารพิษไมโครซิสตินสำหรับการผลิต polyclonal antibody

2. เพื่อผลิต polyclonal antibody ไว้สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินด้วยวิธี ELISA

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งของไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis*

1.1 จาก stock culture

ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการรวบรวมและเก็บรักษา *Microcystis* จำนวน 54 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) ซึ่งส่วนใหญ่คัดแยกจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง

1.2 จากการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำเพื่อรวบรวมสายพันธุ์เพิ่มเติม ด้วยตาข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 20 ไมครอน โดยจะทำการเลือกเก็บบริเวณขอบแหล่งน้ำทางใต้ของทิศทางลม (หรือตามแนวสันเขื่อน) เพราะในสภาวะเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจะสังเกตเห็นตัวอย่างมาอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบริเวณผิวน้ำชายฝั่งในวันที่มีแสงแดดจัด ทำการโยนตาข่ายกรองแพลงก์ตอนไปในแหล่งน้ำ แล้วทำการลากไปตามแนวนอนระดับผิวน้ำ นำตัวอย่างเก็บใส่ขวดพลาสติกเพื่อทำการคัดแยกและจัดจำแนก วัดค่าความเป็นกรด–ด่างของแหล่งน้ำพร้อมทั้งบันทึกผล

2. การจัดจำแนกชนิดของ *Microcystis*

นำตัวอย่างน้ำที่เก็บได้มาตรวจสอบและจัดจำแนกโดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาว่าในแหล่งน้ำนั้นสามารถพบ *Microcystis* sp. ชนิดใดบ้าง โดยทำการสังเกต ขนาดของเซลล์ ลักษณะรูปร่างโคโลนี ตามหลักการจำแนกชนิดของ Watanabe (1996) จากนั้นทำการคัดแยกเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพิษไมโครซิสติน พร้อมทั้งถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อประกอบการจัดจำแนกต่อไป

ตารางที่ 2 สปีชีส์ของไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในยีนัส *Microcystis* จำแนกตามลักษณะโคโลนี

สายพันธุ์	Species	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด
M50001	*M. aeruginosa*	สระบัวสมิหลา	สงขลา
M50002	*M. ichtyoblabe*	สระบัวสมิหลา	สงขลา
M50003	*M. aeruginosa*	ห้วยซับประดู่	นครราชสีมา
M50004	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำห้วยเดื่อโหวก	อุตรดิตถ์
M50006	*M. aeruginosa*	เขื่อนท่าทุ่งนา	กาญจนบุรี
M50007	*M. aeruginosa*	เขื่อนเขาแหลม	กาญจนบุรี
M50008	*M. aeruginosa*	เขื่อนศรีนครินทร์	กาญจนบุรี
M50009	*M. aeruginosa*	เขื่อนแก่งกระจาน	เพชรบุรี
M50011	*M. aeruginosa*	เขื่อนปราณบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
M50014	*M. ichtyoblabe*	บ่อกุ้งฉะเชิงเทรา	ฉะเชิงเทรา
M50015	*Microcystis* sp.	คลองบางโปง	สมุทรปราการ
M50016	*M. aeruginosa*	เขื่อนลำพระเพลิง	นครราชสีมา
M50017	*M. aeruginosa*	เขื่อลำตะคอง	นครราชสีมา
M50020	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง	สุรินทร์
M50022	*M. aeruginosa*	สถาบันราชภัฏอุบล	อุบลราชธานี
M50024	*M. aeruginosa*	สระน้ำ ม. หัวเฉียว	กรุงเทพฯ
M50025	*M. aeruginosa*	สระน้ำ กม. 4 บางนา	กรุงเทพฯ
M50026	*M. aeruginosa*	สระน้ำ รร. วุฒิวิทยา	ชลบุรี
M50027	*M. aeruginosa*	อ่าเก็บน้ำบางพระ	ชลบุรี
M50029	*M. ichtyoblabe*	อ่างเก็บน้ำเขาจุก	ระยอง
M50030	*M. wesengergii*	อ่างเก็บน้ำดอกกราย	ชลบุรี
M50032	*M. aeruginosa*	บ่อปลาที่ใช้ EM	ชลบุรี
M50033	*Microcystis* sp.	เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์	ลพบุรี
M50034	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำห้วยซับเหล็ก	ลพบุรี
M50036	*M. aeruginosa*	บ่อปลาบ้านดงตาล 1	ลพบุรี
M50037	*M. aeruginosa*	บ่อปลาบ้านดงตาล 2	ลพบุรี
M50038	*M. aeruginosa*	บ่อปลาบ้านเนินเพิ่ม	อุทัยธานี
M50040	*M. aeruginosa*	เขื่อนภูมิพล	ตาก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์	Species	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด
M50042	*M. ichtyoblabe*	บ่อบำบัดน้ำทิ้งตาก	ตาก
M50043	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำชำบอน	อุตรดิตถ์
M50045	*M. ichtyoblabe*	เขื่อนสิริกิตต์	อุตรดิตถ์
M50046	*M. aeruginosa*	เขื่อนดินช่องเขาขาด	อุตรดิตถ์
M50049	*M. ichtyoblabe*	อ่างเก็บน้ำแม่เมาะ	ลำปาง
M50050	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำห้วยกระเลา	สุรินทร์
M50052	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำแม่จาง	ลำปาง
M50053	*M. ichtyoblabe*	กว๊านพะเยา	พะเยา
M50054	*M. aeruginosa*	เขื่อนแม่กวงอุดมธารา	เชียงใหม่
M50055	*M. ichtyoblabe*	ห้วยตึงเฒ่า	เชียงใหม่
M50056	*M. aeruginosa*	สระสวนหลวงร. 9เชียงใหม่	เชียงใหม่
M50058	*M. aeruginosa*	บ่อปลาปทุมธานี 2	ปทุมธานี
M50062	*M. aeruginosa*	บ่อปลามก. 3	กรุงเทพฯ
M50063	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำมาบประชัน	ชลบุรี
M50064	*M. aeruginosa*	อ่างเก็บน้ำหนองกลางดง	ชลบุรี
M50066	*M. ichtyoblabe*	บ่อปลาลพบุรี 4	ลพบุรี
M50068	*M. ichtyoblabe*	อ่างเก็บน้ำห้วยสวาย	บุรีรัมย์
M50069	*M. wesengergii*	สระน้ำดอนเมือง	กรุงเทพฯ
M50070	*M. aeruginosa*	สระน้ำราชภัฏสงขลา	สงขลา
M50072	*M. ichtyoblabe*	สระน้ำ รพ. ธัญญารักษ์	กรุงเทพฯ
M50075	*M. ichtyoblabe*	อ่างเก็บน้ำแม่ถาง	ลำปาง
M50076	*M. aeruginosa*	บึงบอระเพ็ด	นครสวรรค์
M50077	*M. aeruginosa*	บ่อปลานครสวรรค์	นครสวรรค์
M50078	*M. aeruginosa*	สระน้ำแม่ลา 1	สิงห์บุรี
M50080	*M. aeruginosa*	สระน้ำพิษณุโลก	พิษณุโลก

3. วิธีการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Microcystis*

3.1 เทคนิคการคัดแยกด้วยไมโครปิเปตต์

ทำการแยกเซลล์โดยหยดน้ำตัวอย่างลงในสไลด์หลุมนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ทำการดึงเซลล์โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ที่ฆ่าเชื้อ และดึงปลายให้แหลมให้มีขนาดเล็กพอเหมาะกับขนาดของเซลล์หรือโคโลนีขนาดเล็ก (ไมโครพาสเจอร์ปิเปต) นำไมโครพาสเจอร์ปิเปตต่อเข้ากับปลายข้างหนึ่งของสายยาง ปลายอีกด้านหนึ่งของสายยางจะใช้สำหรับดูดและเป่าตัวอย่างด้วยปาก ในการดึงเซลล์เลื่อนปลายพาสเจอร์ปิเปตต์มาอยู่ใกล้เซลล์ที่ต้องการ เมื่อดึงเซลล์ได้แล้วให้ถ่ายลงในสไลด์หลุมใหม่ซึ่งมีน้ำกลั่นสำหรับล้างเซลล์ ทำการล้างเซลล์ประมาณ 5 – 6 ครั้ง จนแน่ใจว่ามีเพียงเซลล์หรือโคโลนีเดียวจากนั้นถ่ายลงในหลอดฝาเกลียวขนาดเล็ก ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MA medium (ส่วนประกอบดังตารางที่ 3) สำหรับ *Microcystis* ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มแสง (Growth cabinet, model MLR3500H, Sanyo, Tokyo, Japan) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 100 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 – 4 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นการเจริญของเซลล์ จากนั้นนำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่าทำการคัดแยกแล้วได้สายพันธุ์ *Microcystis* เพียงชนิดเดียวจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยการย้ายเซลล์ลงไปเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่บรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปศึกษาการผลิตสารพิษและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ *Microcystis* ต่อไป

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของ MA medium (Ichimura, 1979)

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.05	กรัม
KNO_3	0.1	กรัม
$NaNO_3$	0.05	กรัม
Na_2SO_4	0.04	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.05	กรัม
β-sodiumglycerophosphate	0.1	กรัม
Na_2EDTA	0.005	กรัม
$FeCl_3.6H_2O$	0.0005	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.005	กรัม
$ZnCl_2$	0.0005	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.005	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0008	กรัม
H_3BO_3	0.02	กรัม
Bicine	0.5	กรัม
น้ำ De-ionized	1,000	มิลลิลิตร
pH	8.6	

3.2 เทคนิคการคัดแยกด้วยกล้องไมโครแมนิพูเลเตอร์

จัดเตรียมกล้องไมโครแมนิพูเลเตอร์ ให้อยู่ในลักษณะที่พร้อมใช้งานจัดโดยปรับกำลังขยายให้สามารถมองเห็น microtool (glass needle) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์นำแผ่นสไลด์วางบน stage ของกล้อง หยดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบนสไลด์ 1หยด จากนั้นนำตัวอย่างมาหยดในน้ำกลั่นที่อยู่บน สไลด์พร้อมทั้งใช้ microtool ดูดโคโลนีของตัวอย่างขึ้น – ลง เบาๆประมาณ 2 – 3 ครั้ง และทำการย้ายตัวอย่างมาล้างในน้ำกลั่นหยดใหม่จนแน่ใจว่ามีเซลล์เพียงชนิดหรือโคโลนีเดียว จากนั้นถ่ายลงในหลอดฝาเกลียวขนาด เล็ก ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้แสงสำหรับเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 100 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 – 4 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นการเจริญของได้ชัดเจน จากนั้นนำเซลล์นั้นมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่าทำการคัดแยกได้ยีนัส *Microcystis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยการย้ายเซลล์ลงไปเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่บรรจุอาหาร MA ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาการผลิตสารพิษและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตต่อไป

3.3 Pour Plate Technique (Shirai และคณะ, 1989)

เทคนิคนี้สามารถที่จะคัดแยกตัวอย่างเชื้อให้เป็น unialgal และ axenic culture ได้โดยการนำเอาเชื้อจากเทคนิคที่ 1 และ 2 มาทำการคัดแยกอีกครั้งดังนี้นำตัวอย่างเชื้อที่ต้องการมาเลี้ยงในอาหารชนิด CB ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้ตัวอย่างเชื้อปรับเข้ากับสภาพอาหารชนิดใหม่ หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยปั่นบน vortex หรือ sonicator เบาๆ เป็นเวลา 2 นาทีทำการเจือจางเชื้อ 10 เท่า นำตัวอย่างเชื้อที่ได้ 100 ไมโครลิตร ทำการ pour plate โดยใช้ 0.4% agarose – CB medium (ตารางที่ 4) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปิดรอบจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิลม์โดยรอบเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำมาเพาะเลี้ยงประมาณ 7-15 วัน จะสังเกตเห็นมีโคโลนีสีเขียวของเชื้อขึ้น นำเอาโคโลนีนั้นมาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นเชื้อที่ต้องการ แล้วนำตัวอย่างเชื้อนั้นมาทำการ pour plate อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่เป็นชนิดเดียวกันและบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้สำหรับเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 100 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 – 4 อาทิตย์ จะสังเกตุเห็นการเจริญของเซลล์จากนั้นนำเซลล์นั้นมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่าทำการคัดแยกแล้วได้สายพันธุ์ *Microcystis* เพียงชนิดเดียวจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยการย้ายเซลล์ลงไปเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่บรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปศึกษาการผลิตสารพิษและศึกษาปัจจัยที่มีผล ต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ *Microcystis* ต่อไป

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของ CB medium (Shirai และคณะ, 1989)

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.15	กรัม
KNO_3	0.10	กรัม
$MgCl_2.7H_2O$	0.04	กรัม
β-sodiumglycerophosphate	0.05	กรัม
Vitamin B_1	0.01	มิลลิกรัม
Vitamin B_{12}	0.0001	มิลลิกรัม
Biotin	0.0001	มิลลิกรัม
P IV metal mixture	3.0	.มิลลิลิตร
Bicine	0.5	กรัม
น้ำ De-ionized	997	มิลลิลิตร
pH 9.0		
<u>P IV metal mixture</u>		
$FeCl_3.6H_{2O}$	0.196	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.036	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.022	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.005	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0025	กรัม
$Na_2EDTA.2H_2O$	1.0	กรัม
น้ำ De-ionized	1,000	มิลลิลิตร

4. การเพาะเลี้ยง *Microcystis*

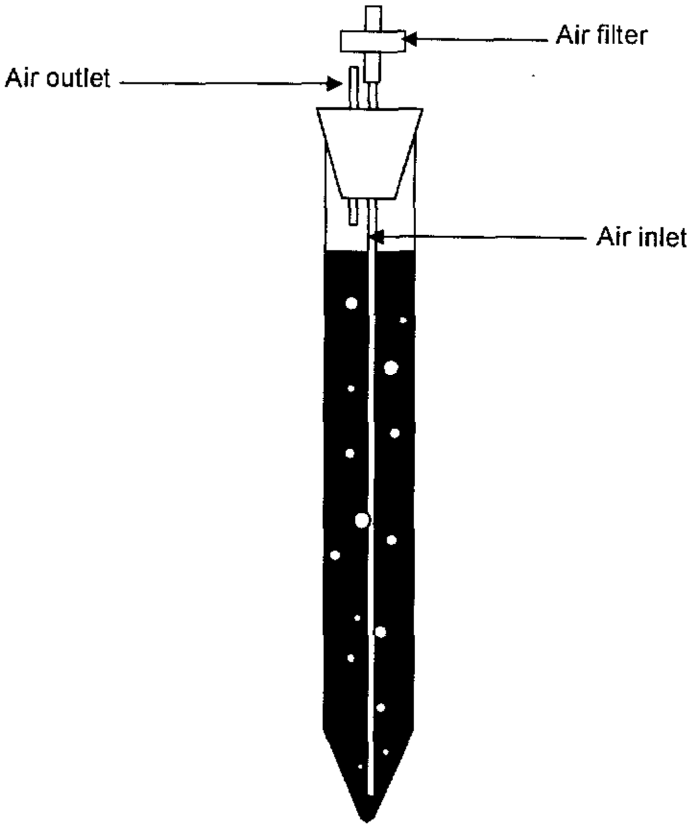
<u>4.1 การเก็บรักษาสายพันธุ์ *Microcystis* ในหลอดทดลองฝาเกลียว</u>

ทำการถ่ายตัวอย่างเชื้อลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 x 100 มม. ซึ่งบรรจุอาหารชนิด MA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปบ่มและเก็บรักษาในตู้เลี้ยงสาหร่ายที่ปรับความเข้มแสงที่ 100 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 6 ต่อ 8 ชม. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่เมื่อสังเกตเห็นปริมาณเซลล์หนาแน่น (ประมาณ 2-3 เดือน) วิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างสายพันธุ์ *Microcystis* สำหรับไว้ใช้ต่อไป

<u>4.2 การเพาะเลี้ยงในหลอดก้นกรวยขนาดใหญ่</u>

ทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1 $x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 3 x 35 เซ็นติเมตร ซึ่งบรรจุอาหารชนิด MA มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดด้วยจุกยางที่หลอดที่ต่อ

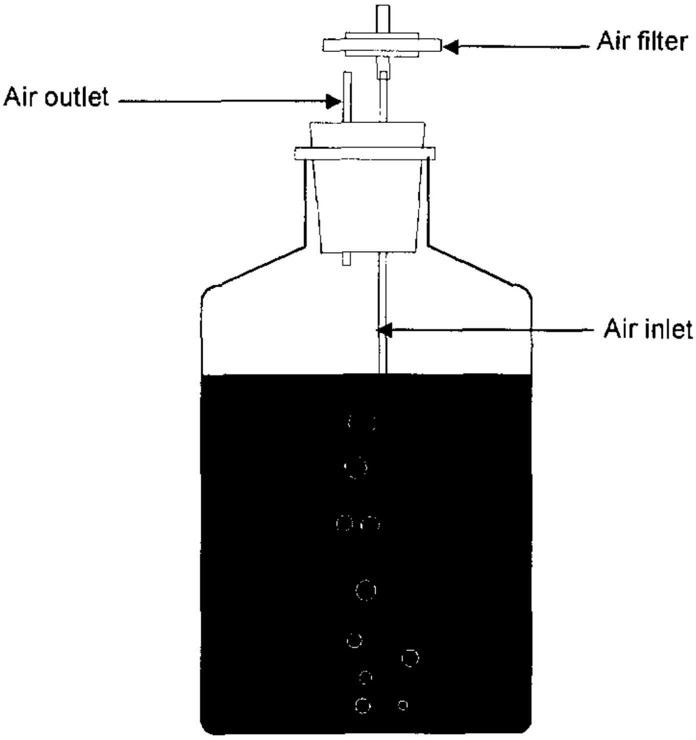
เข้ากับท่อให้อากาศโดยผ่านตัวกรองอากาศ (ภาพที่ 2) จากนั้นนำหลอดมาบ่มในตู้สำหรับเลี้ยงสาหร่ายโดยเฉพาะโดยปรับความเข้มแสงประมาณ 100 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีและอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พ่นอากาศในอัตรา 30-40 มิลลิลิตร ต่อนาทีทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน นำมาวัดการเจริญด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



ภาพที่ 2 การเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในหลอดก้นกรวยขนาด 200 มิลลิลิตร

4.3 การเพาะเลี้ยง *Microcystis* ในขวดขนาด 10 ลิตรเพื่อผลิตไมโครซิสติน

ทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้น (ประมาณ 1 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากหลอดก้นกรวยขนาด 200 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วซึ่งบรรจุอาหาร MA มีปริมาตร 10 ลิตร (ภาพที่ 3) ปิดฝาหลอดด้วยจุกยางที่หลอดที่ต่อเข้ากับท่อให้อากาศโดยผ่านตัวกรองอากาศ จากนั้นนำขวดเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไปวางไว้ในชั้นที่จัดเตรียมไว้ โดยให้แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซ็นต์ตามแนวข้างขวดจำนวน 3 หลอด (ความเข้มแสงประมาณ 200 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที) พ่นอากาศเพื่อให้มีการกวนและผสมอย่างทั่วถึง ทำการเพาะเลี้ยงประมาณ 10-14 วัน ไซยาโนแบคทีเรียจะเจริญจนเห็นอาหารเป็นสีเขียวเข้ม ตรวจวัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแบบต่อเนื่อง เซลล์ที่ได้จะนำไปสกัดแยกสารพิษต่อไป



ภาพที่ 3 ขวดเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียขนาด 10 ลิตร

5. การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน (Harada, 1988)

นำเซลล์ *Microcystis* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาเหวี่ยงแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 g นาน 15 นาที รินน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติม 5 % acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้ว vortex นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 g 15 นาที สารพิษจะละลายอยู่ในส่วนใสที่เป็นสารทำละลาย นำส่วนใสที่ได้มากำจัดสารปนเปื้อนออก โดยการผ่าน C_{18} cartridge (Sep-pak, Millipore, Waters Associates) สารพิษจะถูกดูดซับอยู่ใน cartridge (ก่อนนำ cartridge มาใช้ทำการล้างด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร) ทำการชะ cartridge ด้วยเมธานอล 20 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นชะสารพิษที่ต้องการออกจาก cartridge ด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปผ่านการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภายใต้สุญญากาศ) จนเหลือตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านตลับกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Perkin Elmer, Connecticut, USA) ที่ประกอบด้วย LC pump (Series 200) และ programmable absorbance detector model 785 A โดยฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผ่าน HPLC คอลัมน์ Mightysil ODS (RP-18GP 150-4.6, Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan) ใช้สารละลายเคลื่อนที (mobile phase) ประกอบด้วยเมธานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมล ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 (v/v) ปรับค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 3 ตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเทียบระยะเวลาคงตัว (retention time) และ พื้นที่ใต้ peak กับสารพิษมาตรฐาน (Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan)

6. การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของ *Microcystis*

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ จะทำการปรับปรุงสูตรอาหาร MA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อในยีนัส *Microcystis* ทั่วไป โดยจะศึกษาเฉพาะสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลัก 5 ชนิด ที่เซลล์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสำหรับการเจริญและการผลิตสารพิษ ได้แก่ $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, KNO_3, $NaNO_3$, Bicine และ β-sodium-glycerophosphate พร้อมทั้งทำการศึกษาถึงสภาวะแวดล้อม ได้แก่ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และ ความเข้มแสง ในการศึกษานี้จะเลือกใช้สายพันธุ์ *Microcystis* ที่ได้วิเคราะห์แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษไมโครซิสตินได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้จะคัดเลือก *Microcystis* ที่ไม่สร้างสารพิษมาทำการศึกษาถึงผลของปัจจัยข้างต้นต่อการกระตุ้นให้สร้างสารพิษ

6.1 ศึกษาปริมาณของ $Ca(NO_3)_2$

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MA ที่มีการปรับความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ให้เท่ากับ 0, 5, 20, 50 (สูตรปกติ), 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นำอาหารดังกล่าวไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บรรจุอาหารลงในหลอดทดลองก้นกรวยขนาด 3 x 35 เซ็นติเมตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการถ่ายเชื้อที่อยู่ในระยะ log phase ให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับเซลล์ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 250 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีและมีการให้อากาศ เก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 14 วัน นำไปวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบและคำนวณกลับเป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และหลังจากครบ 14 วันแล้วนำเซลล์ซัสเพ็นชันส่วนเหลือปริมาตร 100 มิลลิลิตรไปวิเคราะห์สารพิษต่อไป

6.2 ศึกษาปริมาณของ KNO_3 ที่มีต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA (ที่ปรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $Ca(NO_3)_2$ จากข้อ 6.1) และทำการปรับความเข้มข้นของ KNO_3 เท่ากับ 0, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองตามสภาวะเหมือนข้อ 6.1

6.3 ศึกษาปริมาณของ $NaNO_3$ ที่มีต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA (ที่ปรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $Ca(NO_3)_2$ จากข้อ 6.2 และ KNO3 จากข้อ 6.2) และทำการปรับความเข้มข้นของ ($NaNO_3$) เท่ากับ 0, 2.5, 5 (สูตรปกติ), 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองตามสภาวะเหมือนข้อ 6.1

6.4 ศึกษาปริมาณของ β-sodium-glycerophosphate ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA ที่มีการปรับความเข้มข้นของ β-sodium- glycerophosphate เท่ากับ 0, 20, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองตามสภาวะเหมือนข้อ 6.1

6.5 ศึกษาปริมาณของ Bicine ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA ที่มีการปรับความเข้มข้นของ Bicine เท่ากับ 0, 100, 100, 200, 300, 400 และ 500 (สูตรปกติ) มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองตามสภาวะเหมือนข้อ 6.1

6.6 ศึกษาอิทธิพลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA สูตรปกติ ปรับค่า pH ของอาหาร MA สูตรปกติด้วย 1N H_2SO_4 หรือ 1N KOH ให้ได้เท่ากับ 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดลองตามสภาวะเหมือนข้อ 6.1

6.7 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA สูตรปกติ นำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บรรจุอาหารลงในหลอดทดลองขนาด 3 x 35 ซม ปริมาตร 150 มล. ทำการถ่ายเชื้อที่อยู่ในระยะ log phaseให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับเซลล์ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการวัด OD_{550} เปรียบเทียบกัน จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงตามสภาวะการทดลองเหมือนข้อ 6.1

6.7 ศึกษาค่าความเข้มแสงต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MA สูตรปกติ นำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บรรจุอาหารลงในหลอดทดลองขนาด 3 x 35 ซม ปริมาตร 150 มล. ทำการถ่ายเชื้อที่อยู่ในระยะ log phase ให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับเซลล์ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการวัด OD_{550} เปรียบเทียบกัน จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ควบคุมความเข้มแสงที่ 200, 250 (สภาวะปกติ), 300 และ 400 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที (สภาวะการทดลองเหมือนข้อ 6.1)

7. จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินโดย *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA ที่ปรับปรุงใหม่

นำผลที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม มาใช้ในการเพาะเลี้ยง *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 โดยเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MA เดิมและใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงใหม่ การทดลองทำในขวดเพาะเลี้ยงแก้วขนาด 10 ลิตร หลังจากเตรียมอาหารแล้ว ทำการถ่ายเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร และทำการวัด OD_{550} ควบคู่ไปด้วย จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะที่กำหนด และมีการให้อากาศ เก็บตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งการเจริญของเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ นำตัวอย่างไปวิเคราะห์การเจริญโดยการวัด OD_{550} เปรียบเทียบกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พร้อมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ

8. การเพาะเลี้ยง *Microcystis* เพื่อผลิตสารพิษไมโครซิสตินบริสุทธิ์สำหรับใช้เป็น antigen

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Microcystis* สายพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษสูง ในขวดขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหาร MA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บเชื้อเพื่อวัดการเจริญเติบโตทุก ๆ 2 วัน จนเชื้อเข้าสู่ระยะแรกของการเจริญเติบโตแบบคงที่ หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง continuous centrifuge (Westfalia, Germany) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติก 5 เปอร์เซนต์ รวม 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 100 มิลลิลิตร นำส่วนใสที่สกัดได้มารวมกัน (แยกเก็บ) ตะกอนเซลล์ที่เหลือนำมาสกัดซ้ำด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ อีก 2 ครั้งๆละ 50 มิลลิลิตร นำส่วนใสของเมธานอลที่สกัดได้มารวมกัน แล้วนำไปผ่านการระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ ละลายสารตัวอย่างกลับด้วยส่วนใสของกรดอะเซติกข้างต้น และนำมาผ่าน Sep-Pak C_{18} cartridge ล้าง cartridge ด้วยเมธานอล 20 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นชะสารพิษที่ต้องการออกจาก cartridge ด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาระเหยแห้งอีกครั้งด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ ละลายสารตัวอย่างกลับด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างมากรองผ่านตลับกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน แยกสารพิษด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Preparative HPLC Column (Mightysil RP-18GP 250-20, Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan)) เก็บ fraction ของสารพิษแต่ละชนิด หลังจากนั้นนำมาผ่านการระเหยแห้งและนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้แผ่น HPTLC (Kieselgel 60 F254, Merck 1.05642) ระบบสารละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม ต่อ เมธานอล ต่อ น้ำในอัตราส่วน 4 : 6 : 1 ตรวจหาสารพิษภายใต้แสง UV เพื่อทราบตำแหน่งของสารพิษ ทำการขูดสารพิษออกจากแผ่น HPTLC แล้วชะสารพิษออกด้วยเมธานอล 100 เปอร์เซนต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 239 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารพิษ

Cell mass (eq. to 1.0 g DW)
↓
Extract with 50 ml 5% acetic acid (2 times)
↓
Centrifuge
↓ → Collect supernatant separately
Pellet
↓
Re-extract with 50 ml 100% methanol (2 times)
↓
Centrifuge
↓
Collect and combine supernatant
↓
Evaporate to dryness under vacuum by rotary evaporator
↓
Dissolve dry residue with acetic acid fraction
↓
Centrifuge
↓
Collect supernatant
↓
Pass thru preconditioned C18 SPE (solid phase extraction) cartridge
↓
Wash with 10 ml 20% methanol
↓
Elute with 5 ml 100% methanol
↓
Evaporate to dryness under vacuum by rotary evaporator
↓
Add 1.0 ml methanol and mix until completely dissolve
↓
Filter with 0.22 μ membrane filter
↓
Inject to preparative HPLC on ODS column (25x250 mm Mightysil)
using 50 mM phosphate buffer pH 3.0 in 60% methanol
↓
Inject to preparative HPLC on ODS column (25x250 mm Mightysil)
using 50 mM phosphate buffer pH 3.0 in 60% methanol
↓
Collect each toxin peak separately
↓
To each toxin fraction, evaporate to dryness with a rotary evaporator
↓
(continue)

ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการสกัดและการเตรียมสารพิษบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น antigen

↓

Dissolve in 20-30 ml 20% methanol

↓

Pass thru C18 SPE cartridge

↓

Wash with 10 ml 20% methanol

↓

Elute with 5 ml 80% methanol

↓

Evaporate to dryness under vacuum or N2 flow

↓

Dissolve in methanol

↓

Apply in strip manner to HPTLC plate (Kieselgel 60 F254, Merck 1.05642)

↓

Develop with methanol : Chloroform : H_2O (4:6:1)

↓

View and mark the toxin band under UV lamp (Rf approx. 0.5)

↓

Scrape the toxin band and load into the extraction tube

↓

Elute with
80% methanol in 50 mM phosphate buffer pH 3.0 for MCYST-RR
or
100% methanol for MCYST-YR and LR

↓

Adjust methanol concentration to 20% by water

↓

Pass thru C18 SPE cartridge

↓

Wash with 10 ml 20% methanol

↓

Elute with 5 ml 80% methanol

↓

Measurement the absorbance at 239 nm (A)

↓

Calculate the concentration according to the following formula

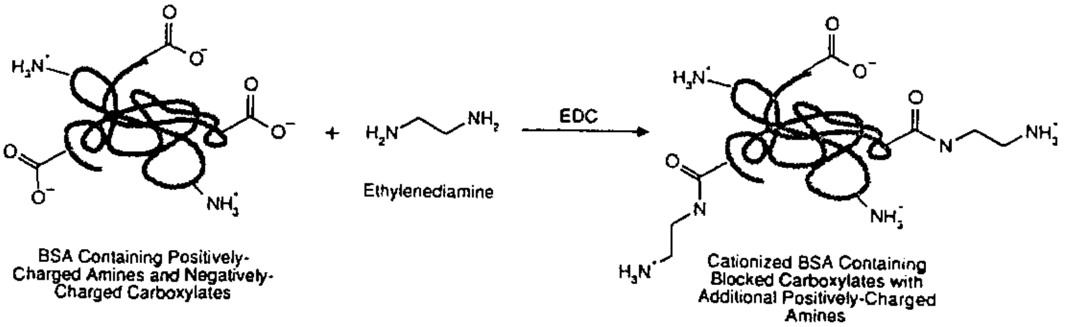
Toxin content = A x MW (of toxin) x 10^{-3}/31,000 µg/ml

ภาพที่ 4 (ต่อ)

9. การเตรียม antiserum จากไมโครซิสติน (Chu และคณะ, 1982)

เนื่องจากสารพิษไมโครซิสตินมีหลายชนิด และจากการศึกษาของผกามาส (2544) ที่ได้ทำการจำแนกชนิดและการผลิตสารพิษโดย *Microcystis* sp. ที่พบในประเทศไทย พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษจะมี MCYST-RR ในปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ MCYST-LR สำหรับ MCYST-YR พบน้อยที่สุด ในการวิจัยนี้จึงได้เลือกสารพิษ MCYST-RR เป็นต้นแบบในการผลิต polyclonal antibody แต่เนื่องจาก MCYST-RR มีขนาดเล็กเพียง 1,037 ดาลตัน (Chorus และ Bartram, 1999) ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ จึงต้องนำไปจับโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่ได้ทำการดัดแปลงให้มีหมู่ amine เพิ่มขึ้น โดยนำไปเชื่อมกับ ethylenediamine (EDA) โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDPC) เป็นตัวเชื่อม BSA ที่เชื่อมกับ EDA แล้ว เรียกว่า cationized BSA (cBSA) การที่ cBSA มีประจุบวกสูงขึ้นจะส่งผลให้มี immunogenicity สูงขึ้นด้วย เนื่องจากสภาวะที่มีประจุบวกทำให้สามารถจับกับ antigen presenting cells (APC) ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มี pH ต่ำ ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เร็วกว่าและเกิดการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะได้ดีกว่าด้วย (Muckerheide, 1987b; Domen, 1987; Apple, 1988; Domen and Hermanson, 1992)

ในการเชื่อม MCYST-RR เข้ากับ cBSA โดยใช้ EDPC เป็นตัวเชื่อมเนื่องจาก EDPC มีคุณสมบัติเป็น zero-length cross-linkers คือเป็นสารที่มีขนาดเล็กมีความสามารถในการทำให้สารตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปเชื่อมติดกันด้วนพันธะ amide โดยทำการเชื่อมหมู่ carboxylate ที่อยู่บน MCYST-RR กับหมู่ amine ที่อยู่บน cBSA แล้วตัว EDPC เองก็จะหลุดออกมาและสามารถกำจัดออกได้ง่าย ขั้นตอนในการเชื่อม EDA กับ BSA และ การเชื่อม MCYST-RR กับ EDA-BSA ได้แสดงไว้ในภาพที่ 7 และ ภาพที่ 8 ตามลำดับ



ภาพที่ 6 การทำปฏิกิริยาระหว่าง BSA และ EDA ได้เป็น cBSA

10% EDA 1 ml

↓

(BSA 300 mg + EDPC 400 mg) ในน้ำ 15 ml

↓

ปรับ pH 5.5 ด้วย 1N HCl 2.5 ml

↓ RT, 2 hr.

เติม EDPC อีก 200 mg

↓

ปรับ pH 5.5 ด้วย 1N HCl

↓ RT, ON

Dialysis ด้วย DW เป็นเวลา 3 วัน

↓

นำไป lyophize จนแห้ง

↓

เก็บที่ 4°C

ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการเชื่อม ethylenediamine (EDA) กับ bovine serum albumin (BSA)

9.1 การหาปริมาณ EDA ที่เหมาะสม

นำ BSA 300 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 15 มิลลิลิตร แล้วทำการเติม 1-ethyl-3,3-dimethylaminopropyl-carbodiimide (EDPC) 400 มิลลิกรัมเติมสารละลาย 10% EDA 0.002, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 1.5, 2, 2.5 มิลลิลิตร ทำการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย 1N HCl 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติม EDPC ลงไปอีก 200 มิลลิกรัม หลังจากนั้นจึงทำการปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วยสารละลาย 1N HCl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 คืน ทำการ dialysis ด้วยน้ำกลั่น 2 ลิตรเป็นเวลา 3 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำทุกวัน นำไป lyophilize จนแห้งแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.2 การหาปริมาณ EDPC ที่เหมาะสม

ทำการทดลองดังวิธีข้างต้นแต่ใช้ 10%EDA 1, 1.5, 2, 2.5 มิลลิลิตร และทำการเติม EDPC 600 และ 800 มิลลิกรัมใน EDA แต่ละปริมาตร

9.3 การเชื่อม MCYST-RR เข้ากับ cBSA (ดัดแปลงจากวิธีของ Chu และคณะ, 1989)

ละลาย MCYST-RR 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมด้วยสารละลาย ethanol 0.08 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำ deionize (pH 5) 0.32 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลาย EDA-BSA 20 มิลลิกรัม

ในน้ำ deionize (pH 5) 0.4 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วยสารละลาย 0.2 N NaOH ค่อยๆ หยดลงในสารละลาย EDPC 1.32 กรัมในน้ำ deionize (pH 5) 1.5 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วยสารละลาย 0.2 N NaOH ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไป dialysis ด้วยสารละลาย 0.1M NaCl 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไป lyophilize จนแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.4 การเชื่อม MCYST-RR กับ γ-globulin (ดัดแปลงตามวิธีของ Yu et al., 2002)

ละลาย EDPC 0.75 มิลลิกรัมด้วย N,N-dimethylformamide (DMF) 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปรวมกับสารละลาย NHS ที่มี NHS 0.75 มิลลิกรัมละลายอยู่ใน DMF 0.05 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ๆ) นำส่วนผสมนี้เติมลงในสารละลาย MCYST-RR ที่มี MCYST-RR 0.5 มิลลิกรัมละลายอยู่ใน DMF 0.1 มิลลิลิตรบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส อีก 1 คืน เติมส่วนผสมนี้ลงไปอย่างช้าๆ ในสารละลาย γ-globulin ที่ละลาย γ-globulin 2 มิลลิกรัมด้วย 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) 2 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง dialysis ด้วย 0.01M phosphate buffer (pH 7.5) ที่เติม 0.15 M NaCl ลงไป(PBS) 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำสารละลายนี้ไป lyophilize เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น immunogen ฉีดเข้าสัตว์ทดลอง

9.5 การเชื่อม poly-lysine กับ MCYST-RR (ดัดแปลงตามวิธีของ Yu et al., 2002)

ค่อยๆ หยดสารละลาย EDPC 10 มิลลิกรัมที่ละลายในน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตรลงในส่วนผสมของ MCYST-RR กับ poly-L-lysine ซึ่งละลาย MCYST-RR 0.5 มิลลิกรัมด้วยเอทธานอล 25% 0.25 มิลลิกรัม stire สารละลายตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึง dialysis ด้วยสารละลาย 0.01M phosphate buffer saline นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำไป lyophilize เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนวิธีทาง ELISA

MCYST-RR 5 mg

↓

ละลายใน ethanol 0.08 ml

↓

เจือจางด้วยน้ำกลั่น (pH 5) 0.32 ml

↓

ผสมกับ EDA-BSA solution [20 mg ในน้ำกลั่น (pH 5) 0.4 ml]

↓

ปรับ pH 5 ด้วย 0.2 N NaOH

↓

ค่อย ๆหยดลงไปใน EDPC solution [EDPC 1.32 g ในน้ำกลั่น (pH 5) 1.5 ml]

↓ pH 5, RT, 5 hr.

นำไป dialyzed กับ 0.1 M NaCl 2 ลิตร

↓ 6°C, 24 hr.

lyophilize

ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนการเชื่อม MCYST-RR (MCYST-RR) กับ cBSA

9.4 การตรวจสอบผลการ conjugate

9.4.1 การตรวจสอบด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (David และ Raykundalia, 1988)

ล้างกระจก comb และ spacer ให้สะอาด (ไม่ถูด้วยสก็อตไบร์ท) แล้วจึงทำความสะอาดเพื่อกำจัดคราบไขมันออกอีกครั้งด้วย methanol เตรียม separating (lower) gel โดยการผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันดี ทำการเติม catalyst รีบผสมแล้วเทอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น (เทปริมาตร 3 ใน 4 แผ่นกระจก) หลังจากเทเจลแล้วให้รีบเทน้ำทับผิวหน้าเจลเพื่อทำให้ผิวหน้าเรียบและเป็นการกำจัดฟองอากาศรวมทั้งจะช่วยกระตุ้นปฏิกิริยา polymerization ซึ่งเจลจะเกิดปฏิกิริยาต้องใช้เวลาอย่างน้อย 30-45 นาที เทน้ำออกแล้วเติม stacking gel ลงไป ซึ่งต้องใช้เวลานาน 20-30 นาที (เทปริมาตร 1 ใน 4 ของแผ่นกระจก)

ผสมตัวอย่างกับ buffer ในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วแช่ในน้ำเดือดนาน 2-5 นาที ตัวอย่างที่เหมาะสมควรจะมีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 2-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดึง comp ออกจาก stacking gel หยอดตัวอย่างลงใน well 30 ไมโครลิตร

เติม running buffer ลงใน tank วาง gel cassettes ลงไปในถังแล้วทำการต่อกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ประมาณ 1.5 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่อยู่ในส่วนของ stacking gel แล้วจึงเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น

40 มิลลิแอมแปร์ ประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่อยู่ในส่วนของ running gel หรือจนกระทั่งสีเคลื่อนที่ไปจนเกือบถึงขอบปลายสุดของ plate ประมาณ 1 ซม. จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

ทำการเอาเจลออกจาก cassettes โดยทำการเปิด cassettes ใต้น้ำที่ผสมสีย้อมอยู่ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นเจลไปแช่ใน destainer solution ทิ้งไว้ 1 คืน หรือจนกระทั่ง background staining หลุดออก (เป็นการละลายส่วนที่ย้อมออก ตรงไหนที่ไม่มีโปรตีนสีจะถูกชะออก แต่ตรงไหนที่มีโปรตีนจะติดสีน้ำเงิน)

9.4.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

ละลายสารที่ต้องการวัดด้วยน้ำ deionize water ให้ได้ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำ deionize water ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตร โดยใช้น้ำ deionize water เป็น blank

9.4.3 การทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการ coat แอนติเจน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน coating buffer 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้ว block แอนติเจนด้วย 0.1% gelatin ใน PBS-T 150-170 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เตรียมแอนติซีรัมที่ absorp ด้วย 2%BSA ที่ละลายอยู่ใน PBS-T โดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติซีรัมที่ได้เตรียมไว้100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียม goat-anti rabbit Immunoglobulin G ที่ linked กับเอนไซม์ แล้วทำการเจือจาง 1: 2000 เท่าด้วย PBS-T ที่ผสม 0.5% ovalbumin ล้าง plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม goat-anti rabbit Immunoglobulin G ที่ linked กับเอนไซม์ที่ได้เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม p-nitrophenyl phosphate อัตราส่วน 1:1 ใน substrate buffer (diethanolamine buffer) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

10. การฉีดสารพิษเข้าสู่สัตว์ทดลอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Chu et al., 1989)

ทดลองฉีดกระตุ้นอิมูโนเจนของ MCYST-RR ที่พ่วงกับ protein carrier ชนิด BSA, cBSA และ γ-globulin เข้าสู่กระต่ายพันธุ์ไวท์นิวซีแลนด์ เพศเมีย อายุประมาณ 2 เดือน โดยแบ่งการทดลองฉีดกระตุ้นเป็น 2 ครั้ง ดังนี้

<u>ครั้งที่ 1</u> เตรียม immunogen โดยดัดแปลงตามวิธีของ Chu และคณะ (1989) ฉีดเข้ากระต่าย 4 ชุด ดังนี้ ชุดที่ 1 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 1-2 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier ชนิด cBSA ที่เชื่อมกับ MCYST-RR 5 มิลลิกรัม, ชุดที่ 2 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 3-4 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier ชนิด cBSA ที่เชื่อมกับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม, ชุดที่ 3 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 5-7 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier

ชนิด cBSA ที่เชื่อมกับ MCYST-RR 15 มิลลิกรัม, ชุดที่ 4 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 8-10 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier ชนิด BSA ที่เชื่อมกับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยละลาย immunogen 500 ไมโครกรัมด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ฉีดกระตุ้นเข้าสู่สัตว์ทดลองบริเวณผิวหนังชั้น intradermal ของกระต่ายทิ้งไว้ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเจาะเลือดเก็บซีรัมประมาณ 10 มิลลิลิตร ฉีดสารพิษกระตุ้นซ้ำที่บริเวณกล้ามเนื้อ (intramuscular) บริเวณขาหลังของกระต่ายในสัปดาห์ที่ 4 และ 11 ด้วยการละลาย immunogen 500 ไมโครกรัมในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 0.1 มิลลิลิตรผสมกับ incomplete Freund's adjuvant 0.3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเจาะเลือดเก็บซีรัมทุกสัปดาห์เป็นเวลา 14 สัปดาห์

<u>ครั้งที่ 2</u> เตรียม immunogen โดยดัดแปลงตามวิธีของ Chu และคณะ (1989) สำหรับการเชื่อม MCYST-RR ด้วย BSA และ cBSA นั้นมีการดัดแปลงวิธีการโดยขั้นตอนการเชื่อมจะใช้สารละลาย 0.1M MES (2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid) pH 4.75 เป็นตัวทำละลายแทนการใช้น้ำ deionize เพื่อลดปัญหาในการปรับพีเอช ส่วนการเชื่อม γ-globulin กับ MCYST-RR นั้นดัดแปลงตามวิธีการของ Yu และคณะ (2002) จากการทดลองครั้งนี้ฉีดกระต่าย 3 ชุดดังนี้ ชุดที่ 1 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 1-3 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier ชนิด cBSA ที่เชื่อมกับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม, ชุดที่ 2 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 4-6 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier ชนิด BSA ที่เชื่อมกับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม และชุดที่ 3 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 7-8 ฉีดกระตุ้นด้วย protein carrier ชนิด γ-globulin 2 มิลลิกรัมที่เชื่อมกับ MCYST-RR 0.5 มิลลิกรัมตามลำดับ โดยละลาย immunogen 500 ไมโครกรัมด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 1 มิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ฉีดกระตุ้นเข้าสู่สัตว์ทดลองบริเวณผิวหนังชั้น intradermal ของกระต่ายทิ้งไว้ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเจาะเลือดเก็บซีรัมประมาณ 10 มิลลิลิตร ฉีดสารพิษกระตุ้นซ้ำที่บริเวณใต้ผิวหนังชั้น subcutaneous ในสัปดาห์ที่ 4 และ 10 ด้วยการละลาย immunogen 500 ไมโครกรัมในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 1 มิลลิลิตรผสมกับ incomplete Freund's adjuvant 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเจาะเลือดเก็บซีรัมทุกสัปดาห์ ขณะนี้อยู่ในระหว่างการเก็บแอนติซีรัมครั้งที่ 4

11. การทดสอบหาคุณภาพของแอนติซีรัม

<u>11.1 การทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายกับแอนติเจนแต่ละชนิดด้วยวิธี indirect ELISA</u>

เคลือบแอนติเจน (BSA, cBSA, cBSA-MC-RR, MC-RR) 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับกระต่ายกลุ่มที่ 1) หรือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับกระต่ายกลุ่มที่ 2) ที่ละลายใน coating buffer 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้ว block แอนติเจนด้วย 0.1% gelatin ใน PBS-T 150-170 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติซีรัมที่ได้เจือจางที่ความ

เข้มข้น 1: 1,000 ลงไป 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม goat-anti rabbit Immunoglobulin G ที่ linked กับเอนไซม์ horseradish peroxidase ที่เจือจาง 1: 10,000 เท่าด้วย PBS-T ที่ผสม 0.5% ovalbumin ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม O-phenylenediamine (OPD) ละลายใน substrate buffer 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

11.2 การหาปริมาณแอนติเจน (PLL-MC-RR) ที่เหมาะสม

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1 แต่เคลือบ microwell ด้วย PLL-MC-RR โดยใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1:100,000 และ 1:1,000,000 ตามลำดับ เจือจางแอนตีซีรัมเป็น 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000 และ 1:10,000,000 ตามลำดับ

11.3 การหาค่าไตเตอร์

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1 แต่เคลือบ microwell ด้วย PLL-MC-RR ความเข้มข้น 1:1000 แล้วเจือจางแอนติซีรัมให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน

12. การทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA

12.1 การตกตะกอนแอนติบอดี

แอนติบอดี 1 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวลงไป 33.3% กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที นำตะกอนมาละลายด้วย PBS 1 มิลลิลิตร แล้วจึงตกตะกอนซ้ำด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 33.3% กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที นำตะกอนมาละลายด้วย PBS 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำไป dialysis ด้วย 20mM carbonate (pH 9.5) 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของแอนติบอดีดังสมการ

$$\text{ปริมาณแอนติบดี} = \frac{\text{Absorbance 280 nm}}{1.4}$$

12.2 การเชื่อมแอนติบอดีกับ HRP

ละลาย HRP 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น 0.24 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1M sodium periodate ใน 10mM sodium phosphate (pH 7) ลงไป 0.06 มิลลิลิตร สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีเขียวอ่อน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไป dialysis ด้วย 1mM sodium acetate (pH 4) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงเติมสารละลายแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 2

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 20mM carbonate (pH 9.5) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม sodium borohydride ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

12.3 <u>การเตรียมกราฟมาตรฐานเพื่อทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA</u>

เคลือบ microwell ด้วย PLL-MC-RR ที่เจือจางด้วย 150mM phosphate buffer saline pH7.1 ความเข้มข้น 1:1000 ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T (150mM phosphate buffer saline pH7.4 ที่เติม 0.05%tween 20) 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.1% skimmed milk ซึ่งละลายอยู่ใน PBS-T 200 ไมโครลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติม MCYST-RR ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย 150mM phosphate buffer saline pH7.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติมแอนติบอดีที่ทำการติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP (Ab-HRP) ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย 300mM phosphate buffer saline pH7.4ที่ความเข้มข้น1:1000 ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลาย TMB substrate ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 1N hydrochloric acid 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

12.4 <u>การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ของแอนติบอดีต่อสารพิษมาตรฐานชนิดอื่นๆ</u>

ทำการทดลองเหมือนข้อ 1.3 แต่ทดสอบด้วยสารพิษมาตรฐาน MCYST-YR และ MCYST-LR เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ MCYST-RR

12.5 <u>การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ของแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดต่างๆ</u>

ทำการทดลองเหมือนข้อ 1.3 แต่ทดสอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ คือ กับ cBSA (cationized bovine serum albumin), skimmed milk, BSA (bovine serum albumin), γ-globulin, ovalbumin และ poly-L-lysine ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ng/ml-1 mg/ml เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ MCYST-RR

12.6 <u>การหา %recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำกลั่น</u>

ทำการทดลองเหมือนข้อ 1.3 แต่ทดสอบด้วยน้ำกลั่นที่เติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR 0.5, 1, 5 และ 10 ppb แล้วคำนวณหา %recovery ของสารพิษ MCYST-RR เทียบกับกราฟมาตรฐาน

12.7 <u>การหา %recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำประปา</u>

ทำการทดลองเหมือนข้อ 1.3 แต่ทดสอบด้วยน้ำประปาที่เติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ppb แล้วคำนวณหา %recovery ของสารพิษ MCYST-RR เทียบกับกราฟมาตรฐาน

12.8 <u>การตรวจหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจากสารสกัดสาหร่ายที่ได้จากธรรมชาติด้วยวิธี ELISA และวิธี HPLC</u>

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 50 มิลลิลิตร เติมสาหร่ายแห้ง 1 กรัม สกัดด้วยสารละลาย 5% acetic acid ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึง centrifuge ด้วยความเร็ว 3000 รอบ นาน 15 นาที เก็บส่วนใสไว้ สำหรับตะกอนนำไปสกัดอีกครั้งด้วย 100% methanol 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึง centrifuge ด้วยความเร็ว 3000 รอบ นาน 15 นาที เก็บส่วนใสรวมกับส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย acetic acid แล้วนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่อง evaporator ละลายกลับด้วยสารละลาย 20% methanol 20 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ผ่าน C18 SPE (solid phase extraction) cartridge ล้างด้วยสารละลาย 20% methanol 10 มิลลิลิตร ชะด้วยสารละลาย 80% methanol 5 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายกลับด้วยสารละลาย 30% methanol 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี HPLC และวิธี direct competitive ELISA

สำหรับตัวอย่างน้ำกลั่น น้ำประปา และน้ำที่เก็บได้จากสระน้ำภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR 100 ppb แล้วเจือจางด้วยสารละลาย 150mM phosphate buffer saline pH7.4 วิเคราะห์ด้วยวิธี direct competitive ELISA

ผลและวิจารณ์

1. การสำรวจการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียใน ยีนัส *Microcystis* จากแหล่งน้ำ

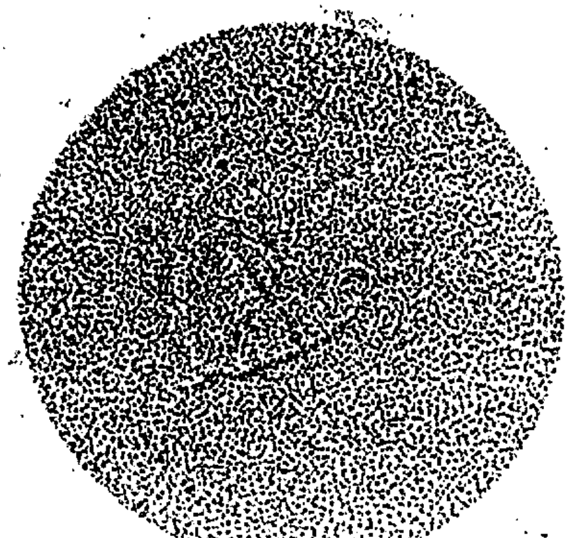
จากการสำรวจแหล่งน้ำเพิ่มเติมเพื่อคัดแยก *Microcystis* หาสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้สูง ตั้งแต่เดือนสิงหาคม ถึง พฤศจิกายน 2545 โดยทำการสำรวจเก็บตัวอย่างตามแหล่งน้ำต่างๆ ได้แก่ บ่อ, สระ, คลอง, บึง, ฝายน้ำ, อ่างเก็บน้ำ และ เขื่อนเก็บกักน้ำ ในหลายจังหวัดของภาคกลาง ภาคตะวันออก และ ภาคใต้ ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 27 แห่ง แต่ในปีนี้เนื่องจากสภาวะแปรปรวนของฤดูกาลที่มีฝนต่อเนื่องเกือบตลอดเวลา ทำให้ระยะเวลาพักตัวของแหล่งน้ำ (hydraulic retention time) สั้น จึงไม่พบการการสะสมของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Microcystis* โดยพบ algal bloom เพียง 3 แหล่งในบ่อปลาดุก อ. ลำลูกกา กรุงเทพฯ แต่ในการตรวจตัวอย่างน้ำพบว่ามีตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในยีนัสนี้ 12 แห่ง (ตารางที่ 5) เมื่อทำการจัดจำแนกสปีชีส์โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Watanabe (1996) ซึ่งการจัดจำแนกสปีชีส์อาศัยการสังเกตจาก ขนาดของเซลล์ และ รูปร่างลักษณะโคโลนี เป็นหลัก พบว่าเกือบทั้งหมดเป็น *Microcystis aeruginosa* มี 2 ตัวอย่างที่ลักษณะของโคโลนีไม่ชัดเจนไม่สามารถจำแนกจนถึงระดับสปีชีส์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ จึงจำแนกเป็น *Microcystis sp.* สาเหตุที่ในบ่อเลี้ยงปลา พบว่ามีการเจริญเติบโตอย่างของ *Microcystis* อย่างรวดเร็ว อาจจะเนื่องมาจากว่าในบ่อปลานี้มีปริมาณของสารอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจนที่มาจากอาหารเลี้ยงปลา และ *Microcystis* สามารถใช้เพื่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มีอยู่เดิมจำนวน 80 สายพันธุ์ ได้ลดจำนวนลงเหลือเพียง 54 สายพันธุ์ เนื่องจากบางส่วนได้ตายไปโดยไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งส่วนที่เหลือนี้กระจายอยู่ใน 4 สปีชีส์ คือ *Microcystis aeruginosa* (ภาพที่ 5) ซึ่งมีจำนวนมากที่สุด และรองลงมาคือ *Microcystis wesenbergii* (ภาพที่ 6), *Microcystis ichthyoblabe* (ภาพที่ 7) และ *Microcystis sp.* (ภาพที่ 8) ตามลำดับ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *Microcystis aeruginosa* และ *Microcystis ichthyoblabe* เป็นสปีชีส์ที่มีการแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวาง ในแหล่งน้ำที่สำรวจได้ในประเทศไทย ยีนัส *Microcystis* ทั้งสองสปีชีส์สามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และส่วนใหญ่ยังสามารถสร้างสารพิษไมโครซิสตินได้อีกด้วย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่พบในประเทศญี่ปุ่น โดย *Microcystis aeruginosa* จะก่อให้เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายในแหล่งน้ำ จะก่อให้เกิดปัญหาความเป็นพิษมาก และ *Microcystis ichthyoblabe* เป็นสปีชีส์ที่มีการแพร่กระจายสามารถพบทั้งสายพันธุ์ที่สร้างพิษ และสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษสร้างพิษ สำหรับ *Microcystis wesenbergii* มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในญี่ปุ่นเช่นกัน แต่ไม่สร้างสารพิษ (Watanabe, 1996)

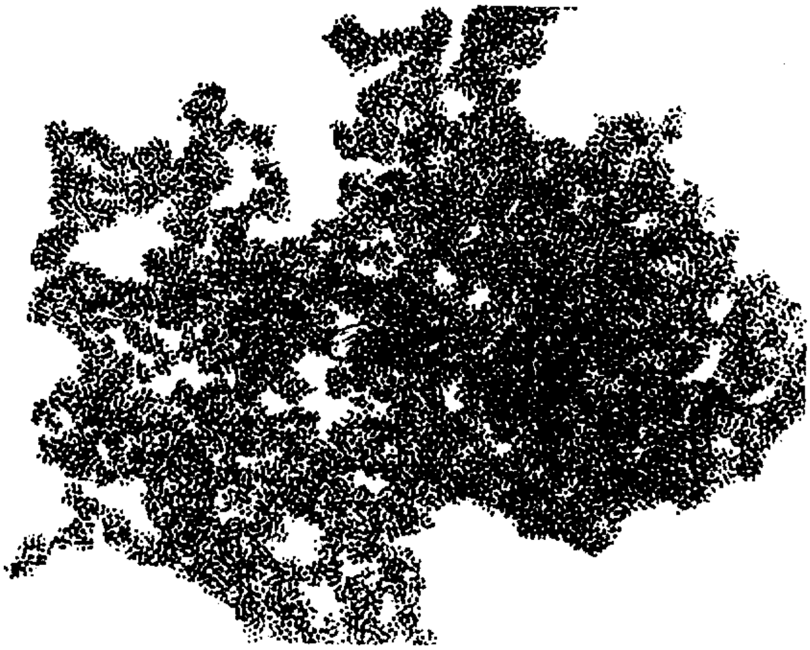
ตารางที่ 5 สปีชีส์ของไซยาโนแบคทีเรียในยีนัส *Microcystis* จำแนกตามลักษณะโคโลนี ที่เก็บเพิ่ม

สายพันธุ์	**Species**	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**	**จังหวัด**
M50081	*M. aeruginosa*	เขื่อนบางวาด	ภูเก็ต
M50082	*Microcystis* sp.	บ่อน้ำ	ภูเก็ต
M50083	*M. aeruginosa*	บ่อน้ำ	ตรัง
M50084	*M. aeruginosa*	อ่างน้ำมหาวิทยาลยสงขลานครินทร์	สงขลา
M50085	*M. aeruginosa*	บ่อปลา	กรุงเทพฯ
M50086	*M. aeruginosa*	บ่อปลา	กรุงเทพฯ
M50087	*M. aeruginosa*	บ่อปลา	กรุงเทพฯ
M50088	*M. aeruginosa*	บ่อน้ำ	กรุงเทพฯ
M50089	*M. aeruginosa*	บ่อน้ำ	กรุงเทพฯ
M50090	*M. aeruginosa*	บ่อน้ำ	จันทบุรี
M50091	*Microcystis* sp.	บ่อน้ำ	ตราด
M50092	*M. aeruginosa*	บ่อน้ำ	ตราด

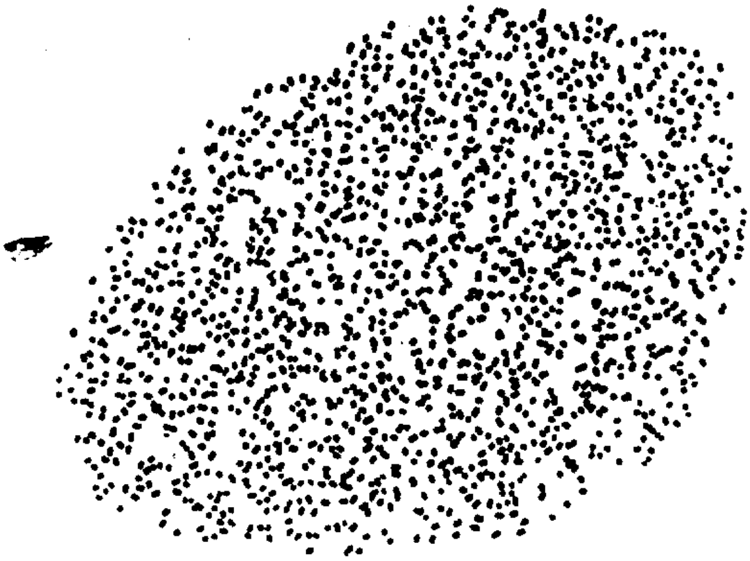
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Microcystis aeruginosa*



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Microcystis wesenbergii*



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Microcystis ichthyoblabe*

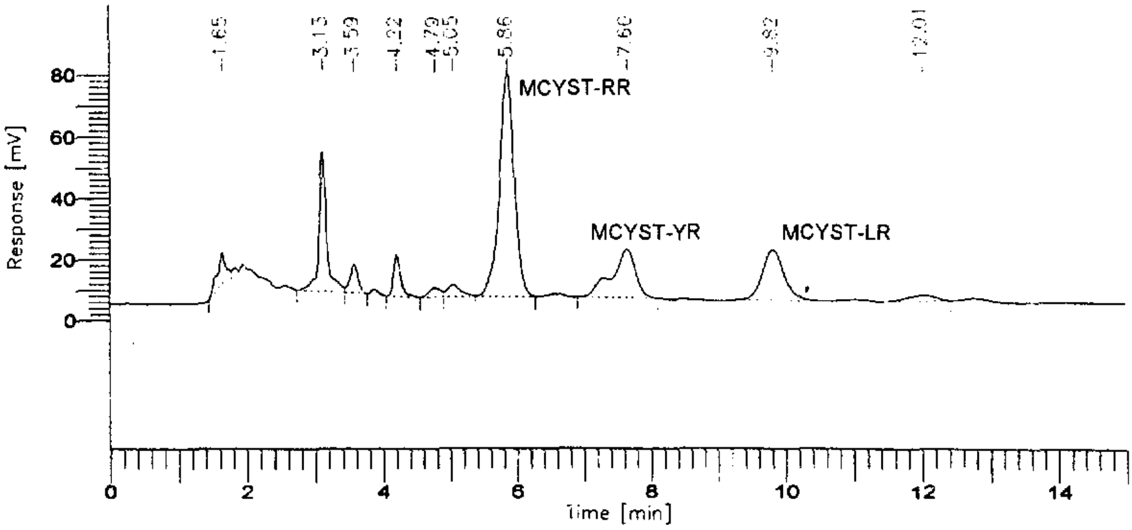


ภาพที่ 8 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Microcystis* sp.

2. การตรวจสอบชนิดของสารพิษไมโครซิสตินใน ยีนัส *Microcystis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สำรวจจากแหล่งน้ำในประเทศไทย

จากการตรวจสอบการสร้างสารพิษไมโครซิสตินของไซยาโนแบคทีเรียในยีนัส *Microcystis* ที่รวบรวมได้ทั้งหมด 66 สายพันธุ์ (stock culture 54 สายพันธุ์ และแยกได้ใหม่ 12 สายพันธุ์) โดยทำการเพาะเลี้ยงในหลอดก้นกรวยขนาด 200 มล. นาน 3 สัปดาห์ แล้วนำสาหร่ายที่ได้มาสกัดแล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามีสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ 34 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) โดยพบสารพิษไมโครซิสตินชนิด RR, YR, LR และอีกชนิดหนึ่งที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (ภาพที่ 9) โดยพบว่าเชื้อจะสร้าง MCYST-RR ได้ในปริมาณมากที่สุด (25 สายพันธุ์), MCYST-LR พบในปริมาณที่รองลงมา และ MCYST-YR สร้างได้น้อยที่สุด โดยสายพันธุ์ M50058 มีการสร้าง MCYST-RR จึงคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการสร้างสารพิษไมโครซิสตินที่จะนำไปใช้เป็น antigen ต่อไป นอกจากนี้ยังได้เลือกสายพันธุ์ M50020 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษมาศึกษาสภาวะแวดล้อมที่อาจกระตุ้นให้มีการสะสมไมโครซิสติน เป็นที่น่าสังเกตว่าบางสายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะมีการสร้างสารพิษลดลง หรือไม่สร้างสารพิษเลย ทั้งอาจเป็นเพราะว่าสภาวะในการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการไม่เหมาะต่อการสร้างสารพิษของแต่ละสายพันธุ์ และแต่ละสายพันธุ์อาจมีความต้องการสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

จากการศึกษาจะพบว่าสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารพิษได้จากอ่างเก็บน้ำได้เป็นส่วนใหญ่ และในบ่อเลี้ยงปลา-กุ้ง พบว่ามีการแพร่กระจายไซยาโนแบคทีเรียในยีนัส *Microcystis* ที่สร้างสารพิษได้มากเช่นกัน ซึ่งแหล่งน้ำนี้จะนำมาใช้ประโยชน์ในการอุปโภค-บริโภค, การเกษตร และเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่นำมาเป็นอาหาร ดังนั้นสารพิษเหล่านี้จะมีผลต่อสุขภาพของคน สัตว์ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในแหล่งน้ำนั้นทั้งทางตรง และทางอ้อม



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารพิษไมโครซิสติน 3 ชนิด วิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ Mightysil ODS (150 x 4.6 mm) และ 0.05 M phosphate buffer pH 3.0 in 60% methanol เป็น mobile phase ตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร

ตารางที่ 6 ชนิดของสารพิษไมโครซิสตินในไซยาโนแบคทีเรียในยีนัส *Microcystis* สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์	Species	ชนิดของสารพิษ MCYST			
		RR	YR	LR	Other
M50001	*M. aeruginosa*	++	-	+	-
M50002	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50003	*M. aeruginosa*	++	+	+	-
M50004	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50006	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50007	*M. aeruginosa*	-	-	+	-
M50008	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50009	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50011	*M. aeruginosa*	+++	+	++	-
M50014	*M. ichtyoblabe*	-	-	+	-
M50015	*Microcystis* sp.	-	-	+	-
M50016	*M. aeruginosa*	+	+	+	+
M50017	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50020	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50022	*M. aeruginosa*	++	-	+	-
M50024	*M. aeruginosa*	++	-	++	-
M50025	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50026	*M. aeruginosa*	+++	-	-	+
M50027	*M. aeruginosa*	-	+	-	-
M50029	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50030	*M. wesengergii*	-	-	-	-
M50032	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50033	*Microcystis* sp.	+	+	+	-
M50034	*M. aeruginosa*	+	+	+	+
M50036	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50037	*M. aeruginosa*	+	-	-	-
M50038	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50040	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50042	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์	Species	ชนิดของสารพิษ MCYST			
		RR	YR	LR	Other
M50043	*M. aeruginosa*	+++	-	+	-
M50045	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50046	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M58049	*M. ichtyoblabe*	-	+	-	-
M50050	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50052	*M. aeruginosa*	++	-	-	-
M50053	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	+
M50054	*M. aeruginosa*	-	+	+	-
M50055	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50056	*M. aeruginosa*	-	-	+	-
M50058	*M. aeruginosa*	++++	+	++	-
M50062	*M. aeruginosa*	-	-	+	-
M50063	*M. aeruginosa*	+	-	-	-
M50064	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50066	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50068	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50069	*M. wesengergii*	-	-	-	-
M50070	*M. aeruginosa*	++	+	+	-
M50072	*M. ichtyoblabe*	-	-	-	-
M50075	*M. ichtyoblabe*	+	-	-	-
M50076	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50077	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50078	*M. aeruginosa*	+	++	-	-
M50080	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50081	*M. aeruginosa*	+	-	+	-
M50082	*Microcystis* sp.	++	+	-	-
M50083	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50084	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50085	*M. aeruginosa*	+	+	+	-
M50086	*M. aeruginosa*	+	+	+	-
M50087	*M. aeruginosa*	-	-	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์	Species	ชนิดของสารพิษ MCYST			
		RR	YR	LR	Other
M50088	*M. aeruginosa*	-	-	-	-
M50089	*M. aeruginosa*	+	-	-	-
M50090	*M. aeruginosa*	++	+	+	-
M50091	*Microcystis* sp.	+	-	-	-
M50092	*M. aeruginosa*	+	-	-	-

3. การปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของ *M. aeruginosa*

จากการศึกษาเพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ M50058 ซึ่งสำรวจและแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา 2 จังหวัดปทุมธานี ที่ทำการวิเคราะห์แล้วว่ามีการสร้างสารพิษ MCYST-RR ได้ในปริมาณสูง, และสามารถสร้างสารพิษ MCYST-YR และ MCYST-LR ได้เล็กน้อย และ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50020 จากอ่างเก็บน้ำห้วยเสนงที่ไม่พบการสร้างสารพิษ และทั้งสองสายพันธุ์ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาผลการปรับปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารดังนี้ $Ca(NO_3)_2$, KNO_3, $NaNO_3$, Bicine, β-sodium-glycerophosphate และสภาวะความเป็นกรด – ด่าง, อุณหภูมิ, ความเข้มแสงที่มีผลต่อการสร้างสารพิษไมโครซิสตินและการเจริญเติบโต เมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะแรกของการเจริญเติบโตแบบคงที่ *Microcystis aeruginosa* สามารถสร้างสารพิษได้มากและจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์นำไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ

<u>3.1 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ</u>

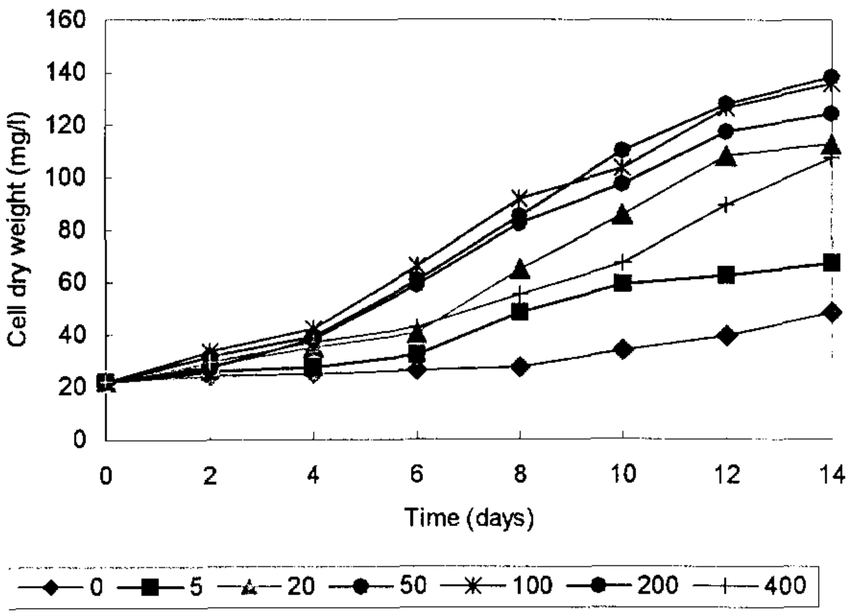
จากผลการทดลองปรับความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ ในอัตรา 0, 5, 20, 50 (สูตรปกติ), 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 เมื่อเลี้ยงใน MA medium ที่ใช้ความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดิมในสูตรอาหารยังคงให้อัตราการเจริญสูงสุด มีค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เมื่อเลี้ยงไป 14 วัน เท่ากับ 138.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ระดับความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ ที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ปริมาณเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง135.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่ระดับ $Ca(NO_3)_2$ อื่นๆ มีอัตราการเจริญที่ด้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 10) จึงสรุปว่า $Ca(NO_3)_2$ ที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอัตราที่เหมาะสมดีอยู่แล้วสำหรับ *Microcystis* M50058 ที่สร้างสารพิษ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษในเซลล์ของ *Microcystis* ที่เลี้ยงด้วย MA medium โดยใช้ $Ca(NO_3)_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษไมโครซิสตินที่สุด เพราะให้ปริมาณ MYCST-RR สูงสุดที่ 0.88 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และให้ปริมาณสารพิษรวม 1.12 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 11) ผลการทดลองยัง

ชี้ให้เห็นว่า $Ca(NO_3)_2$ มีความสำคัญต่อการสร้างสารพิษ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี $Ca(NO_3)_2$ เซลล์ไม่สามารถผลิตสารพิษได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Watanabe and Oishi (1985) ที่รายงานว่าการผลิตสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียยีนัส *Microcystis* จะมีปริมาณสูงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง สำหรับ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50020 ที่ไม่สร้างสารพิษ พบว่าการให้ $Ca(NO_3)_2$ ที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ปริมาณเซลล์ที่สูงที่สุด คือ 187.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงครบ 14 วัน (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 12) แต่ตรวจไม่พบสารพิษไมโครซิสตินในทุกระดับความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ จึงสรุปได้ว่า $Ca(NO_3)_2$ ไม่สามารถกระตุ้นให้ *Microcystis* สร้างสารพิษได้

จะเห็นว่า *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 และสายพันธุ์ M50020 จะเจริญเติบโตได้ดีที่ปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างสูง แสดงว่าปริมาณไนโตรเจนจะมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต และเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ ต่ำ หรือไม่ให้ $Ca(NO_3)_2$ พบว่ามีการเจริญเติบโตบ้าง แต่ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากว่าเซลล์สามารถใช้ KNO_3, $NaNO_3$ และ Bicine (ที่มีอยู่ในสูตรอาหาร MA medium) เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน $Ca(NO_3)_2$ ก็ได้

ตารางที่ 7 ผลของ $Ca(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 (สูตรปกติ), 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	0	5	20	50	100	200	400
0	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1
2	24.0	25.8	28.2	31.4	33.5	27.2	29.4
4	25.1	27.4	35.1	39.2	42.1	38.1	37.2
6	26.1	32.0	40.3	60.7	65.8	58.7	42.7
8	27.5	48.1	64.7	85.0	91.7	82.5	54.9
10	33.7	59.2	85.6	110.1	103.4	97.3	67.1
12	39.4	62.4	108.2	127.8	126.4	117.4	89.4
14	48.3	67.2	112.7	138.3	135.9	124.4	107.4

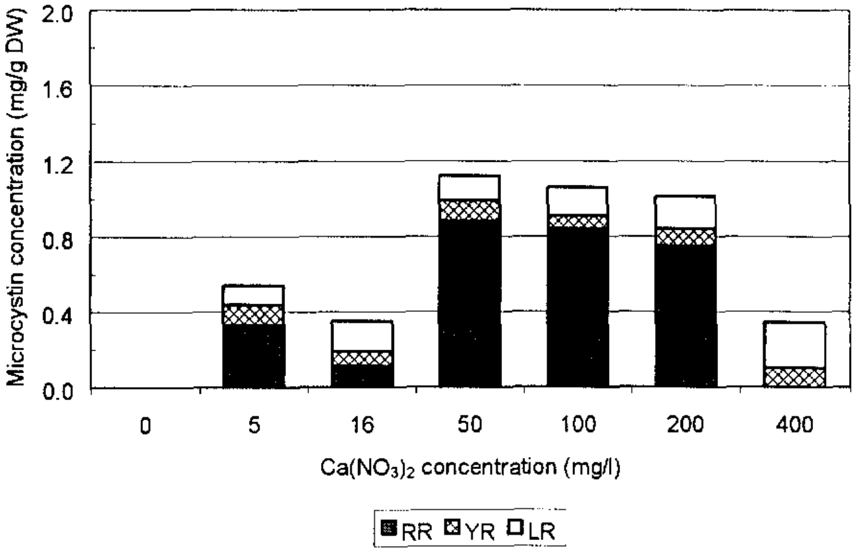


ภาพที่ 10 ผลของ $Ca(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 (สูตรปกติ), 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

$Ca(NO_3)_2$	ชนิดของสารพิษ MCYSTs (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
(mg/l)	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	ND	ND	ND	ND
5	0.33	0.11	0.10	0.54
16	0.11	0.08	0.16	0.35
50 (สูตรปกติ)	0.88	0.11	0.13	1.12
100	0.84	0.07	0.15	1.06
200	0.75	0.09	0.17	1.01
400	ND	0.10	0.24	0.34

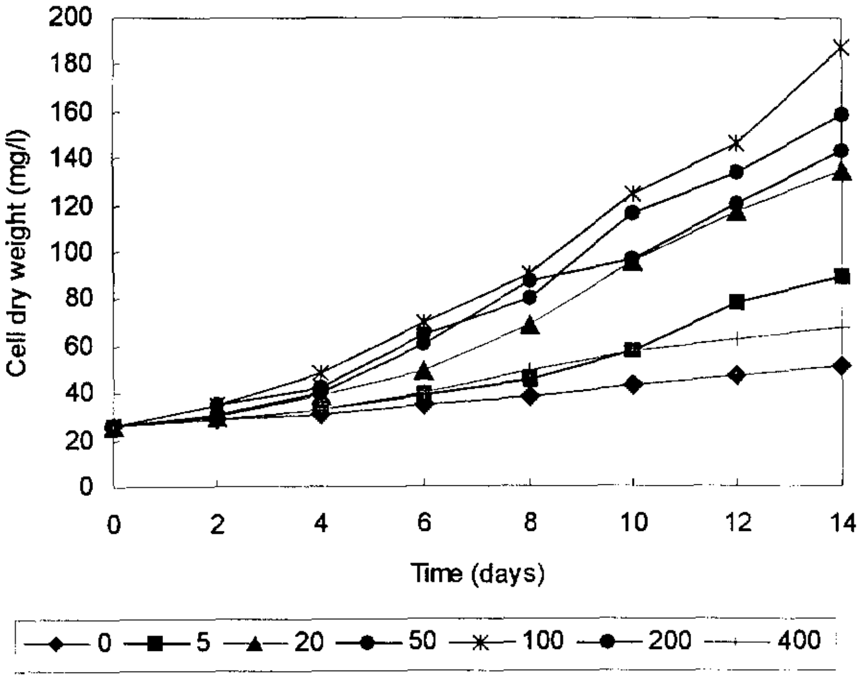
หมายเหตุ ND = ไม่พบปริมาณสารพิษ



ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้นของ $Ca(NO_3)_2$ ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

ตารางที่ 9 ผลของ $Ca(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 (สูตรปกติ), 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50020

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
(วัน)	0	5	20	50	100	200	400
0	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4
2	28.4	28.9	30.2	35.2	35.4	30.7	29.0
4	30.7	33.1	38.7	42.1	48.6	39.9	32.5
6	34.6	39.4	49.3	64.8	70.5	60.4	40.1
8	38.4	45.3	69.1	80.3	90.4	87.3	49.6
10	43.7	57.4	95.7	116.1	124.9	96.4	57.4
12	47.2	78.3	117.2	133.8	146.3	121.0	62.4
14	51.7	89.4	134.7	158.4	187.4	143.8	67.8



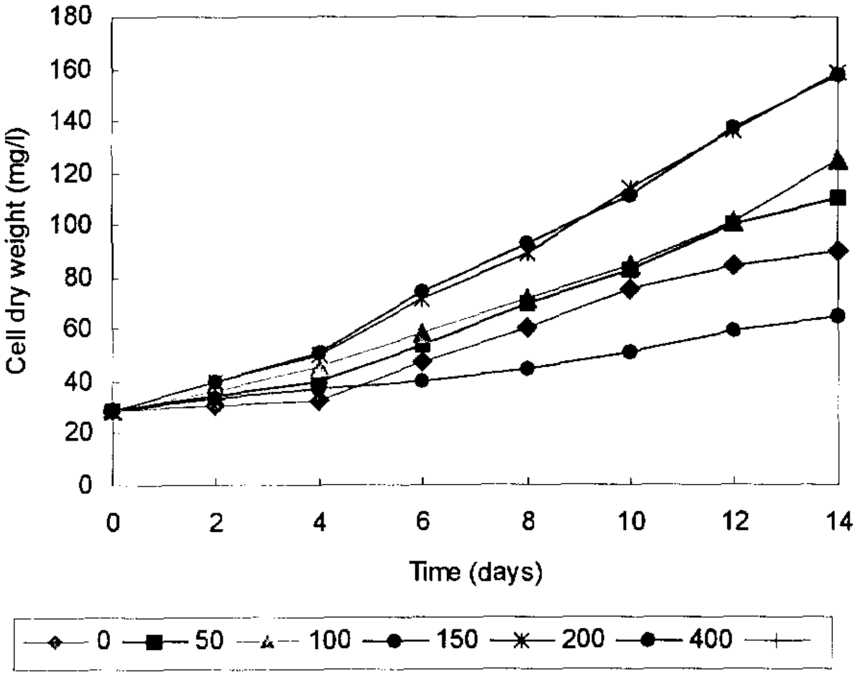
ภาพที่ 12 ผลของ $Ca(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 (สูตรปกติ), 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50020

3.2 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ KNO_3ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

การศึกษาถึงปริมาณ KNO_3ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารพิษโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นของ KNO_3ใน MA medium เท่ากับ 0, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่ที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญทุกๆ 2 วัน ผลการศึกษาพบว่า *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 มีการเจริญสูงสุดที่ 158.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ที่ระดับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ให้ความเข้มข้นของเซลล์ใกล้เคียงกันที่ 157.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 10 และภาพที่ 13) นั่นแสดงว่า KNO_3 ที่ใช้ในสูตรอาหาร MA medium ควรเพิ่มเป็น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ KNO_3 ในอัตราสูงถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของ M50058 จะต่ำมากมีลักษณะคล้ายกับสูงจนเป็นพิษต่อไซยาโนแบคทีเรีย สำหรับผลวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ *Microcystis aeruginosa* M50058 สร้างสารพิษ MCYST–RR, MCYST–YR และ MCYST–LR มีสัดส่วนในลักษณะเดิม โดยมีปริมาณ MCYST-RR ตามความเข้มข้นของปริมาณ KNO_3 ข้างต้น 0.30, 0.40, 1.21, 0.81, 0.65 และ 0.68 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 14) โดยมีปริมาณสารพิษรวมสูงสุดที่ได้ 1.46 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ M50020 มีลักษณะของอัตราการเจริญคล้ายกับ M50058 คือ เมื่อใช้ KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 200.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ที่ระดับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นของเซลล์ใกล้เคียงกันที่ 195.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 12 และภาพที่ 15) และที่ความเข้มข้นของ KNO_3 ต่างๆ กันก็ไม่สามารถกระตุ้นให้สายพันธุ์ M50020 สร้างสารพิษไมโครซิสติน

ตารางที่ 10 ผลของ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	0	50	100	150	200	400
0	28.7	28.7	28.7	28.7	28.7	28.7
2	30.4	34.5	36.0	39.6	40.3	33.1
4	32.8	40.1	45.5	51.4	50.4	37.4
6	47.1	54.1	58.2	74.3	71.4	40.2
8	60.3	69.8	71.5	92.7	89.2	44.2
10	75.1	82.7	84.7	111.8	114.3	51.0
12	84.2	100.6	101.4	137.2	136.7	59.4
14	89.7	110.4	124.9	157.3	158.7	64.7

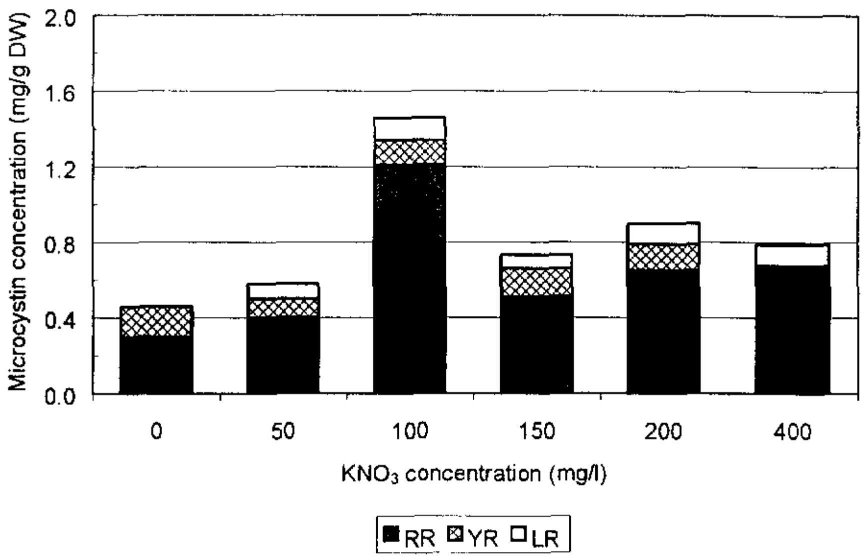


ภาพที่ 13 ผลของ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 11 ผลของความเข้มข้นของ KNO_3 ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

KNO_3 (mg/l)	ปริมาณและชนิดของสารพิษ MCYSTs (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	0.30	0.16	ND	0.46
50	0.40	0.10	0.08	0.58
100 (สูตรปกติ)	1.21	0.13	0.12	1.46
150	0.81	0.15	0.07	0.73
200	0.65	0.14	0.11	0.90
400	0.68	ND	0.11	0.79

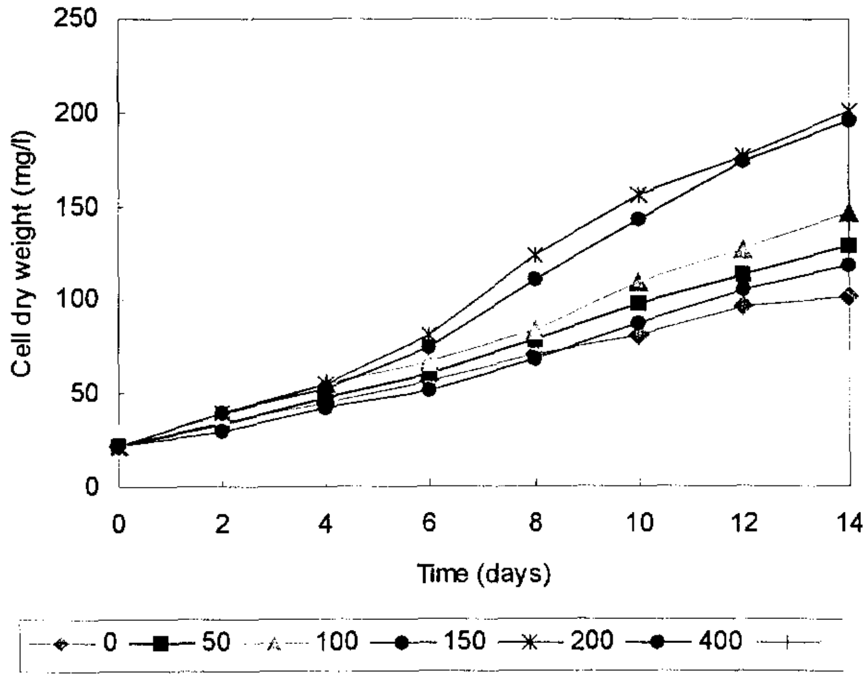
หมายเหตุ ND = ไม่พบปริมาณสารพิษ



ภาพที่ 14 ผลของความเข้มข้นของ KNO_3 ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

ตารางที่ 12 ผลของ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50020

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
(วัน)	0	50	100	150	200	400
0	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3
2	34.2	34.1	38.3	40.1	39.8	30.0
4	44.7	47.3	55.1	52.7	55.7	42.9
6	57.3	60.2	67.5	74.6	80.6	51.4
8	70.8	78.4	83.4	110.6	124.3	68.3
10	81.4	98.5	109.4	143.5	155.7	87.8
12	97.2	113.1	127.8	174.2	176.4	105.4
14	101.2	128.4	147.5	195.3	200.4	118.3



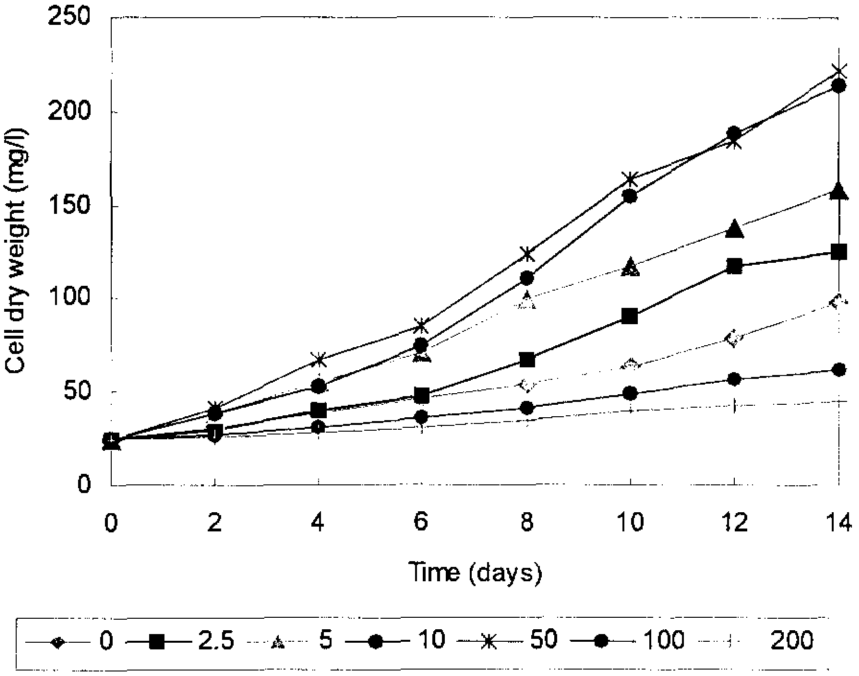
ภาพที่ 15 ผลของ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50020

3.3 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

ศึกษาถึงปริมาณ $NaNO_3$ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นของ $NaNO_3$ จากอาหารชนิด MA ซึ่งเป็นสูตรอาหารปกตินำมาปรับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 2.5, 5 (สูตรปกติ), 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สภาวะการเลี้ยงเหมือนข้างต้น พบว่า *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 มีอัตราการเจริญเท่ากับ 97.4, 124.8, 158.9, 214.1, 221.5, 61.7 และ 45.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13 และภาพที่ 16) โดยปริมาณ $NaNO_3$ ในระดับ 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงสรุปว่าที่อัตรา 10 มิลลิกรัมต่อลิตร น่าจะเป็นระดับที่เหมาะสม โดยระดับของ $NaNO_3$ ที่ใช้จะสูงกว่าเดิมเท่าตัว ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ พบว่าปริมาณสารพิษ MCYST-RR ที่ M50058 ผลิตมีค่าเท่ากับสูงสุดที่ 1.58 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ $NaNO_3$ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่อนข้างน่าแปลกใจเพราะที่ระดับความเข้มข้นนี้มีปริมาณเซลล์ค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 17) อย่างไรก็ตาม $NaNO_3$ ที่ระดับ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ให้ปริมาณสารพิษใกล้เคียงกัน สำหรับสายพันธุ์ 50020 ตอบสนองต่อปริมาณ $NaNO_3$ ที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 248.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่มีความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ใดเลยที่สามารถกระตุ้นให้สายพันธุ์ M50020 สร้างสารพิษไมโครซิสตินได้ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 13 ผลของ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น กับ 0, 2.5, 5 (สูตรปกติ), 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	0	2.5	5	10	50	100	200
0	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1
2	30.6	29.5	38.2	38.5	41.2	27.1	26.0
4	38.4	40.1	54.9	53.4	67.4	30.4	28.1
6	46.5	48.2	70.4	74.3	85.5	35.7	30.4
8	54.3	67.4	99.1	110.6	124.1	41.2	34.2
10	62.7	89.6	117.3	154.3	164.2	49.3	39.4
12	78.5	117.5	138.4	187.9	184.3	57.1	42.0
14	97.4	124.8	158.9	214.1	221.5	61.7	45.2

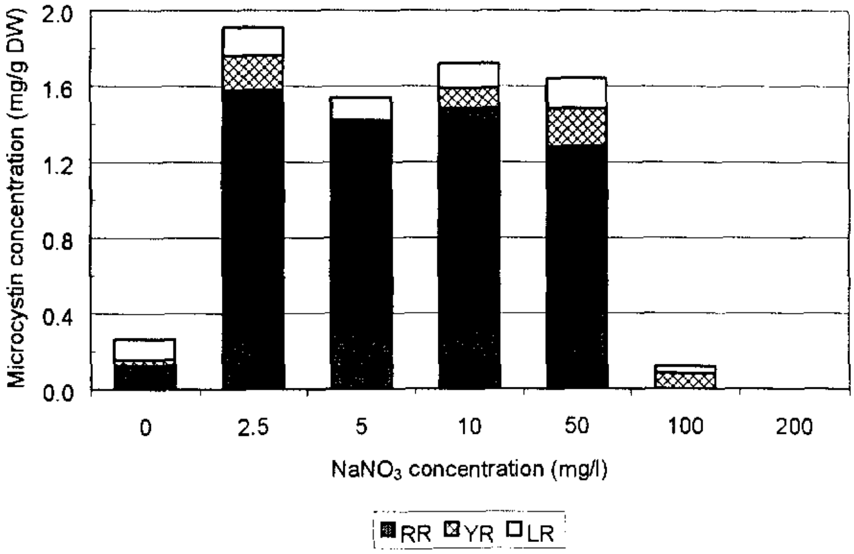


ภาพที่ 16 ผลของ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5 (สูตรปกติ), 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

$NaNO_3$ (mg/l)	ปริมาณและชนิดของสารพิษ MCYSTs (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	0.13	0.03	0.11	0.27
2.5	1.58	0.18	0.15	1.91
5 (สูตรปกติ)	1.42	ND	0.12	1.54
10	1.48	0.11	0.13	1.72
50	1.28	0.20	0.16	1.64
100	ND	0.08	0.04	0.12
200	ND	ND	ND	ND

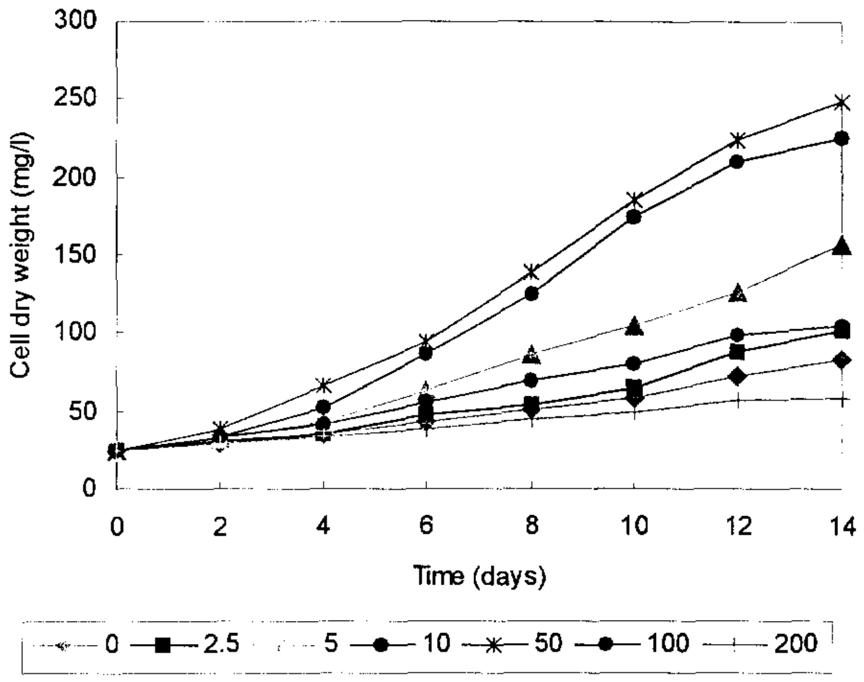
หมายเหตุ ND = ไม่พบปริมาณสารพิษ



ภาพที่ 17 ผลของความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

ตารางที่ 15 ผลของ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น กับ 0, 2.5, 5 (สูตรปกติ), 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50020

เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	0	2.5	5	10	50	100	200
0	25.1	25.1	25.1	25.1	25.1	25.1	25.1
2	29.4	30.4	32.5	34.6	38.4	33.5	29.4
4	35.1	35.7	42.7	52.1	66.5	42.1	33.8
6	42.7	47.2	64.0	87.3	94.6	56.3	38.2
8	50.4	53.9	86.5	124.9	139.4	69.7	45.2
10	59.4	64.3	104.6	174.6	185.6	80.4	49.6
12	72.1	88.6	126.8	210.4	223.8	98.7	57.4
14	84.2	102.5	157.3	225.4	248.2	105.4	58.4



ภาพที่ 18 ผลของ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5 (สูตรปกติ), 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50020

3.4 ศึกษาปริมาณของ β-sodium-glycerophosphate ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

β-sodium-glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสเฟตอินทรีย์สำหรับ *Microcystis* จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการใช้แหล่งฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate) ไม่สามารถทดแทน β-sodium-glycerophosphate ได้ โดยที่ฟอสเฟตจะเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญในกระบวนการเมตาโบลิซึม และจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจะมีความต้องการปริมาณฟอสเฟสแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะแวดล้อม ในการศึกษานี้ทำการเพาะเลี้ยง *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในอาหาร MA ที่ปรับความเข้มข้นของ β - sodium-glycerophosphate เป็น 0, 25, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญทุกๆ 2 วัน พบว่า M50058 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีแหล่งฟอสเฟต (อัตราของ β-sodium-glycerophosphate 0 มิลลิกรัมต่อลิตร)ในขณะที่อัตราการเจริญของ M50058 จะต่ำเมื่อใช้ β-sodium-glycerophosphate 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 16 และภาพที่ 19) ความเข้มข้นที่ 400 มิลลิกรัมต่อลิตรเริ่มเป็นพิษต่อ *Microcystis* ดังจะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญจะลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับการใช้ ใช้ β-sodium-glycerophosphate 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 267.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงนาน 14 วัน

ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสติน เมื่อเซลล์มีการเจริญสูงสุด (14 วัน) พบว่า *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 0, 25, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการผลิตสารพิษรวมเท่ากับ 0.02, 0.31, 0.85, 1.72, 1.97, 1.96 และ 1.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตสารพิษได้สูงสุดเท่ากับ 1.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST- RR 1.59 มิลลิกรัม, MCYST-YR 0.16 มิลลิกรัม และ MCYST-LR 0.22 มิลลิกรัม ที่ปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

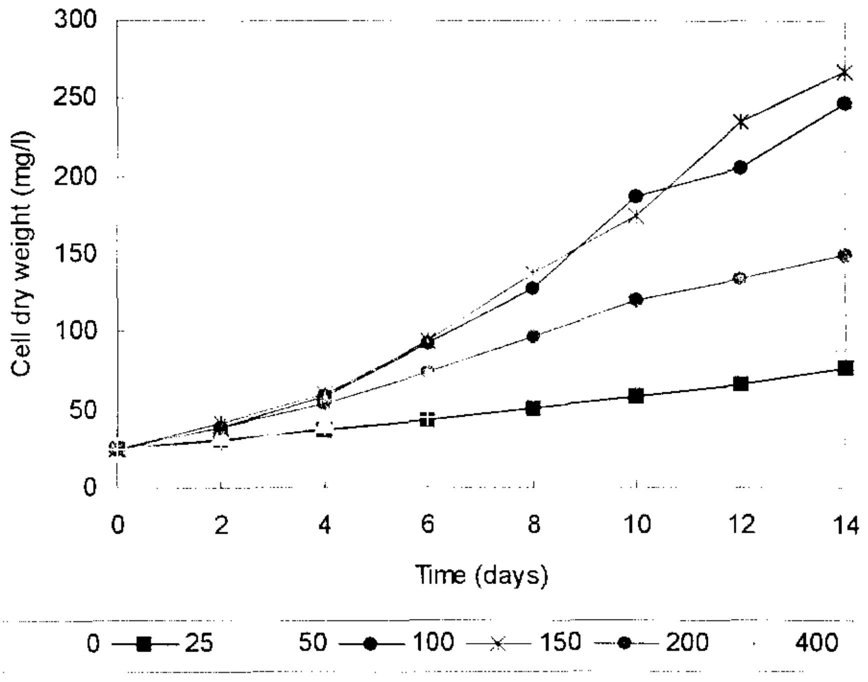
จากการศึกษาสรุปได้ว่าการศึกษาการปรับปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 เท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีฟอสเฟตพบว่าเกือบไม่มีการเจริญ โดยภายหลังจากวันที่ 8 ไม่ได้เก็บตัวอย่าง เนื่องจากลักษณะของเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเมื่อใช้ฟอสเฟตในปริมาณที่น้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร *Microcystis* ก็ยังมีการเจริญและการสร้างสารพิษแต่ในปริมาณน้อย แสดงว่าปริมาณฟอสเฟตมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ การทดลองนี้ให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาของ Utkilen and Gjolme (1995) ที่พบว่าในสภาวะที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตจะไม่มีผลต่อการสร้างสารพิษ ในขณะที่ Sivonen (1992a) กล่าวว่าไซยาโนแบคทีเรียมักจะสร้างสารพิษได้มากในสภาวะที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตสูง

เนื่องจากในการทดลองข้างต้นที่ผ่านมาไม่สามารถกระตุ้นให้ *Microcystis aeruginosa* M50020 สร้างสารพิษได้ ในการทดลองนี้และการทดลองต่อไปไม่ได้นำสายพันธุ์มาทดลองอีก

ตารางที่ 16 ผลของ β-sodium-glycerophosphate ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
(วัน)	0	25	50	100	150	200	400
0	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1
2	29.4	30.4	33.8	39.0	41.5	38.4	29.4
4	30.0	37.2	41.8	58.4	60.8	54.2	38.6
6	28.4	42.8	68.4	92.7	94.6	74.5	44.6
8	27.5	50.4	89.6	128.4	137.4	96.8	59.7
10	ND	59.4	111.3	186.7	174.5	120.4	68.7
12	ND	66.7	120.7	205.4	234.8	134.5	86.4
14	ND	78.0	145.8	246.8	267.3	149.8	88.7

หมายเหตุ ND = Not determined

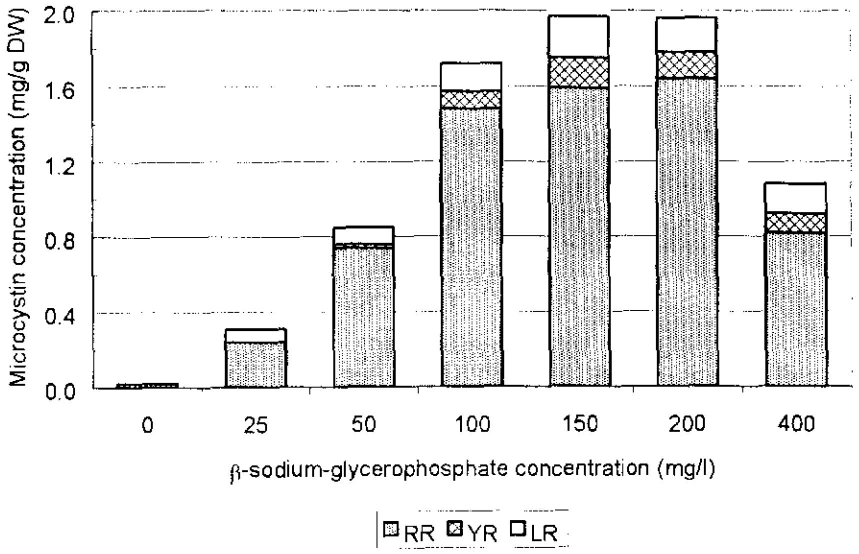


ภาพที่ 19 ผลของ β-sodium-glycerophosphate ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 (สูตรปกติ), 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 17 ผลของความเข้มข้นของ β-sodium-glycerophosphate ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

β-sodium-glycero-phosphate (mg/l)	ชนิดของสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	0.02	ND	ND	0.02
25	0.24	ND	0.07	0.31
50	0.74	0.02	0.09	0.85
100 (สูตรปกติ)	1.48	0.09	0.15	1.72
150	1.59	0.16	0.22	1.97
200	1.64	0.14	0.18	1.96
400	0.82	0.10	0.16	1.08

หมายเหตุ ND = ไม่พบปริมาณสารพิษ



ภาพที่ 20 ผลของความเข้มข้นของ β-sodium-glycerophosphate ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

3.5 ศึกษาปริมาณของ Bicine ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

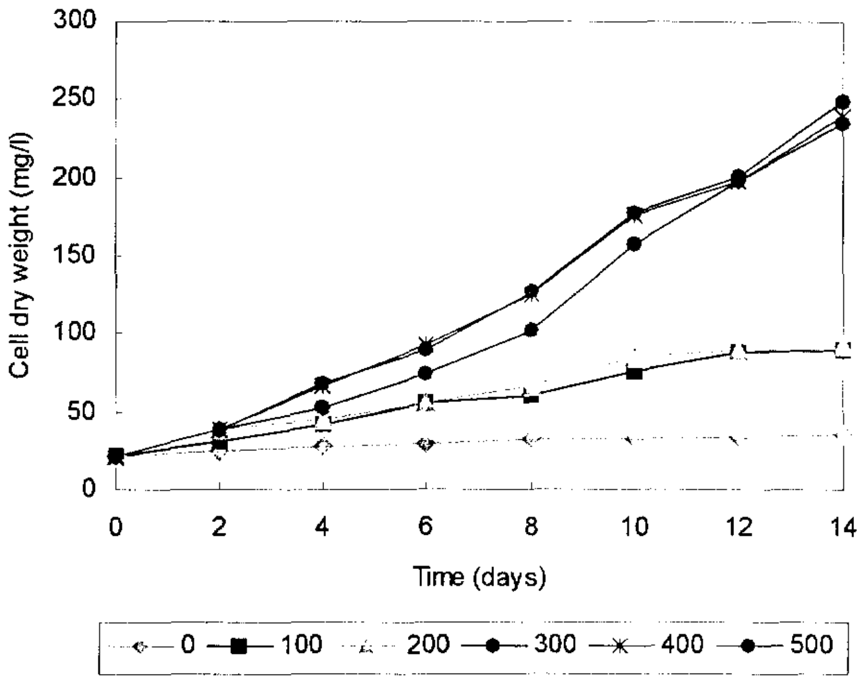
Bicine ในอาหารสูตร MA ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เพื่อรักษาระดับ pH ให้อยู่ในช่วง 8.6 (Ichimura, 1979) แต่เนื่องจากสารนี้มีราคาค่อนข้างแพงและใช้ในปริมาณมาก (500 มิลลิกรัมต่อลิตร) จึงทำการทดลองเพื่อหาระดับของ Bicine ที่เหมาะสม (ต่ำลง) เพื่อลดต้นทุนการเพาะเลี้ยง ใน การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ Bicine ต่อการเจริญและผลิตสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 โดยทำการปรับความเข้มข้นของ Bicine ให้เท่ากับ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 (สูตรปกติ) มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญทุกๆ 2 วันจากนั้น นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญ (ภาพที่ 21) จากผลการทดลองที่ได้ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 พบว่าอัตราการเจริญของ M50058 เมื่อใช้ Bicine 0, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อ ลิตร อยู่ในระดับที่ต่ำมาก ในขณะที่อัตราของ Bicine ที่ 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร M50058 มีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกันมากจนเกือบไม่แตกต่าง โดยที่ที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ปริมาณ เซลล์สูงสุดที่ 248.7 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงนาน 14 วัน (ตารางที่ 18)

ผลจากการวิเคราะห์สารพิษพบว่าปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Bicine ที่มีผลต่อการ ผลิตสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 (ตารางที่ 19) จะพบว่าเซลล์มีการ สร้างสารพิษรวมเท่ากับ 0.59, 1.05, 0.90, 1.73, 1.98 และ 1.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จะ สังเกตว่าที่ความเข้ม Bicine เท่ากับ 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์สามารถสร้างสารพิษ ได้สูงสุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 1.73, 1.98 และ 1.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดย สัดส่วนของสารพิษ MCYST-RR, MCYST-YR และ MCYS- LR ก็ใกล้เคียงกัน

สรุปได้ว่าความเข้มข้นของ Bicine ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างสารพิษ เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นที่สูงไม่มีความแตกต่างของการเจริญและการสร้างสารพิษ เป็นที่น่าสังเกตว่า การเจริญและการสร้างสารพิษจะค่อนข้างน้อยเมื่อใช้ Bicine น้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สามารถนำไนโตรเจนและคาร์บอนจาก Bicine มาใช้ใน ขบวนการเมทตาโบลิซึ่ม เพื่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

ตารางที่ 18 ผลของ Bicineที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 (สูตรปกติ) มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
(วัน)	0	100	200	300	400	500
0	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5
2	24.2	30.4	38.4	38.7	39.4	38.5
4	28.4	42.5	45.2	52.1	66.5	67.4
6	30.1	55.7	55.4	74.5	92.4	90.4
8	32.4	60.4	67.2	102.4	124.8	126.3
10	32.6	75.9	85.7	157.6	176.4	178.4
12	33.4	88.6	90.1	197.5	198.4	201.4
14	35.5	90.4	92.4	234.8	240.3	248.7

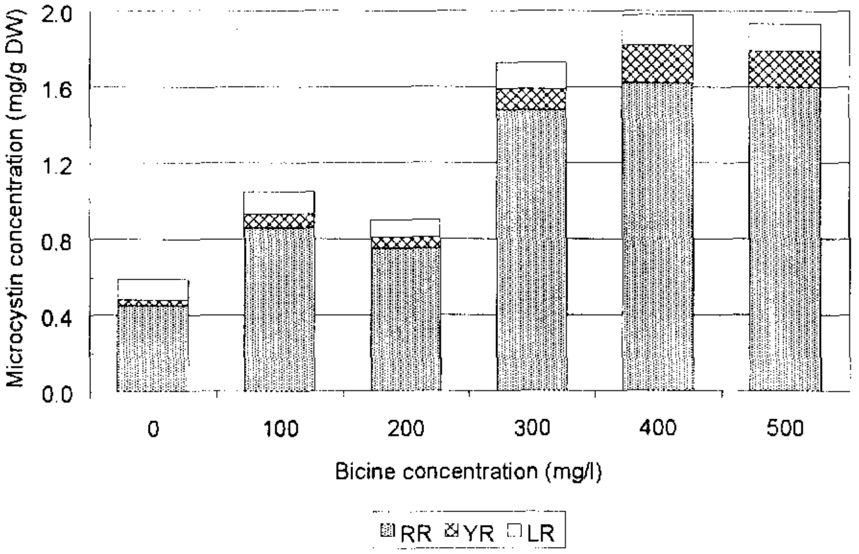


ภาพที่ 21 ผลของ Bicineที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 (สูตรปกติ) มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 19 ผลของความเข้มข้นของ Bicine ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

Bicine (mg/l)	ชนิดของสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	0.45	0.03	0.11	0.59
100	0.86	0.07	0.12	1.05
200	0.75	0.06	0.09	0.90
300	1.48	0.11	0.14	1.73
400	1.62	0.20	0.16	1.98
500 (สูตรปกติ)	1.60	0.19	0.14	1.93

หมายเหตุ ND = ไม่พบปริมาณสารพิษ



ภาพที่ 22 ผลของความเข้มข้นของ Bicine ต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

3.6 อิทธิพลของค่า pH เริ่มต้นต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

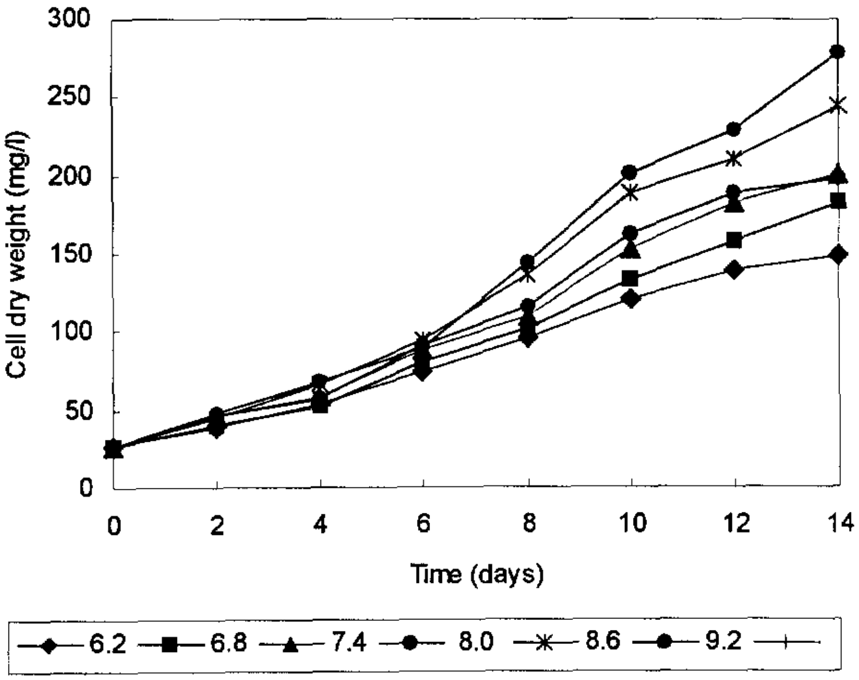
การศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* M50058 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร MA สูตรปกติที่ปรับ pH ด้วย 1 N KOH และ 1N H_2SO_4 ให้เท่ากับ 6.2 , 6.8 , 7.4 , 8.0 , 8.6 (สูตรปกติ) และ 9.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 250 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญทุกๆ 2 วันจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญ (ภาพที่ 23) จากการศึกษาพบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของ M50058 เท่ากับ 9.2 ได้ปริมาณเซลล์คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 278.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 20) เมื่อเลี้ยงนาน 14 วัน และมีแนวโน้มว่ายังสามารถเจริญไปได้อีกระยะหนึ่ง โดยที่ pH เริ่มต้นนี้ให้ผลดีกว่า pH เริ่มต้น 8.6 ที่ใช้อยู่เดิมในสูตรปกติ เป็นที่น่าสังเกตว่า *M. aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 สามารถเจริญได้ใน pH ค่อนข้างกว้าง เพราะที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.2 ไซยาโนแบคทีเรียนี้ก็ยังสามารถเจริญได้ดีพอสมควร

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษที่พบของ *M. aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 หลังจากที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MA ที่ปรับ pH เท่ากับ 6.2 , 6.8 , 7.4 , 8.0 , 8.6 และ 9.2 พบว่าปริมาณสารพิษรวมมีค่าเท่ากับ 1.47, 1.57, 1.46, 1.73, 1.82 และ 1.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 21) ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 8.6-9.2 มีการสร้างสารพิษได้สูงสุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 1.82-1.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST–RR 1.57-1.59, MCYST–YR 0.06-0.07 และ MCYST–LR 0.19-0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 24)

จาการศึกษาถึงผลของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารพิษสามารถสรุปได้ว่า *M. aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 มีการเจริญสูงสุดที่ pH เท่ากับ 9.2 ซึ่งเป็นค่าเดียวกับการผลิตสารพิษไมโครซิสตินได้สูงสุดเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Eloff and van der Westhuizen (1981) ที่รายงานว่า *M. aeruginosa* พบว่าจะผลิตสารพิษได้ดีเมื่อ pH สูงกว่า 9 แต่จากการศึกษาของ Wicks and Thiel (1990) พบว่า *M. aeruginosa* ที่สำรวจได้จากเขื่อนเก็บน้ำ Hartbeespoort มีการผลิตสารพิษสูงสุดที่ pH เท่ากับ 8

ตารางที่ 20 ผลของ pH เริ่มต้นที่ 6.2, 6.8, 7.4, 8.0, 8.6 (สูตรปกติ) และ 9.2 ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

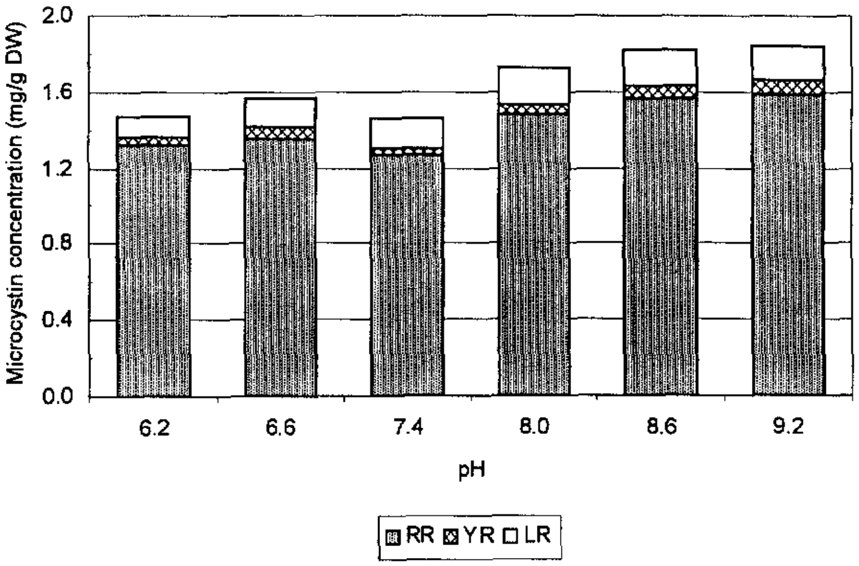
เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
(วัน)	6.2	6.8	7.4	8.0	8.6	9.2
0	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6
2	38.5	40.2	46.6	46	44.2	47.3
4	53.6	52.3	58.2	57.2	66.5	67.4
6	73.9	80.3	88.3	90.6	94.7	90.4
8	95.3	102.2	110.3	115.3	135.8	143.2
10	120.4	132.6	153.7	162.7	189.3	200.6
12	139.6	158.2	182.4	188.8	210.4	229.4
14	148.4	182.3	200.5	198.6	244.2	278.5



ภาพที่ 23 ผลของ pH เริ่มต้นที่ 6.2, 6.8, 7.4, 8.0, 8.6 (สูตรปกติ) และ 9.2 ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 21 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

pH	ชนิดของสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
6.2	1.32	0.04	0.11	1.47
6.6	1.35	0.07	0.15	1.57
7.4	1.27	0.03	0.16	1.46
8.0	1.48	0.05	0.20	1.73
8.6	1.57	0.06	0.19	1.82
9.2	1.59	0.07	0.18	1.84



ภาพที่ 24 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

3.7 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

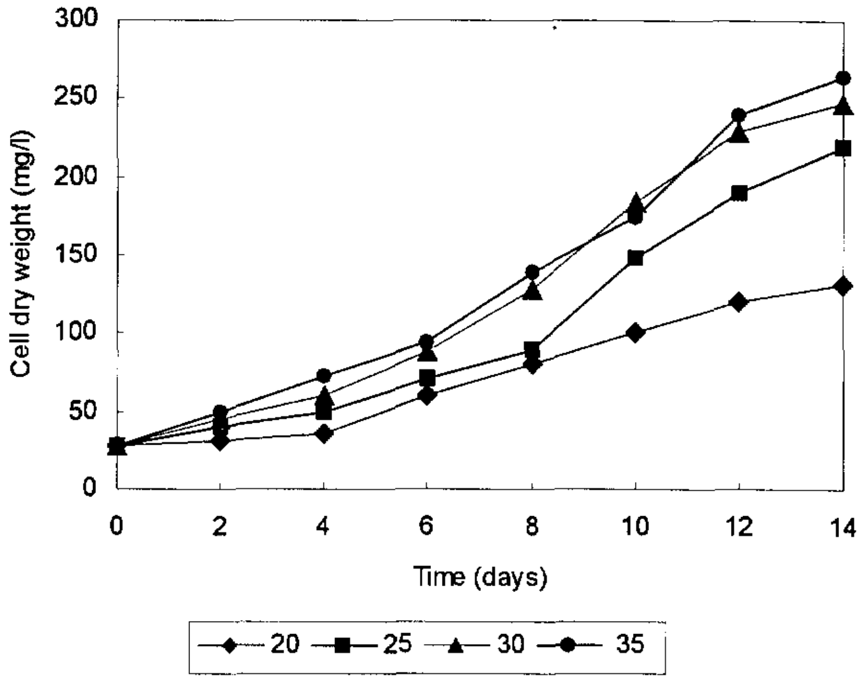
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 และ M50020 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร MA โดยให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 250 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญทุกๆ 2 วันจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญ (ภาพที่ 25) พบว่าสายพันธุ์ M50058 มีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีการเจริญคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 264.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 22) และที่อุณหภูมิต่ำถึง 20 องศาเซลเซียสก็ยังมีการเจริญค่อนข้างดี จากการสังเกตพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *M. aeruginosa* ที่อุณหภูมิต่ำจะมีสีของเซลล์ออกไปทางสีฟ้ามากกว่าสีเขียว

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ *M. aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เซลล์มีการสร้างสารพิษรวมสูงสุดที่ 1.92 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST–RR 1.65, MCYST–YR 0.09 และ MCYST–LR 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 23 และภาพที่ 26) และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าจะมีการเจริญสูงสุดแต่มีการสร้างสารพิษรวมได้เพียง 1.66 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ถ้าคำนวณเป็นผลผลิตต่อปริมาตรแล้วที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณสารพิษรวม 439.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าปริมาณสารพิษที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเล็กน้อย (422.6 ไมโครกรัมต่อลิตร)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายพันธุ์ M50058 อยู่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างสารพิษอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Watanabe (1996) ที่รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเล็กน้อย รวมทั้งคล้ายกับผลการศึกษาที่เคยมีผู้รายงานไว้ Watanabe and Oishi (1985) ได้ศึกษาความเป็นพิษและและอัตราการเจริญของ *M. aeruginosa* M228 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่าเซลล์จะผลิตสารพิษได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตสารพิษได้สูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด และคล้ายกับผลการศึกษาของ Van der Westhuizen and Eloff (1985) และ Codd and Poon (1988) พบว่า *M. aeruginosa* จะสร้างสารพิษได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสารพิษได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 15 , 28 และ 38 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ดีหากพิจารณาถึงสภาพแวดล้อมทางภูมิศาสตร์ของแหล่งน้ำที่มาของ *M. aeruginosa* จะเห็นว่าผลการศึกษาครั้งนี้ให้ผลในทำนองเดียวกันทั้งสิ้น ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิเฉลี่ย สูงสุด – ต่ำสุดของประเทศไทยจะอยู่ที่ประมาณ 24 – 32 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 22 ผลของอุณหภูมิที่ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

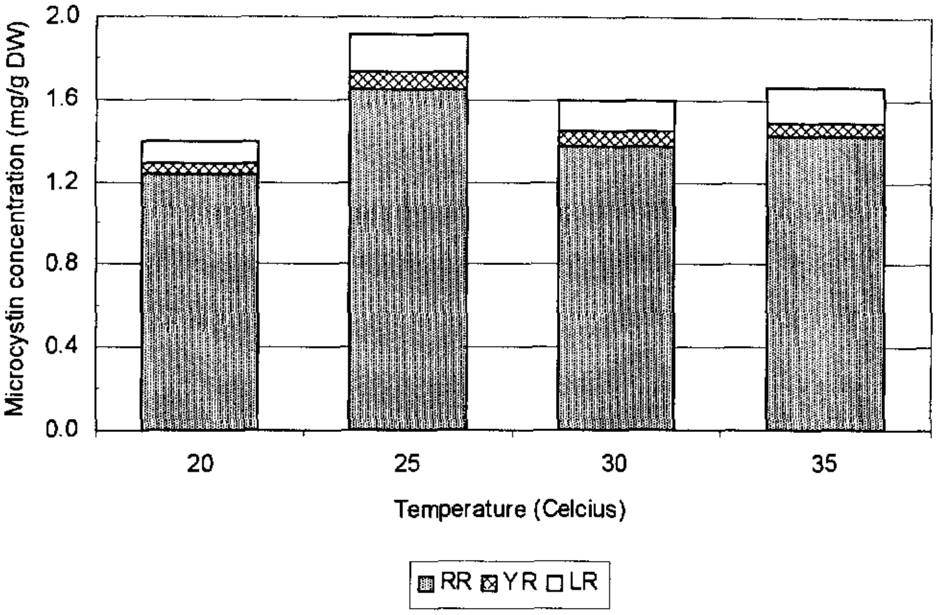
เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
(วัน)	20	25	30	35
0	27.9	27.9	27.9	27.9
2	30.6	39.5	45.2	49.8
4	35.9	50.2	60.3	72.1
6	60.4	70.4	88.4	94.2
8	80.4	90.3	128.8	139.4
10	100.2	148.3	183.5	174.2
12	120.1	189.6	229.4	239.1
14	130.9	220.1	247.7	264.5



ภาพที่ 25 ผลของอุณหภูมิที่ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

อุณหภูมิ (°C)	ชนิดของสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
20	1.24	0.05	0.11	1.40
25	1.65	0.09	0.18	1.92
30	1.38	0.07	0.15	1.60
35	1.43	0.06	0.17	1.66



ภาพที่ 26 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

3.8 อิทธิพลของความเข้มแสงต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ

แสงเป็นแหล่งให้พลังงานสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของพวกไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณแสงที่แตกต่างกัน ในสภาพธรรมชาติแสงถูกพิจารณาว่ามีความสำคัญในการผลิตสารพิษและการเจริญ จากการศึกษาของ Utkilen and Gjolme (1992) พบว่าปริมาณสารพิษมากขึ้นเมื่อความเข้มแสงสูงขึ้น 41 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และปริมาณสารพิษจะเริ่มคงที่และลดลงเมื่อมีความเข้มแสงเพิ่มขึ้น จะเห็นว่าปริมาณความเข้มแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ

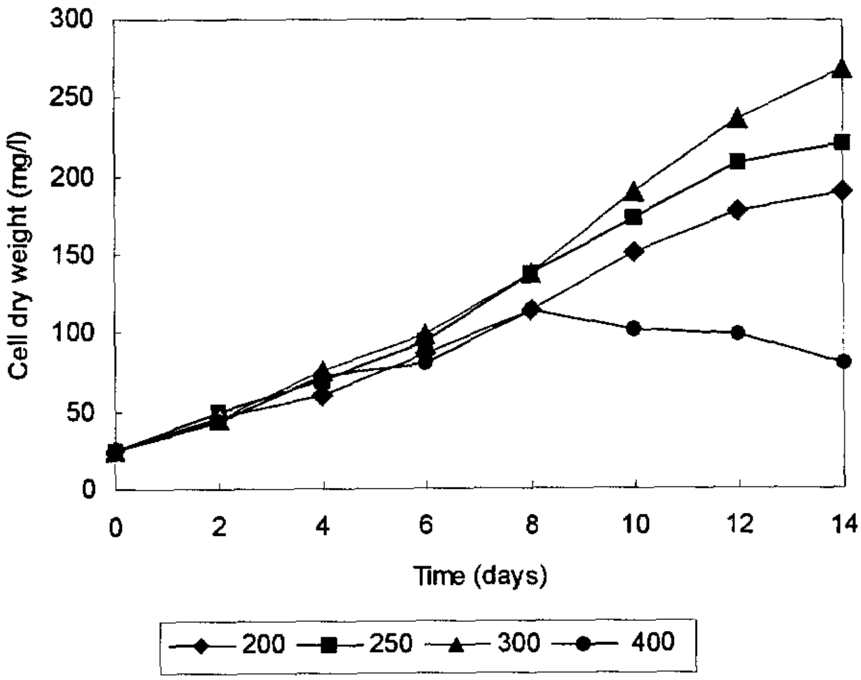
จากการศึกษาปริมาณความเข้มแสงที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในอาหาร MA สูตรปกติ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยปรับปริมาณความเข้มแสงที่ 200, 250 (สภาวะปกติ), 300 และ 400 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญทุกๆ 2 วันจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญ (ภาพที่ 27) พบว่าปริมาณความเข้มแสงที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญ คือ 300 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยได้ปริมาณเซลล์คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 268.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 24) และเมื่อความเข้มแสงสูงถึง 400 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เริ่มมีผลยับยั้งการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* หลังจากเลี้ยงได้ 8 วัน สังเกตเห็นการเจริญลดลงอย่างชัดเจน และเมื่อครบ 14 วันเซลล์จะเริ่มเหลืองตาย

จาการศึกษาปริมาณความเข้มแสงที่มีการผลิตสารพิษไมโครซิสตินของ *Microcystis aeruginosa* พบว่าที่ความเข้มแสง 250 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เซลล์สามารถผลิตสารพิษได้สูงสุดประมาณ1.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST–RR 1.72, MCYST–YR 0.09 และ MCYST–LR 0.16 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 25 และภาพที่ 28)

ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะความเข้มแสงจากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ต้องการปริมาณความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ 300 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และความเข้มแสงที่เหมาะต่อการสร้างสารพิษไมโครซิสตินได้ดีที่สุดอยู่ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 250 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ซึ่งถ้าเซลล์ได้รับแสงมากเกินไปก็จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองของ Sivonen (1990) ศึกษาเกี่ยวกับความเข้มแสงพบว่าเมื่อให้ความเข้มแสงสูงกว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมแล้วอัตราการเจริญจะชะงักและผลิตสารพิษได้ในปริมาณที่น้อย นอกจากนี้ Zevenboom and Mur (1984) พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงมากอาจทำให้เซลล์ได้รับความเสียหาย

ตารางที่ 24 ผลของความเข้มแสงที่ ที่ 200, 250 (สภาวะปกติ), 300 และ 400 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

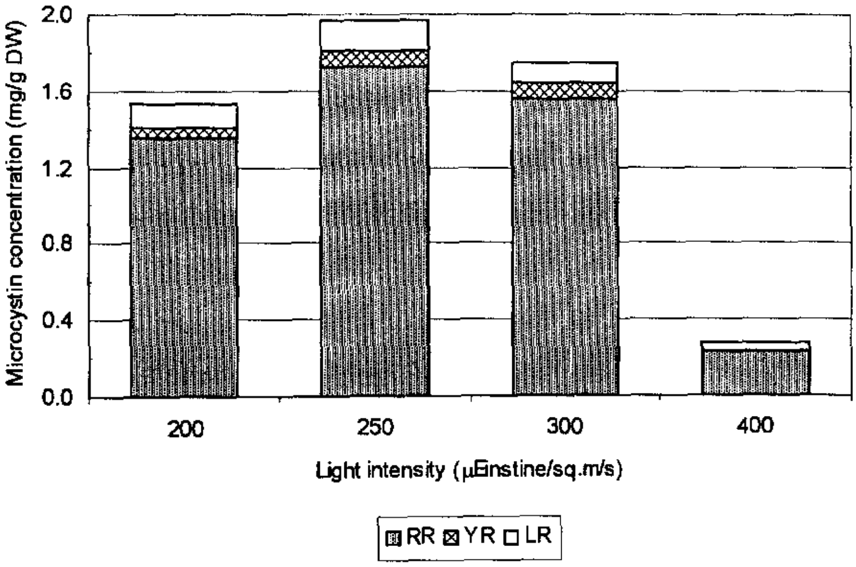
เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	200	250	300	400
0	24.8	24.8	24.8	24.8
2	45.9	49.3	45.2	43.2
4	60.3	70.2	75.3	72.4
6	87.2	95.1	99.2	80.4
8	113.8	138.2	138.2	113.9
10	152.0	173.9	190.4	102.5
12	178.3	208.4	237.2	98.3
14	190.5	220.5	268.4	80.2



ภาพที่ 27 ผลของความเข้มแสงที่ ที่ 200, 250 (สภาวะปกติ), 300 และ 400 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058

ตารางที่ 25 ผลของความเข้มแสงต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058

Light Intensity μEinstine/m^2/s	ชนิดของสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
200	1.35	0.06	0.12	1.53
250	1.72	0.09	0.16	1.97
300	1.56	0.08	0.11	1.75
400	0.23	ND	0.05	0.28



ภาพที่ 28 ผลของความเข้มแสงต่อการสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์

4. **จลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินโดย *M. aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA ที่ปรับปรุงใหม่**

จากผลการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 โดยทำการปรับองค์ประกอบของสูตรอาหาร MA จนได้สูตรอาหารใหม่ที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสตินได้สูงขึ้น โดยสูตรอาหารที่ปรับปรุงใหม่มีส่วนประกอบดังนี้

สารประกอบ	MA สูตรเดิม	MA สูตรปรับปรุง
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	50	50
KNO_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	100	150
$NaNO_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	50	10
Na_2SO_4 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	40	40
$MgCl_2.6H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	50	50
β -Sodium-glycerophosphate (มิลลิกรัมต่อลิตร)	100	150
Na_2EDTA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	5	5
$FeCl_3.6H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.5	0.5
$ZnCl_2$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.5	0.5
$CoCl_2.H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	5	5
$Na_2MoO_4.2H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.8	0.8
H_3BO_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	20	20
Bicine (มิลลิกรัมต่อลิตร)	500	300
Deionized water (มิลลิลิตร)	1000	1000
พี-เอช	8.6	8.6

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเป็นระยะเวลาทั้งหมด 20 วัน พบว่า อาหารสูตร modified MA ให้การเจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าสูตรอาหาร MA เดิม ได้อย่างชัดเจน โดยเมื่อครบ 20 วันจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 347.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับ 263.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรเดิม โดยที่ในวันที่ 8 อาหารทั้งสองสูตรมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.272 และ 0.219 วัน$^{-1}$ (ตารางที่ 26) อย่างไรก็ตามจากลักษณะของการเจริญในอาหารทั้งสองสูตร ดูเหมือนว่าเซลล์จะไม่มีการเจริญในระยะ log phase เลย (ภาพที่ 29)ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากว่ามีปัจจัยหลักบางประการที่จำกัดการเจริญ ซึ่งถ้าดูจากสภาวะการเพาะเลี้ยงแล้วปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแสงน่าจะเป็นสองปัจจัยหลัก

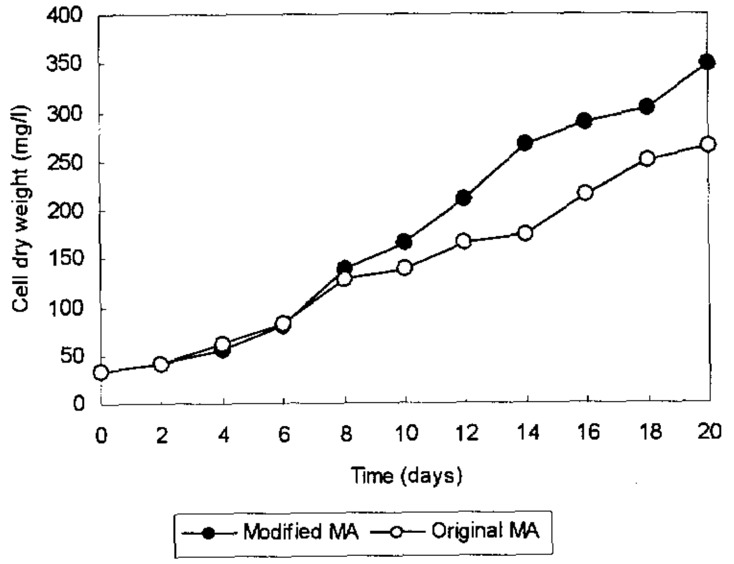
ในการเปรียบเทียบการผลิตสารพิษไมโครซิสตินสูตรอาหาร MA และ modified MA พบว่าเซลล์มีการสะสมสารพิษสูงสุดในวันที่ 6 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร modified MA และ

อาหาร MA สูตรเดิม ตามลำดับ ในอาหาร modified MA (ตารางที่ 27) โดย มีการสะสมสารพิษรวมในเซลล์ได้สูงสุด เท่ากับ 2.64 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากปริมาณสารพิษประกอบด้วย MCYST–RR 2.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง MCYST–YR 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ MCYST–LR 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัม (ภาพที่ 30) ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหาร MA สูตรเดิม M50058 ก็มีการผลิตสารพิษในระดับใกล้เคียงกัน คือ ในวันที่ 8 ที่มีการผลิตสารพิษรวมได้สูงสุด เท่ากับ 2.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST–RR 2.10 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง MCYST–YR 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ MCYST–LR 0.17 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 28 และภาพที่ 31)

จากการศึกษาเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการเจริญ และการผลิตสารพิษไมโครซิสตินของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA และ modified MA สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร modified MA จะมีอัตราการเจริญจำเพาะการผลิตสารพิษไมโครซิสตินสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA และจะมีการผลิตสารพิษไมโครซิสตินสูงสุดในช่วงต้นของการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Watanabe and Oishi (1985)

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในสูตรอาหาร modified MA กับสูตรอาหาร MA เดิม

เวลา (วัน)	Modified MA		Original MA	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Specific growth rate, μ (d^{-1})	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Specific growth rate, μ (d^{-1})
0	32.7	-	32.7	-
2	42.1	0.126	41.7	0.122
4	55.4	0.137	61.7	0.196
6	80.4	0.186	82.4	0.145
8	138.4	0.272	127.8	0.219
10	164.2	0.085	137.2	0.035
12	211.3	0.126	164.8	0.092
14	265.1	0.113	172.4	0.023
16	289.4	0.044	214.0	0.108
18	302.6	0.022	250.1	0.078
20	347.8	0.070	263.8	0.027

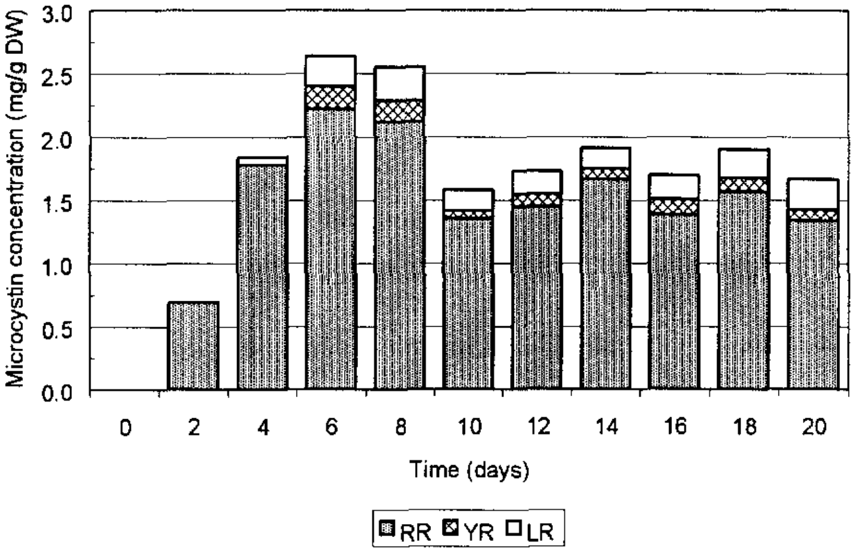


ภาพที่ 29 เปรียบเทียบการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* M50058 ในอาหาร modified MA กับ อาหาร MA สูตรเดิม ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน

ตารางที่ 27 ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจาก *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในอาหาร modified MA

เวลา (วัน)	ชนิดสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	ND	ND	ND	ND
2	0.69	ND	ND	0.69
4	1.78	ND	0.06	1.84
6	2.22	0.18	0.24	2.64
8	2.12	0.17	0.26	2.55
10	1.36	0.06	0.16	1.58
12	1.45	0.10	0.18	1.73
14	1.67	0.08	0.16	1.91
16	1.39	0.12	0.19	1.70
18	1.57	0.11	0.22	1.90
20	1.34	0.09	0.24	1.67

ND วิเคราะห์ไม่พบปริมาณสารพิษ

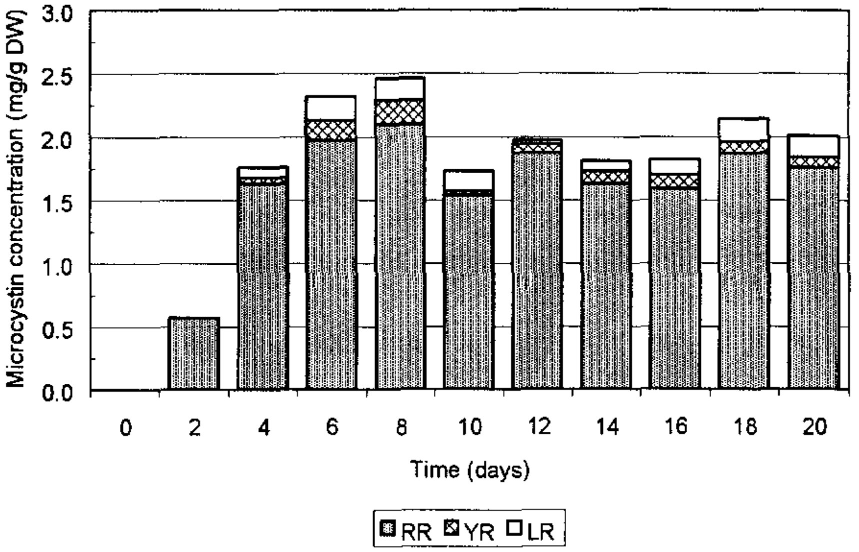


ภาพที่ 30 การสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในอาหาร modified MA

ตารางที่ 28 ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจาก *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในอาหาร MA สูตรเดิม

เวลา (วัน)	ชนิดสารพิษไมโครซิสติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	RR	YR	LR	ปริมาณรวม
0	ND	ND	ND	ND
2	0.57	ND	ND	0.57
4	1.63	0.05	0.08	1.76
6	1.97	0.16	0.19	2.32
8	2.10	0.19	0.17	2.46
10	1.54	0.03	0.16	1.73
12	1.87	0.07	0.03	1.97
14	1.63	0.10	0.08	1.81
16	1.59	0.11	0.12	1.82
18	1.87	0.09	0.18	2.14
20	1.76	0.08	0.17	2.01

ND วิเคราะห์ไม่พบปริมาณสารพิษ



ภาพที่ 31 การสร้างสารพิษของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ M50058 ในอาหาร MA สูตรเดิม

5. การเพาะเลี้ยง *Microcystis* เพื่อผลิตสารพิษไมโครซิสติน

ผลจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* เพื่อใช้เป็นแหล่งสกัดสารพิษ โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ 50058 (รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1) ซึ่งสามารถเจริญได้ดีและผลิตสารพิษ microcystin RR (MCYST-RR) ได้สูงในสภาพธรรมชาติ เมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้ขวดแก้วขนาด 10 ลิตร และนำมาสกัดสารพิษแล้วปรากฏว่ามีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ และในการสกัดสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ลิตร ได้ปริมาณสารพิษน้อยมากเพียง 60-90 ไมโครกรัมเท่านั้น ซึ่งจากการพิจารณาพบว่าการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวในห้องปฏิบัติการเพื่อการผลิตสารพิษสำหรับงานทดลองต่อไปคงใช้เวลานานมากกว่าจะได้ปริมาณสารพิษตามต้องการประมาณ 20 มิลลิกรัม (สำหรับการเตรียมแอนติเซรัม 4 ครั้งๆละ 5 มิลลิกรัม)

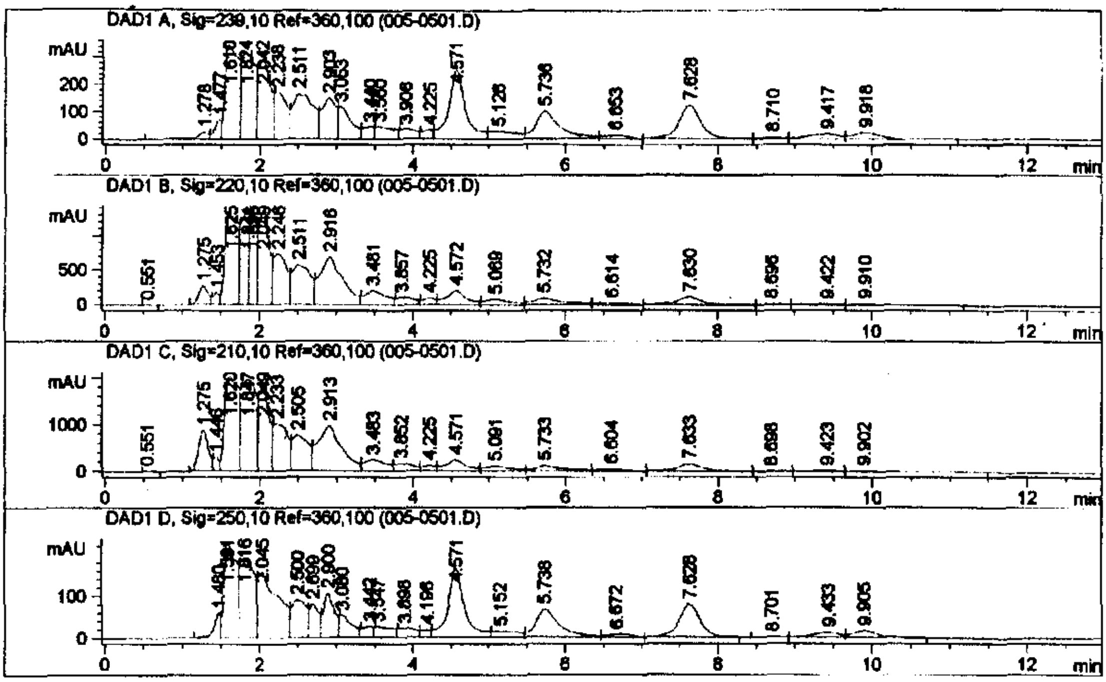
ดังนั้นการผลิตสารพิษ MCYST-RR เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการหาแหล่งไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ (ตามข้อแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิจากผลของการรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1) และพบว่ามีการเจริญของ *Microcystis* อย่างมากในบ่อเลี้ยงปลาดุก จังหวัดปทุมธานี ซึ่งเป็น *Microcystis aeruginosa* เป็นส่วนใหญ่ จากการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินพบว่ามีปริมาณของ MCYST-RR ค่อนข้างสูง จึงได้ทำการเก็บรวบรวมเซลล์และนำมาสกัดสารพิษและทำให้บริสุทธิ์ สำหรับใช้เป็นแหล่งของสารพิษสำหรับขั้นตอนการผลิตแอนติซีรัมต่อไป

5.1 การสกัด microcystin RR (MCYST-RR) และทำให้บริสุทธิ์

สำหรับวิธีการสกัดและทำให้บริสุทธิ์นั้นได้ดัดแปลงตามวิธีการของ Harada et. al. (1988) โดยในขั้นตอนแรกได้ทำการสกัดสารพิษและแยกสารพิษด้วยวิธี HPLC ซึ่งจะได้ microcystin peak ของสารพิษหลายชนิดปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดโดยเปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐานของ MCYST-RR, MCYST-YR และ MCYST-LR แล้ว จะได้สารพิษ MCYST-RR, MCYST-YR และ MCYST-LR ที่เวลา 4.571, 5.736 และ 7.628 นาทีตามลำดับ (ภาพที่ 32) โดยจะปรากฏ peak ของ MCYST-RR สูงสุด รองลงมาเป็น MCYST-LR และ MCYST-YR ตามลำดับ จากความแตกต่างของระยะเวลาในแต่ละ peak จึงสามารถเลือกเก็บเฉพาะ fraction ของ peak MCYST-RR ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์

เมื่อนำสารพิษที่แยกสกัดได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี HPTLC และทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี HPLC จะได้ MCYST-RR peak เหลือเพียง peak เดียว (ภาพที่ 33) ซึ่งลักษณะของ peak แสดงให้เห็นว่า MCYST-RR ที่สกัดได้นี้มีความบริสุทธิ์มาก

ดังนั้นผลของการสกัดสารพิษและทำให้บริสุทธิ์จากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งธรรมชาติ จึงสามารถผลิต MCYST-RR ได้ในปริมาณมากและมีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการเตรียมเป็น immunogen เพื่อการผลิตแอนติซีรัมต่อไป

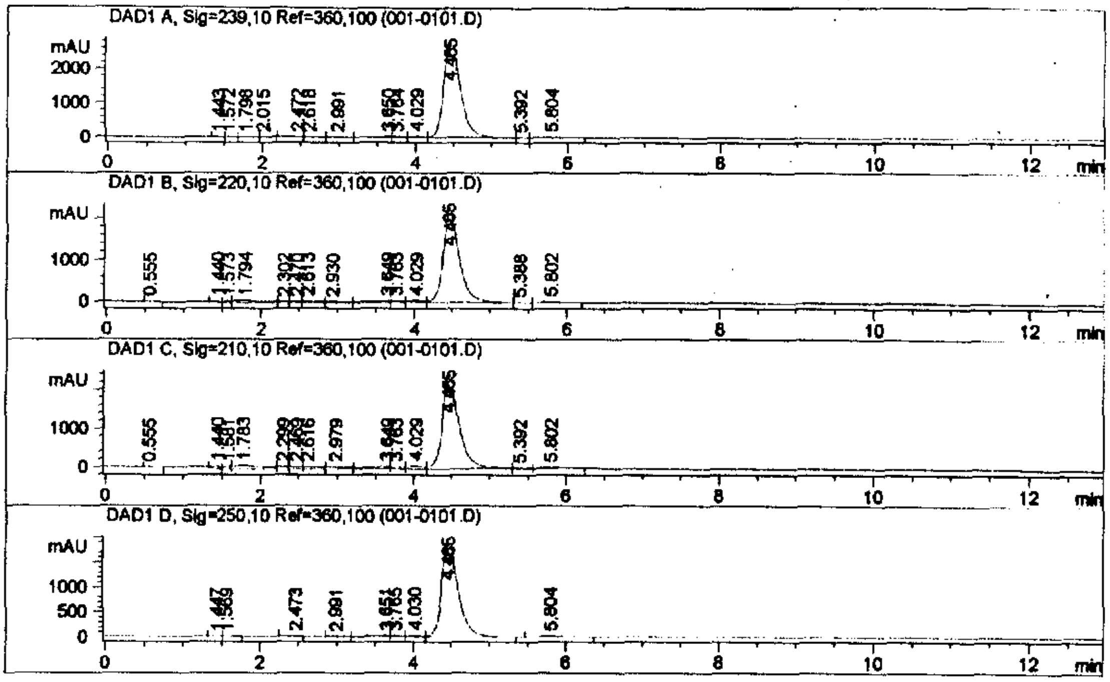


ภาพที่ 32 แสดง peak ของไมโครซิสตินจากตัวอย่างที่สกัดจากเซลล์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 µm) ใช้ mobile phase คือ Methanol/0.05 M phosephate buffer pH 3 (60/40) ที่อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วย Diode array detector

Peak ที่เวลา 4.571 นาที คือ MCYST-RR,

Peak ที่เวลา 5.736 นาที คือ MCYST-YR และ

Peak ที่เวลา 7.628 นาที คือ MCYST-LR



ภาพที่ 33 แสดง peak ของ MCYST-RR (เวลา 4.465 นาที) จากตัวอย่างสารพิษ MCYST-RR บริสุทธิ์ หลังผ่านขั้นตอนของ HPTLC เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ คอลัมน์ Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 µm) ใช้ mobile phase คือ Methanol/0.05 M phosephate buffer pH 3 (60/40) ที่อัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วย Diode array detector

6. การเตรียม antiserum จากไมโครซิสติน (Chu et. al., 1982)

6.1 การหาปริมาณ EDA ที่เหมาะสม

จากการทดลองหาปริมาณ EDA ที่เหมาะสมตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของ BSA ที่ทำปฏิกิริยากับ EDA ในปริมาณที่ต่างกันได้ เนื่องมาจากสารทั้งสองชนิดมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันมาก BSA มีน้ำหนักโมเลกุล 67000 ในขณะที่ EDA มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 60 เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากันจึงทำให้มีขนาดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อใช้ 10% EDA ปริมาตร 0.002-0.1 มิลลิลิตรพบว่ามองไม่เห็นแถบโปรตีนเลยทั้งๆ ที่ใช้ความเข้มข้นเท่ากัน

ส่วนวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงนั้นจะสามารถมองเห็นปฏิกิริยาได้ โดย BSA สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร (Masseyeff et. al., 1993) เนื่องจากภายในโมเลกุลประกอบด้วย tyrosine จึงทำให้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นนี้ได้ (Hermanson, 1996) ส่วนไมโครซิสตินสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร เนื่องจากภายในโมเลกุลประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-amino-9-methoxy-2, 6, 8,-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid (Adda) ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงนี้ (Sivonen et. al., 1992a, b, c; Namikoshi et. al., 1992a, b, c) ดังนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยาระหว่าง MCYST-RR กับ cBSA จึงสามารถดูการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการดูดกลืน

แสงของสารที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วได้ โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารที่สามารถดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet absorption) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอื่นจะเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงนั้นเปลี่ยนไป (Leach, 1969)

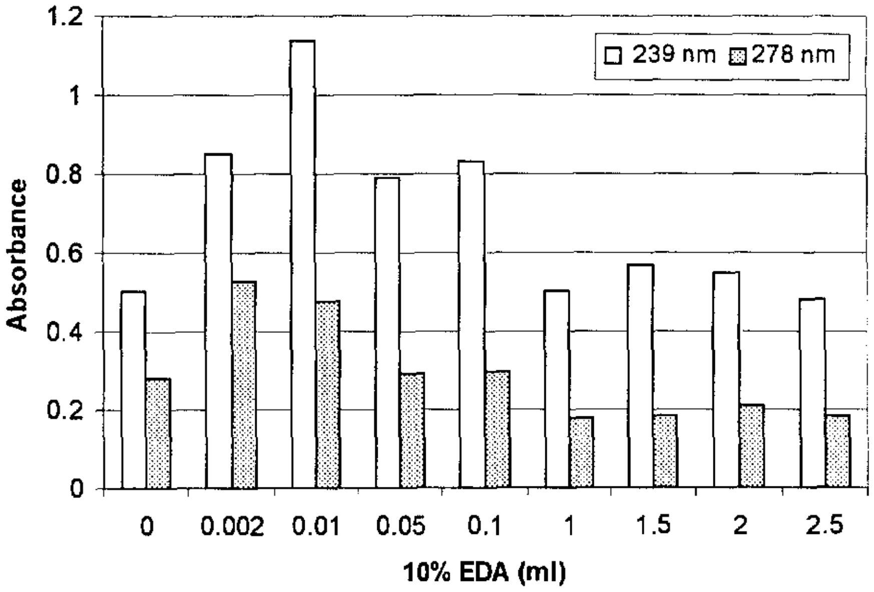
จากการทดลองนี้พบว่าที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร เมื่อเติม EDA ให้ทำปฏิกิริยากับ BSA โดยใช้ปริมาณ EDPC เท่ากันหมด พบว่าปริมาณ EDA ต่ำกว่า 0.5 มิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นจาก BSA ปกติที่วัดได้จาก 0.28099 จะเพิ่มขึ้นเป็น 0.52737 เมื่อเติม EDA น้อยสุดและค่าการดูดกลืนแสงนี้จะค่อย ๆลดลงตามอัตราส่วนที่มี EDA เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะเริ่มคงที่เมื่อใช้ EDA อยู่ระหว่างจำนวน 1-1.5 มิลลิลิตร โดยมีค่าอยู่ที่ 0.18128-0.18694 ดังแสดงในตารางที่ 29 แสดงว่าปริมาณ EDA 1 มิลลิลิตรน่าจะเป็นปริมาณที่มากเกินพอที่จะใช้ทำปฏิกิริยากับหมู่ carboxylate ที่อยู่บน BSA ได้หมดจนไม่เหลือหมู่ carboxylate บน BSA ที่จะทำปฏิกิริยากับหมู่ amine ที่อยู่บนโมเลกุลของ BSA ด้วยกันเอง และเนื่องจาก EDA มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 60 ซึ่งน้อยกว่า BSA มากจึงแย่งจับกับหมู่ activated carboxylate ได้ดีกว่าหมู่ amine ที่อยู่บนโมเลกุลของ BSA ในการหาปริมาณ EDA ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับ BSA ได้หมด เพื่อหาปริมาณ EDA ที่น้อยที่สุดที่จะสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ carboxylate ที่อยู่บน BSA โดยไม่เหลือหมู่ carboxylate ที่จะทำให้เกิดการจับกับโมเลกุลของ BSA ด้วยกันเอง เพราะต้องการให้ BSA มีหมู่ amine มากที่สุดจะได้มีความสามารถในการจับกับหมู่ carboxylate ที่อยู่บนโมเลกุลของ MCYST-RR ได้มากที่สุด

เมื่อแสดงผลการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงด้วยกราฟ ภาพที่ 34 จะเห็นได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันชัดเจนเมื่อเติม EDA ต่ำกว่า 1 มิลลิลิตร และการเปลี่ยนแปลงนี้จะแตกต่างน้อยมากเมื่อเพิ่ม EDA ตั้งแต่จำนวน 1 มิลลิลิตรขึ้นไป ซึ่งจากกราฟนี้สามารถอธิบายได้ว่า สารที่มีพันธะ peptide ส่วนใหญ่จะสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร BSA ซึ่งภายในโมเลกุลประกอบด้วยพันธะ peptide มากมายจึงทำให้สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรได้เช่นกัน และจากเหตุผลนี้จึงทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรได้เนื่องจากเป็นไหล่ที่ตกลงมาของ peak จากช่วงคลื่น 210 นาโนเมตร เมื่อใช้ EDA น้อยกว่า 1 มิลลิลิตรพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรมีค่าสูงขึ้น แสดงว่า BSA เกิดการจับกันเองแล้วทำให้มีพันธะ peptide มากขึ้นเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรมีค่าสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ EDA จนถึง 1 มิลลิลิตรขึ้นไปพบว่าค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เนื่องมาจากเกิดพันธะ amide ระหว่าง BSA กับโมเลกุลของ EDA ซึ่งมีขนาดเล็กมากทำให้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน (Pauillac et. al., 1998)

ตารางที่ 29 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 nm เมื่อทำการ conjugate bovine serum albumin กับ ethylene diamine โดยทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณ ethylene diamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ปริมาณ 10% EDA ที่ใช้ (ml)	Absorbance 238 nm	Absorbance 278 nm
0	0.50510	0.28099
0.002	0.84898	0.52737
0.01	1.13650	0.47438
0.05	0.78960	0.29374
0.1	0.83286	0.29879
1.0	0.50505	0.18128
1.5	0.56981	0.18694
2.0	0.55044	0.21076
2.5	0.48193	0.18677

<u>หมายเหตุ</u> ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะมีความเข้มข้น 0.4 mg/ml และใช้ BSA 300 mg



ภาพที่ 34 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตร เมื่อใช้ปริมาณ 10% EDA ปริมาณต่างๆ กันทำปฏิกิริยากับ BSA

6.2 การทดลองการเปลี่ยนแปลงปริมาณ EDPC

การทดลองเพิ่มปริมาณ EDPC ซึ่งเป็นตัวเชื่อมจากจำนวน 600 มิลลิกรัมเป็น 800 มิลลิกรัม พร้อมกับทดลองให้ EDA เพิ่มขึ้นด้วยนั้น เพื่อจะยืนยันผลการทดลองที่ว่าปริมาณ EDA 1 มิลลิลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ BSA

ผลของการทดลองปรากฏว่า การใช้ EDPC จำนวน 600 มิลลิกรัมเป็น 800 มิลลิกรัม นั้น ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตรมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากแม้จะเพิ่มปริมาณ EDA และตัวเชื่อม EDPC (ตารางที่ 30) ซึ่งแสดงว่า EDA 1 มิลลิลิตร และ EDPC จาก 600 มิลลิกรัมเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ BSA เพราะถ้า EDA ไม่ได้จับกับหมู่ carboxylate ที่อยู่บน BSA ได้หมดก็จะเหลือหมู่ carboxylate ที่อยู่บน BSA เมื่อเพิ่มปริมาณ EDPC ก็จะทำให้สามารถจับกับหมู่ amine ที่อยู่บน BSA ได้อีกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตรก็น่าจะสูงขึ้น แต่จากการทดลองนี้เมื่อเพิ่มปริมาณ EDPC จาก 600 มิลลิกรัมเป็น 800 มิลลิกรัมก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงแม้ปริมาณ EDA จะสูงขึ้นก็ตาม

ตารางที่ 30 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีการใช้ปริมาณของ EDPC และ EDA ที่ปริมาตรต่างกัน

ปริมาตร 10%EDA (ml)	ปริมาณ EDPC (mg)	ค่าความเข้มแสงที่ 238 nm	ค่าความเข้มแสงที่ 278 nm
0	0	0.50510	0.28099
1	600	0.50505	0.18128
	800	0.54187	0.18971
1.5	600	0.56981	0.18694
	800	0.47773	0.16515
2	600	0.55044	0.21076
	800	0.57002	0.18979
2.5	600	0.48193	0.18677
	800	0.51073	0.18772

หมายเหตุ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะมีความเข้มข้น 0.4 mg/ml และใช้ BSA 300 mg

6.3 การเชื่อมโมเลกุลของ MCYST-RR กับ protein carrier

การตรวจสอบการเชื่อมโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากที่ย้อมสีเจลด้วย coomasie brillient blue R-250 แล้วไม่สามารถมองแถบของโปรตีนที่ต้องการทดสอบได้ดังเช่นผลการทดลองข้างต้น เนื่องจาก กรดอะมิโน lysine ที่อยู่บนโมเลกุล BSA ทำปฏิกิริยากับ MCYST-RR ทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนไปเป็นผลให้สีย้อมไม่สามารถเข้าไปจับได้ (Harlow and Lane, 1988) ได้ จึงไม่สามารถระบุผลการเชื่อมของ MCYST-RR กับ protein carrier ด้วยวิธีนี้ได้ เช่นเดียวกับวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ผลการตรวจสอบระบุได้แต่เพียงว่าสารทั้งสองได้มีการเชื่อมโมเลกุลกันแล้ว โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงของ BSA สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร (Masseyeff et. al., 1993)

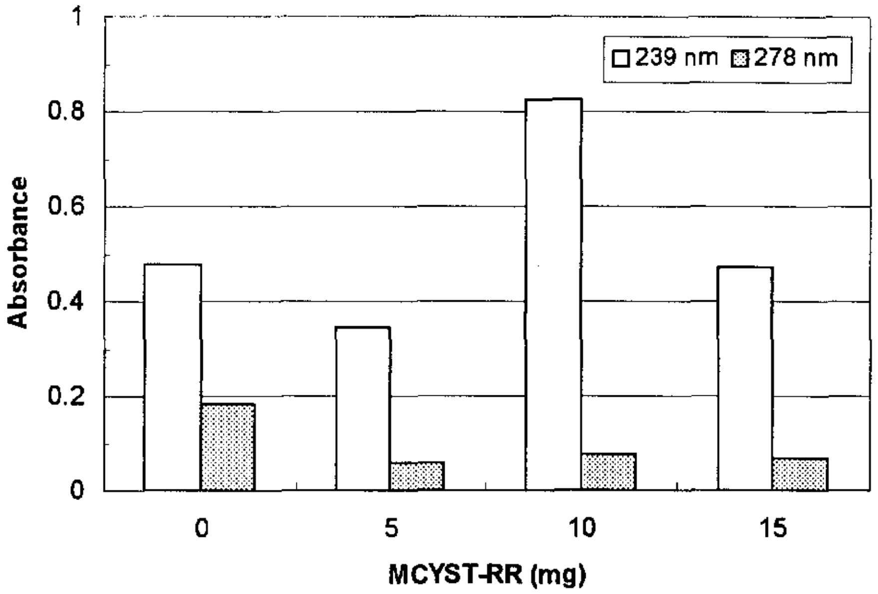
ซึ่งผลจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 ของ BSA ที่ยังไม่ได้เชื่อมกับสารใดๆ จะอ่านค่าได้ 0.280 และเมื่อ BSA ได้ทำปฏิกิริยากับ EDA เป็น cBSA แล้วค่าการดูดกลืนแสงนี้จะลดลงเป็น 0.181 และจะเปลี่ยนแปลงอีกเป็น 0.060, 0.077 และ 0.069 เมื่อมีการเชื่อมโมเลกุลของ MCYST-RR เข้าไปเป็นจำนวน 5,10 และ15 มิลลิกรัมตามลำดับ จากค่าที่เปลี่ยนแปลงนี้แสดงว่าโมเลกุลของ cBSAได้ทำปฏิกริยาแล้ว ในขณะที่การอ่านค่าการค่าการดูดกลืนแสงที่ 238 ของ BSA และ cBSA ที่ยังไม่ได้มีการเชื่อมโมเลกุลของ MCYST-RR จะอ่านค่าได้เท่ากันที่ 0.505 ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงนี้จะเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเชื่อมโมเลกุลของ MCYST-RR ซึ่งวัดได้เป็น 0.454 ,0.826 และ 0.474 ตามจำนวนมิลลิกรัมของ MCYST-RR ที่ใช้ 5,10 และ15 มิลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 31) โดยค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงขึ้นกับปริมาณของ MCYST-RR ที่ได้ทดลองเชื่อมเข้าไปอย่างไม่เป็นอัตราสัดส่วน

ตารางที่ 31 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 nm เมื่อทำการ conjugate protein carrier กับ MCYST-RR ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ปริมาณ MCYST-RR / protein carrier (mg)	Absorbance 238 nm	Absorbance 278 nm
BSA	0.505	0.280
cBSA0	0.505	0.181
BSA + MCYST-RR 10 mg	0.697	0.100
cBSA+ MCYST-RR 5 mg	0.454	0.060
cBSA+ MCYST-RR 10 mg	0.826	0.077
cBSA+ MCYST-RR 15 mg	0.474	0.069

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะมีความเข้มข้น 0.4 mg/ml

การเชื่อมโยงของ MCYST-RR กับ cBSAนั้น Chu et. al. (1990)ได้ได้รายงานการเตรียม immunogen เพื่อการผลิตแอนติซีรัมนั้นได้ใช้ปริมาณของ MCYST-RR จำนวน 5 มิลลิกรัม ซึ่งจากผลการทดลองที่เพิ่มปริมาณของ MCYST-RR เป็น10 มิลลิกรัม สามารบ่งชี้ได้ว่ามีปริมาณของ MCYST-RR ที่เชื่อมกันมีเพิ่มมากขึ้นโดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 238 ที่เพิ่มจาก 0.454 เป็น 0.826 แต่ในขณะที่การเพิ่มจำนวนของ MCYST-RR เป็น 15 มิลิลกรัม ค่าการดูดกลืนแสงกลับไม่ได้เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนแต่กลับมีค่าน้อยกว่าการใช้ MCYST-RR ที่ 10 มิลิลกรัมอีกด้วย เมื่อพิจาณาจากกราฟ ภาพที่ 35 จะเห็นความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 10 มิลิลกรัม อาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาแบบสุ่มระหว่างหมู่ carboxylate ที่อยู่บน MCYST-RR กับหมู่ amine ที่อยู่บน cBSA ที่เกิดการจับกันเป็นกลุ่มก้อนจนอาจบดบังหมู่ Adda ที่อยู่บน MCYST-RR ได้ จึงอาจทำให้ค่าที่อ่านได้นั้นต่ำกว่าทั้งที่มีการเชื่อมกันมากกว่า ซึ่งไม่สามารถระบุได้เนื่องจาก MCYST-RR มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก



ภาพที่ 35 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตร เมื่อใช้ MCYST-RR ปริมาณต่างๆ กันทำปฏิกิริยากับ cBSA

เมื่อเปรียบเทียบกับการดูดกลืนแสงของการทดลองที่ใช้ protein carrier ชนิด BSA กับโมเลกุลของ MCYST-RR จะให้ผลที่สอดคล้องกันคือ ค่าการดูดกลืนแสงของ BSA (ตารางที่ 31) มีค่าที่ 0.280 และจะเปลี่ยนแปลงเป็น 0.100 เมื่อมีการเชื่อม MCYST-RR ในขณะที่พิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของ MCYST-RR ที่ 238 เมื่อ BSA ที่ยังไม่ถูกเชื่อมจะอ่านค่าได้ที่ 0.505 และจะเปลี่ยนแปลงเป็น 0.697 เมื่อมีการเชื่อมโมเลกุลของ MCYST-RR แล้ว

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวของ cBSA และ BSA ทำให้สามารถอนุมานได้ว่ามีการเชื่อมโยงของโมเลกุล MCYST-RR กับ protein carrier ทั้งสองชนิด แล้วจริง จึงเลือก immunogen ที่เตรียมจาก protein carrier ชนิด cBSA เชื่อมกับ MCYST-RR 10, 15 มิลลิกรัม เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงของ MCYST-RR สูง และจากรายงานพบว่าการใช้ cBSA จะส่งผลให้มี immunogenicity สูงขึ้น เนื่องจากสภาวะที่ประจุบวกบน cBSA ทำให้สามารถจับกับ antigen presenting cells (APC) ได้ดีทำให้เกิดการตอบสนองทางคุ้มกันได้เร็วกว่าและเกิดการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะได้ดีกว่าด้วย (Domen and Hermanson,1992) พร้อมกันนี้ได้เลือก protein carrier ชนิด BSA ที่เชื่อม MCYST-RR 10 มิลลิกรัมด้วยเนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงของ MCYST-RR สูงเป็นอันดับสอง

จากการทดลองการเชื่อม MCYST-RR กับ protein carrier ซ้ำอีกครั้งกับ BSA, cBSA และได้เพิ่ม γ-globulin เข้ามา แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตร เพื่อดูผลการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังเชื่อม MCYST-RR กับ protein carrier ซึ่ง micrcystin มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ส่วน BSA และ γ-globulin มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร จากตารางที่ 32 ผลการเชื่อม MCYST-RR กับ BSA นั้นพบว่าการเชื่อมครั้งใหม่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตร มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างเห็นได้ชัด คือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตรลดลงจากเดิม คือจาก 0.345 เป็น 0.272 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมคือ 0.537 เป็น 1.595 ซึ่งแสดงว่า MCYST-RR น่าจะเข้าไปจับกับ BSA ได้มากขึ้น หรืออาจเนื่องมาจากการเข้าไปจับกับ BSA แล้วเกิดการหันหน้าด้านที่มีกรดอะมิโน Adda ซึ่งแสดงความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรได้มากกว่าเดิม

จากตารางที่ 32 เมื่อเปรียบเทียบผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ cBSA- MCYST-RR ชุดเก่าและชุดใหม่นั้น พบว่าการเชื่อมชุดใหม่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตรลดลงจากเดิม คือจาก 0.225 เป็น 0.149 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรมีค่าลดลงจากเดิมคือ 2.695 เป็น 1.809 การที่ผลการทดลองมีความไม่สัมพันธ์กันอาจเนื่องมาจากมีการจับกันของไมโครซิสตินกับ cBSA จริง แต่เนื่องจากโปรตีนมีการม้วนพับกันอาจทำให้หมู่ที่มีความสามารถในการ absorb แสงมีการม้วนเข้าไปอยู่ภายในจนทำให้ค่าที่อ่านได้ไม่แน่นอน

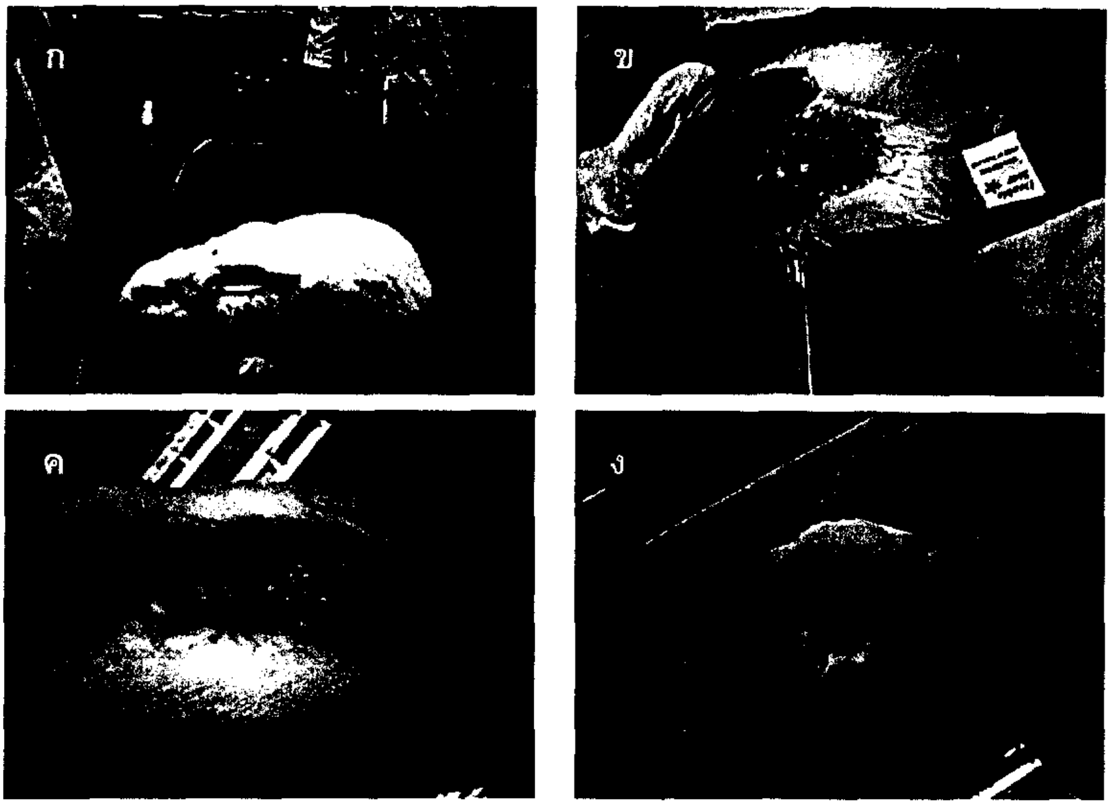
ตารางที่ 32 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 และ 278 นาโนเมตรเพื่อเปรียบเทียบผลการเชื่อม MCYST-RR กับ protein carrier แต่ละชนิด

ตัวอย่าง	Absorbance 238 nm	Absorbance 278 nm
BSA	1.376	0.614
cBSA	1.814	0.428
BSA-MC (เก่า)	0.537	0.345
BSA-MC (ใหม่)	1.595	0.272
cBSA-MC (เก่า)	2.695	0.225
cBSA-MC (ใหม่)	1.809	0.149
γ-globulin	3.096	2.051
γ-globulin-MC	0.320	0.180

<u>หมายเหตุ</u> ตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/ml

7. การฉีดสารพิษเข้าสู่สัตว์ทดลอง

ได้ทำการฉีดสารพิษเข้าสู่สัตว์ทดลองโดยฉีดเข้าผิวหนังด้านหลังของกระต่ายดังภาพที่ 36(ข) จะสังเกตเห็นว่ามีตุ่มนูนเกิดขึ้น และเมื่อปล่อยไว้นาน 1 สัปดาห์พบว่ามีแผลเกิดขึ้นซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการใช้ complete Freund's adjuvant ดังภาพที่ 36(ค)



ภาพที่ 36 (ก) ลักษณะของกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์, (ข) การฉีดเข้าผิวหนัง (id), (ค) แผลที่เกิดจากการฉีด id หลังทิ้งไว้ 1 สัปดาห์, (ง) การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (im) และ (จ) การเจาะเลือดจากหูกระต่าย

8. การทดสอบหาคุณภาพของแอนติซีรัม – กระต่ายชุดที่ 1

<u>8.1 การทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายกับแอนติเจนแต่ละชนิดด้วยวิธี indirect ELISA</u>

ผลการทดลองนี้เป็นการทดสอบแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระต่ายครั้งที่ 1 การทดลองนี้ได้แบ่งกระต่ายเป็น 4 ชุด โดยแต่ละชุดจะได้รับอิมมูโนเจนที่แตกต่างกันคือ ชุดที่ 1 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 1-2 ได้รับอิมมูโนเจนที่เกิดจากการเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR โดยใช้ปริมาณ MCYST-RR 5 มิลลิกรัม

ในการเชื่อมกับ cBSA, ชุดที่ 2 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 3-4 ได้รับอิมมูโนเจนที่เกิดจากการเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR โดยใช้ปริมาณ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA, ชุดที่ 3 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 5-7 ได้รับอิมมูโนเจนที่เกิดจากการเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR โดยใช้ปริมาณ MCYST-RR 15 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA, ชุดที่ 4 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 8-10 ได้รับอิมมูโนเจนที่เกิดจากการเชื่อม BSA กับ MCYST-RR โดยใช้ปริมาณ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA

จากการทดลองชุดที่ 1-3 นั้นเป็นการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย MCYST-RR ที่เชื่อมกับ cBSA แต่ให้มีปริมาณ MCYST-RR ในการเชื่อมที่แตกต่างกัน พบว่ากระต่ายส่วนใหญ่จะมีการตอบสนองได้ดีกับ cBSA แต่เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 8 การตอบสนองต่อ cBSA จะมีค่าลดลง ในขณะที่การตอบสนองต่อ cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR จะมีค่าสูงขึ้น ยกเว้นกระต่ายชุดที่ 1 ที่มีการตอบสนองต่อ MCYST-RR ได้ต่ำกว่า cBSA มาก อาจเนื่องมาจากปริมาณ MCYST-RR ที่ใช้ในการเชื่อมไม่เหมาะสม หรืออาจเป็นปัจจัยเนื่องมาจากตัวกระต่ายเองที่มีการตอบสนองต่อ MCYST-RR ได้น้อย การที่กระต่ายส่วนใหญ่มีการตอบสนองต่อ MCYST-RR ได้ช้ากว่า cBSA อาจเนื่องมาจากขนาดของ MCYST-RR ที่ต่ำกว่า cBSA มาก ทำให้ต้องใช้เวลาในการจดจำโครงสร้างได้ช้ากว่าโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ (Crowther, 1995)

สำหรับการทดลองในชุดที่ 4 ซึ่งได้รับอิมมูโนเจนที่เกิดจากการเชื่อม MCYST-RR กับ BSA นั้นพบว่าในระยะแรกมีการตอบสนองต่อ MCYST-RR ได้ต่ำ แต่จะเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 9 รวมทั้งยังสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับ BSA- MCYST-RR ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่ MCYST-RR มีขนาดเล็กเมื่อนำมาเคลือบ microwell ทำให้เห็นการเกิดปฏิกิริยาได้ไม่ชัดเจน และกระต่ายในชุดนี้ไม่ทำปฏิกิริยากับ BSA ยกเว้นกระต่ายตัวที่ 9 ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ BSA ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์แต่ละตัวที่มีความสามารถในการจดจำโครงสร้างต่างๆได้แตกต่างกัน

ดังนั้นในการทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างภูมิคุ้มกันต่อสารพิษ MCYST-RR นั้นควรนำสารพิษซึ่งมีขนาดเล็กนี้เชื่อมกับสารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน carrier จึงจะสามารถเห็นผลในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสารพิษนี้ได้ชัดเจน

8.1.1 เมื่อฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วย cBSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 5 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA

จากตารางที่ 33 – 34 และภาพที่ 37 - 38 เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย cBSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 5 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA เข้าสู่สัตว์ทดลองตัวที่ 1-2 แล้วเจือจางแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายในแต่ละสัปดาห์เป็น 1: 1,000 เปรียบเทียบกับ normal serum (NS) คือแอนติซีรัมที่ยังไม่ได้ฉีดอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายสัตว์ พบว่าแอนติซีรัมของกระต่ายตัวที่ 1-2 จะตอบสนองต่อ cBSA ได้ดีโดยสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นพบว่าจะตอบสนองกับ free MCYST-RR ได้น้อย แต่การตอบสนองต่อ MCYST-RR จะเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 7

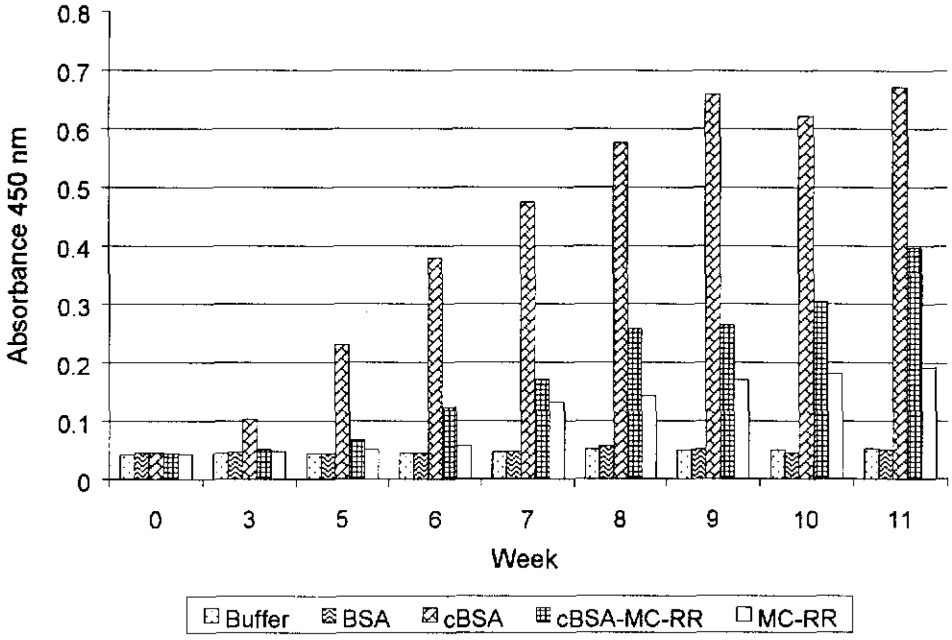
หลังจากนั้นก็จะมีค่าคงที่ ในขณะที่การตอบสนองต่อ cBSA จะมีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ และจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 9 ส่วนการตอบสนองต่อ cBSA- MCYST-RR นั้นจะมีค่าคงที่ในสัปดาห์ที่ 8

จากการทดลองชุดนี้พบว่ากระต่ายมีการตอบสนองต่อ MCYST-RR ได้ต่ำกว่า cBSA มาก อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของ cBSA ที่มีขนาดใหญ่ และ MCYST-RR มีปริมาณไม่เหมาะสม หรืออาจเป็นผลมาจากความสามารถทางภูมิคุ้มกันของกระต่ายที่มีความสามารถในการจดจำโครงสร้างต่าง ๆได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 33 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 1 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.043	0.045	0.045	0.045	0.047	0.051	0.050	0.050	0.052
BSA	0.046	0.047	0.045	0.045	0.048	0.057	0.051	0.045	0.050
cBSA	0.046	0.103	0.230	0.379	0.475	0.576	0.659	0.622	0.672
cBSA- MCYST-RR	0.045	0.051	0.068	0.123	0.171	0.257	0.264	0.304	0.396
MCYST-RR	0.044	0.048	0.051	0.057	0.132	0.143	0.170	0.182	0.191

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 5 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



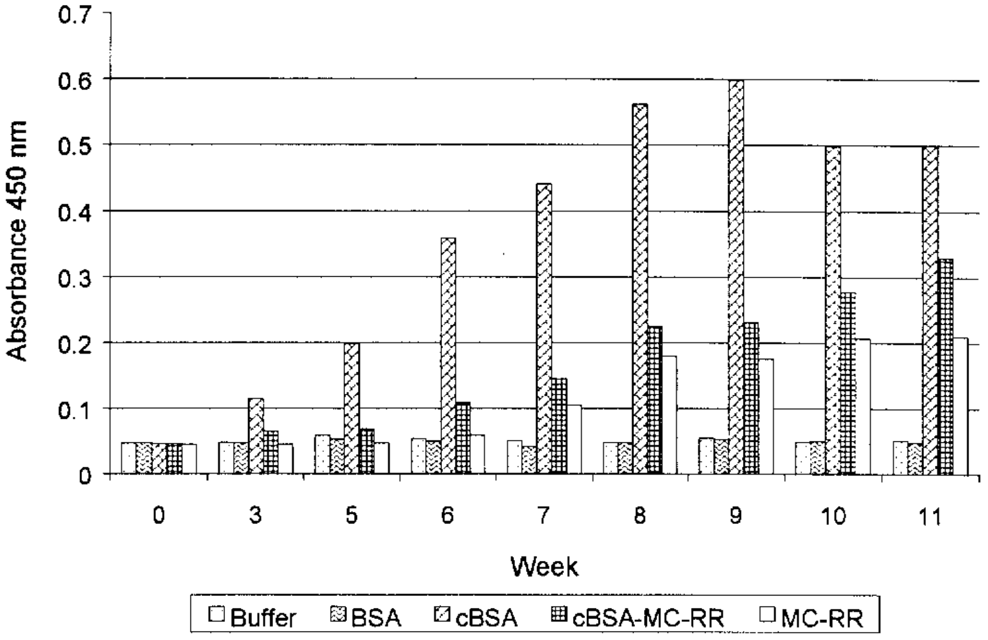
ภาพที่ 37 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 1 ในแต่ละสัปดาห์ที่ ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 1% SM วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 34 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 2 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.047	0.048	0.059	0.054	0.051	0.048	0.055	0.049	0.051
BSA	0.048	0.047	0.053	0.050	0.042	0.048	0.053	0.050	0.048
cBSA	0.046	0.114	0.199	0.358	0.441	0.562	0.598	0.499	0.500
cBSA- MCYST-RR	0.046	0.065	0.068	0.109	0.145	0.225	0.231	0.277	0.329
MCYST-RR	0.045	0.045	0.047	0.059	0.105	0.179	0.175	0.207	0.209

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 5 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 38 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 2 ในแต่ละสัปดาห์ที่ ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 1%SM วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

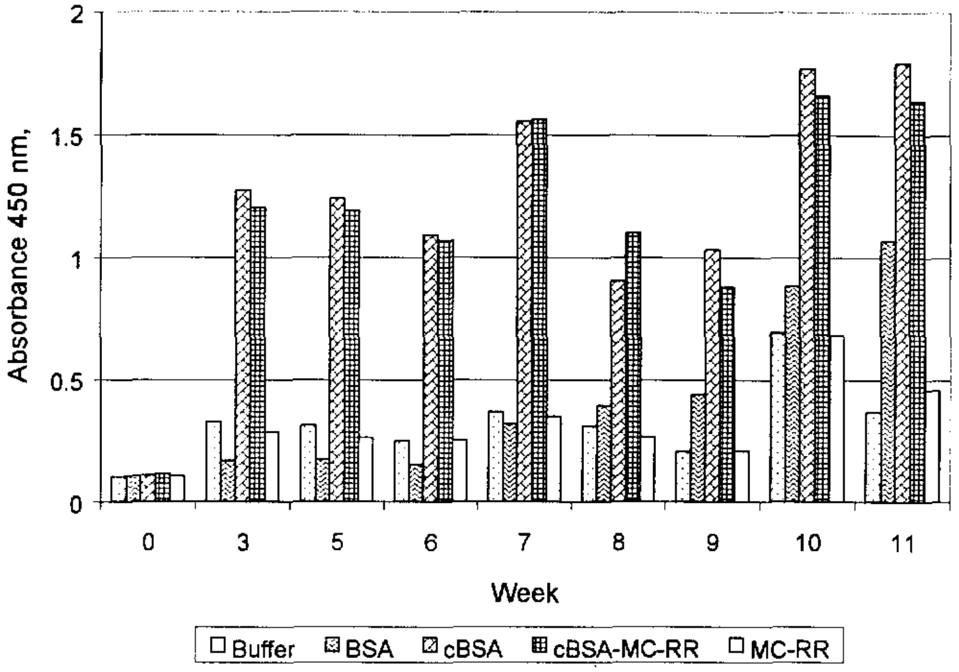
8.1.2 เมื่อฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วย cBSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA

จากตารางที่ 35 – 36 และภาพที่ 39 - 40 เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย cBSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA เข้าสู่สัตว์ทดลองตัวที่ 3-4 แล้วเจือจางแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายในแต่ละสัปดาห์เป็น 1: 1,000 เปรียบเทียบกับ normal serum (NS) คือแอนตีซีรัมที่ยังไม่ได้ฉีดอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายสัตว์นั้น พบว่าแอนตีซีรัมของกระต่ายทั้ง 2 ตัวจะตอบสนองต่อ cBSA และ cBSA- MCYST-RR ได้ดี กระต่ายตัวที่ 4 จะสามารถตอบสนองต่อ free MCYST-RR ได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับ BSA หรือ buffer อาจเนื่องมาจากแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 มี affinity ต่อ free MCYST-RR ที่ค่อนข้างดีแม้จะต่ำกว่า cBSA ก็ตาม ซึ่งผิดกับกระต่ายตัวที่ 3 ที่ทำปฏิกิริยากับ BSA แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ free MCYST-RR นั้นอาจจะมีผลมาจากการมี affinity ต่อ free MCYST-RR ที่ค่อนข้างต่ำ หรืออาจจะเป็นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายเองที่ไม่ตอบสนองต่อ free MCYST-RR

ตารางที่ 35 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.103	0.330	0.314	0.250	0.370	0.310	0.207	0.694	0.368
BSA	0.105	0.170	0.175	0.154	0.319	0.396	0.439	0.884	1.069
cBSA	0.108	1.275	1.240	1.094	1.556	0.902	1.031	1.771	1.795
cBSA- MCYST-RR	0.114	1.204	1.191	1.070	1.563	1.101	0.879	1.661	1.639
MCYST-RR	0.106	0.289	0.263	0.254	0.35	0.267	0.209	0.683	0.458

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

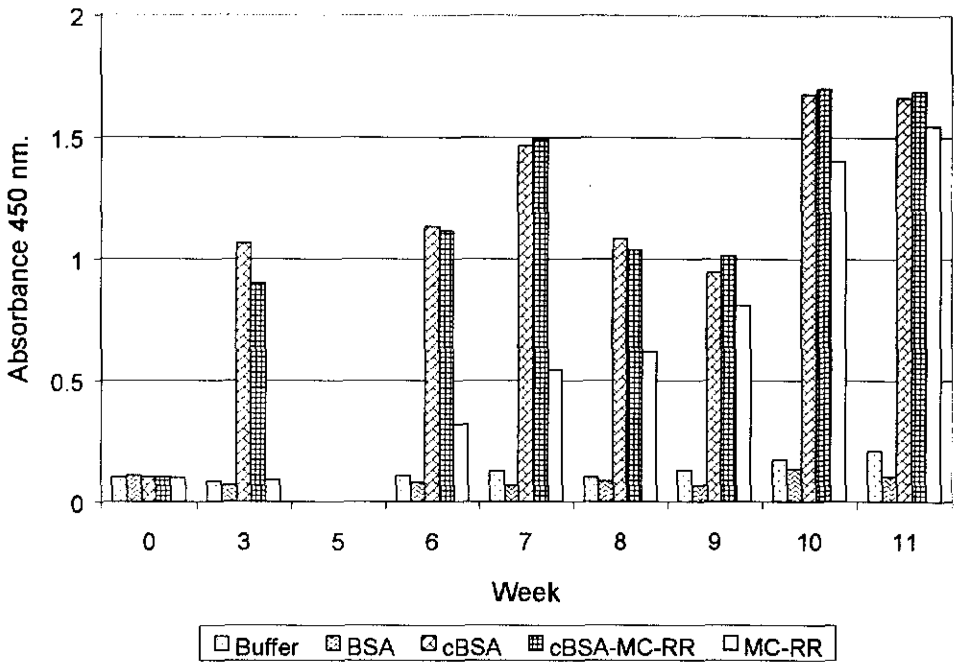


ภาพที่ 39 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 36 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.100	0.084	ND	0.109	0.126	0.099	0.128	0.174	0.209
BSA	0.107	0.068	ND	0.080	0.065	0.084	0.065	0.133	0.102
cBSA	0.104	1.063	ND	1.131	1.464	1.081	0.945	1.676	1.663
cBSA- MCYST-RR	0.102	0.900	ND	1.112	1.490	1.037	1.013	1.699	1.690
MCYST-RR	0.101	0.089	ND	0.319	0.543	0.618	0.809	1.400	1.545

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ND คือ ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 40 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

8.1.3 เมื่อฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วย cBSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 15 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA

จากตารางที่ 37 – 39 และภาพที่ 41 - 43 เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย cBSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 15 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA เข้าสู่สัตว์ทดลองตัวที่ 5-7 แล้วทำการเจือจางแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายในแต่ละสัปดาห์เป็น 1: 1,000 เปรียบเทียบกับ normal serum (NS) คือแอนตีซีรัมที่ยังไม่ได้ทำการฉีดอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายสัตว์ พบว่าแอนตีซีรัมของกระต่ายตัวที่ 5-7 จะตอบสนองต่อ cBSA และ cBSA- MCYST-RR ได้ดีโดยสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นพบว่าจะตอบสนองกับ free MCYST-RR ได้น้อยกว่าการตอบสนองต่อ cBSA และ cBSA- MCYST-RR แต่การตอบสนองต่อ MCYST-RR จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่การตอบสนองต่อ cBSA และ cBSA- MCYST-RR มีค่าค่อนข้างคงที่

กระต่ายตัวที่ 5 และ 6 นั้นสามารถตอบสนองได้ดีกับ cBSA และสามารถตอบสนองต่อ MCYST-RR ได้เช่นกันอาจเนื่องมาจาก MCYST-RR มีขนาดเล็กเมื่อนำไปเคลือบบน microwell ทำให้เห็นผลของปฏิกิริยาได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการตรวจสอบไตเตอร์จึงควรนำ MCYST-RR ไปเชื่อมกับสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ cBSA หรือ BSA ดังการทดลองของ Pauillac et. al. (1998) ได้ทำการเชื่อมแฮปเตนคือ 4-acetyl benzoic acid (ABA) กับ BSA เพื่อผลิต polyclonal antibody ต่อ ABA เขาทำการตรวจสอบไตเตอร์ของกระต่ายโดยใช้ ABA ที่เชื่อมกับ ovalbumin ส่วนการทดลองของ Pestka and Chu (1984) ได้เชื่อมแฮปเตนคือ aflatoxin B1(AFB1) กับ EDA-BSA เพื่อผลิต polyclonal antibody ต่อ AFB1 และตรวจสอบไตเตอร์ของกระต่ายโดยใช้ AFB1 ที่เชื่อมกับ modified DNA และจากการทดลองของ Yu et. al. (2002) ได้เชื่อมแฮปเตนคือ MCYST-LR กับ gamma-globulin เพื่อผลิต polyclonal antibody ต่อ MCYST-LR เขาสอบไตเตอร์ของกระต่ายโดยใช้ MCYST-LR ที่เชื่อมกับ poly-lysine จากผลการทดลองนี้พบว่าแอนติซีรัมต่อ MCYST-RR มีค่าเพิ่มขึ้นช้ากว่า cBSA อาจเนื่องมาจาก MCYST-RR มีขนาดเล็กกว่า cBSA มาก เมื่อทำการฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองจึงต้องใช้เวลาในการจดจำ MCYST-RR นานกว่าสารที่มีขนาดใหญ่ (Crowther, 1995)

ส่วนการที่กระต่ายตัวที่ 5 และ 6 มีการตอบสนองต่อ BSA ต่ำหรือแทบจะไม่ตอบสนองต่อ BSA เลยนั้นอาจเนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายที่มีความสามารถในการจดจำ BSA ได้ต่ำ หรืออาจจะเป็นเพราะว่าโครงสร้างของ MCYST-RR และ EDA เข้าไปจับกับ BSA แล้วทำให้โครงสร้างเปลี่ยนทำให้มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แต่เมื่อดูผลจากกระต่ายตัวที่ 7 พบว่าสามารถตอบสนองต่อ BSA ได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นั่นแสดงว่าการเชื่อมครั้งนี้สัตว์ทดลองสามารถตอบสนองต่อ BSA, cBSA และ MCYST-RR ได้หมดแต่ affinity ที่มีต่อสารแต่ละตัวในสัตว์ทดลองคนละตัวกันมีไม่เท่ากันทำให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันออกไป (Crowther, 1995) สำหรับกระต่ายตัวที่ 6 นี้พบว่าจะมีค่า buffer ค่อนข้างสูงอาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของระบบภูมิคุ้มกันในตัวกระต่ายเองที่มีความสามารถในการยึดเกาะกับ microwell ได้ดีกว่าตัวอื่นๆ หรืออาจเนื่องมาจากใช้

blocking ที่ไม่เหมาะสม จึงควรทำการปรับลดค่านี้เพื่อจะได้ค่าการตอบสนองต่อแอนติเจนต่างๆ ที่แท้จริง

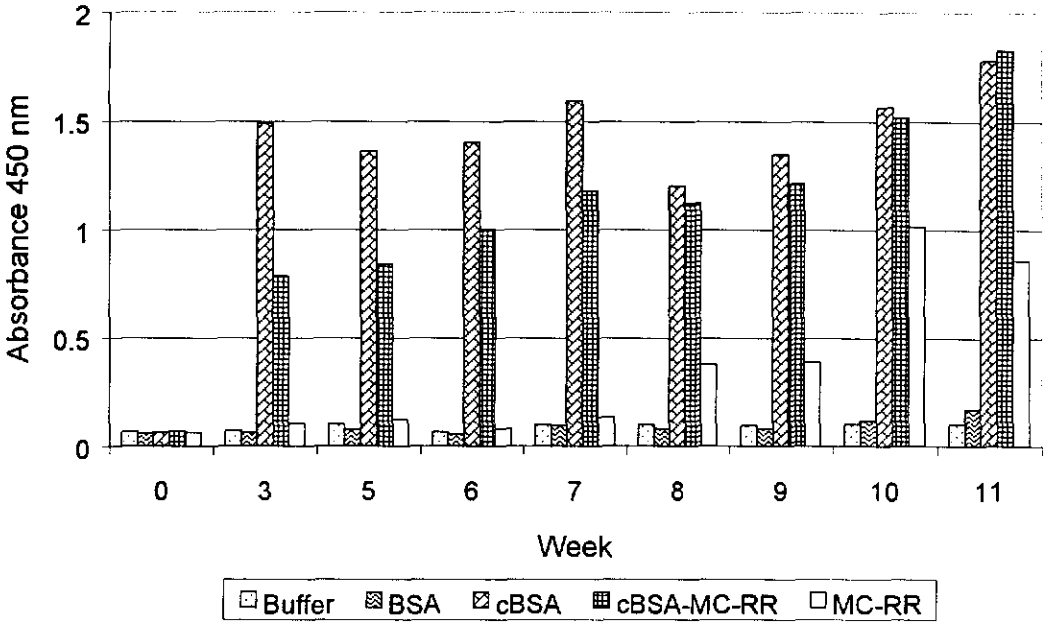
เมื่อสังเกตจากสัปดาห์ที่ 8 พบว่าแอนติบอดีของกระต่ายทุกตัวทำปฏิกิริยากับ cBSA ได้ลดลง แต่ยังคงทำปฏิกิริยาได้ดีกับ cBSA- MCYST-RR และทำปฏิกิริยากับ MCYST-RR ได้เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากผลการทำปฏิกิริยาต่อ cBSA- MCYST-RR ที่เพิ่มขึ้นในระยะหลังนี้เป็นผลรวมของการสร้างแอนติบอดีต่อ cBSA และ กับ MCYST-RR ซึ่งต่างจากระยะแรกที่เป็นผลมาจากแอนติบอดีต่อ cBSA

ตารางที่ 37 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 5 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.069	0.073	0.102	0.066	0.100	0.100	0.095	0.101	0.102
BSA	0.062	0.064	0.077	0.057	0.096	0.081	0.081	0.118	0.171
cBSA	0.067	1.489	1.361	1.401	1.595	1.202	1.347	1.564	1.781
cBSA- MCYST-RR	0.069	0.783	0.841	1.002	1.179	1.121	1.214	1.516	1.828
MCYST-RR	0.064	0.106	0.122	0.082	0.134	0.379	0.389	1.015	0.858

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

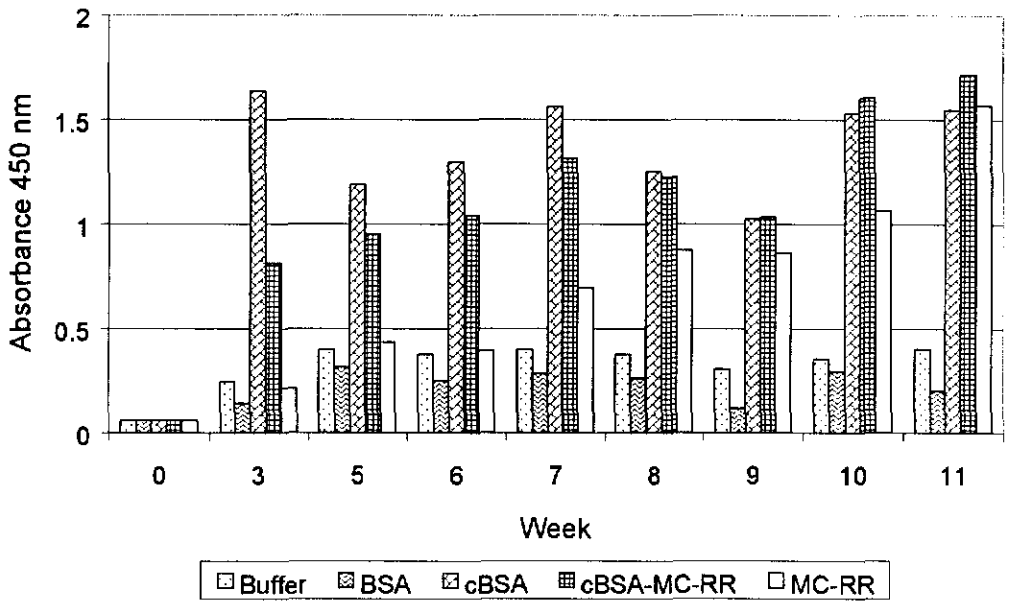


ภาพที่ 41 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 5 ในแต่ละสัปดาห์ที่ ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 38 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 6 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.063	0.246	0.399	0.374	0.397	0.377	0.304	0.354	0.401
BSA	0.060	0.141	0.313	0.250	0.284	0.262	0.116	0.294	0.201
cBSA	0.060	1.637	1.191	1.298	1.562	1.251	1.027	1.531	1.546
cBSA- MCYST-RR	0.063	0.812	0.951	1.041	1.312	1.225	1.034	1.607	1.716
MCYST-RR	0.060	0.214	0.433	0.395	0.694	0.875	0.862	1.065	1.568

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

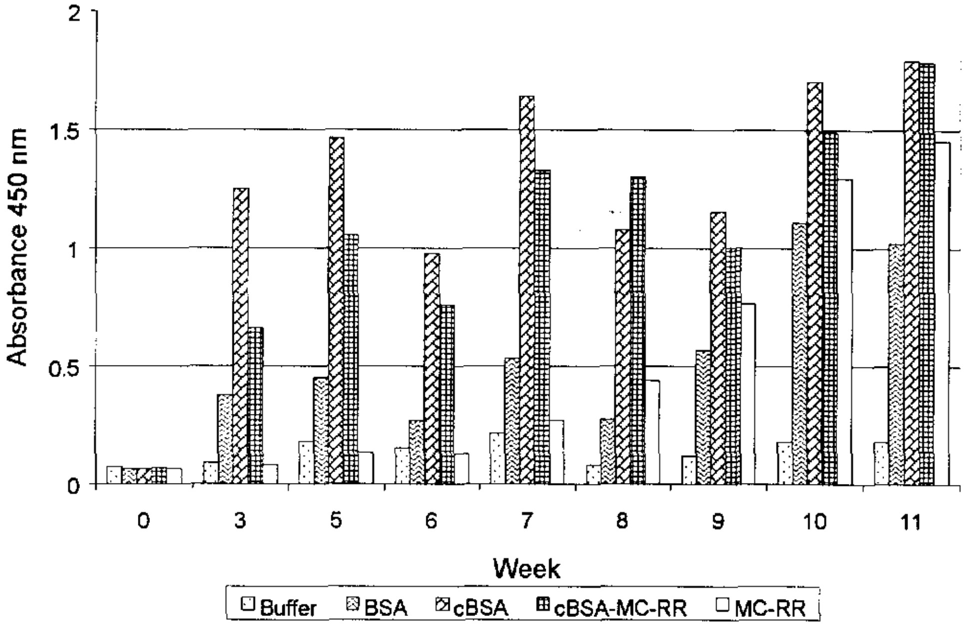


ภาพที่ 42 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 6 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้ทำการเจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 39 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 7 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.073	0.089	0.179	0.151	0.216	0.082	0.120	0.180	0.179
BSA	0.064	0.378	0.452	0.269	0.533	0.276	0.569	1.109	1.021
cBSA	0.064	1.250	1.464	0.977	1.641	1.078	1.155	1.704	1.795
cBSA- MCYST-RR	0.069	0.662	1.053	0.760	1.329	1.302	1.003	1.491	1.785
MCYST-RR	0.065	0.082	0.135	0.127	0.271	0.441	0.764	1.295	1.455

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 43 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 7 ในแต่ละสัปดาห์ที่ ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

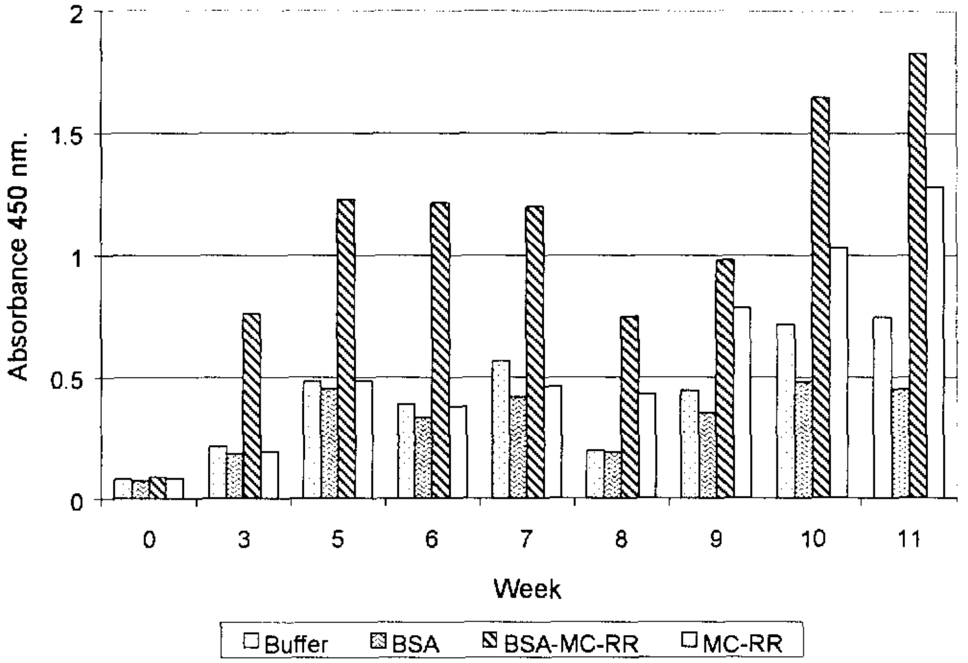
8.1.4 เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย BSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการ conjugate กับ BSA

จากตารางที่ 40 – 42 และภาพที่ 44 - 46 เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย BSA- MCYST-RR ที่ใช้ปริมาณ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการ conjugate กับ cBSA เข้าสู่สัตว์ทดลองตัวที่ 8-10 แล้วทำการเจือจางแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายในแต่ละสัปดาห์เป็น 1: 1,000 แล้วทำการเปรียบเทียบกับ normal serum (NS) พบว่ากระต่ายตัวที่ 8 และ 10 สามารถตอบสนองต่อ BSA- MCYST-RR และ free MCYST-RR ได้ดีแต่จะตอบสนองต่อ free MCYST-RR ได้ช้ากว่า BSA- MCYST-RR ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่ free MCYST-RR มีขนาดเล็กมากทำให้เห็นผลไม่ชัดเจน และกระต่ายตัวนี้มีการตอบสนองต่อ BSA ต่ำเมื่อเทียบกับ normal serum แต่ถ้าทำการปรับลดระดับ buffer ให้มีค่าต่ำกว่านี้อาจจะทำให้ได้ผลที่แน่ชัดกว่านี้ว่าจริง ๆ แล้วมีการตอบสนองต่อ BSA หรือไม่ สำหรับกระต่ายตัวที่ 9 พบว่าสามารถตอบสนองได้ดีกับ BSA, BSA- MCYST-RR และ free MCYST-RR รวมทั้งค่า buffer ก็ยังมีค่าสูง แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายตัวนี้ดีเกินไป

ตารางที่ 40 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 8 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.080	0.215	0.480	0.387	0.564	0.197	0.444	0.713	0.744
BSA	0.073	0.185	0.450	0.332	0.416	0.190	0.350	0.478	0.449
BSA- MCYST-RR	0.088	0.760	1.227	1.214	1.198	0.745	0.980	1.647	1.828
MCYST-RR	0.084	0.192	0.483	0.376	0.460	0.428	0.783	1.030	1.281

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

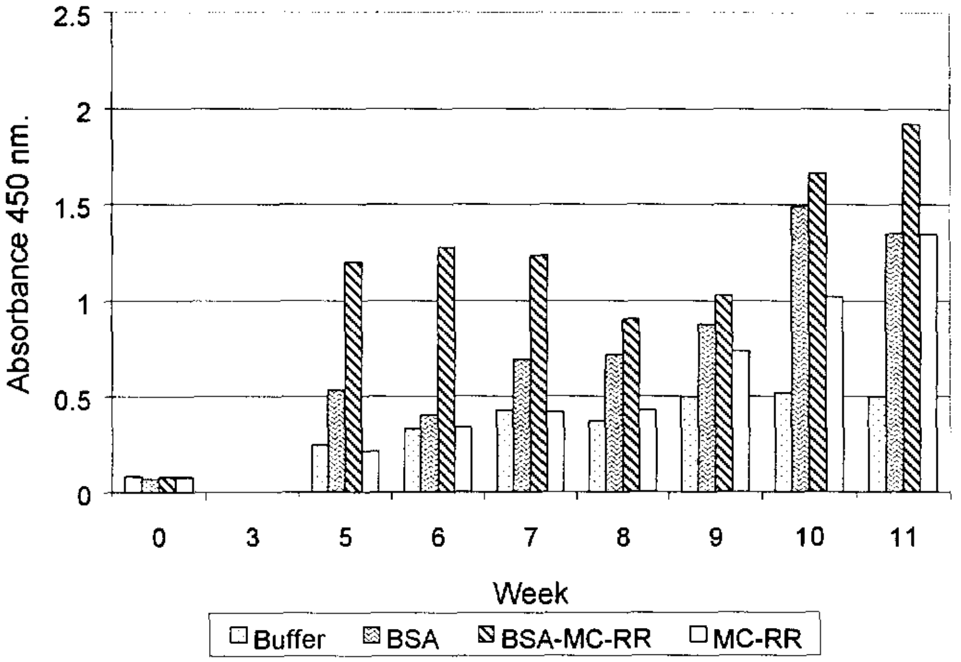


ภาพที่ 44 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 8 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, BSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 41 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 9 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.079	-	0.246	0.330	0.426	0.370	0.497	0.517	0.499
BSA	0.068	-	0.531	0.404	0.694	0.717	0.873	1.490	1.349
BSA- MCYST-RR	0.078	-	1.199	1.275	1.235	0.903	1.025	1.661	1.917
MCYST-RR	0.075	-	0.211	0.339	0.417	0.428	0.736	1.020	1.347

หมายเหตุ
- ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

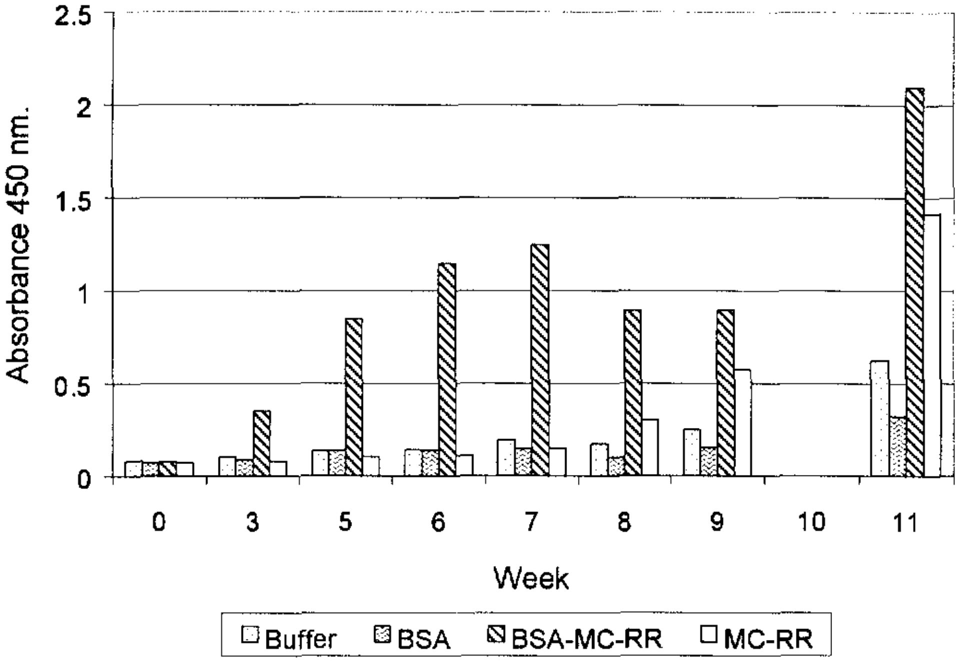


ภาพที่ 45 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 9 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, BSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้ เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 42 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 10 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1: 1,000

แอนติเจน	Absorbance 450 nm								
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7	สัปดาห์ 8	สัปดาห์ 9	สัปดาห์ 10	สัปดาห์ 11
Buffer	0.081	0.105	0.137	0.142	0.195	0.173	0.251	-	0.626
BSA	0.070	0.087	0.139	0.140	0.150	0.099	0.153	-	0.323
BSA- MCYST-RR	0.077	0.352	0.848	1.145	1.246	0.892	0.896	-	2.097
MCYST-RR	0.071	0.080	0.105	0.111	0.148	0.301	0.574	-	1.415

หมายเหตุ - ไม่ได้ absorb แอนติซีรัม, เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



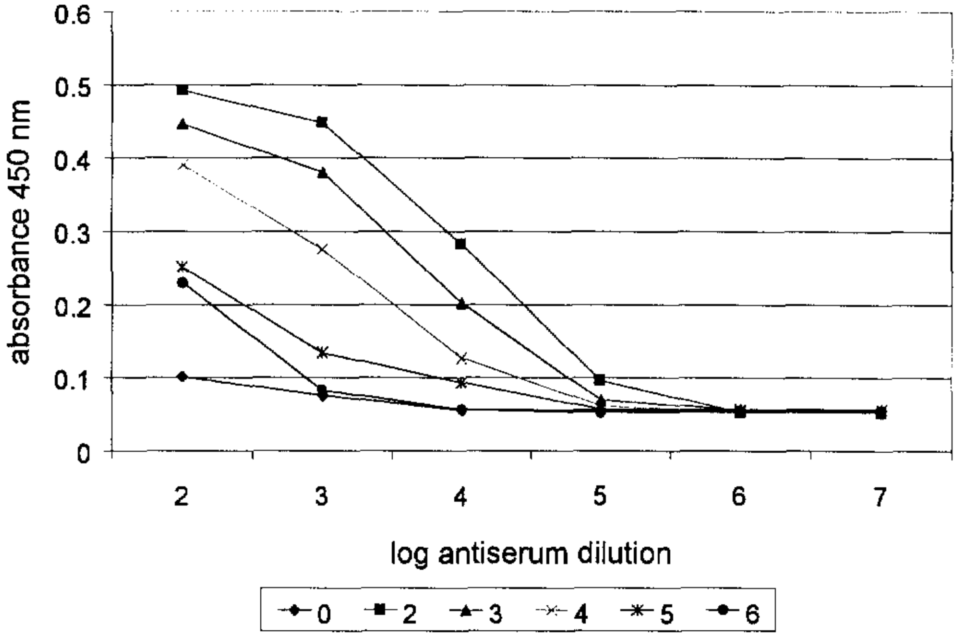
ภาพที่ 46 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 10 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, BSA-MC และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ blocking คือ 0.1% gelatin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

8.2 การหาปริมาณแอนติเจน (PLL- MCYST-RR) ที่เหมาะสม

จากตารางที่ 43 และภาพที่ 47 เมื่อไม่มีแอนติเจน (PLL- MCYST-RR) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อเติมแอนติเจน (PLL- MCYST-RR) ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพบว่าที่ความเจือจาง 1:1,000 เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการทดลองเนื่องจากมีความชันค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อนำมาทดสอบกับแอนติบอดีก็ยังเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน และยังเป็นการประหยัด ไม่สิ้นเปลืองแอนติเจน แม้เจือจางแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็พบว่ายังคงเห็นการเกิดปฏิกิริยา และพบว่าที่ความเข้มข้นนี้สามารถทดสอบค่าไตเตอร์ได้ถึง 10,000 รวมทั้งยังสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติเจนที่ค่าความเข้มข้น 1:10,000

ตารางที่ 43 การหาปริมาณแอนติเจน (PLL- MCYST-RR) ที่เหมาะสมต่อการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ในกระต่ายตัวที่ 4 เมื่อใช้แอนติซีรัมในสัปดาห์ที่ 10

Antiserum	Antigen (PLL- MCYST-RR) dilution					
dilution	0	1:10^{2}	1:10^{3}	1:10^{4}	1:10^{5}	1:10^{6}
1:10^{2}	0.102	0.493	0.4470	0.391	0.252	0.230
1:10^{3}	0.076	0.449	0.381	0.276	0.135	0.083
1:10^{4}	0.056	0.283	0.202	0.127	0.094	0.057
1:10^{5}	0.056	0.097	0.070	0.062	0.058	0.053
1:10^{6}	0.056	0.053	0.057	0.054	0.057	0.053
1:10^{7}	0.056	0.053	0.053	0.053	0.057	0.053



ภาพที่ 47 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log antiserum dilution กับการดูดกลืนแสงที่ 450 nm เมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติเจน (PLL- MCYST-RR) เพื่อหาปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลอง เมื่อใช้แอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ในสัปดาห์ที่ 10 ทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ HRP เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้, OPD เป็น substrate และใช้ 1%SM เป็น blocking บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

8.3 การทดสอบค่าไตเตอร์

จากผลการทดลองในตารางที่ 44 – 53 และภาพที่ 48 - 57 พบว่าค่าไตเตอร์ต่อสารพิษไมโครซิสตินของกระต่ายทั้ง 4 สภาวะ ส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 10,000 ยกเว้นกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 เป็นกระต่ายที่ได้รับแอนติเจนที่เกิดจากการเชื่อมระหว่าง cBSA กับ MCYST-RR โดยใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อม ซึ่งกระต่ายชุดนี้ได้แก่กระต่ายตัวที่ 3 และ 4 นั้นมีค่าไตเตอร์ที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ คือมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 100,000 โดยเฉพาะกระต่ายตัวที่ 4 ที่มีค่าไตเตอร์สูงถึง 100,000 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 และค่าไตเตอร์ของกระต่ายส่วนใหญ่จะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงสัปดาห์ที่ 6-8 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 3 ที่ปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมต่อ carrier มีการลดลงในช่วงนี้ และปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมต่อไมโครซิสตินก็มีค่าเพิ่มขึ้น

จากการทดลองนี้คาดว่าปริมาณไมโครซิสตินที่เหมาะสมต่อการเชื่อมกับ cBSA น่าจะเท่ากับ 10 มิลลิกรัม เพราะให้ผลการทำปฏิกิริยาต่อสารพิษที่เด่นชัดที่สุด นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อทำการเชื่อมกับ cBSA ซึ่งที่ปริมาณ 10 มิลลิกรัมให้ผลการทดลองที่เด่นชัดกว่าการทดลองที่ปริมาณอื่น

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการใช้ carrier ที่เป็น BSA กับ cBSA ถึงแม้ว่าแอนติซีรัมจะทำปฏิกิริยากับ carrier ที่เป็น BSA ได้ต่ำกว่าการใช้ cBSA แต่ไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อสารพิษไมโครซิสตินที่ใช้ cBSA เป็น carrier นั้นก็มีค่าสูงกว่าการใช้ BSA เป็น carrier ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่ cBSA มีประจุบวกมากกว่าแล้วเกิดการเหนี่ยวนำให้จับกับ antigen presenting cells (APC) ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีประจุเป็นลบ ส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้เร็วและดีกว่า (Muckerheide et. al., 1987b; Domen et. al., 1987; Apple et. al., 1988; Domen and Hermanson, 1992)

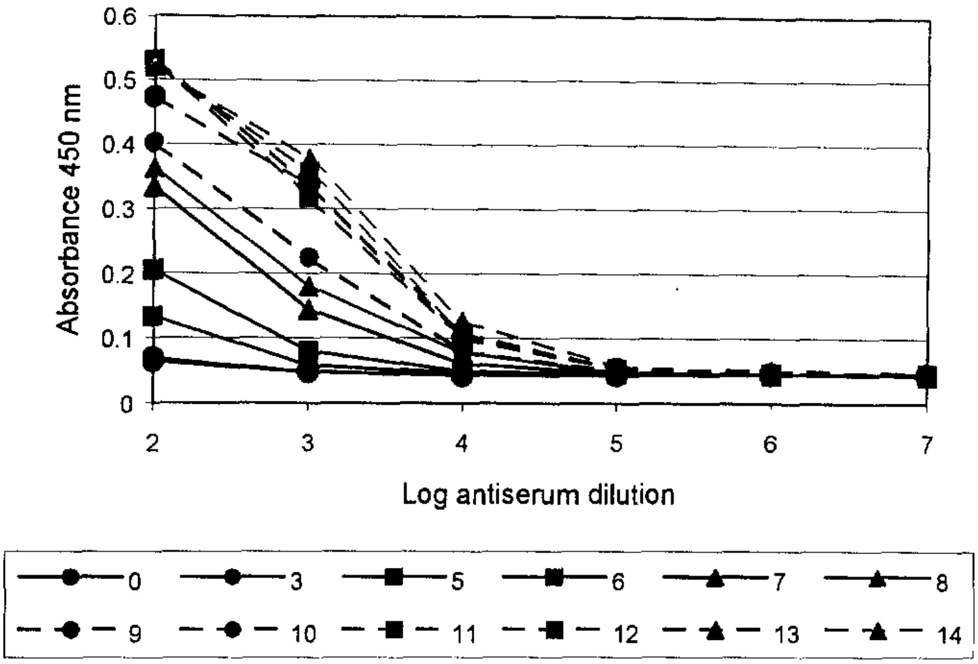
แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เกิดจากตัวสัตว์ทดลองเองซึ่งมีความสามารถในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ รวมทั้งตำแหน่งที่มีการฉีดกระตุ้นล้วนมีผลต่อการทดลองทั้งสิ้น (Harlow and Lane, 1988; Crowther, 1995)

ตารางที่ 44 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 1 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 5 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.065	0.048	0.043	0.044	0.045	0.045
3	0.069	0.048	0.046	0.047	0.045	0.045
5	0.133	0.057	0.047	0.047	0.045	0.044
6	0.205	0.080	0.050	0.045	0.045	0.045
7	0.334	0.144	0.061	0.047	0.045	0.046
8	0.363	0.180	0.077	0.048	0.046	0.044
9	0.402	0.225	0.079	0.049	0.044	0.046
10	0.473	0.337	0.102	0.053	0.046	0.045
11	0.524	0.357	0.108	0.053	0.045	0.045
12	0.530	0.318	0.100	0.053	0.045	0.045
13	0.532	0.336	0.105	0.053	0.050	0.046
14	0.520	0.378	0.127	0.056	0.048	0.043

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11



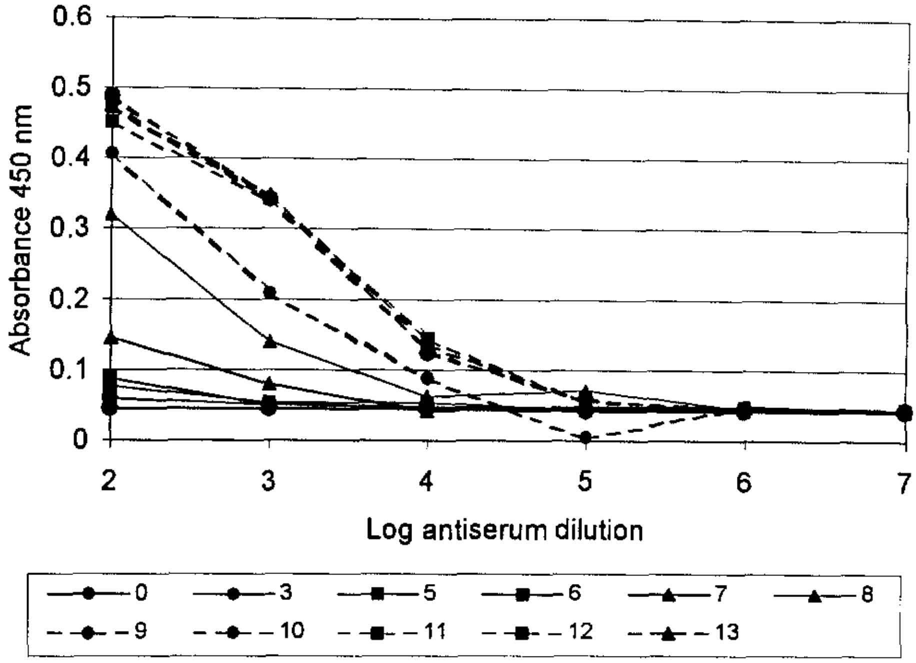
ภาพที่ 48 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 1 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 5 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 45 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 2 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 5 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.047	0.045	0.045	0.044	0.044	0.043
3	0.059	0.052	0.049	0.045	0.046	0.044
5	0.078	0.054	0.055	0.046	0.045	0.043
6	0.089	0.052	0.049	0.047	0.045	0.045
7	0.146	0.079	0.044	0.050	0.049	0.045
8	0.319	0.141	0.062	0.071	0.045	0.045
9	0.405	0.209	0.088	0.0054	0.048	0.046
10	0.489	0.343	0.126	0.060	0.045	0.045
11	0.472	0.342	0.146	0.058	0.046	0.045
12	0.452	0.344	0.129	0.057	0.050	0.046
13	0.475	0.349	0.136	0.058	0.048	0.047
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11
- ND : ไม่มีข้อมูล



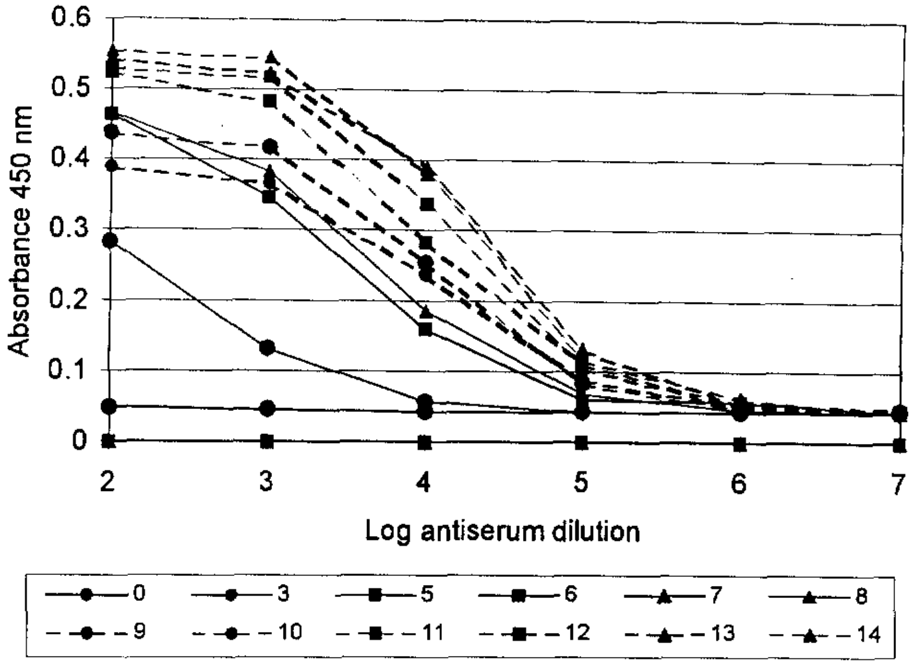
ภาพที่ 49 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 2 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 5 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธีindirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 46 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.050	0.046	0.043	0.044	0.043	0.043
3	0.283	0.131	0.056	0.043	0.043	0.043
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	0.463	0.346	0.160	0.061	0.056	0.044
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	0.467	0.382	0.187	0.069	0.047	0.043
9	0.388	0.367	0.237	0.089	0.052	0.045
10	0.436	0.416	0.253	0.084	0.049	0.045
11	0.523	0.483	0.284	0.112	0.054	0.045
12	0.528	0.516	0.338	0.107	0.051	0.046
13	0.542	0.523	0.389	0.131	0.054	0.049
14	0.553	0.547	0.379	0.116	0.063	0.044

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11
- ND : ไม่มีข้อมูล



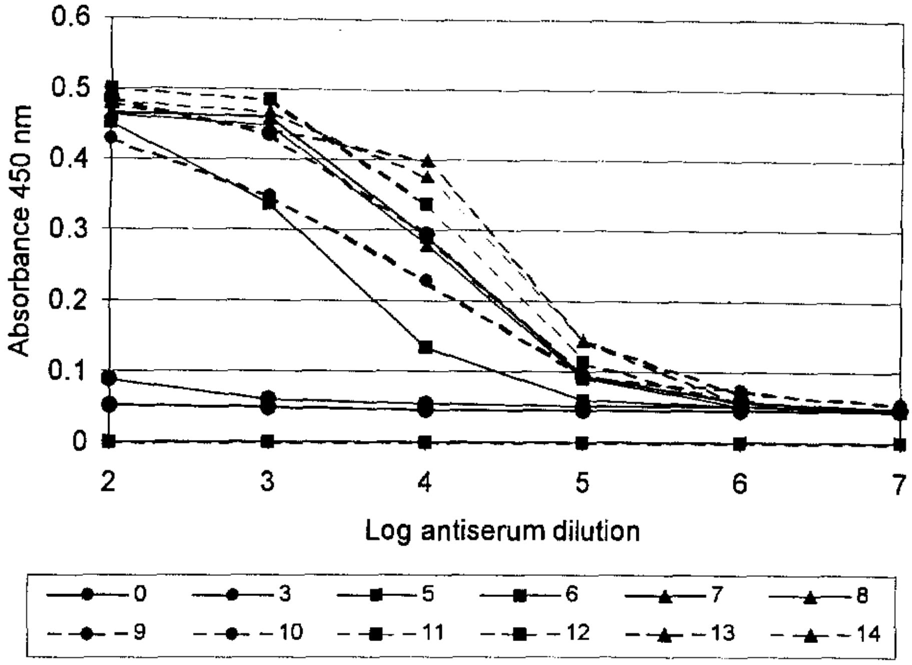
ภาพที่ 50 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 3 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 47 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.051	0.050	0.045	0.045	0.045	0.045
3	0.088	0.060	0.053	0.051	0.051	0.050
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	0.451	0.337	0.134	0.059	0.051	0.048
7	0.466	0.460	0.291	0.095	0.057	0.048
8	0.464	0.450	0.280	0.092	0.052	0.047
9	0.430	0.349	0.230	0.095	0.075	0.054
10	0.485	0.437	0.294	0.095	0.060	0.047
11	0.499	0.485	0.337	0.115	0.058	0.047
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	0.479	0.444	0.400	0.147	0.072	0.057
14	0.482	0.470	0.376	0.145	0.057	0.049

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11
- ND : ไม่มีข้อมูล



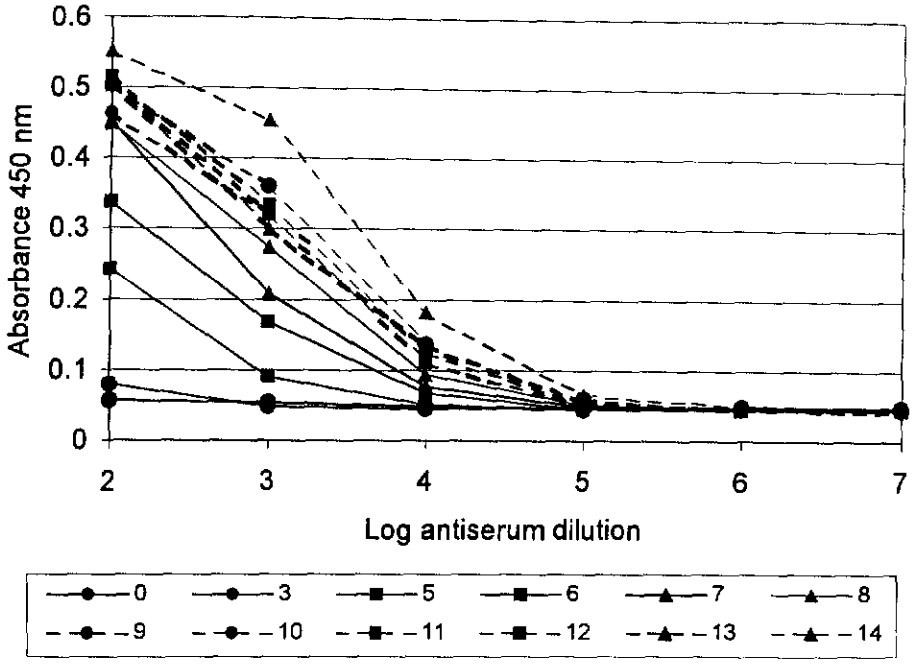
ภาพที่ 51 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 4 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 48 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 5 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 15 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.056	0.055	0.048	0.045	0.045	0.045
3	0.081	0.050	0.046	0.050	0.049	0.045
5	0.243	0.092	0.051	0.047	0.049	0.050
6	0.337	0.170	0.068	0.047	0.047	0.046
7	0.452	0.210	0.077	0.049	0.045	0.045
8	0.449	0.274	0.095	0.051	0.047	0.050
9	0.463	0.319	0.111	0.052	0.045	0.044
10	0.503	0.360	0.136	0.060	0.047	0.048
11	0.514	0.333	0.126	0.055	0.047	0.046
12	0.506	0.321	0.111	0.054	0.049	0.046
13	0.503	0.299	0.133	0.056	0.047	0.050
14	0.551	0.455	0.184	0.066	0.051	0.046

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11
- ND : ไม่มีข้อมูล



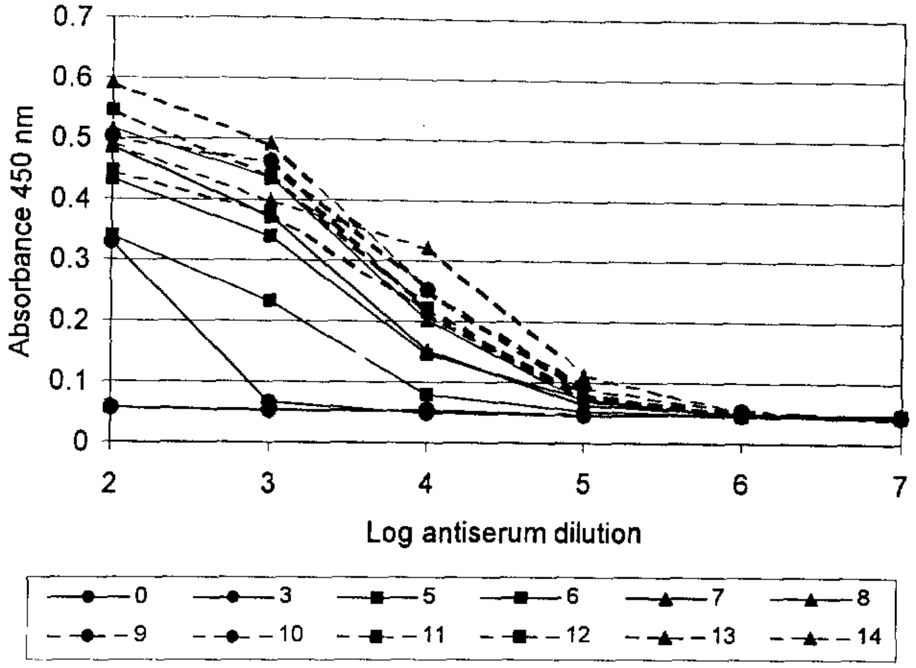
ภาพที่ 52 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 5 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MC-RR 15 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 49 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 6 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 15 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.056	0.053	0.055	0.047	0.048	0.045
3	0.330	0.068	0.049	0.046	0.046	0.045
5	0.340	0.234	0.080	0.055	0.047	0.046
6	0.435	0.339	0.148	0.072	0.046	0.047
7	0.488	0.374	0.155	0.064	0.050	0.047
8	0.516	0.436	0.205	0.071	0.048	0.050
9	0.502	0.464	0.215	0.075	0.048	0.046
10	0.503	0.465	0.254	0.094	0.054	0.045
11	0.448	0.380	0.216	0.077	0.050	0.045
12	0.548	0.440	0.225	0.079	0.049	0.047
13	0.593	0.492	0.255	0.085	0.051	0.047
14	0.492	0.400	0.323	0.113	0.056	0.046

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11



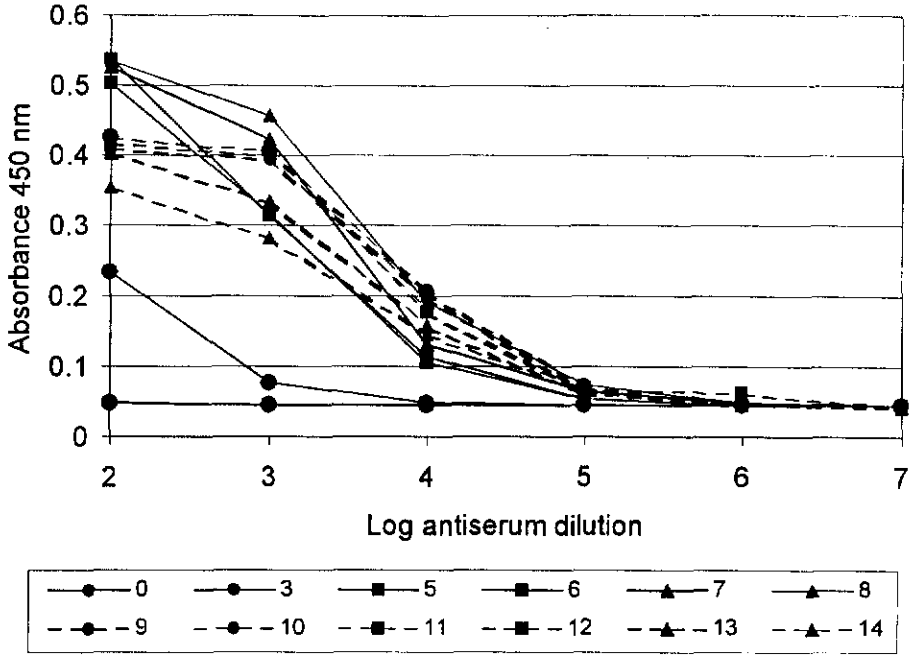
ภาพที่ 53 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 6 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 15 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 50 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 7 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 15 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.048	0.046	0.045	0.046	0.046	0.045
3	0.235	0.078	0.049	0.046	0.045	0.045
5	0.504	0.318	0.106	0.053	0.046	0.047
6	0.536	0.315	0.114	0.055	0.047	0.045
7	0.527	0.422	0.131	0.065	0.048	0.046
8	0.534	0.458	0.192	0.073	0.050	0.045
9	0.409	0.394	0.198	0.067	0.047	0.043
10	0.425	0.405	0.205	0.072	0.046	0.045
11	0.425	0.406	0.176	0.068	0.062	0.044
12	0.416	0.400	0.178	0.064	0.046	0.045
13	0.404	0.334	0.158	0.062	0.046	0.043
14	0.354	0.282	0.147	0.066	0.047	0.043

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11



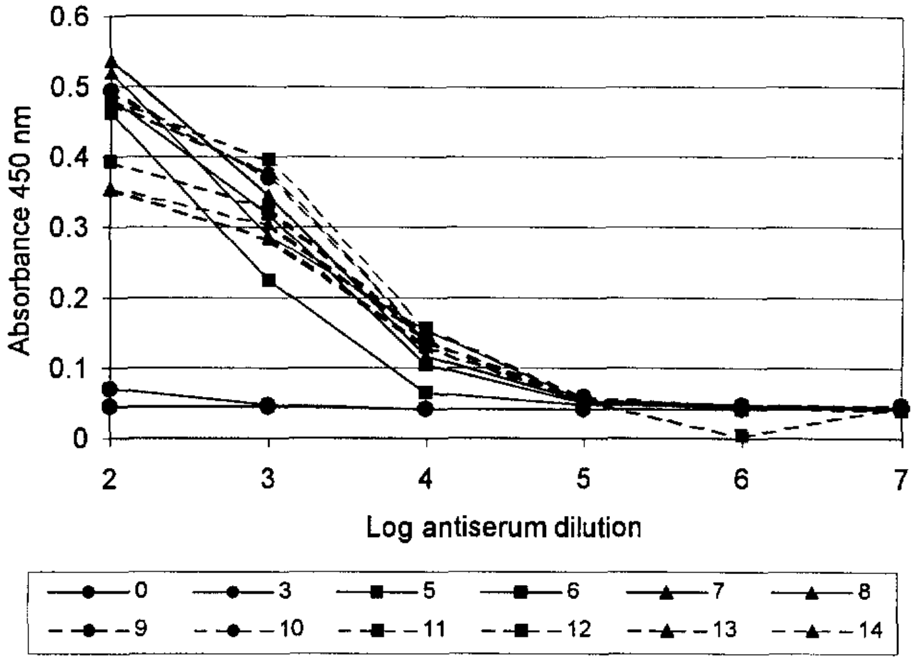
ภาพที่ 54 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 7 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 15 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 51 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 8 หลังจากการ immunization ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.047	0.045	0.044	0.043	0.042	0.043
3	0.071	0.048	0.044	0.044	0.043	0.045
5	0.464	0.225	0.067	0.050	0.045	0.045
6	0.483	0.319	0.105	0.051	0.046	0.046
7	0.536	0.347	0.117	0.053	0.048	0.045
8	0.521	0.289	0.154	0.054	0.043	0.044
9	0.477	0.378	0.139	0.054	0.050	0.050
10	0.495	0.372	0.141	0.060	0.048	0.050
11	0.484	0.398	0.157	0.060	0.047	0.046
12	0.395	0.328	0.142	0.055	0.0046	0.047
13	0.355	0.285	0.132	0.057	0.046	0.043
14	0.357	0.305	0.141	0.060	0.046	0.046

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11



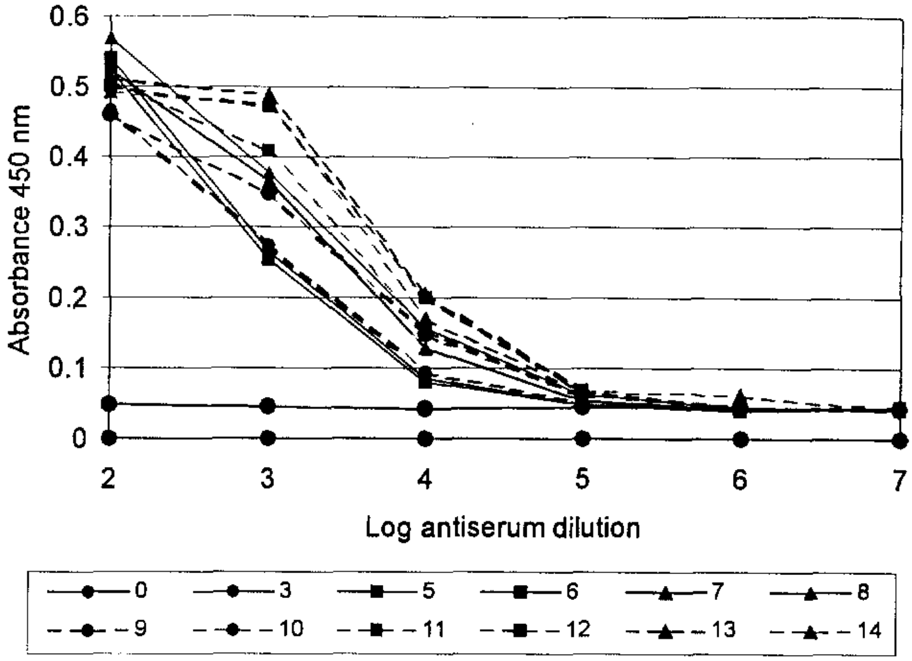
ภาพที่ 55 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 8 ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม BSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 52 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 9 หลังจากการ immunization ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.050	0.046	0.044	0.047	0.046	0.044
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	0.523	0.253	0.081	0.050	0.044	0.043
6	0.539	0.267	0.087	0.049	0.040	0.045
7	0.524	0.365	0.129	0.053	0.043	0.043
8	0.570	0.376	0.156	0.062	0.047	0.044
9	0.467	0.273	0.095	0.053	0.045	0.045
10	0.460	0.350	0.150	0.064	0.045	0.044
11	0.510	0.410	0.155	0.063	0.046	0.046
12	0.501	0.471	0.199	0.070	0.046	0.044
13	0.512	0.488	0.206	0.070	0.046	0.043
14	0.491	0.478	0.172	0.068	0.064	0.044

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11
- ND : ไม่มีข้อมูล



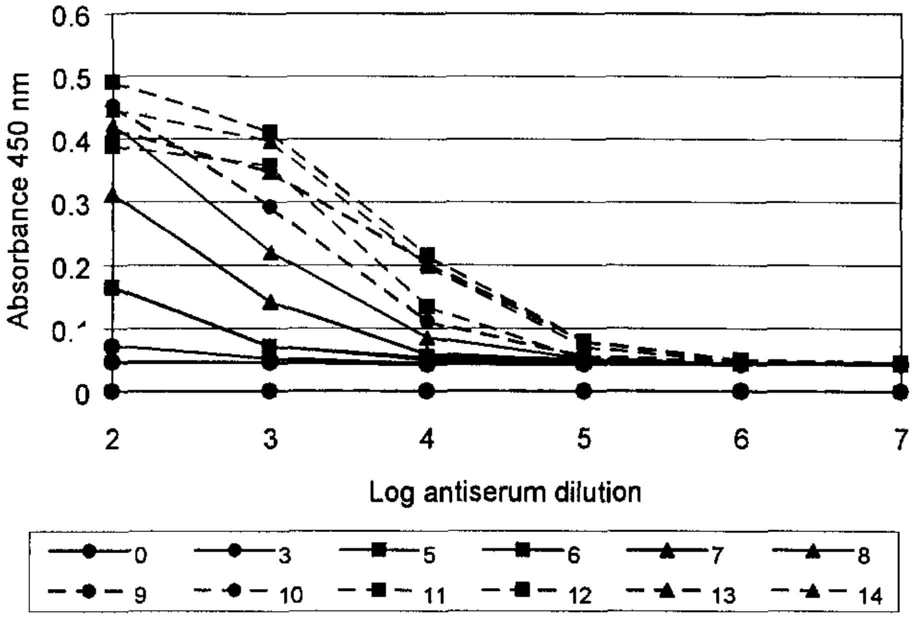
ภาพที่ 56 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 9 ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม BSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 53 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 10 หลังจากการ immunization ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm					
	การเจือจางแอนติบอดี					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	0.047	0.046	0.043	0.044	0.043	0.043
3	0.072	0.052	0.045	0.046	0.044	0.044
5	0.166	0.071	0.050	0.045	0.044	0.043
6	0.164	0.070	0.054	0.045	0.046	0.045
7	0.312	0.142	0.059	0.050	0.044	0.044
8	0.423	0.22	0.085	0.052	0.044	0.046
9	0.452	0.292	0.110	0.055	0.047	0.045
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	0.388	0.357	0.134	0.051	0.045	0.043
12	0.490	0.410	0.215	0.079	0.049	0.045
13	0.414	0.347	0.203	0.078	0.049	0.045
14	0.446	0.396	0.198	0.070	0.047	0.044

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 1%SM เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 11
- ND : ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 57 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 10 ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม BSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

9. การทดสอบหาคุณภาพของแอนติซีรัม – กระต่ายชุดที่ 2

9.1 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี

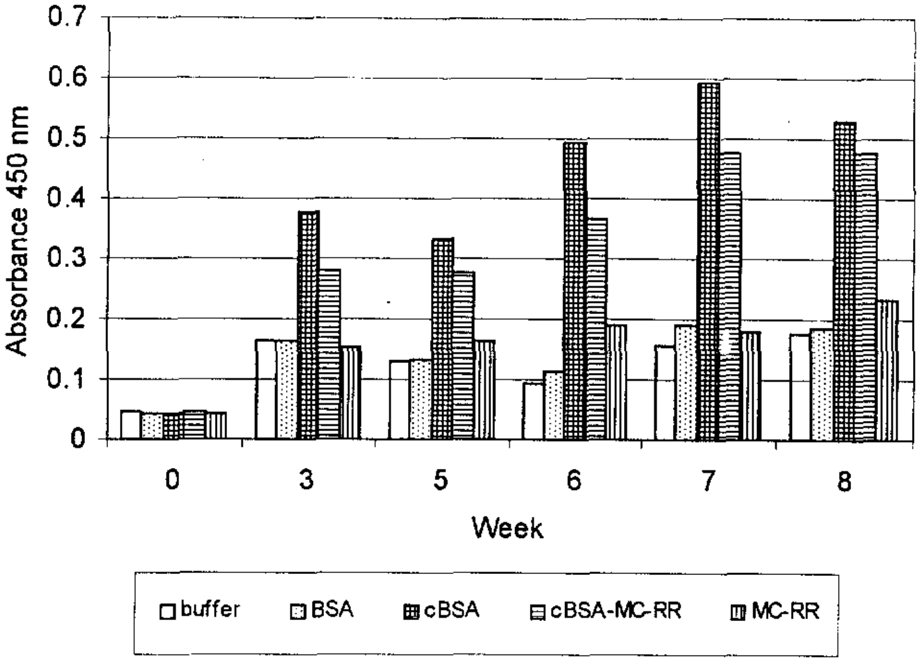
การทดลองนี้ได้แบ่งกระต่ายออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มที่ได้รับอิมมูโนเจน cBSA- MCYST-RR โดยกลุ่มนี้จะมีกระต่าย 3 ตัวคือกระต่ายตัวที่ 1-3 ส่วนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่ได้รับอิมมูโนเจน BSA- MCYST-RR กลุ่มนี้จะมีกระต่าย 3 ตัวคือกระต่ายตัวที่ 4-6 และกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่ได้รับอิมมูโนเจน γ-globulin- MCYST-RR โดยกลุ่มนี้จะมีกระต่าย 2 ตัวคือกระต่ายตัวที่ 7-8 กระต่ายทั้ง 3กลุ่มจะได้รับอิมมูโนเจนที่แตกต่างกันนี้โดยจะใช้อิมมูโนเจน 500 ไมโครกรัม ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) 1 มิลลิลิตร ผสมกับ complete freund's adjuvant 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าบริเวณผิวหนัง (intradermal) ของกระต่าย และฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10 ที่บริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้อิมมูโนเจนในปริมาณและสัดส่วนเดียวกับการฉีดในครั้งแรกแต่ผสมกับ incomplete freund's adjuvant แทน complete freund's adjuvant

จากผลการทดลองในกระต่ายกลุ่มที่ 1 พบว่าแอนติบอดีของกระต่ายทั้ง 3 ตัวสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ BSA, cBSA, cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR (ตารางที่ 54 – 56 และภาพที่ 58 – 60) โดยจะทำปฏิกิริยากับ cBSA ได้ดีที่สุด แต่จากการทดลองนี้คาดว่ากระต่ายที่ให้ผลน่าพอใจที่สุดคือกระต่ายตัวที่ 3 เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับไมโครซิสตินได้ดีที่สุด ส่วนกระต่ายตัวที่ 2 ถึงแม้จะทำปฏิกิริยากับไมโครซิสตินได้ดีเช่นกันแต่พบว่า background ของระบบยังมีค่าสูงกว่ากระต่ายตัวที่ 3

ตารางที่ 54 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 1 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm				
	buffer	BSA	cBSA	cBSA- MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.047	0.044	0.044	0.047	0.045
5	0.163	0.162	0.378	0.279	0.154
6	0.129	0.134	0.332	0.278	0.162
7	0.095	0.115	0.492	0.366	0.189
8	0.158	0.190	0.595	0.476	0.180
9	0.177	0.187	0.529	0.477	0.233

หมายเหตุ - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



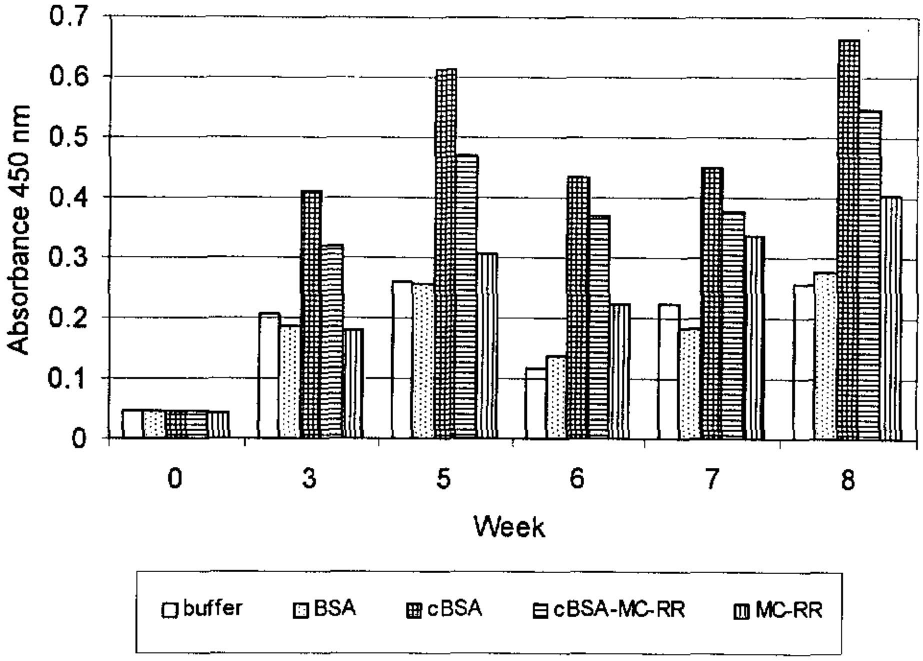
ภาพที่ 58 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 1 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1%gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

ตารางที่ 55 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 2 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm				
	buffer	BSA	cBSA	cBSA- MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.046	0.046	0.047	0.047	0.045
5	0.208	0.187	0.411	0.320	0.180
6	0.261	0.256	0.613	0.470	0.308
7	0.118	0.137	0.435	0.369	0.224
8	0.222	0.182	0.450	0.378	0.337
9	0.257	0.278	0.663	0.548	0.404

<u>หมายเหตุ</u> - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



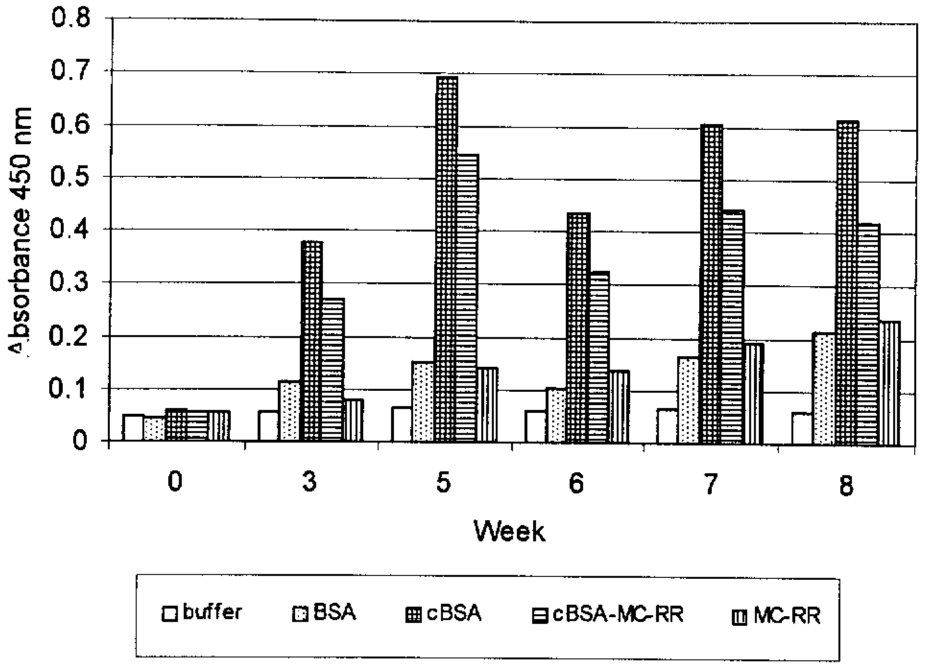
ภาพที่ 59 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 2 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1%gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

ตารางที่ 56 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm				
	buffer	BSA	cBSA	cBSA- MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.049	0.046	0.062	0.057	0.058
5	0.058	0.114	0.378	0.269	0.080
6	0.063	0.153	0.695	0.543	0.142
7	0.061	0.103	0.434	0.323	0.137
8	0.066	0.163	0.604	0.442	0.192
9	0.062	0.213	0.612	0.418	0.236

<u>หมายเหตุ</u> - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ cBSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



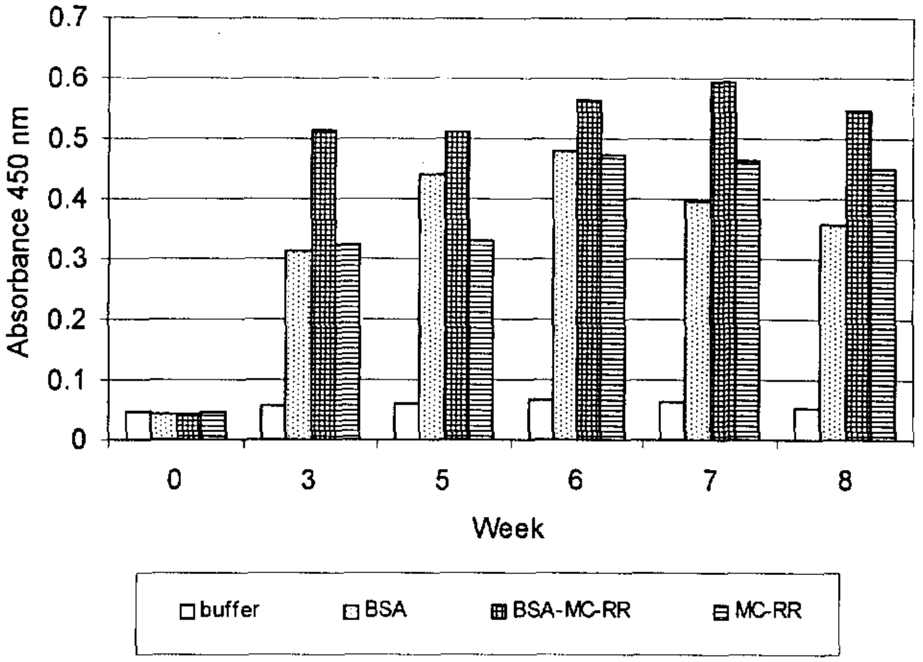
ภาพที่ 60 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, cBSA, cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1%gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

จากผลการทดลองในกระต่ายกลุ่มที่ 2 คือกระต่ายที่ได้รับอิมมูโนเจน BSA- MCYST-RR พบว่าแอนติซีรัมของกระต่ายทุกตัวสามารถทำปฏิกิริยากับ BSA, BSA- MCYST-RR และ MCYST-RR ได้ (ตารางที่ 57 – 59 และภาพที่ 61 – 63) แต่กระต่ายทุกตัวในกลุ่มนี้สามารถทำปฏิกิริยากับไมโครซิสตินได้สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยเฉพาะกระต่ายตัวที่ 4 ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไมโครซิสตินได้สูงที่สุด และเป็นที่น่าสังเกตว่าในระยะแรก คือ สัปดาห์ที่5 และ 6 นั้นแอนติซีรัมของกระต่ายตัวนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับ BSA แต่เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 8 และ 9 พบว่าการทำปฏิกิริยากับ BSA เริ่มลดลง ในขณะที่สามารถทำปฏิกิริยากับไมโครซิสตินได้สูงขึ้นและยังสูงกว่า BSA แต่ข้อมูลเหล่านี้ยังไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้แน่ชัดเพราะยังต้องศึกษาต่อไปอีกเพื่อดูว่าหลังจากการฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 10 กระต่ายยังคงสามารถสร้างแอนติบอดีต่อสารพิษไมโครซิสตินได้เพิ่มกว่านี้หรือไม่หรืออาจจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อ BSA เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 57 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm			
	buffer	BSA	BSA- MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.046	0.045	0.045	0.046
5	0.057	0.315	0.512	0.325
6	0.059	0.440	0.510	0.331
7	0.066	0.479	0.564	0.472
8	0.062	0.397	0.595	0.463
9	0.053	0.357	0.546	0.450

หมายเหตุ - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ BSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



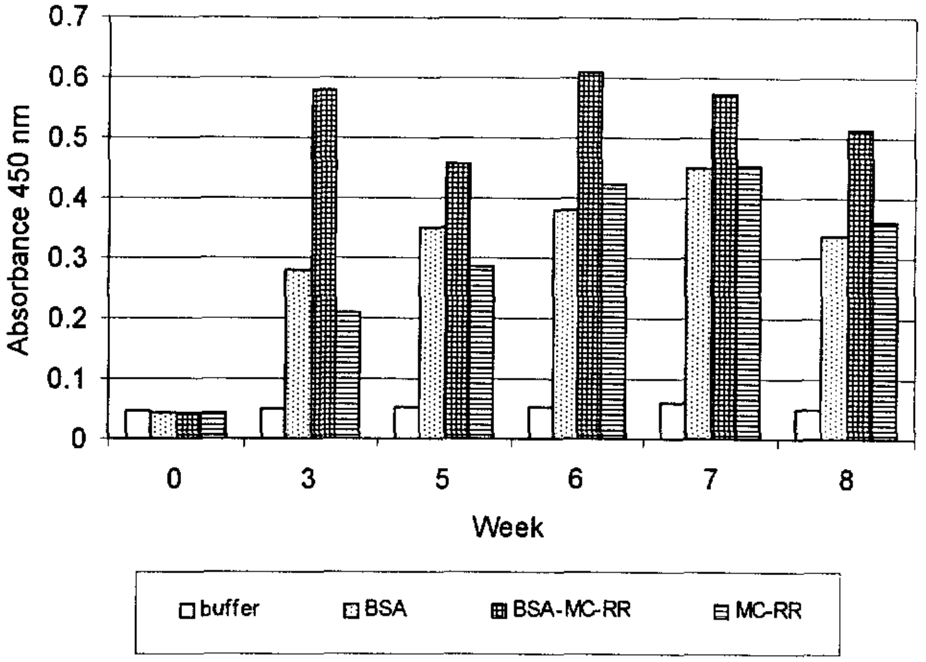
ภาพที่ 61 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, BSA- MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1%gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

ตารางที่ 58 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 5 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm			
	buffer	BSA	BSA- MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.046	0.044	0.045	0.045
5	0.051	0.280	0.579	0.210
6	0.053	0.351	0.456	0.286
7	0.055	0.380	0.610	0.422
8	0.060	0.450	0.572	0.452
9	0.050	0.337	0.514	0.359

<u>หมายเหตุ</u> - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ BSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

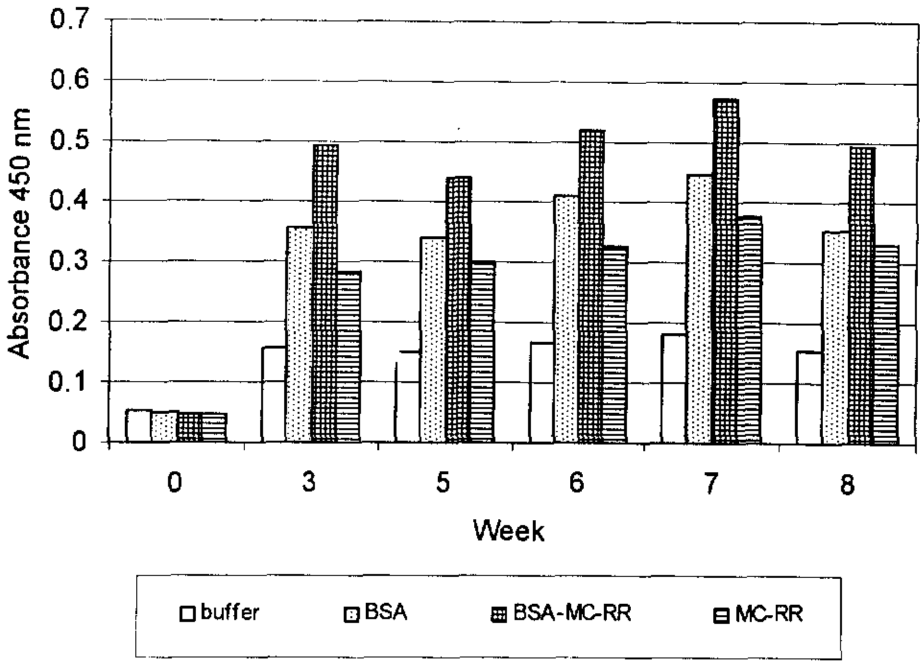


ภาพที่ 62 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 5 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, BSA- MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1% gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

ตารางที่ 59 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 6 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm			
	buffer	BSA	BSA- MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.054	0.050	0.046	0.046
5	0.156	0.357	0.495	0.282
6	0.151	0.340	0.439	0.300
7	0.166	0.410	0.521	0.328
8	0.180	0.447	0.575	0.376
9	0.152	0.354	0.493	0.329

<u>หมายเหตุ</u> - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 10 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ BSA
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 63 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 6 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, BSA, BSA- MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1% gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

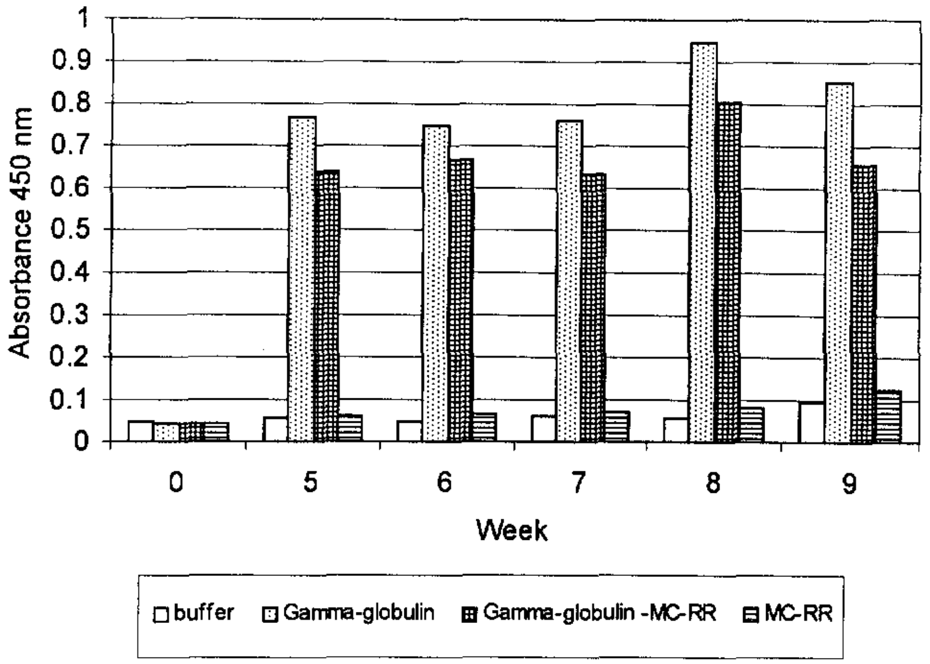
จากผลการทดลองในกระต่ายกลุ่มที่ 3 ได้แก่กระต่ายตัวที่ 7 และ 8 ซึ่งได้รับอิมมูโนเจนคือ γ-globulin- MCYST-RR พบว่ากระต่ายในกลุ่มนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ γ-globulin, γ-globulin-MCYST-RR และ MCYST-RR (ตารางที่ 60 – 61 และภาพที่ 64 – 65) โดยแอนติซีรัมของกระต่ายทั้ง 2 ตัวจะทำปฏิกิริยากับ γ-globulin และ γ-globulin- MCYST-RR ได้สูงกว่าการทำปฏิกิริยากับ MCYST-RR มาก การที่กระต่ายในกลุ่มนี้สร้างแอนติซีรัมต่อ MCYST-RR ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นั้นอาจเป็นผลมาจากการที่ γ-globulin เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มากทำให้เกิดการตอบสนองต่อโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่เกิดขึ้นได้ดีและเร็วกว่า หรืออาจเป็นผลมาจากอัตราการเชื่อมกันระหว่า γ-globulin กับ MCYST-RR ไม่เหมาะสม ทำให้ปริมาณ MCYST-RR ไม่เด่นพอที่จะแสดงลักษณะโครงสร้างของตัวมันเองได้

ตารางที่ 60 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 7 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm			
	buffer	γ-globulin	γ-globulin - MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.047	0.043	0.042	0.042
5	0.055	0.768	0.639	0.062
6	0.050	0.748	0.669	0.065
7	0.060	0.763	0.633	0.072
8	0.056	0.949	0.807	0.080
9	0.096	0.854	0.659	0.126

<u>หมายเหตุ</u> - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 0.5 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ γ-globulin 2 มิลลิกรัม
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



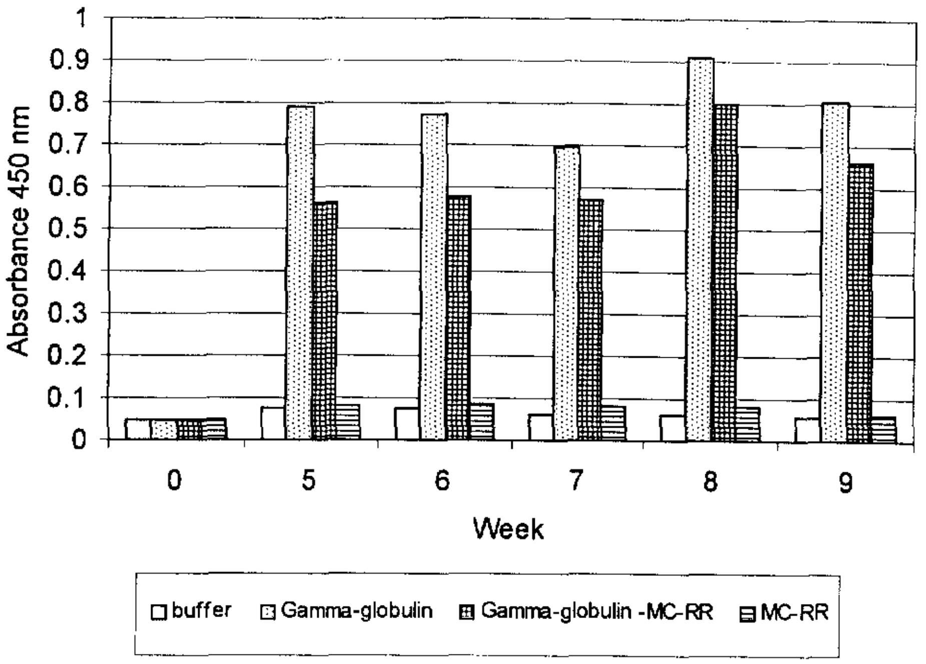
ภาพที่ 64 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 7 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, γ-globulin, γ-globulin - MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1%gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

ตารางที่ 61 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อใช้แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 8 ซึ่งเจือจางแอนติซีรัมที่ความเข้มข้น 1:1,000

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm			
	buffer	γ-globulin	γ-globulin - MCYST-RR	MCYST-RR
0	0.049	0.049	0.047	0.049
5	0.078	0.791	0.560	0.083
6	0.076	0.772	0.576	0.087
7	0.062	0.694	0.571	0.079
8	0.060	0.909	0.800	0.081
9	0.055	0.806	0.660	0.061

<u>หมายเหตุ</u> - เอนไซม์ที่ใช้คือ HRP 1: 10,000, substrate ที่ใช้คือ OPD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

- แอนติเจนที่ใช้คือ MCYST-RR ที่ได้จากการคำนวณ toxin content ได้ 0.5 มิลลิกรัมแล้วเชื่อมกับ γ-globulin 2 มิลลิกรัม
- บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- สัปดาห์ที่ 0 คือ normal serum ที่ได้เจือจางเป็น 1:1,000
- จากการทดลองนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 65 แสดงการเปลี่ยนแปลงผลของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 ในแต่ละสัปดาห์ที่ได้เจือจาง 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับ buffer, γ-globulin, γ-globulin - MCYST-RR และ MCYST-RR เมื่อใช้เอนไซม์ HRP และ OPD เป็น substrate ในการเกิดปฏิกิริยา ใช้ 0.1%gelatin เป็น blocking วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง 2 ชุด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1 คือกระต่ายที่ได้รับ cBSA- MCYST-RR และกลุ่มที่ 2 คือกระต่ายที่ได้รับ BSA- MCYST-RR โดยเลือกตัวแทนของกระต่ายในแต่ละกลุ่มจากกระต่ายแต่ละชุดดังนี้ กลุ่มที่ 1 ชุดที่ 1 เลือกกระต่ายตัวที่ 4 ส่วนชุดที่ 2 เลือกกระต่ายตัวที่ 3 และ กลุ่มที่ 2 ชุดที่ 1 เลือกกระต่ายตัวที่ 9 ส่วนชุดที่ 2 เลือกกระต่ายตัวที่ 4

การเปรียบเทียบผลการทดลองของกระต่ายกลุ่มที่ 1 โดยตารางที่ 62 และภาพที่ 66 เป็นผลการทดลองของกระต่ายชุดที่ 1 สำหรับตารางที่ 63 และภาพที่ 67 เป็นผลการทดลองของกระต่ายชุดที่ 2 ถึงแม้การทดลองทั้ง 2 ชุดจะไม่สามารถเปรียบเทียบผลของตัวเลขที่แสดงค่าการดูดกลืนแสง ได้เนื่องจากใช้แอนติเจนความเข้มข้นไม่เท่ากัน โดยชุดที่ 1 ใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชุดที่ 2 ใช้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สามารถดูแนวโน้มของการทดลองได้คือ ผลการทดลองในชุดที่ 1 พบว่าแอนติซีรัมทำปฏิกิริยาได้กับ cBSA, cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ BSA แอนติซีรัมของกระต่ายตัวที่ 4 ในชุดที่ 1 นี้พบว่าสามารถสร้างแอนติซีรัมที่ทำปฏิกิริยากับ micocystin-RR ได้สูงเกือบเท่ากับความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ cBSA ซึ่งผลการทดลองชุดนี้น่าพอใจกว่าการทดลองในชุดที่ 2 ที่แอนติซีรัมของกระต่ายเกิดปฏิกิริยาได้กับ BSA, cBSA, cBSA- MCYST-RR และ MCYST-RR แต่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ MCYST-RR ได้ต่ำกว่า cBSA มาก การที่ผลการทดลองให้ค่าที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพในการเชื่อมสารแต่ละครั้งมีไม่เท่ากัน ทำให้ MCYST-RR เข้าไปจับได้แตกต่างกัน หรืออาจเนื่องมาจากความสามารถของกระต่ายที่สามารถจดจำโครงสร้างต่างๆ ได้แตกต่างกัน

สำหรับการทดลองกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่ได้รับ BSA- MCYST-RR เลือกกระต่ายตัวที่ 9 จากชุดที่ 1 ดังตารางที่ 64 และภาพที่ 68 สำหรับชุดที่ 2 เลือกกระต่ายตัวที่ 4 ดังตารางที่ 65 และภาพที่ 69 พบว่ากระต่ายทั้ง 2 กลุ่มสามารถทำปฏิกิริยากับ BSA, BSA- MCYST-RR และ MCYST-RR ได้ แต่การทดลองทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถเปรียบเทียบผลโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสง เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนในการเคลือบ microwell แตกต่างกัน คือชุดที่ 1 ใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชุดที่ 2 ใช้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อดูแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาต่อสารต่างๆ พบว่ากระต่ายชุดที่ 2 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 ขึ้นไปแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับ MCYST-RR ได้สูงกว่า BSA แต่กระต่ายชุดที่ 1 นั้นแอนตีซีรัมต่อ MCYST-RR ยังมีค่าเท่ากับความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ BSA

<u>9.2 การทดสอบค่าไตเตอร์</u>

จากผลการทดลองนี้พบว่ากระต่ายกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้รับอิมมูโนเจนคือ MCYST-RR ที่เชื่อมกับ cBSA มีค่าไตเตอร์ 10,000-100,000 โดยเฉพาะกระต่ายตัวที่ 2 และ 3 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 100,000 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 ขึ้นไป ดังตารางที่ 66 และภาพที่ 70 ในขณะที่กระต่ายตัวที่ 1 มีค่าไตเตอร์เพียง 10,000 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 ขึ้นไป ตารางที่ 67 และดังภาพที่ 71

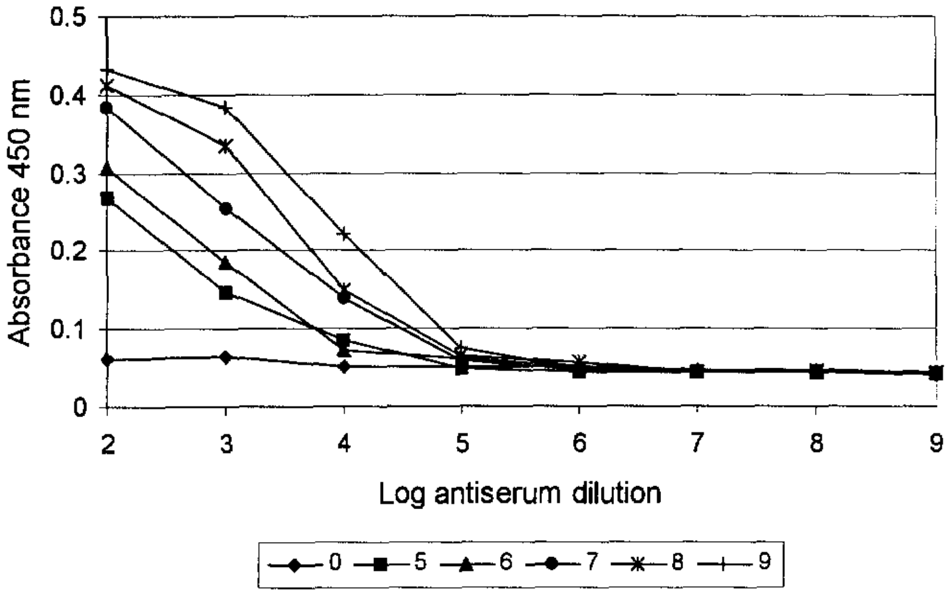
สำหรับกระต่ายกลุ่มที่ 2 ได้รับอิมมูโนเจนคือ MCYST-RR ที่เชื่อมกับ BSA พบว่ากระต่ายทุกตัวในกลุ่มนี้มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 100,000 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ดังตารางที่ 68 และภาพที่ 72

ส่วนกระต่ายกลุ่มที่ 3 ได้รับอิมมูโนเจนคือ MCYST-RR ที่เชื่อมกับ γ-globulin พบว่ากระต่ายทุกตัวในกลุ่มนี้มีค่าไตเตอร์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ คือเท่ากับ 1,000 แม้จะมีการฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 ค่าไตเตอร์ของกระต่ายกลุ่มนี้ก็ไม่เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 69 และภาพที่ 73

ตารางที่ 62 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 1 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.061	0.065	0.051	0.052	0.051	0.045	0.045	0.043
5	0.269	0.148	0.085	0.049	0.045	0.045	0.045	0.042
6	0.306	0.185	0.073	0.061	0.052	0.047	0.045	0.043
7	0.383	0.256	0.140	0.058	0.046	0.045	0.046	0.043
8	0.413	0.334	0.150	0.065	0.056	0.044	0.046	0.043
9	0.434	0.383	0.221	0.074	0.048	0.046	0.047	0.042

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate
- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10

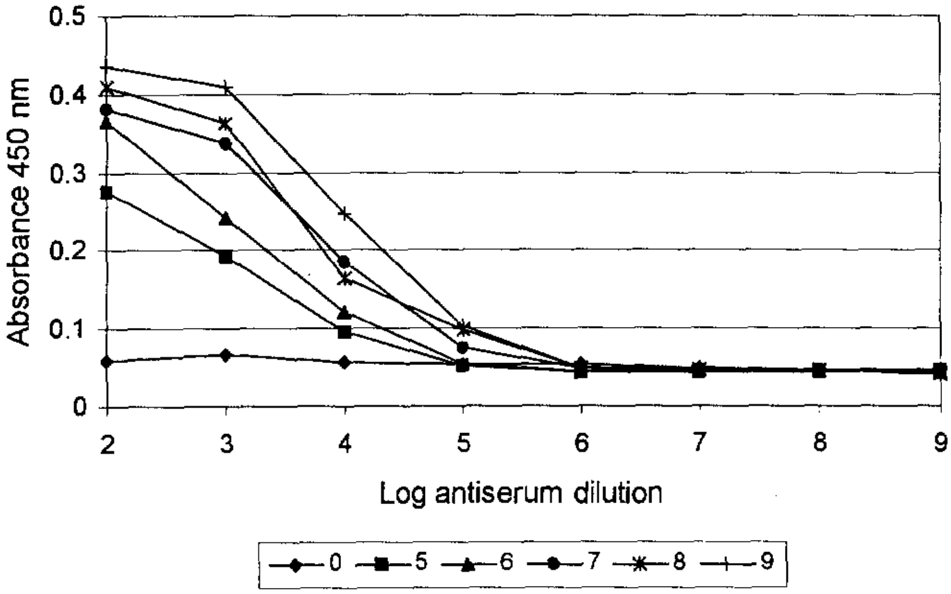


ภาพที่ 66 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 1 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 63 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 2 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.059	0.068	0.056	0.053	0.055	0.049	0.046	0.047
5	0.277	0.194	0.095	0.051	0.045	0.044	0.045	0.047
6	0.366	0.242	0.122	0.055	0.045	0.049	0.047	0.044
7	0.382	0.338	0.185	0.074	0.048	0.046	0.046	0.047
8	0.410	0.364	0.166	0.099	0.049	0.046	0.046	0.042
9	0.435	0.410	0.247	0.102	0.050	0.045	0.046	0.046

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate
- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10

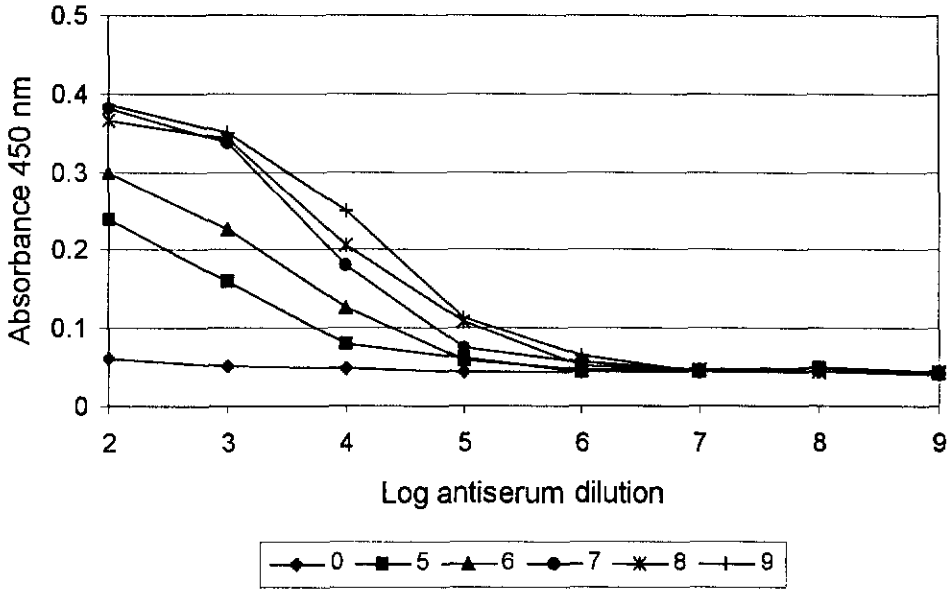


ภาพที่ 67 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 2 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 64 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 3 หลังจากการ immunization ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ cBSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.061	0.051	0.050	0.045	0.044	0.044	0.045	0.043
5	0.239	0.159	0.080	0.063	0.044	0.045	0.048	0.041
6	0.300	0.228	0.127	0.060	0.047	0.046	0.048	0.045
7	0.381	0.338	0.181	0.075	0.057	0.046	0.050	0.043
8	0.366	0.344	0.207	0.107	0.051	0.046	0.045	0.045
9	0.386	0.350	0.249	0.113	0.064	0.045	0.045	0.042

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate
- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10



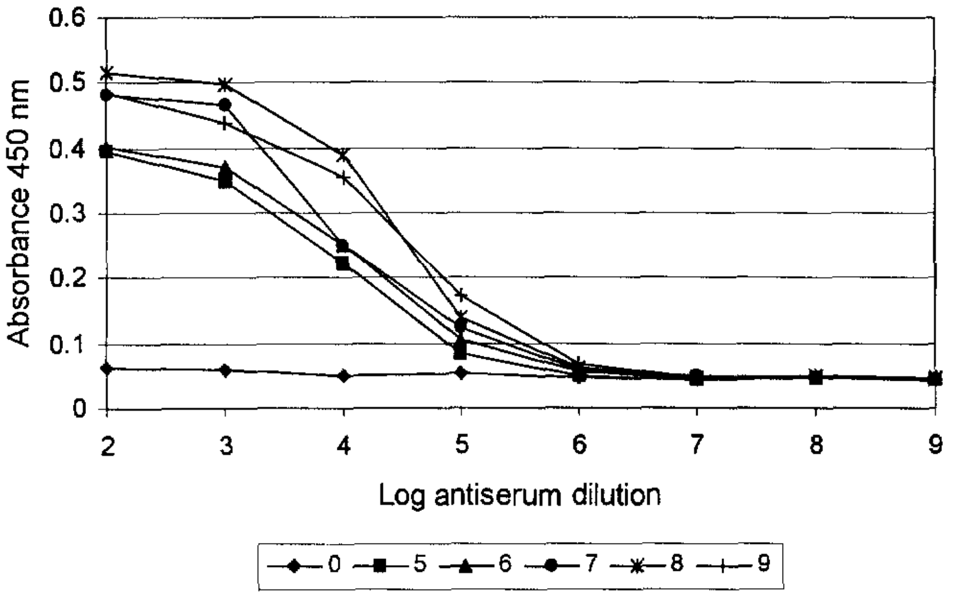
ภาพที่ 68 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 3 ด้วย cBSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม cBSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 65 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 4 หลังจากการ immunization ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.062	0.060	0.051	0.053	0.046	0.044	0.045	0.044
5	0.397	0.348	0.222	0.083	0.049	0.044	0.045	0.042
6	0.402	0.372	0.250	0.104	0.055	0.046	0.046	0.046
7	0.481	0.466	0.252	0.125	0.060	0.048	0.046	0.043
8	0.517	0.498	0.389	0.140	0.062	0.047	0.048	0.046
9	0.486	0.438	0.356	0.173	0.067	0.046	0.045	0.042

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10



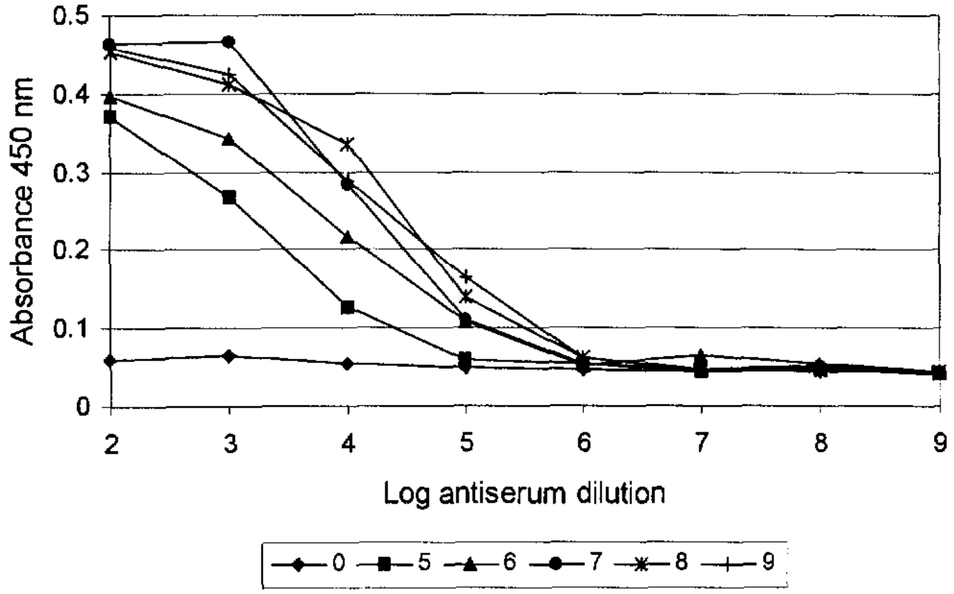
ภาพที่ 69 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 4 ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม BSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 66 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 5 หลังจากการ immunization ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.060	0.065	0.054	0.050	0.046	0.045	0.048	0.042
5	0.370	0.267	0.126	0.058	0.054	0.045	0.046	0.042
6	0.398	0.343	0.217	0.108	0.052	0.064	0.054	0.045
7	0.465	0.467	0.284	0.111	0.053	0.046	0.051	0.042
8	0.454	0.413	0.334	0.138	0.062	0.046	0.047	0.045
9	0.460	0.425	0.288	0.166	0.063	0.046	0.045	0.043

<u>หมายเหตุ</u> - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10

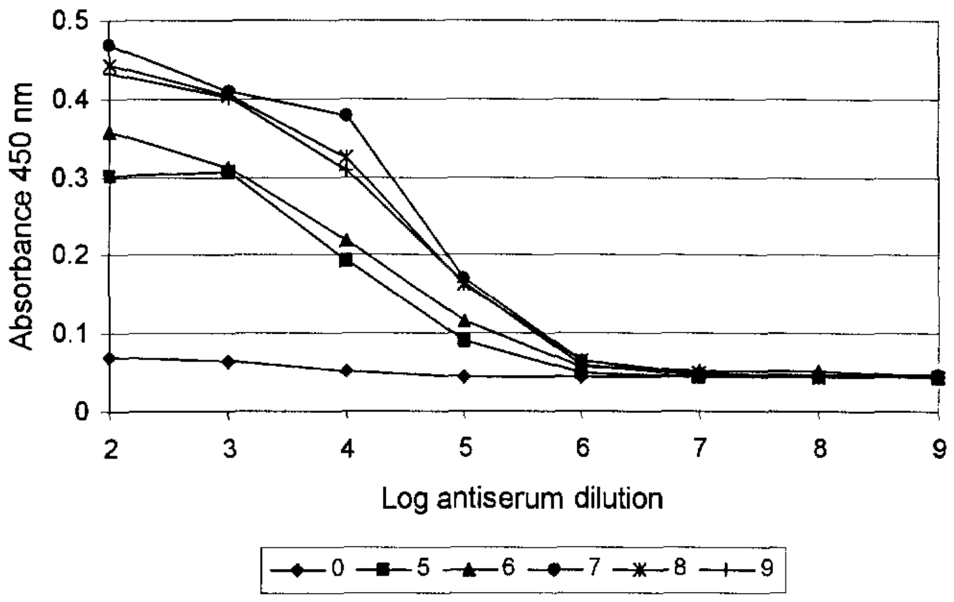


ภาพที่ 70 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 5 ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม BSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 67 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 6 หลังจากการ immunization ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.070	0.065	0.052	0.044	0.044	0.043	0.045	0.044
5	0.301	0.306	0.193	0.091	0.048	0.044	0.045	0.044
6	0.359	0.313	0.219	0.115	0.057	0.051	0.051	0.045
7	0.469	0.411	0.380	0.169	0.064	0.047	0.046	0.046
8	0.444	0.405	0.325	0.162	0.064	0.048	0.045	0.045
9	0.433	0.403	0.309	0.165	0.059	0.046	0.044	0.044

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate
- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10

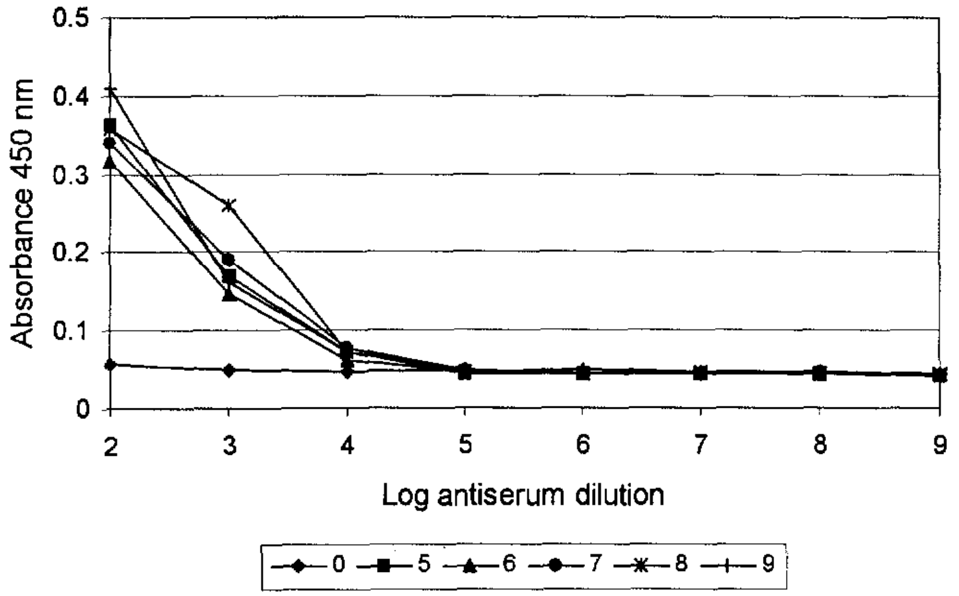


ภาพที่ 71 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 6 ด้วย BSA- MCYST-RR (เมื่อเชื่อม BSA กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 68 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 7 หลังจากการ immunization ด้วย γ-globulin- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ γ-globulin) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.056	0.049	0.047	0.048	0.045	0.045	0.044	0.045
5	0.364	0.171	0.072	0.045	0.044	0.044	0.045	0.041
6	0.317	0.147	0.062	0.046	0.049	0.046	0.045	0.044
7	0.341	0.191	0.078	0.049	0.045	0.045	0.046	0.042
8	0.359	0.260	0.073	0.047	0.044	0.046	0.044	0.045
9	0.410	0.163	0.073	0.050	0.045	0.046	0.046	0.044

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate
- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10



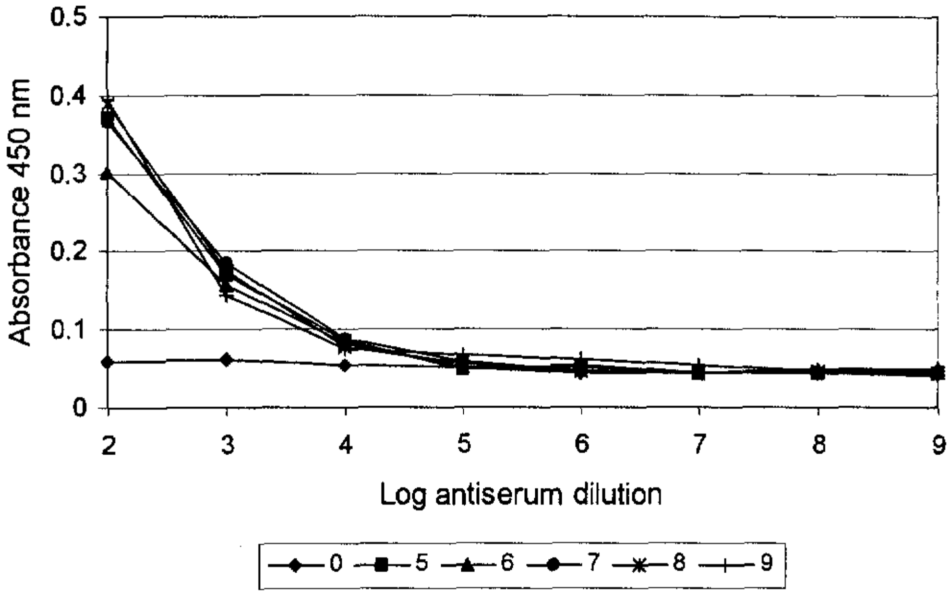
ภาพที่ 72 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 7 ด้วย γ-globulin - MCYST-RR (เมื่อเชื่อม γ-globulin กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

ตารางที่ 69 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ 8 หลังจากการ immunization ด้วย γ-globulin- MCYST-RR (เมื่อใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ γ-globulin) โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

สัปดาห์ที่	Absorbance 450 nm							
	การเจือจางแอนติบอดี							
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
0	0.060	0.061	0.053	0.051	0.045	0.045	0.045	0.042
5	0.370	0.170	0.085	0.050	0.054	0.043	0.045	0.043
6	0.301	0.156	0.083	0.052	0.051	0.045	0.048	0.048
7	0.365	0.186	0.087	0.059	0.047	0.045	0.045	0.044
8	0.390	0.174	0.077	0.057	0.047	0.045	0.046	0.045
9	0.394	0.144	0.074	0.067	0.061	0.053	0.047	0.047

หมายเหตุ - PLL- MCYST-RR เจือจาง 1:1,000, 0.1%gelatin เป็น blocking, Goat-anti rabbit IgG-HRP เจือจาง 1:10,000 และ OPD เป็น substrate

- ฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และ 10



ภาพที่ 73 แสดงไตเตอร์ต่อสารพิษ MCYST-RR ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อ immunization กระต่ายตัวที่ 8 ด้วย γ-globulin - MCYST-RR (เมื่อเชื่อม γ-globulin กับ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม) แล้วทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ PLL- MCYST-RR เป็นตัวเคลือบ microwell

โดยสรุปจากการเปรียบเทียบผลการทดสอบค่าไตเตอร์จากกระต่าย 2 ชุด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1 คือกระต่ายที่ได้รับ cBSA- MCYST-RR และกลุ่มที่ 2 คือกระต่ายที่ได้รับ BSA- MCYST-RR พบว่ากระต่ายทั้ง 2 ชุดให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันดังนี้

กระต่ายกลุ่มที่ 1 คือกลุ่มที่ได้รับอิมมูโนเจน cBSA- MCYST-RR โดยใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมเชื่อมกับ cBSA จากผลการทดลองได้ทำการเลือกกระต่ายตัวที่น่าสนใจที่สุดจากการทดลองแต่ละชุดคือ กระต่ายชุดที่ 1 เลือกกระต่ายตัวที่ 4 ซึ่งพบว่ามีค่าไตเตอร์เท่ากับ 10,000 ในสัปดาห์ที่ 6 และค่าไตเตอร์จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 100,000 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 ขึ้นไป ซึ่งค่าไตเตอร์ที่สูงขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากการฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 แต่หลังจากที่มีการฉีดกระตุ้นซ้ำอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 11 พบว่าค่าไตเตอร์ยังคงเท่าเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลงแม้ผ่านไปถึง 4 สัปดาห์

สำหรับกระต่ายชุดที่ 2 ตัวที่น่าสนใจที่สุดคือกระต่ายตัวที่ 2 ซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1,000 ในสัปดาห์ที่ 5 และมีค่าไตเตอร์สูงขึ้นเป็น 10,000 ในสัปดาห์ที่ 6-7 หลังจากนั้นค่าไตเตอร์มีค่าสูงขึ้นอีกถึง 100,000 ในสัปดาห์ที่ 8-9 การที่ค่าไตเตอร์มีค่าสูงขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากการฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และคาดว่าการฉีดกระตุ้นซ้ำอีกครั้งในสัปดาหี่ 10 อาจจะทำให้ค่าไตเตอร์มีการเปลี่ยนแปลงที่ดีขึ้นกว่านี้

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองในกระต่ายทั้ง 2 กลุ่มนี้พบว่ายังไม่มีความแตกต่างของการทดลอง แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนในช่วงนี้เพราะกระต่ายชุดที่ 2 ได้ทดลองไปเพียง 9 สัปดาห์ ซึ่งควรจะดูผลกันต่อไปอีกสักระยะ

กระต่ายกลุ่มที่ 2 คือกระต่ายที่ได้รับอิมมูโนเจน BSA- MCYST-RR โดยใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัมในการเชื่อมกับ BSA จากการทดลองในชุดที่ 1 ได้เลือกกระต่ายตัวที่ 9 ซึ่งมีผลไตเตอร์ที่เด่นชัดกว่าตัวอื่นๆ พบว่ามีค่าไตเตอร์ต่อสารพิษไมโครซิสตินเท่ากับ 1,000 ในสัปดาห์ที่ 5-6 และค่าไตเตอร์จะสูงขึ้นเป็น 100,000 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 ขึ้นไป และแม้จะมีการฉีดกระตุ้นซ้ำในสัปดาห์ที่ 11 ค่าไตเตอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

สำหรับกระต่ายชุดที่ 2 จากกลุ่มนี้ ได้เลือกกระต่ายตัวที่ 4 ซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 10,000 ในสัปดาห์ที่5 และค่าไตเตอร์สูงขึ้นเป็น 100,000 ในสัปดาห์ที่ 6-9

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจากกระต่ายทั้ง 2 ชุด พบว่ากระต่ายชุดที่ 2 มีการเปลี่ยนแปลงที่ดีกว่าชุดที่ 1 คือมีค่าไตเตอร์ต่อสารพิษไมโครซิสตินที่สูงกว่าชุดแรกถึง 10 เท่าแม้จะทำการทดลองเพียง 9 สัปดาห์ แต่เมื่อฉีดกระตุ้นซ้ำอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 10 คาดว่าค่าไตเตอร์ของกระต่ายชุดที่ 2 น่าจะมีค่าเพิ่มขึ้นอีก

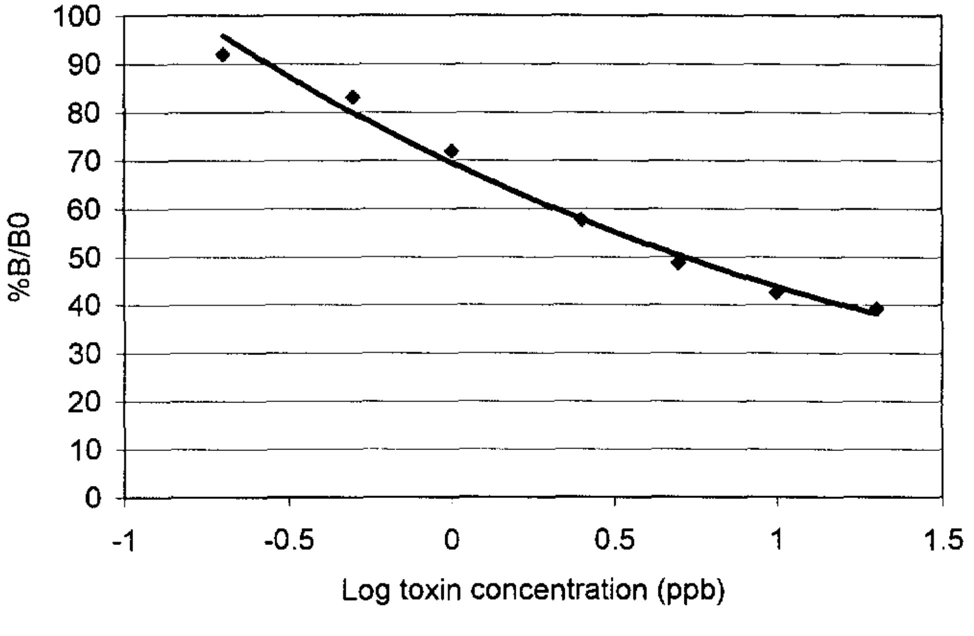
สำหรับการทดลองในกระต่ายกลุ่มที่ 3 เป็นการเลือก protein carrier ชนิดใหม่ในการเชื่อมกับ MCYST-RR เพื่อศึกษาผลของ protein carrier ว่าจะมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อสารพิษไมโครซิสตินได้ดีกว่าเดิมหรือไม่ โดยการทดลองนี้ใช้ MCYST-RR 0.5 มิลลิกรัมเชื่อมกับ gamma-globulin 2 มิลลิกรัม (Yu et. al., 2002) โดยใช้ carbodiimide เป็นตัวเชื่อม จากการทดลองนี้พบว่ากระต่ายชุดที่ 2 ตัวที่ 8 มีค่าไตเตอร์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ คือมีค่าไตเตอร์เพียง 1,000 ซึ่งอาจจะ

เป็นผลมาจากโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่มากของ gamma-globulin ทำให้แอนติบอดีเกิดการจดจำโครงสร้างนี้ได้มากกว่าโครงสร้างของสารพิษไมโครซิสตินซึ่งมีขนาดเล็กกว่า ดังภาพที่

10. กราฟมาตรฐานและการคำนวณความเข้มข้นของสารพิษไมโครซิสติน

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % of binding (%B/B_0) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน MCYST-RR ในระบบ log โดย % of binding (%B/B_0) คำนวณได้จาก (B/B_0)x100 เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่าง หรือจากสารละลายมาตรฐาน และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จาก blank ใน PBS ดังนั้น ถ้าตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นของสารพิษไมโครซิสตินก็สามารถคำนวณได้โดยตรงจากกราฟมาตรฐาน

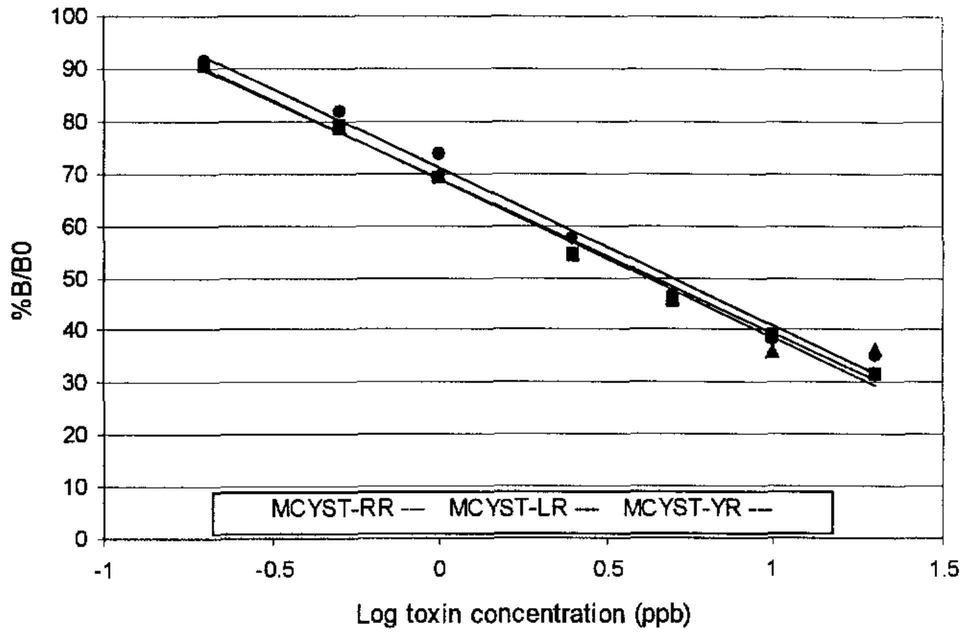
จากกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 74 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % of binding (%B/B_0) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน MCYST-RR ในระบบ log นั้น พบว่าจากการทดลองนี้ความเข้มข้นที่แสดงความสามารถในการแข่งขันระหว่างสารละลาย MCYST-RR กับ Ab-HRP แล้วแสดงความแตกต่างของผลการทดลองได้ชัดเจนเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader คือ 0.2-20 ppb เมื่อนำผลการทดลองมาเขียนกราฟแล้วได้ค่า correlation (R^2 = 0.9815) และพบว่าความเข้มข้น 0.5 ppb ขึ้นไปสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีแต่ละความเข้มข้นได้ด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 74 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาสารพิษ MCYST-RR โดยเจือจางสารพิษมาตรฐานในสารละลาย PBS (150 mM phosphate buffer saline) pH 7.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 0.2-20 ppb ซึ่งทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA จากการทดลองนี้ได้ทำการทดลองทั้งหมด 20 ครั้ง (n=20) โดยแต่ละครั้งทำการทดลอง 2 ซ้ำ

11. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ของแอนติบอดีต่อสารพิษมาตรฐานชนิดอื่น

สารพิษมาตรฐานที่นำมาใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารพิษ MCYST-RR คือสารพิษ MCYST-YR และ MCYST-LR จากภาพที่ 75 พบว่า MCYST-RR ได้ค่า correlation (R^2=0.9911) และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=66.005e^{-0.5355x}$ ส่วน MCYST-YR ได้ค่า correlation (R^2=0.9792) และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=68.292e^{-0.5186x}$ สำหรับ MCYST-LR ได้ค่า correlation (R^2=0.9771) และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=66.115e^{-0.5072x}$ จากข้อมูลที่ได้จากกราฟนี้สามารถสรุปเป็นตารางเพื่อแสดงผลการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ของแอนติบอดีต่อสารพิษมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ดังตารางที่ 70 ซึ่งพบว่า แอนติบอดีที่ได้นี้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับสารพิษ MCYST-YR ได้ 86.26% และ 94.15% สำหรับสารพิษ MCYST-LR



ภาพที่ 75 กราฟแสดงการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ระหว่าง anti-MC antibody (Ab-HRP) กับสารพิษไมโครซิสตินชนิดต่างๆ (MCYST-RR, MCYST-YR, MCYST-LR) ด้วยวิธี direct competitive ELISA เมื่อได้ทำการทดลองเป็นจำนวน 20 ครั้ง และแต่ละครั้งทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 70 แสดงผลการทำปฏิกิริยาข้ามระหว่างสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR กับสารพิษมาตรฐาน MCYST-YR และ MCYST-LR

สารพิษมาตรฐาน	น้ำหนักโมเลกุล	50%B/B_0 (nM)	cross-reactivity relation to MCYST-RR (%)
MCYST-RR	1038	0.52	100
MCYST-YR	1045	0.60	86.26
MCYST-LR	995	0.55	94.15

12. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ

จากการทดลองพบว่าจะเกิดการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับ cBSA (cationized bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยได้ค่า %B/B_0 เท่ากับ 78%

13. การหา %recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำกลั่น

เมื่อเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไปในน้ำกลั่นด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังนี้ 0.5, 1, 5 และ 10 ppb แล้วทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 71 และภาพที่ 76 พบว่าสามารถหา %recovery ได้ 96.7, 90.7, 98.6 และ 89.2% ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 15 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 71 แสดงผล%recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำกลั่น

ปริมาณ MCYST-RR ที่เติมลงไป (mg/ml)	Recovery		SD
	ppb	%	
0.5	0.48	96.7	0.01
1	0.91	90.7	0.03
5	4.93	98.6	1.16
10	8.92	89.2	1.21
overall		93.8	

<u>หมายเหตุ</u> SD = standard deviation

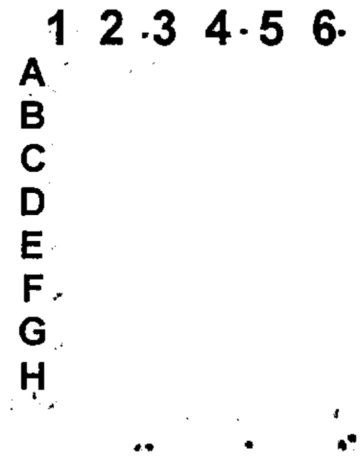
14. การหา % recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำประปา

เมื่อเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไปในน้ำประปาด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังนี้ 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ppb แล้วทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 72 และภาพที่ 76 พบว่าสามารถหา %recovery ได้ 92.0, 85.0, 102.3, 88.7 และ 85.1% ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 10 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 72 แสดงผล%recovery ของสารพิษ MCYST-RR ที่เติมลงในน้ำประปา

ปริมาณ MCYST-RR ที่เติมลงไป (mg/ml)	Recovery		SD
	ppb	%	
0.5	0.46	92.0	0.004
1	0.85	85.0	0.006
2.5	2.56	102.3	0.115
5	4.43	88.7	0.24
10	8.51	85.1	2.20
overall		90.6	

<u>หมายเหตุ</u> SD = standard deviation



ภาพที่ 76 แสดงผลการหา %recovery ในน้ำกลั่น (แถวที่ 3 และ 4) และน้ำประปา (แถวที่ 5 และ 6) เมื่อเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไปในปริมาณ 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ppb ตามลำดับ แล้วเปรียบเทียบผลการทดลองกับสารละลายมาตรฐาน MCYST-RR ซึ่งละลายอยู่ใน PBS (แถวที่ 1 และ 2) ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ โดยให้แถว B-G คือความเข้มข้นของ MCYST-RR ที่ 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ppb ตามลำดับ ส่วนแถว A คือสารละลายที่ไม่มีการเติมสารพิษลงไป

15. เปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธี ELISA และวิธี HPLC

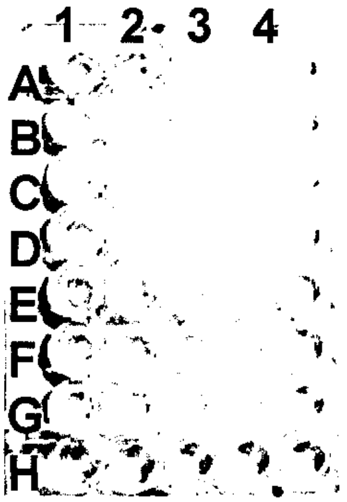
จากการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีการเจริญของ *Microcystis* sp. ด้วยวิธี HPLC และ direct competitive ELISA ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 73 และภาพที่ 77 พบว่าสาหร่ายจากน้ำทั้ง 3 แหล่ง ให้ผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA สูงกว่า HPLC เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลมาจากแอนติบอดีที่ได้เป็นแบบ polyclonal antibody ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารพิษไมโครซิสตินที่ไม่มีในสารพิษมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด (MCYST-RR, MCYST-YR และ MCYST-LR) ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (n=5)

สำหรับตัวอย่างน้ำที่ทำการเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไป 100 ppb ได้แก่น้ำกลั่น น้ำประปา และตัวอย่างน้ำจากสระน้ำภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ก่อนเติมสารพิษลงไปตรวจพบสารพิษ MCYST-0.2 ppb จากตัวอย่างน้ำที่ได้จากสระน้ำภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากผลการทดลองในตารางที่ 73 และภาพที่ 78 พบว่าเมื่อทดสอบหาปริมาณสารพิษด้วยวิธี direct competitive ELISA แล้วได้ปริมาณสารพิษใกล้เคียงกับสารพิษที่ได้เติมลงไป ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความคลาดเคลื่อนของแอนติบอดีที่ผลิตได้ เนื่องจากเป็น polyclonal antibody ผลที่ได้จึงเป็นเพียงการวิเคราะห์เชิงคุณภาพที่สามารถบอกได้ว่าวิธีการนี้ตรวจหาสารพิษได้ประมาณเท่าไหร่ แต่ไม่สามารถบอกความแน่นอนของสารพิษที่ตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วย HPLC ไม่สามารถตรวจพบสารพิษในตัวอย่างทั้งสามที่เติมในอัตรา 100 ppb เนื่องจากวิธีนี้มี detection limit อยู่ที่ประมาณ 10 นาโนกรัม และจะให้ได้ผลที่เชื่อถือได้ควรจะมีค่าประมาณ 100 เท่าของ detection limit นั่นคือประมาณ 1,000 นาโนกรัม (Harada, 1996) แต่ในตัวอย่างทั้งสามมีปริมาณสารพิษเพียง 2 นาโนกรัมเท่านั้น (คำนวณจากปริมาณตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร)

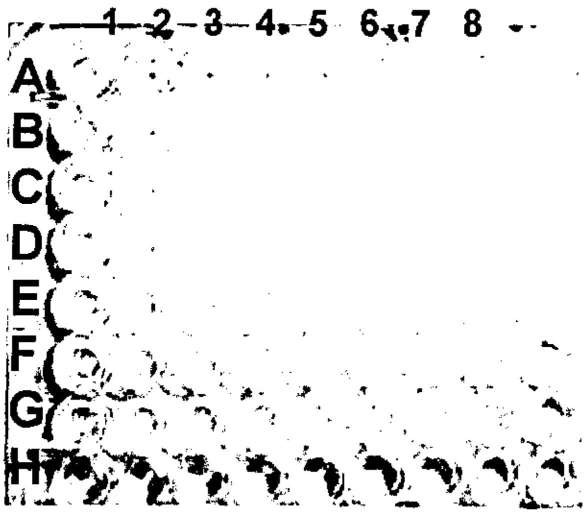
ตารางที่ 73 แสดงผลการตรวจหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจากสารสกัดสาหร่ายที่ได้จากธรรมชาติด้วยวิธี ELISA และวิธี HPLC

แหล่งของสารพิษ	Toxin concentration (ppb)	
	ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC	ตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA
แหล่งน้ำ 1	488,000	522,000
แหล่งน้ำ 2	431,000	622,000
แหล่งน้ำ 3	80,000	197,000
น้ำกลั่น (spiked 100 ppb)	ND	124
น้ำประปา (spiked 100 ppb)	ND	164
สระน้ำ (spiked 100 ppb)	ND	143

<u>หมายเหตุ</u> - ND = Not detected
- สระน้ำก่อนเติมสารพิษมาตรฐานลงไป 100 ppb พบว่ามีปริมาณสารพิษ ไมโครซิสตินเพียง 0.2 ppb
- บ่อที่ 3 เติมสาหร่ายแห้งลงไป 0.2 กรัมในตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร



ภาพที่ 77 แสดงผลการหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสารพิษไมโครซิสติน (แถวที่ 3 และ 4) เมื่อเจือจางตัวอย่างด้วย PBS แบบ 10-fold dilution จากแถว B-G ส่วนแถว A เป็นตัวอย่างน้ำที่ยังไม่ได้เจือจาง พบว่าสามารถหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างได้ 431 ppm ด้วยวิธี direct competitive ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารละลายมาตรฐาน (แถวที่ 1 และ 2) โดยมีความเข้มข้นของสารพิษเท่ากับ 0, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ppb ตามลำดับ (โดยเรียงความเข้มข้นจากแถว A- G)



ภาพที่ 78 ผลการตรวจหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น (แถวที่ 3 และ 4) น้ำประปา (แถวที่ 5 และ 6) น้ำจากสระน้ำ (แถวที่ 7 และ 8) โดยได้เติมสารพิษ MCYST-RR ลงไปในตัวอย่างน้ำเหล่านี้ 100 ppb แล้วเจือจางด้วย PBS แบบ 10-fold dilution จากแถว C-G ส่วนแถว B เป็นตัวอย่างน้ำที่ยังไม่ได้เจือจาง และแถว A คือตัวอย่างน้ำที่ไม่มีสารพิษ แล้วทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารละลายมาตรฐาน (แถวที่ 1 และ 2) โดยมีความเข้มข้นของสารพิษเท่ากับ 0, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ppb ตามลำดับ (โดยเรียงความเข้มข้นจากแถว A- G)

16. ELISA Kit ต้นแบบสำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

จากผลการทดลองขั้นต้นสามารถผลิต polyclonal antibody สำหรับการตรวจสอบปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวม (มีค่า cross reactivity สูงกับสารพิษไมโครซิสตินอีก 2 ชนิดที่ทดสอบ) ในน้ำด้วยเทคนิค direct competitive ELISA ได้ในระดับต่ำกว่า 1 ppb ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานความปลอดภัยในน้ำดื่มขององค์การอนามัยโลก ทำให้มั่นใจว่าสามารถที่จะผลิตชุดตรวจสอบในเชิงการค้าได้อย่างแน่นอน

ชุดตรวจสอบนี้ออกแบบมาเพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในน้ำ ที่ระดับ 0.2 –2 ppb (ภาพที่ 74) โดยต้องตรวจวัดด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และถ้าระดับสารพิษรวมสูงกว่า 0.5 ppb จะสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า นั่นแสดงว่าชุดตรวจสอบนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดขั้นต่ำ (Limit of Detection, LOD) ที่ 0.2 ppb โดยที่ความเข้มของสีจะเป็นปริมาณผกผันกับปริมาณสารพิษ นั่นคือ

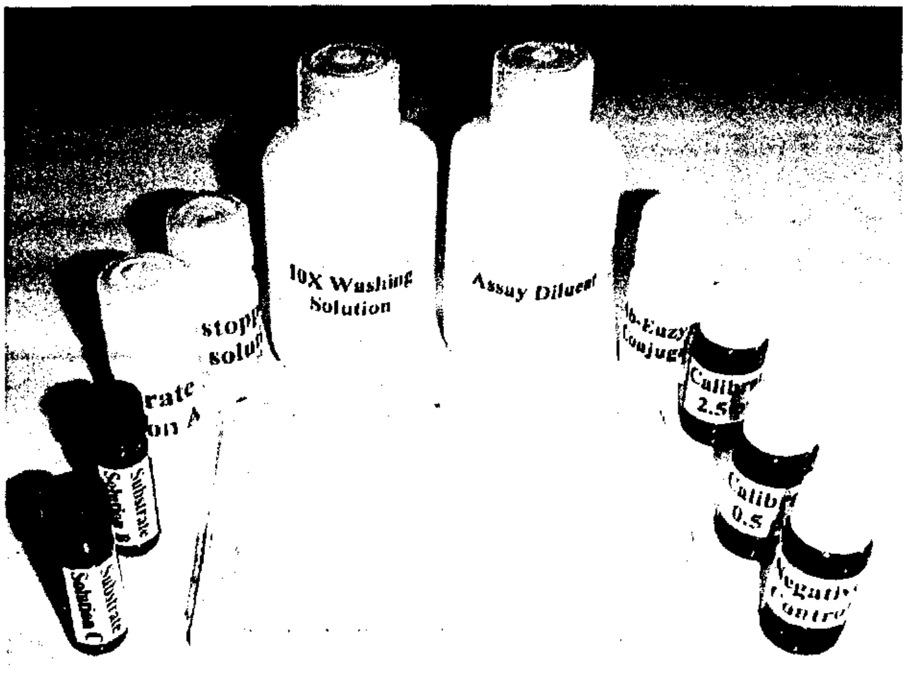
สีเข้ม = ปริมาณสารพิษต่ำ

สีอ่อน = ปริมาณสารพิษสูง

สำหรับการตรวจสอบสารพิษเชิงปริมาณของชุดตรวจสอบนี้ เชื่อว่ามีระดับตรวจวัดเชิงปริมาณขั้นต่ำ (Limit of Quantitation, LOQ) ที่ 0.5 ppb เพราะจากผลการ spike สารพิษไมโครซิสติน 0.5 ppb ในน้ำประปาที่เป็น neagtive control (ตารางที่ 72) พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของการตรวจวัดที่ 0.46 ppb (ค่า SD = 0.004 ppb) คิดเป็น 92 % recovery ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่น่าพอใจเป็นอย่างยิ่ง

<u>16.1 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบ</u> (ภาพที่ 79)

1. Antibody-coated micro-well plate
2. Negative Control
3. 0.5 ppb Microcystin RR calibrator
4. 2.5 ppb Microcystin RR calibrator
5. Assay diluent
6. Antibody-enzyme conjugate
7. 10X Wash salt solution
8. Substrate A, B and C (เตรียม substrate mixture ในอัตราส่วน A:B:C = 10 มิลลิลิตร : 100 ไมโครลิตร : 7 ไมโครลิตร ก่อนใช้งาน หลังผสมแล้วมีอายุการเก็บ 1 ชั่วโมง)
9. Stop solution



ภาพที่ 78 แสดงส่วนประกอบของชุดต้นแบบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

16.2 วิธีการใช้งาน (ภาพที่ 80)

1. เตรียมสารละลายและอุปกรณ์ทั้งหมดให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน และอยู่ที่อุณหภูมิห้อง
2. เติม negative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (ถ้าตัวอย่างน้ำมีปริมาณสารพิษสูงเกินไป ให้เจือจางด้วย assay diluent)
3. เติม antibody-enzyme conjugate ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
4. ผสมสารละลายใน micro-well plate ด้วยการหมุนในแนวราบเป็นวงกลมประมาณ 20-30 วินาที
5. ปิดฝา micro-well plate แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
6. เทสารละลายทิ้งในอ่างน้ำ หรือภาชนะที่เหมาะสม
7. เติม wash solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วดูดทิ้ง ทำทั้งหมด 3 ครั้ง
8. เติม substrate mixture ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ในที่มืด จะได้สารละลายสีฟ้าเกิดขึ้น
9. เติม stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จะได้สารละลายสีเหลืองเกิดขึ้น
10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA Reader
11. คำนวณปริมาณสารพิษจาก %B/Bo ดังนี้

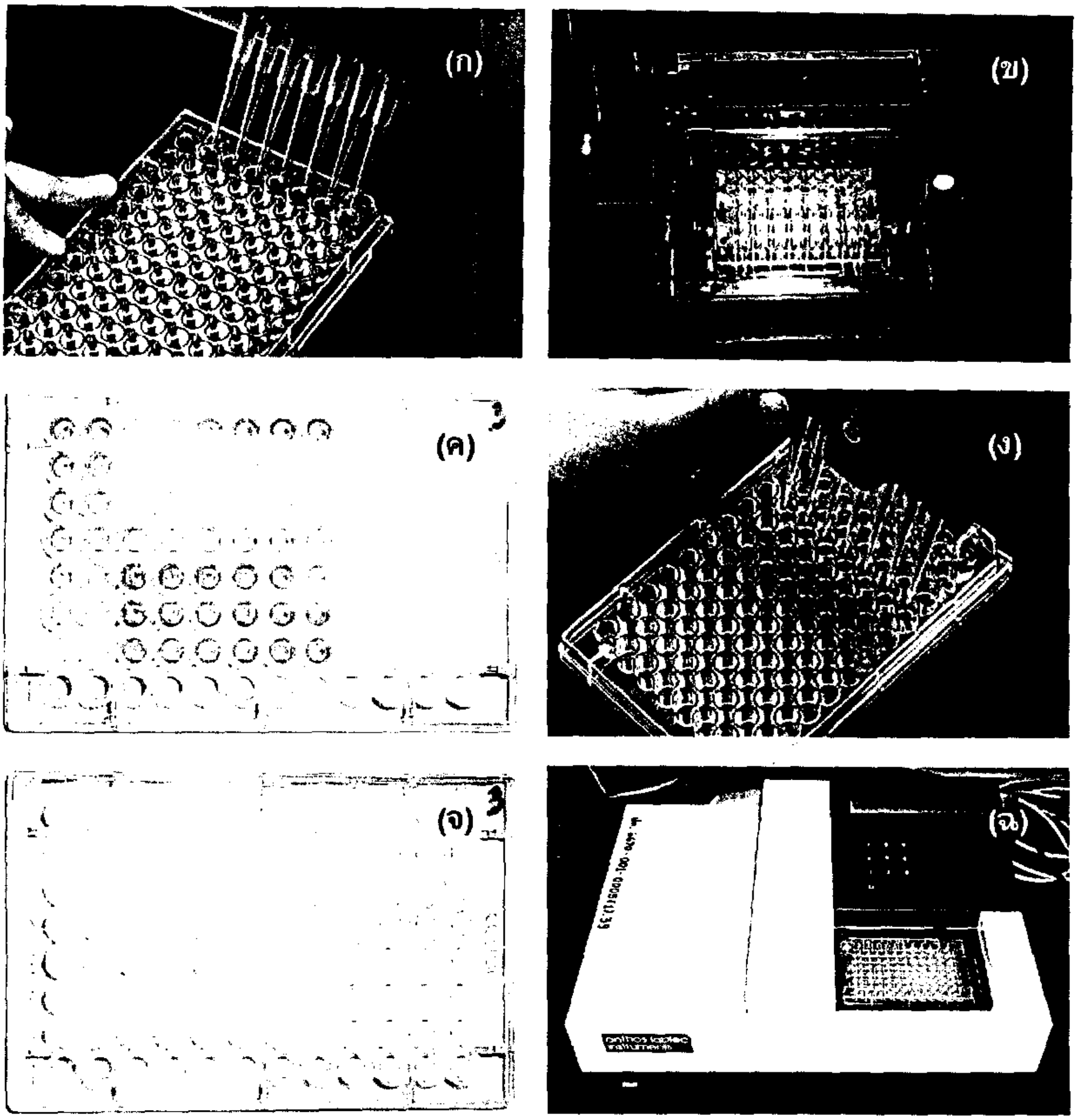
$$\%B/Bo = \frac{\text{Average Absorbance of Calibrator or Sample}}{\text{Average Absorbance of Negative Control}} \times 100$$

ค่า %B/Bo นี้เป็นค่าที่สัมพัทธ์ (relative value) ที่ค่อนข้างคงที่ เนื่องจากเป็นค่าที่คำนวณเปรียบเทียบกับ calibrator ในทุกชุดของการตรวจวัด ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการทดลองข้างต้น (ภาพที่ 74) จะได้ค่าโดยประมาณดังนี้

%B/Bo	Microcystin Concentration (ppb)
92.0	0.2
83.2	0.5
72.0	1
57.6	2.5
48.8	5
42.5	10
39.3	20

ซึ่งในการตรวจวัดแต่ละครั้งจะต้องทำกราฟมาตรฐานจาก calibrator ที่เตรียมไว้ให้ (0.5 และ 2.5 ppb) หลังจากนั้นจึงทำการคำนวณ โดย plot ค่า log ของความเข้มข้นของ calibrator แกน x

และค่า %B/Bo บนแกน y (ดังภาพที่ 74) ซึ่งถ้าค่า %B/Bo เมื่อเทียบแล้วได้มากกว่า 2.5 ppb ควรจะรายงานว่ามีปริมาณสารพิษมากกว่า 2.5 ppb หรือ ถ้าต้องการรายงานในเชิงปริมาณต้องเจือจางตัวอย่างให้ปริมาณสารพิษอยู่ระหว่าง 0.5 – 2.5 ppb แล้วทำการตรวจวัดใหม่



ภาพที่ 79 แสดงขั้นตอนการตรวจสอบสารพิษไมโครซิสตินในน้ำด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ (ก) การเติม microcystin assay diluent ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุม (ข) การล้างด้วย washing salt solution (ค) สีที่เกิดขึ้นหลังจากการเติม substrate (ง) การเติม stop solution (จ)) สีที่เกิดขึ้นหลังจากการเติม stop solution และบ่มนาน 30 นาที และ (ฉ) การอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader

ภาคผนวก

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตสารพิษ microcystin สำหรับการผลิต polyclonal antibody

2. เพื่อผลิต Polyclonal antibody ไว้สำหรับตรวจหาสารพิษ microcystin ด้วยวิธี ELISA

ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

ได้ผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ทั้ง 2 ประการ

บทความสำหรับเผยแพร่

ปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์และการตายของสัตว์เลี้ยงหลายแห่งทั่วโลก เช่น การรายงานการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ในประเทศไทย (อาภารัตน์และคณะ 2542) การเกิดโรคตับอักเสบระบาดอย่างรุนแรง ในประชากรใน Palm Island รัฐ Queens land ประเทศออสเตรเลีย (Baurke และคณะ, 1983) การเกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้น ของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979 และ Yu, 1989) เป็นต้น ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษนี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* และ *Nodularia* โดยสามารถเจริญเติบโตรวดเร็วในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อม และมีผลกระทบต่อนิเวศวิทยาอย่างกว้างขวาง

ปัญหาการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำจึงเป็นปัญหาใหม่ที่หน่วยงานต่างๆ กำลังให้ความสนใจและเร่งดำเนินการแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำเพื่อการบริโภคให้ปลอดจากสารพิษเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่จำเป็นต้องเร่งศึกษา เนื่องจากสารพิษถูกกำจัดได้ยากในกระบวนการการผลิตน้ำประปา มีรายงานว่าสามารถตรวจพบสารพิษ microcystin จากไซยาโนแบคทีเรียนี้ได้ในน้ำประปาของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย ด้วยการใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เทคนิค ELISA และทดสอบความเป็นพิษกับหนู (Chorus and Bartram, 1999) ซึ่งองค์การอนามัยโลก (WHO) จึงได้มีข้อกำหนดค่าความปลอดภัยสำหรับการปนเปื้อนของสารพิษ microsystin LR and equivalent ได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำดื่ม

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียผลิตสารพิษสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Microcystis aeruginosa* โดยตรวจพบในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำจากเขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสระน้ำเลี้ยงเป็ดหน้าเรือนจำคลองเปรมกรุงเทพฯ และยังได้สรุปว่าแหล่งน้ำภายในประเทศขณะนี้กำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรมก่อให้เกิดอันตราย หากประชากรมีการบริโภคน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษนี้เป็นประจำ (อาภารัตน์และคณะ 2542) นอกจากนี้การสำรวจของ วิเชียร และคณะ (2001) ยังพบว่ามีการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการเกษตร อุปโภค-บริโภค และเพื่อการพักผ่อน

จากปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษนี้แนวทางหนึ่งที่จักช่วยหลีกเหลี่ยงการใช้น้ำที่มีสารพิษปนเปื้อน คือการหาวิธีตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ผ่านมาการวิเคราะห์หาสารพิษกลุ่มนี้จะใช้เทคนิคทาง HPLC ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษหลัก (microcystin-LR, -RR และ –YR) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวไม่เพียงพอในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนระดับต่ำ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีความชำนาญ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ ELISA เป็นเทคนิคหนึ่งที่มี

ประสิทธิภาพสามารถตรวจหาสารพิษได้ครอบคลุมกว้างขวาง มีความไวสูง ไม่เจาะจงชนิดของ microcystin ที่มีอยู่มากชนิด และยังสะดวกในการตรวจหาสารพิษจากตัวอย่างจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีอย่างยิ่งในการช่วยตรวจหาสารพิษในระยะปฐมภูมิ ปัจจุบันบริษัทในต่างประเทศได้ผลิต ELISA KIT ขายในราคา KIT ละ 396 เหรียญดอลลาห์สหรัฐ ซึ่งเป็นราคาที่ค่อนข้างสูงมากอีกทั้งน่ามีความจำเพาะต่อตัวอย่างในประเทศสหรัฐอเมริกา

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการพัฒนา ELISA Kit ต้นแบบเพื่อใช้ตรวจหาสารพิษ microcystin ในน้ำ โดยการผลิตแอนติซีรัมแบบ polyclonal antibody จากผลการทดลองสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษในน้ำได้ในระดับ 0.2 ppb (ต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader) และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb ซึ่งต้นทุนในการผลิตชุดตรวจสอบนี้จะมีราคาถูกกว่าที่สั่งซื้อจากต่างประเทศประมาณ 10 เท่า และมีคุณภาพในการตรวจวัดเท่าเทียมกัน อีกทั้งน่าจะมีความจำเพาะกับสารพิษในไซยาโนแบคทีเรียที่พบอยู่ในประเทศไทย โดยคาดว่าหน่วยงานที่เกี่ยวของกับการผลิตน้ำเพื่อบริโภค เช่นการประปานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค ประปาหมู่บ้าน หรือหน่วยงานเป็นเจ้าของแหล่งน้ำเพื่อการอุปโภค เช่นการไฟฟ้าฝ่ายผลิต กรมชลประทาน และองค์การบริหารส่วนตำบล จะเป็นผู้นำชุดตรวจสอบนี้ไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษนี้ในน้ำ อีกทั้งยังใช้เป็นระบบเตือนภัยสำหรับเกษตรกรที่ใช้น้ำนั้นให้หลีกเลี่ยงการใช้น้ำที่มีการปนเปื้อนของสารพิษในระดับอันตราย

ชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

กิจกรรมที่วางแผนและกิจกรรมที่ดำเนินงานมา

กิจกรรม	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3
	1-6	7-12	1-6	7-12	1-6
1. การสำรวจแหล่งและการคัดเลือก *Microcystis* sp.ที่ผลิตสารพิษในปริมาณสูง					
2. การเพาะเลี้ยง *Microcystis* sp. และการสกัดสารพิษบริสุทธิ์					
การผลิตแอนติเซรั่มของ microcystin แบบ polyclonal 3.1 การเตรียม immunogens 3.2 การฉีดกระตุ้น 3.3 การตรวจสอบคุณภาพแอนติเซรั่ม					
การพัฒนา ELISA Kit ต้นแบบ					
Validation ความแม่นยำของการตรวจสอบ					
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Kit กับวิธีอื่น					
เผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัดสัมมนาและสาธิตร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง					
สรุปและรายงาน					

←——→ กิจกรรมที่วางแผน ←·······→ กิจกรรมที่ได้ดำเนินงาน

ผลที่คาดว่าจะได้รับเทียบกับผลที่ได้รับจริง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับจริง
1. วิธีการเลี้ยงและเพิ่มปริมาณไซยาโนแบคทีเรีย 2. ไซยาโนแบคทีเรียเพื่อการผลิต microcystin ในปริมาณมาก 3. study site	1. คัดเลือกสายพันธุ์ M50058 สำหรับผลิตสารพิษ 2. ทดลองผลิตสารพิษ microcystin ในปริมาณมาก 3. นำไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* ที่เจริญในแหล่งน้ำธรรมชาติมาผลิตสารพิษ
4. วิธีในการสกัดและเตรียมสารพิษให้บริสุทธิ์ 5. ผลของการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดได้ด้วยวิธี HPLC 6. microcystin บริสุทธิ์พร้อมฉีดเข้ากระต่ายเพื่อผลิตแอนติเซรั่ม	4. วิธีในการสกัดและเตรียมสารพิษให้บริสุทธิ์ 5. ผลของการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดได้ เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC 6. microcystin บริสุทธิ์ สำหรับ conjugate กับ protein carrier เพื่อฉีดเข้ากระต่ายเพื่อผลิตแอนติเซรั่ม
7. แอนติซีรัม 8. ข้อมูลการทดสอบ Validation เบื้องต้น 9. ชุดน้ำยาตรวจสอบสารพิษ 10. ผลตรวจสอบภาคสนาม 11. ข้อมูลการทดสอบ Validation	7. แอนติซีรัม 8. ข้อมูลการทดสอบ Validation เบื้องต้น 9. ชุดน้ำยาตรวจสอบสารพิษ 10. ผลตรวจสอบภาคสนาม 11. ข้อมูลการทดสอบ Validation
12. ได้ข้อมูลประสิทธิภาพของ KIT ต้นแบบเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากห้องLAB ที่ได้ ISO17025 และจากชุดน้ำยาต่างประเทศ 13. ตีพิมพ์ผลงานวิจัยเรื่องในวารสารทั้งในและต่างประเทศ 14. มีการนำชุดตรวจสอบไปใช้ในการทดสอบคุณภาพน้ำในระบบการผลิตประปา 15. มีการนำชุดตรวจสอบไปใช้ในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของสารพิษ	12. ได้ข้อมูลประสิทธิภาพของ KIT ต้นแบบเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC 13. อยู่ในระหว่างดำเนินการ 14. อยู่ในแผนการวิจัยส่วนขยาย 15. อยู่ในแผนการวิจัยส่วนขยาย

เอกสารอ้างอิง

นภาธร บานชื่น. 2530. ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปราโมทย์ ทองกระจาย. 2530. คู่มือการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง หลักการและการประยุกต์เทคนิคทาง RIA และ ELISA. ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 169.

รัชนี ฮงประยูร. 2541. บทปฏิบัติการเซรุ่มวิทยาทางด้านโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 8.

วิเชียร ยงมานิตชัย, ผกามาส อินทโชติ และ เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล. 2001. การสำรวจความหลากหลายไซยาโนแบคทีเรียพิษในประเทศไทย. 6th WRC Workshop on Ertrophication and Toxic Cyanobacteria in Freshwater Reservoirs. 8-10 February 2001. Chiang Mai University.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. 2537. อิมมูโนวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. เค. พี. พริ้นติ้ง จำกัด, กทม.

อาภารัตน์ มหาขันธ์, ประไพภัทร คลังทรัพย์, พรรณรัตน์ รัตนโชติ, วัลลภา อรุณไพโรจน์, โทโมฮารุ ซาโน, มาโกโตะ เอ็ม วาตานาเบ, คูนิมิทซึ คายา และพูนศุข อัตถะสัมปุณณะ. 2542. ความเป็นพิษของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในประเทศไทย วท.(14) 1 : หน้า 7-22.

Al-Lay, J.K., G.K. Poon and G.A. Codd. 1988. Isolation and purification of peptide and alkaloid toxins from *Anabaena flos-aquae* using high performance thin-layer chromatography. J. Microbiol. Methods. 7 : 251-258.

Anderson, G. W. 1958. N, N'-Carbonyldiimidazole, a new reagent for peptide synthesis. J. Am. Chem. Soc. 80: 4323.

Anderson, R. J., H. A. Luu, D. Z. X. Chen, C. F. B. Holmes, M. L. Kent, L. Leblanc, F. J. R. Taylor and D. E. Williams. 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon "netpen liver disease". Toxicon. 31: 1315-1323.

Anjaneyulu, P. S. R. and V. J. Staros. 1987. Reactions of *N*-hydroxysulfosuccinimide active esters. Int. J. Pept. Protein res. 30: 117-124.

Apple, R. J., P. L. Domen, A. Muckerheide and J. G. Michael. 1988. Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells. J. Immunol. 140: 3290-3295.

Beth, A. H., E. T. Conturo, D. S. Venkataramu and V. J. Staros. 1986. Dynamics and interactions of the anion channel in intact human erythrocytes: An electron paramagnetic resonance spectroscopic study employing a new membrane-impermeant bifuntional spinlabel. Biochemistry. 25: 3824-3832.

Bizzini, B., J. Blass, A. Turpin and M. Raynaud. 1970. Chemical characterization of tetanus toxin and toxoid: amino acid composition, number of SS and S-H groups and N-terminal amino acid. Eur. J. Biochem. 17: 100-105.

Bobbitt, J. M. 1956. Periodate oxidation of carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem. 11:1-41.

Botes, D.P., H. Kruger and C.C. Viljoen. 1982. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. 20: 945-953.

Bourke, A. T. C., R. B. Hawes, A. Nielson and N. D. Stallman. 1983. An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possible caused by algal intoxication. Toxicon. Suppl. 3: 45-48.

Boyle, W. J., J. S. Lipsick, E. P. Reddy and M. A. Baluda. 1983. Identification of the leukemogenic protein of avain myeloblastosis virus and of its normal cellular homologue. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 2834-2838.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. 72: 445-459.

Chorus, I. and J. Bartram.1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London.

Chu, B. C. F., R. F. Kramer and E. L. Orgel. 1986. Synthesis of an amplifiable reporter RNA for bioassays. Nucleic Acids Res. 14: 5591-5603.

Chu, F.S., X. Huang and R.D. Wei. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. AOAC. 73: 451-456.

Chu, F.S., X. Huang, R.D. Wei and W.W. Carmichael. 1989. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1928-1933.

Codd, G.A. and G.K. Poon. 1988. Cyanobacterial toxins. In: J. G. Gallon, and L. J. Rogers [Eds] Proc. Phytochem. Soc. Europe, 28, Oxford University Press, Oxford, 283-296.

Cohn, E. J. 1947. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XIII. Crystallization of serum albumins from ethanol-water mixtures. J. Am. Chem. Soc. 69: 1753-1761.

Coleman, P.L., M.M. Walker, D.S. Milbrath, D.M. Stauffer, J.K. Rasmussen, L.R. Krepski, and S.M. Heilman. 1990. Immobilization of protein A at high density on azlactone-functional polymeric beads and their use in affinity chromatography. *J. Chromatogr.* 512: 345-363.

Collier, R. J. and J. Kandel. 1971. Structure and activity of diphtheria toxin. J. Biol. Chem. 246: 1496-1503.

Crowther, R. J. 1995. Methods in Molecular Biology. Vol. 42: ELISA Theory and Practice. Institute for Animal Health, Working, UK.

David. C. and C. Raykundalia. 1988. Antibodies vol. 1. A Practical Approach. IRL Press, Oxford: 38-41.

Delong, S. 1979. Drinking water and liver cell cancer : An epidemiological approach to the ethiology of this disease in China. Chin. Med. J. 92: 748-756.

Denney, J. B. and G. Blobel. 1984. ^{125}I-Labeled cross-linking reagent that is hydrophilic, photo activatable, and cleavable through an azo linkage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 5286-5290.

Dienes, L. 1936. The specific immunity response and the healing of infectious diseases. Arch. Pathol. 21: 357-386.

Domen, P. L. and G. T. Hermanson. 1992. Cationized carriers for immunogen production. U. S. Patent No. 5, 142, 027.

Domen, P. L., A. Muckerheide and J. G. Michael. 1987. Cationization of protein antigens. III. Abrogation of oral tolerance. J. Immunol. 139: 3195-3198.

Donovan, J. A. and L. M. Jennings. 1986. *N*-Hydroxysulfosuccinimido active esters and the L-(+)-lactate transport protein in rabbit erythrocytes. Biochemistry. 25: 1538-1545.

Duncan J. G., K. W. Kauffman, R. A. Hall, X. Huang and F. S. Chu. 2000. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. Environ Health Pers. 108: 435-439.

Dunn, B. M. and B. C. Affinsen. 1974. Kinetics of Woodwart's reagent K hydrolysis and reaction with staphylococcal nuclease. J. Biol. Chem. 249: 3717.

Ellouz, F., A. Adam, R. Ciorbaru and E. Lederer. 1974. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 1317-1325.

Eloff, J.N. and A.J. van der Westhuizen. 1981 Toxicological studies on *Microcystis* . In The Water Environment Algal Toxins and Health ed. Carmichael, W.W. pp. 343 364. New York, Plenum Press.

Eriksson, J.E., J.A.O. Meriluoto and T. Lindholm. 1989. Accumulation of a peptide toxin from cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. Hydrobiologia. 183: 211-216.

Falconer, I. R., M. D. Burch, D. A. Steffensen, M. Choice and O. R Coverdale. 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to

growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. Environ. Toxicon. Wat. Qual. 9: 131-139.

Falconer, I.R., J.V. Smith, A.R.B. Jackson, A. Jones and M.T.C. Runnegar. 1988. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. J. Toxicol. Environ. Health. 24: 291-298.

Fitzgeorge, R. B., S. A. Clack and C. W. Keevil. 1994. Routes of intoxication, pp. 69-74. *In*, Detection Methods for Cyanobacteria Toxins, G. A. Codd and T. M. Jefferies (eds.). The Royal Society of Chemistry. Bath University Press, Cambridge.

Fok, K. F., K. Ohga, G. S. Incefy and B. W. Erickson. 1982. Antigenic specificity of two antibodies directed against the thymic hormone serum thymic factor (FTS). Mol. Immunol. 19: 1667-1673.

Germain, R. N. 1986. The in and out of antigen processing and presentation. Nature (London). 322: 687-689.

Ghosh, S. S., M. P. Kao, W. A. McCue and L. H. Chappelle. 1990. Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes. Bioconjugate Chem. 1: 71-76.

Gilles, M. A., Q. A. Hudson and L. C. Borders. 1990. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. Anal. Biochem. 184: 244-246.

Glazer, A. N., J. R. Delange and S. D. Sigman. 1975. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Chemical Modification of Proteins (Work, T. S., and Work, E., eds) pp. 1-203, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Glenny, A. T., C. G. Pope, H. Waddington and U. Wallace. 1926. Immunological notes. J. Pathol. 29: 31-40.

Harada, K.I. 1996. Chemistry and detection of microcystins. *In* Toxic *Microcystis*, M.F. Watanabe, K. Harada, W. W. Carmichael and H. Fujiki (eds.). CRC Press, Boca Raton.

Harada, K.I., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A. Dahlem, V.R. Beasley and W.W. Carmichael. 1988. Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria. J. Chromatogr. 448: 275-283.

Harada, K.I., K. Ogawa, K. Matsuura, H. Nagai, H. Murata, M. Suzuki, Y. Itezono, N. Nakayama, M. Shirai and M. Nakano. 1991. Isolation of two toxic hepatopeptide microcystins from and axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. Toxicon. 29: 479-489.

Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, United states of America.

Hermanson, G. T. 1996. Bioconjugate Techniques. Academic Press, New York.

Himberg, K., A.M. Keijola, L. Hiisvirta, H. Pysalo, and K Sivonen. 1989. The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. Wat. Res. 23: 979-986.

Hopp, T. P. 1984. Immunogenicity of a synthetic HbsAg peptide: Enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. Mol. Immunol. 21: 13-16.

Hoare, D. G. and D. E., Jr. Koshland. 1967. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. J. Biol. Chem. 242: 2447-2453

Ichimura, T. 1979. Media for blue-green algae. *In,* Methods in Algological Studies, K. Nihsizawa, and M. Chihara (eds.). Kyoritsu, Tokyo. (in Japanese)

Inman, J. K., and H. M. Dintzis. 1969. The derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. Controlled induction of functional groups for the purpose of special biochemical absorbents. J. Biochem. 4: 4074-4080.

Jennings, M. L. and S. J. Nicknish. 1985. Localization of a site of intermolecular cross-linking in human red blood cell band 3 protein. J. Biol. Chem. 260: 5472-5479.

Jia-Rong, L., and F. S. Chu. 1994. Kinetics of distribution of microcystin LR in serum and liver cytosol of mice : An immunochemical analysis. J. Agric. Food Chem. 42: 1035-1040.

Johnson, A. G., S. Gaines and M. Landy. 1956. Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 103: 225-246.

Keijola, A.M., K. Himberg, A.L. Esala, K. Sivonen and L. Hiisvirta. 1988. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot-scale experiments. Toxicol. Asso. 3: 643-648.

Kfir, R., E. Johannsen and D.P. Botes. 1986. Monoclonal antibody specific cyanoginosin-LA preparation and characterization. Toxicon. 24: 543-552.

Korn, A. H., H. S. Feairheller and M. E. Filachione. 1972. Glutaraldehyde: Nature of the reagent. J. Mol. Biol. 65: 525-529.

Kotite, N. J., V. J. Staros and W. L. Cunningham. 1984. Interaction of specific platelet membrane proteins with collagen: Evidance from chemical cross-linking. Biochemistry. 23: 3099-3104.

Krishnamurthy, T., W.W. Carmichael, and E.W. Sarver. 1986. Investigations of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxic peptides. I. Isolation, purification, and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquare*. Toxicon. 24: 865-873.

Kungswan, A., K. Noguchi, S. Matsunaga, M.F. Watanabe, S. Watabe and K. Hashimoto. 1988. Properties of two toxins isolated from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. 26: 119-125.

Kungswan, A., T. Noguchi, M. F. Watanabe, S. Matsunaga, S. Watanabe and K. Hashimoto. 1987. Isolation of two toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Nippon Suisan Gakkaishi 53: 2051-2560.

Lawton, L.A., C.E. Edward, and G.A. Codd. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analyst. 119: 1525-1530.

Leach, J. S. 1969. Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry Part A. Molecular Biology an International Series of Monographs and Textbooks. Academic Press, New York.

Lee, A. C. J., E. J. Powell, W. G. Tregear, D. H. Niall and C. V. Stevens. 1980. A method for preparing β-hCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition. Mol. Immunol. 17: 749-756.

Masseyeff, R. F., W.H. Albert and N.A. Staines. 1993. Methods of Immunological Analysis: Catalytic antibodies. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Meriluoto, J.A.O. and J.E. Eriksson. 1988. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. J. Chromatogr. 438: 93-99.

Metcalf J. S., S. G. Bell and G. A. Codd. 2000. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. Wat. Res. 34: 2761-2769.

Monsan, P, G. Puzo, H. Mazarguil. 1975. Mechanism of glutaraldehyde-protein bond formation. Biochimie.57: 1281-92.

Muckerheide, A., L. P. Domen and G. J. Michael. 1987a. Cationization of protein antigens. II. Alteration of regulatory properties. J. Immunol. 138: 2800-2804.

Muckerheide, A., R. J. Apple, A. J. Pesce and J. G. Michael. 1987b. Cationization of protein antigens. I. Alteration of immunogenic properties. J. Immunol. 138: 833-837.

Nagata, S., T. Tsutsumi, A. Hasegawa, F. Yoshida and Y. Ueno. 1997. Enzyme immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. J. AOAC Int. 80: 408-417.

Nakane, P. K. and A. Kawaoi. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091.

Namikoshi, M., K. Sivonen, R. W. Evans, W. W. Carmichael, L. Rouhiainen, R. Luukainen and L. K. Rinehart. 1992a. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. Toxicon. 30: 1093.

Namikoshi, M., L. K. Rinehart, R. Sakai, R. R. Stotts, M. A. Dahlem, R. V. Beasley, W. W. Carmichael and R. W. Evans. 1992b. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Microcystis wesenbergii*; nine new microcystins. J. Org. Chem. 57: 866-872.

Namikoshi, M., K. Sivonen, W.R. Evans, F. Sun, W.W. Carmichael and K.L. Rinehart. 1992c Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). Toxicon. 30: 1473-1479.

Nicholson, B.C., J. Rositano and M. Burch. 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. Wat. Res. 28: 1297-1303.

Nizan, S., C. Dimentman, and M. Shilo. 1986. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. J. Limnol. Oceano. 31: 497-502.

Pauillac, S., J. Naar, P. Branaa and M. Chinain. 1998. An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten-carrier conjugate. J. of Immunol. Methods. 220: 105-114.

Paul, R. and W. G. Anderson. 1960. *N, N'*-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent. J. Am. Chem. Soc. 82: 4596-4600.

Paul, R. and W. G. Anderson. 1962. *N, N'*-Carbonyldiimidazole in peptide synthesis. III. A synthesis of isoleucine-5-angiotensin II amide-1. J. Org. Chem. 27: 2094-2099.

Pestka, J. J. and F. S. Chu. 1984. Aflatoxin B1 Dihydrodiol Antibody: Production and Aspecificity. Applied. and Environ. Microbiol. 472-477.

Philips, M.J., R.J. Roberts, J.A. Stewart and G.A. Codd. 1985. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmogairderi richardson*. J. Fish. Dis. 8: 339-345.

Rabergh, C.M.L., G. Bylund and J.E. Eriksson. 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus capio* L). Aquat. Toxicol. 20: 131-146.

Rebek, J. and Feitler. 1974. Mechanism of the carbodiimide reaction. II. Peptide synthesis on the solid phase. J. Am. Chem. Soc. 96: 1606-1607.

Riordan, J. F. and Vallee, B. L. 1972. Diazonium salts as specific reagents and probes of protein conformation. In "Methods in Enzymology" (C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, eds.), Vol. 25: 521. Academic Press, New York.

Rothfus, J. A. and E. L. Smith. 1963. IV. The periodate oxidation of glycopeptides from human –globulin. J. Biol. Chem. 238: 1402-1410.

Sheehan, J. C. and P. G. Hess. 1955. A new method of forming peptide bonds. J. Am. Chem. Soc. 77: 1067-1068.

Sheehan, J. C., A. P. Cruickshank and L. G. Boshart. 1961. A convenient synthesis of water-soluble carbodiimides. J. Org. Chem. 26: 2525-2528.

Sheehan, J. C., J. Preston and A. P. Cruickshank. 1965. A rapid synthesis of oligonucleotide derivatives without isolation of intermediates. J. Am. Chem. Soc. 87: 2492-2493.

Shek, P. N. and D. T. Health. 1983. Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. III. Immunogenicity of bovine serum albumin covalently coupled to vesicle surface. Immunology. 50: 101.

Shepherd, P. and C. Dean. 2000. Monoclonal Antibodies. : A Practical Approach. Oxford University Press, New York.

Shinji, S., Y. Nagano, K. Kushida, M. Shirai, K. Harada and M. Nakano. 1994.Cross-reactivity and neutralizing ability of monoclonal antibodies against microcystins. Microbiol. Immunol. 38: 389-392.

Shirai, M., K. Matsumura, A. Ohotake, Y. Takamura, T. Aida and M. Nakano. 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (Cyanobacteria). Am. Soc. Microbiol. 55: 2569-2571.

Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. App. Environ. Microbiol. 56: 2658-2666.

Sivonen, K., M. O. Skulberg, M. Namikoshi, R. W. Evans, W. W. Carmichael and L. K. Rinehart. 1992a Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. App. Env. Microbiol. 58: 2495-2500.

Sivonen, K., M. O. Skulberg, M. Namikoshi, R. W. Evans, W. W. Carmichael and L. K. Rinehart. 1992b Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc* sp. strain 152. Chem. Res. Toxicol. 5: 464-469.

Sivonen, K., M. O. Skulberg, M. Namikoshi, R. W. Evans, W. W. Carmichael and L. K. Rinehart. 1992c. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. Toxicon. 30: 1481-1465.

Staros, J. V. 1982. *N*-Hydroxysulfosuccinimide active esters: Bis(*N*-Hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane impermeant, protein cross-linkers. Biochemistry. 21: 3950-3955.

Sugaya, Y., M. Yasuno and T. Yanai. 1990. Effect of toxic *Microcystis viridis* and isolated toxins on gold fish. Japan J. Limnol. 51: 149-153.

Tanaka, Y., S. Takenaka, H. Matsuo, S. Kitamori and H. Tokiwa. 1993. Levels of microcystins in Japanese lakes. Toxicol. Environ. Chem. 39: 21-28.

Theiss, W.C., W.W. Carmichael, J. Wyman and R. Bruner. 1988. Blood pressure and hepato-cellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. Toxicon. 26: 603-613.

Theorell, H. 1951. The iron-containing enzymes. B. Catalases and peroxidases. "Hydroperoxidases", pp. 397. In J. B. Sumner and K. Myrback, eds. The Enzymes. Academic Press, New York.

Tsuji, K., S. Naito, F. Kondo, N. Ishikawa, M.F. Watanabe, M. Suzuki and K.L. Harada. 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. Environ. Sci. Technol. 28: 173-177.

Turell, M.J. and J.L. Middlebrook. 1988. Mosquito inoculation: an alternative bioassay for toxins. Toxicon. 26: 1089-1094.

Utkilen, H. and N Gjolme. 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa* Appl. Environ. Microbiol. 61: 797-800.

Van der Westhuizen, A.J. and J.N. Eloff. 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). Planta 163: 55-59.

Watanabe, M.F. 1996. Isolation, cultication and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. *In* Toxic *Microcystis*, M.F. Watanabe, K. Harada, W. W. Carmichael and H. Fujiki (eds.). CRC Press, Boca Raton.

Watanabe, M.F. and S. Oishi. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1342-1344.

Watanabe, M.F., K. Tsuji, Y. Watanabe, K.I. Harada and M. Suzuki. 1992. Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. Natural Toxins. 1: 48-53.

Wheat, T., J. A. Shelton, V. Gonzales-Prevatt and E. Goldberg. 1985. The antigenicity of synthetic peptide fragments of lactate dehydrogenase C_4. Mol. Immunol. 22: 1195-1199.

WHO. 1997. Report of the Working Group on Chemical Substances in Drinking Water, Geneva, 22-26 April 1997. Section 5-2 Microcystin-LR. WHO, Geneva, Switzerland.

Wicks, R. J., and P. G. Thiel. 1990. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. Environ. Sci. Technol. 24:1413-1418.

Williams, A. and A. I. Ibrahim. 1981. A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). J. Am. Chem. Soc. 103: 7090-7095.

Woodward, R. B. and A. R. Olofson. 1961. The reaction of isoxazolium salts with bases. J. Am. Chem. Soc. 83: 1010-1012.

Woodward, R. B., A. R. Olofson and H. Mayer. 1961. A new synthesis of peptides. J. Am. Chem. Soc. 83: 1007-1009.

Wright, B. W., G. A. Ross and R. D. Smith. 1989. Capillary zone electrophoresis with laser fluorescence detection of marine toxins. J. Micro-column Separations. 1: 85-92.

Yu, F. Y.; B. H. Liu; H. N. Chou and S. F. Chu. 2002. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. J. of Agric. and Food Chem. 50: 4176-4182.

Yu, S. Z. 1989. Drinking water and primary liver cancer. *In*, Primary Liver Cancer, Z. Y. Tang, M. C. Wu and S. S. Xia (eds.). China Academic Publishers, Bei Jing, Springer-Verlag, Berlin.

Zevenboom, W. and L.R. Mur. 1984. Growth and photosynthetic response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in relation to photoperiodicity and irradiance. Arch Microbiol. 139: 232-239