



1. ผลการผลิต hybridoma

จากผลการทดลองทำการเชื่อมเซลล์ระหว่าง เซลล์ myeloma กับเซลล์ม้ามของหนู
โมซที่ถูกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ P. falciparum ทั้งหมด 8 ครั้ง พบว่าการเชื่อมเซลล์ที่
ได้เซลล์ hybridoma เจริญขึ้นมา ได้แก่ การเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4 ถึง 8 (CU4-CU8) โดย
พบการเจริญของเซลล์ hybridoma ประมาณวันที่ 5-7 หลังการเชื่อมเซลล์ ส่วนการเชื่อม
เซลล์ครั้งที่ 1-3 (CU1-CU3) ไม่พบการเจริญของ hybridoma จากตารางที่ 7 แสดงให้
เห็นผลความเข้มข้นของ NaHCO_3 และ HEPES เพื่อรักษาสภาพ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์และ
ชนิดของ serum supplemented ที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อการเจริญของเซลล์ hybridoma
โดยพบว่า NaHCO_3 ที่มีความเข้มข้น 10 mM ซึ่งปรับ pH ด้วย HCl ให้มี pH เท่ากับ 7.4 ใน
CU1-CU3 ไม่มีการเจริญของเซลล์ hybridoma เลย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaHCO_3
เป็น 24 mM ใน CU4 พบว่ามีการเจริญของเซลล์ hybridoma และการเติม HEPES 20 mM
ลงไปด้วยจะให้ผลการทดลองดีขึ้น ในทำนองเดียวกันชนิดของ serum supplemented ที่
เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ serum 2 ชนิด คือ fetal bovine
serum (FBS) และ fetal calf serum (FCS) เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยใน CU1-
CU3 ใช้ FBS แต่ CU4-CU8 จะใช้ FCS พบว่าการเติม FCS ทำให้เซลล์ hybridoma
เจริญขึ้นมาได้ และสำหรับการชักนำให้เกิดการเชื่อมเซลล์ด้วย PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน
โดยใน CU1 และ CU2 ใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,500 ส่วน CU3-CU8 ใช้ PEG ที่มีน้ำ
หนักโมเลกุล 4,000 พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน

จากตารางที่ 8 ซึ่งได้แสดงผลของจำนวนเซลล์และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ myeloma
กับ immune spleen cell ที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้ง พบว่าการเปลี่ยนอัตราส่วน

การเชื่อมเซลล์ในการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้งไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ hybridoma แต่พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเชื่อมเซลล์เท่ากับ 1:4 และ 1:5 ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองของการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4-8 (CU4-CU8) ตารางที่ 8 จำนวนของ fused cell และ feeder cell ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงซึ่งแสดงในตารางที่ 9 มีผลต่อการเกิด hybridoma โดยพบว่าถ้าจำนวนของ fused cell ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์มีมาก จะทำให้ได้จำนวนของ hybridoma เพิ่มขึ้นตัวอย่างเช่น CU4, CU7, CU8 ในขณะที่จำนวน feeder cell ต่อหลุมไม่มีผลต่อการเกิด hybridoma นอกจากนี้พบว่าถ้าเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์ทั้ง 3 ชนิดต่ำกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ไม่เกิดเซลล์ hybridoma

จากการเปรียบเทียบ เปอร์เซ็นต์ของจำนวนหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่พบเซลล์ hybridoma พบว่าการเชื่อมเซลล์ครั้งที่เกิดเซลล์ hybridoma เป็นจำนวนมากที่สุด ได้แก่ CU7 รองลงมาคือ CU8, CU4, CU6 และ CU5 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

2. ผลการทดสอบ hybridoma ที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ P. falciparum ด้วยวิธี IFA

ผลจากการทดสอบแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มี hybridoma ที่ผลิตได้ ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าการเชื่อมเซลล์ครั้งที่จำนวนหลุมของ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดีมากที่สุดได้แก่ CU8 (42.4%) และรองลงมา คือ CU7 (11.5%), CU6 (6.5%) และ CU4 (3.3%) สำหรับการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 5 (CU 5) ไม่พบว่ามี hybridoma จากหลุมใดผลิตแอนติบอดีเลย

3. ผลการคัดเลือก clone ของ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดี

ในตารางที่ 11 แสดง clone ของ hybridoma ซึ่งแยกได้จากการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้งและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเก็บไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ clone จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4 (CU4) มี 2 clone สำหรับ CU6, CU7 และ CU8 ได้ clone ของ

hybridoma เท่ากับ 2, 5 และ 4 ตามลำดับ หลังจากทำ cloning ครั้งที่ 1 และ recloning อีก 1 ครั้ง แล้วได้ monoclonal ที่เก็บไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์ต่อไป ดังเช่น monoclonal ของ CU4.1 จาก 1st cloning ได้ 2 monoclonal คือ CU4.1-1 และ CU4.1-2 ส่วน 2nd cloning ได้ monoclonal ทั้งหมด 5 monoclonal คือ CU4.1-1-1, CU4.1-2-1, CU4.1-2-2, CU4.1-2-3 และ CU4.1-2-4 สำหรับ monoclonal จาก CU4.2, CU6.1, CU6.2, CU7.1, CU7.2, CU7.3, CU7.4, CU7.5, CU8.1, CU8.2, CU8.3 และ CU8.4 สามารถแยกและเก็บไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 11

ผลจากการตรวจหา ปริมาณของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ monoclonal ที่เก็บไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์ พบว่ามีปริมาณของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันเป็น 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250 และ 1:6250 และปริมาณของแอนติบอดีใน ascitic fluid แตกต่างเป็น 1:250, 1:1250, 1:6250 และ 1:31250 (ตารางที่ 14 ในภาคผนวก ค หน้า 101)

4. ผลการจำแนกกลุ่มของ MAb ที่ผลิตได้

รูปที่ 10 และ 11 แสดงภาพถ่ายของเชื้อ P. falciparum ที่ย้อมด้วยสีอิมมูโน ในภาพแสดงรูปร่างและโครงสร้างของเชื้อที่เจริญในระยะ ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte ที่เจริญอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง บริเวณที่ติดสีม่วงเข้มเป็นจุดกลมแสดงนิวเคลียสส่วนบริเวณที่เป็นไซโทพลาสซึมของเชื้อติดสีม่วงจางกว่า เชื้อในระยะ schizont และ merozoite พบจุดสีดำชัดเจนภายในเซลล์ จุดดังกล่าวเป็นรงควัตถุของเชื้อมาลาเรียหรือ residual body เชื้อมาลาเรียในแต่ละระยะมีรูปร่างแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 11 รูปร่างและลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เห็นโดยการย้อมด้วยสีอิมมูโนจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับลักษณะการติดสีสารเรืองแสงโดยปฏิกิริยา IFA ที่ใช้ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติเจนของเชื้อในระยะต่างๆกับแอนติบอดีจาก monoclonal ที่นำมาทดสอบ เพื่อจำแนกกลุ่มของ MAb เป็นจำนวน 22 monoclonal

ผลการจำแนกกลุ่มของ MAb ที่ผลิตได้ โดยใช้หลักการแสดงความจำเพาะของ MAb ต่อระยะการเจริญของเชื้อ และรูปแบบการติดสีสารเรืองแสงได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งพบว่า MAb กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อที่อยู่ในระยะ schizont และ merozoite เท่านั้น ส่วน MAb กลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ทำปฏิกิริยากับเชื้อทุกระยะการเจริญในเม็ดเลือดแดง รวมทั้งระยะ gametocyte ของเชื้อมาลาเรียไอโซเลต MMS15

ผลการศึกษารูปแบบการติดสีสารเรืองแสงโดยวิธี IFA พบว่ามีลักษณะรูปแบบแตกต่างกันระหว่างแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 12) โดย MAb กลุ่มที่ 1 เป็น monoclonal ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4 ได้แก่ CU4.1-2 และ CU4.2-1 ติดสีสารเรืองแสงเฉพาะ rhoptry organelle ซึ่งเป็น organelle ที่พบในระยะ schizont และ merozoite ดังแสดงในรูปที่ 9 ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็น monoclonal ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 6 (CU6.1-1, CU6.1-1-1, CU6.1-3-1 และ CU 6.1-4) ติดสีสารเรืองแสงที่ผิวเซลล์ของเชื้อที่เจริญในระยะ schizont และ merozoite ที่อยู่ภายในเซลล์ schizont (intraschizont merozoite) ทำให้เห็นการเรืองแสงมีลักษณะคล้ายพวงอุ้งน (รูปที่ 12) กลุ่มที่ 3 เป็น monoclonal ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 6 และ 8 ได้แก่ CU6.2, CU6.2-1, CU6.2-2, CU6.2-3 และ CU8.1-4 ติดสีสารเรืองแสงเป็นจุดเล็กๆที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และบริเวณไซโตพลาสซึมของเชื้อ (รูปที่ 13) กลุ่มที่ 4 เป็น monoclonal ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 7 (CU7.3-1-1, CU7.3-2-1, CU7.4 และ CU7.4-3) ติดสีสารเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสซึมของเชื้อ (รูปที่ 14) กลุ่มที่ 5 เป็น monoclonal ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 7 (CU7.5-2, CU7.5-3, CU7.5-4) ติดสีสารเรืองแสงที่เยื่อหุ้มของ parasitophorus vacuole (parasitophorus vacuole membrane) ดังแสดงในรูปที่ 15 และ 16 โดยมีรายละเอียดและเทียบได้กับภาพวาดในรูปที่ 9 สำหรับกลุ่มที่ 6 เป็น monoclonal ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 8 ได้แก่ CU8.4-1, CU8.4-2-1, CU8.4-3-2, CU8.4-4-1 ติดสีสารเรืองแสงที่ไซโตพลาสซึมและผิวเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย (รูปที่ 17-20)

5. การทดสอบความหลากหลายของแอนติเจนจากเชื้อ *P. falciparum* ไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทย กับ MAb ที่ผลิตได้

ผลจากการทดสอบความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 18 ไอโซเลตด้วย MAb กลุ่มต่างๆที่ได้จำแนกไว้ โดยคัดเลือก MAb มาใช้ทดสอบทั้งหมด 18 monoclonal จาก MAb ทั้งหมด 5 กลุ่ม (ยกเว้นกลุ่มที่ 1) พบว่า MAb ทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 ซึ่งใช้เป็น control สำหรับการอ่านผลของปฏิกิริยาของ MAb แต่ละกลุ่มกับไอโซเลตของเชื้อมาลาเรีย (ตารางที่ 13) พบว่าให้ผลแตกต่างกัน โดย MAb กลุ่มที่ 2 ได้แก่ CU6.1-1, CU6.1-3-1 และ CU6.1-4-1 ทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียได้เพียง 3 ไอโซเลตคือ MMS3, MMS20 และ MMS33 ในขณะที่ MAb กลุ่มที่ 3 คือ CU6.2-1, CU6.2-2, CU6.2-3 และ CU8.1-5 ทำปฏิกิริยากับเชื้อได้ 11 ไอโซเลต ได้แก่ MMS20, BR14, MBR93, MBR94, TM335R, MMS1, MMS14, MBR27, MMS24, MMS15 และ MMS21 ส่วน MAb:CU 7.3-1-1, CU 7.3-2-1, CU 7.4, และ CU 7.4-3 (กลุ่มที่ 4) ทำปฏิกิริยากับเชื้อได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต โดย 5 ไอโซเลต คือ MMS33, MBR27, MMS24, MMS4 และ MMS23 ให้ผลการตีตราเรืองแสงมีความเข้มปานกลาง ในขณะที่เชื้อมาลาเรียอีก 7 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ BR14, MBR93, MBR94, TM335R, MMS1, MMS14 และ BR12 ตีตราเรืองแสงที่มีความเข้มของการเรืองแสงมาก ส่วน MAb:CU7.5-2, CU7.5-3, CU7.5-4 ซึ่งเป็น MAb ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 5 สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียเกือบทุกไอโซเลต ยกเว้นกับไอโซเลต MMS10 ซึ่งไม่พบปฏิกิริยา IFA เลย สำหรับ MAb:CU8.4-1, CU8.4-2-1, CU8.4-3-2 และ CU8.4-4-1 (กลุ่มที่ 6) ทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียทั้ง 18 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ จากผลที่เชื้อมาลาเรียทั้ง 18 ไอโซเลตแสดงปฏิกิริยาจำเพาะกับ MAb ได้แตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย 18 ไอโซเลตนี้เป็น 10 ไทป์ (type) (antigenic type I-X) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์และชนิดของ serum supplemented ในอาหารเลี้ยงเซลล์ hybridoma

Fusion No.	Buffer	pH media	serum supplemented	%Hybridoma growing wells
CU 1	10mM NaHCO ₃	7.4	fetal bovine serum	0*
CU 2	"	7.4	"	0**
CU 3	"	7.4	"	0**
CU 4	24mM NaHCO ₃	7.3	fetal calf serum	21.4 (82/384)
CU 5	25mM NaHCO ₃ +20mM HEPES	7.2	"	15.8 (125/790)
CU 6	"	"	"	17.0 (114/672)
CU 7	"	"	"	53.7 (393/732)
CU 8	"	"	"	32.3 (310/960)

หมายเหตุ: * contaminated โดยแบคทีเรียภายในหลังจากทำ fusion แล้ว 4-5 วัน

** มีการเจริญของเซลล์ fibroblast เกิดขึ้นอย่างหนาแน่น หลังจากทำ fusion แล้ว 10 วัน

CU1และCU2 ทำการเชื่อมเซลล์โดยใช้ PEG ที่มี MW. 1500

CU3-CU8 ทำการเชื่อมเซลล์โดยใช้ PEG ที่มี MW. 4000

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนเซลล์และอัตราส่วนการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ myeloma และ immune spleen ในการทดลองเชื่อมเซลล์ 8 ครั้ง

Fusion No.	Number of cells		Fusion ratio	%Hybridoma growing wells
	Myelomas	Immune Spleen	Myelomas:Immune Spleen	
CU 1	2.0×10^7	1.0×10^8	1:5	0*
CU 2	3.2×10^7	6.9×10^7	1:2	0**
CU 3	5.7×10^7	3.0×10^8	1:10	0**
CU 4	1.0×10^7	4.2×10^7	1:4	21.4 (82/384)
CU 5	1.3×10^7	6.6×10^7	1:5	15.8 (125/790)
CU 6	1.5×10^7	5.5×10^7	1:4	17.0 (114/672)
CU 7	1.5×10^7	7.2×10^7	1:5	53.7 (393/732)
CU 8	3.2×10^7	1.6×10^8	1:5	32.3 (310/960)

หมายเหตุ: * contaminated โดยแบคทีเรียภายในหลังจากทำ fusion แล้ว 4-5 วัน

** มีการเจริญของเซลล์ fibroblast เกิดขึ้นอย่างหนาแน่น หลังจากทำ fusion แล้ว 10 วัน :

ตารางที่ 9 ผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตต่อการเกิด hybridoma ในการ
เชื่อมเซลล์แต่ละครั้ง

Fusion No.	Number of cells per well (100 μ l) $\times 10^5$			% Cell viability			%Hybridoma growing wells
	fused cells	feeder cells	Total	Myelomas	Immuned spleen	feeder	
CU 1	1.4	3.2	4.6	81.25	82.4	81.0	0*
CU 2	2.0	0.7	2.7	78.7	71.5	74.5	0**
CU 3	6.1	0.7	6.8	65.9	70.5	64.9	0**
CU 4	1.3	0.7	2.0	85.0	87.2	89.4	21.4
CU 5	0.6	0.3	0.9	93.8	89.0	95.3	15.8
CU 6	1.0	0.7	1.7	90.8	99.0	90.0	17.0
CU 7	1.1	0.3	1.4	88.0	87.5	83.0	53.7
CU 8	1.0	2.3	3.3	89.3	88.0	85.1	32.3

หมายเหตุ: * contaminated โดยแบคทีเรียภายในหลังจากทำ fusion แล้ว 4-5 วัน

** มีการเจริญของเซลล์ fibroblast เกิดขึ้นอย่างหนาแน่น หลังจากทำ
fusion แล้ว 10 วัน

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่พบ
เซลล์ hybridoma และที่ผลิตแอนติบอดี

Fusion No.	Total no. of culture wells	%Hybridomas growing wells	Total no. of screening wells	% Antibody producing wells
CU 4	384	21.4 (82/384)	60	3.3 (2/60)
CU 5	790	15.8 (125/790)	80	0 (0/80)
CU 6	672	17.0 (114/672)	77	6.5 (5/77)
CU 7	732	53.7 (393/732)	358	11.5 (41/358)
CU 8	960	32.3 (310/960)	304	42.4 (129/304)

ตารางที่ 11 Monoclonal ของ hybridoma ที่ได้จากการทำ single cell cloning
ซึ่งได้คัดเลือกไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์

Fusion No.	monoclonal from fusion	monoclonal from 1st cloning	monoclonal from 2nd cloning
CU 4	CU 4.1 [*]	CU 4.1-1 [*]	CU 4.1-1-1 [*]
		CU 4.1-2 [*]	CU 4.1-2-1 [*]
			CU 4.1-2-2 [*]
			CU 4.1-2-3 [*]
			CU 4.1-2-4 [*]
	CU 4.2 [*]	CU 4.2-1 [*]	CU 4.2-1-1 [*]
			CU 4.2-1-3 [*]
			CU 4.2-1-4 [*]
CU 6	CU 6.1	CU 6.1-1	CU 6.1-1-1
			CU 6.1-1-3
	CU 6.1-2		CU 6.1-2-1
			CU 6.1-2-2

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Fusion No.	monoclonal from fusion	monoclonal from 1st cloning	monoclonal from 2nd cloning
CU 7		CU 6.1-3	
		CU 6.1-4	CU 6.1-3-1 CU 6.1-3-2
		CU 6.2	CU 6.1-4-1 CU 6.1-4-2 CU 6.1-4-3
		CU 7.1 [*]	CU 6.2-1 CU 6.2-2 CU 6.2-3 CU 6.2-4
		CU 7.2 [*]	CU 7.1-1 [*]
		CU 7.3	CU 7.2-1 [*]
		CU 7.3-1	CU 7.3-1-1

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Fusion No.	monoclonal from fusion	monoclonal from 1st cloning	monoclonal from 2nd cloning
CU 8		CU 7.3-2	CU 7.3-2-1
	CU 7.4		
		CU 7.4-3	
	CU 7.5		
		CU 7.5-1	
		CU 7.5-2	
		CU 7.5-3	
		CU 7.5-4	
		CU 8.1	
			CU 8.1-4
			CU 8.1-5
			CU 8.1-6
			CU 8.1-7
		CU 8.2 [#]	
		CU 8.3 [#]	
			CU 8.3-1 [#]
		CU 8.3-2 [#]	
	CU 8.4		
		CU 8.4-1	
			CU 8.4-1-1

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Fusion No.	monoclonal from fusion	monoclonal from 1st cloning	monoclonal from 2nd cloning
		CU 8.4-2	CU 8.4-2-1 CU 8.4-2-2
		CU 8.4-3	CU 8.4-3-1 CU 8.4-3-2 CU 8.4-3-3
		CU 8.4-4	CU 8.4-4-1 CU 8.4-4-2
		CU 8.4-6	

หมายเหตุ * Monoclonal ที่หยุดการสร้างแอนติบอดีหลังจากเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานาน

CU.. คือรหัสที่ใช้แทน hybridoma แต่ละ clone เป็นคำย่อของคำว่า Chulalongkorn University ตัวเลขที่ตามหลัง CU คือครั้งที่ทำการเชื่อมเซลล์ ตัวเลขถัดมาแสดงลำดับที่ของ monoclonal ครั้งแรก และตามด้วยตัวเลขแสดงลำดับที่ของ monoclonal ครั้งที่สอง



ตารางที่ 12 การจัดกลุ่ม MAb ที่ผลิตได้ โดยทดสอบด้วยวิธี IFA

Group	MAbs	Stage of <u>P. falciparum</u>	IFA pattern
1	CU 4.1-2	schizont และ merozoite	คิดสารเรืองแสงที่ rhoptry organelle ภายในไซโตพลาสซึมของเชื้อในระยะ schizont และ merozoite
	CU 4.2-1	schizont และ merozoite	
2	CU 6.1-1	schizont และ merozoite	คิดสารเรืองแสงที่บริเวณผิวของเชื้อในระยะ schizont และ merozoite ที่ยังอยู่ภายในเม็ดเลือดแดง ทำให้เห็นรูปแบบการเรืองแสงมีลักษณะคล้ายพวงอุ้งน
	CU 6.1-1-1	schizont และ merozoite	
	CU 6.1-3-1	schizont และ merozoite	
	CU 6.1-4	schizont และ merozoite	
3	CU 6.2	schizont และ merozoite	มีลักษณะการคิดสารเรืองแสงเข้มเป็นจุดเล็กๆ ที่บริเวณผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และเรืองแสงปานกลางที่บริเวณไซโตพลาสซึมของเชื้อ
	CU 6.2-1	schizont และ merozoite	
	CU 6.2-2	schizont และ merozoite	
	CU 6.2-3	schizont และ merozoite	
	CU 8.1-5	schizont และ merozoite	
4	CU 7.3-1-1	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	คิดสารเรืองแสงทั่วไปที่บริเวณไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย
	CU 7.3-2-1	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	
	CU 7.4	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	
	CU 7.4-3	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Group	MAbs	Stage of <u>P. falciparum</u>	IFA pattern
5	CU 7.5-2	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	ติดสารเรืองแสงตรงบริเวณ parasitophorus membrane ของเชื้อกะระอะ
	CU 7.5-3	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	
	CU 7.5-4	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	
6	CU 8.4-1	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	ติดสารเรืองแสงทั่วไปภายในไซโตพลาสซึม และที่ผิวเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย
	CU 8.4-2-1	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	
	CU 8.4-3-2	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	
	CU 8.4-4-1	ring, trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte	

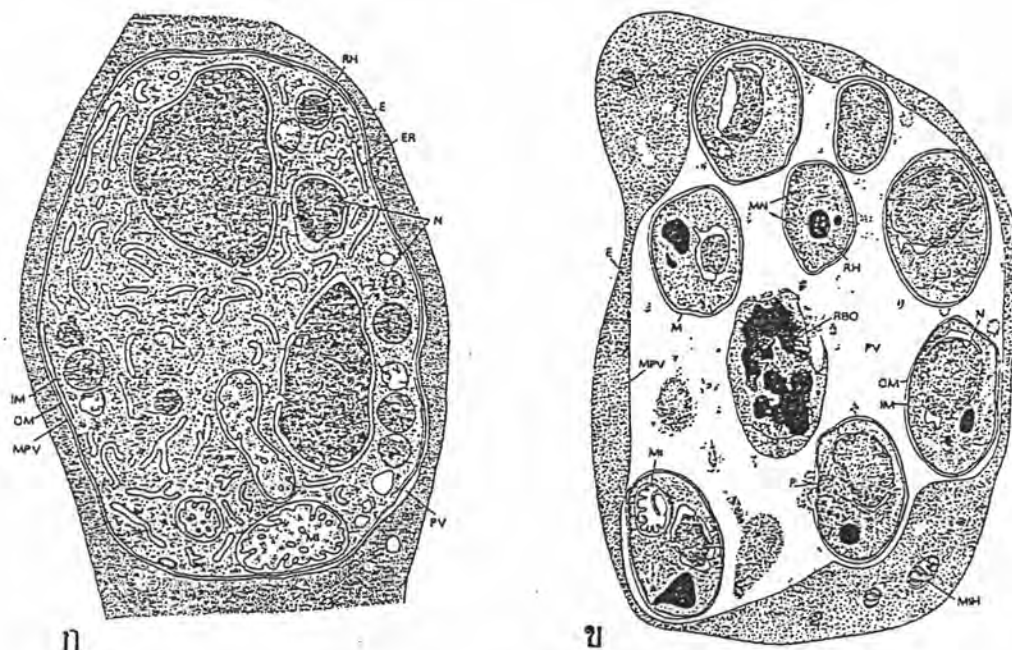
หมายเหตุ MAb กลุ่มที่ 1 ได้ทำการทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์ T9/94 S300.300
 MAb กลุ่มที่ 2-6 ได้ทำการทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 และ
 ไอโซเลต MMS15

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทยกับ MAb ที่ผลิตได้

Group	MAbs	Isolate of <u>P. falciparum</u>																	clone	
		MMS3	MMS33	MMS20	BR14	MBR93	MBR94	TM335R	MMS1	MMS14	BR12	MBR27	MMS24	MMS15	MMS21	MMS4	MMS23	MBR24	MMS10	T9/94 (M1-1)b3
2	CU 6.1-1	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■
	CU 6.1-3-1	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■
	CU 6.1-4-1	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■
3	CU 6.2-1	□	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	■
	CU 6.2-2	□	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	■
	CU 6.2-3	□	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	■
4	CU 8.1-5	□	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	■
	CU 7.3-1-1	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□	□	■
	CU 7.3-2-1	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□	□	■
	CU 7.4	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□	□	■
5	CU 7.4-3	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□	□	■
	CU 7.5-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■
	CU 7.5-3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■
	CU 7.5-4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■
6	CU 8.4-1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	CU 8.4-2-1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	CU 8.4-3-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	CU 8.4-4-1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Antigenic Type	I	II	III	IV					V	VI		VII		VIII		IX	X			

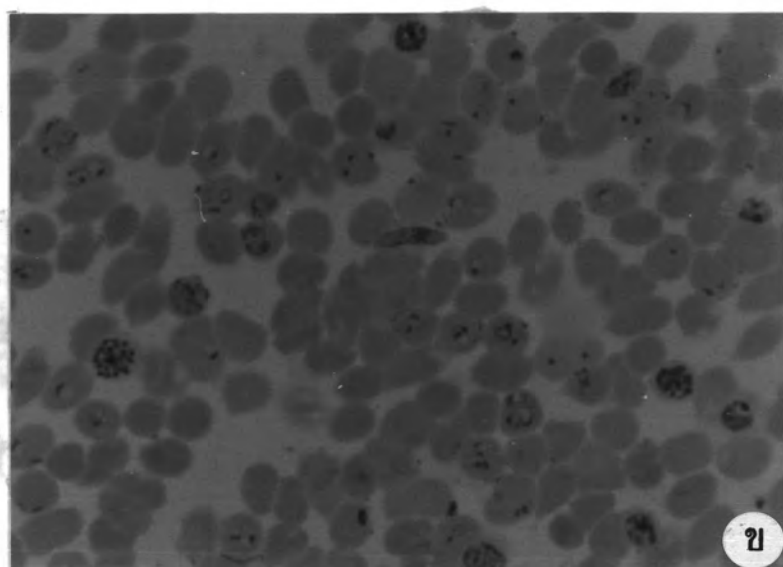
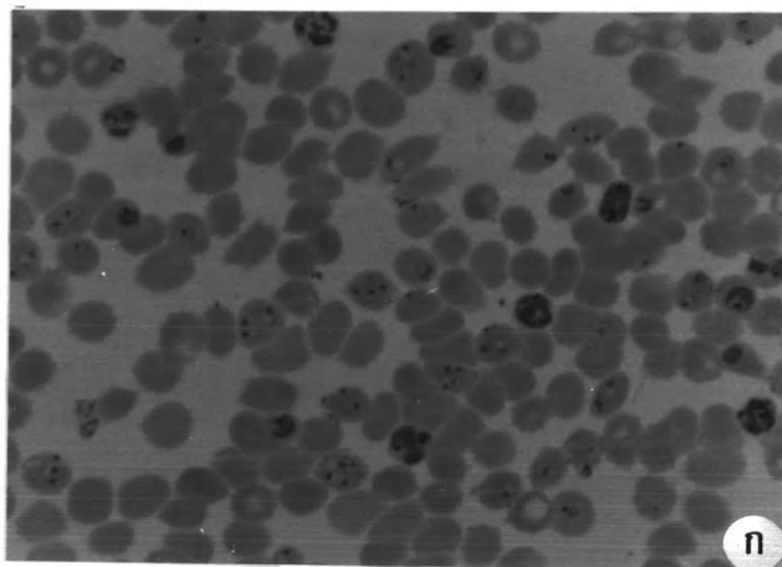
หมายเหตุ: ■ หมายถึงการเรืองแสงที่มีความเข้มมาก, ▣ หมายถึงการเรืองแสงที่มีความเข้มปานกลาง, □ หมายถึงไม่พบการเรืองแสง

P. falciparum สายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 ใช้เป็น control สำหรับเปรียบเทียบ



รูปที่ 9 ภาพวาดแสดงรายละเอียดของเชื้อ Plasmodium spp. (ก) ระยะ schizont และ (ข) ระยะ merozoite (Scholtyseck, 1979)

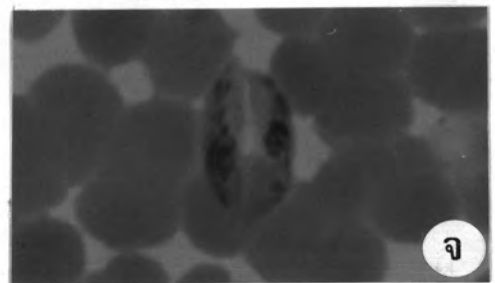
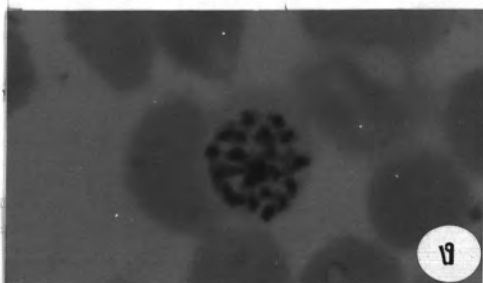
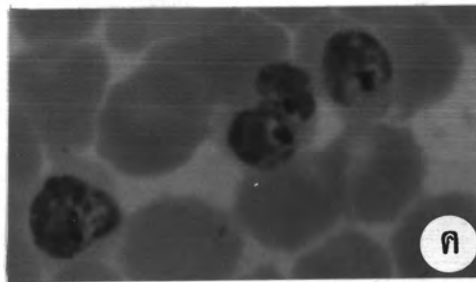
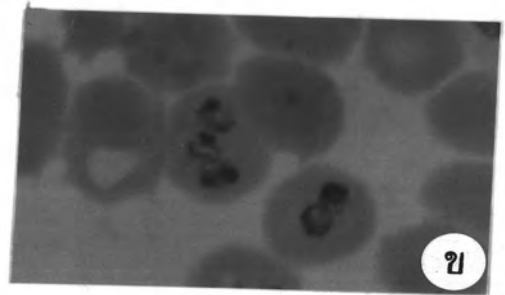
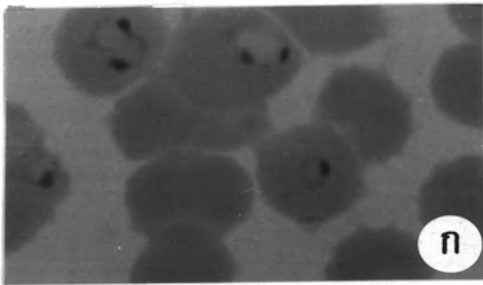
(E=erythrocyte, ER=endoplasmic reticulum, IM=inner membranous complex, M=merozoite, MI=mitochondrion, MIH=host cell mitochondrion, MPV=membrane of parasitophorous vacuole, N=nucleus, OM=outer membrane, PV=parasitophorous vacuole, RBO=residual body, RH=rhoptries)



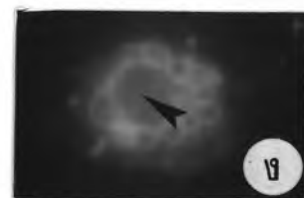
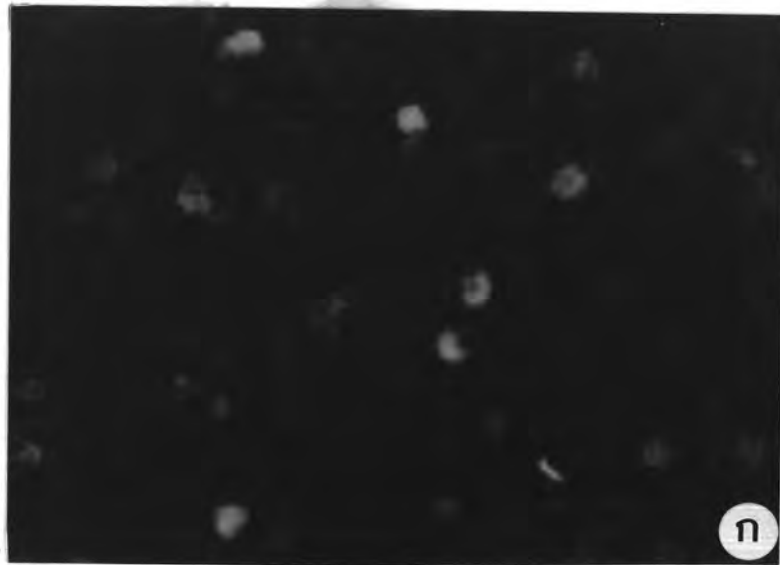
รูปที่ 10 ภาพถ่ายเชื้อ P. falciparum ที่ย้อมด้วยสีอิมซ้า

หมายเหตุ: ก) เชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3, ข) เชื้อไอโซเลต HMS15

(กำลังขยาย 880x)



รูปที่ 11 ระยะเวลาต่างๆของเชื้อ P. falciparum ที่เจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงของคน
 หมายถึง: ก) ระยะ ring, ข) ระยะ trophozoite, ค) ระยะ schizont,
 ง) ระยะ merozoite และ จ) ระยะ gametocyte (กำลังขยาย 2,200x)



รูปที่ 12 รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 2 ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ P. falciparum สายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 ในระยะ schizont และ merozoite

หมายเหตุ: ข) แสดงระยะ schizont, ค) และ ง) แสดงระยะ merozoite ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ schizont มีการเรืองแสงบริเวณผิวของ merozoite แต่ละเซลล์ ทำให้เห็นมีลักษณะคล้ายกับพวงองุ่น

หัวลูกศรชี้ คือ residual body ภายในเซลล์ของเชื้อ

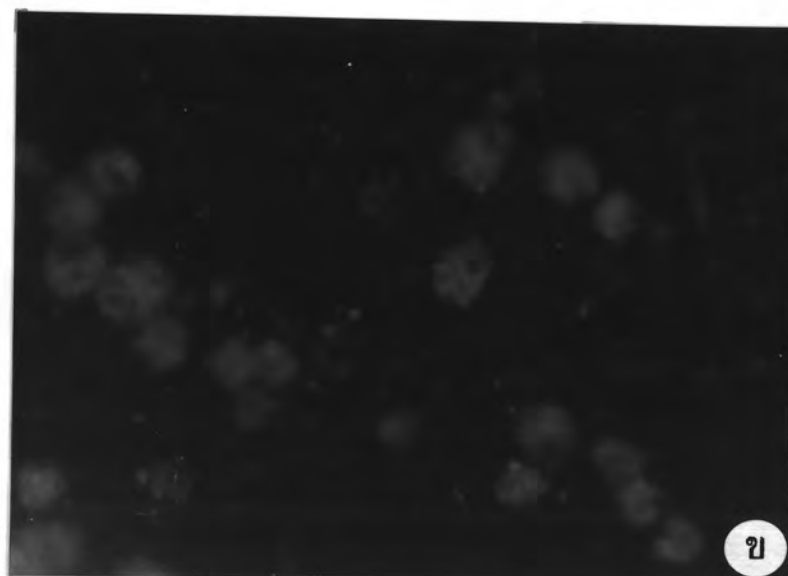
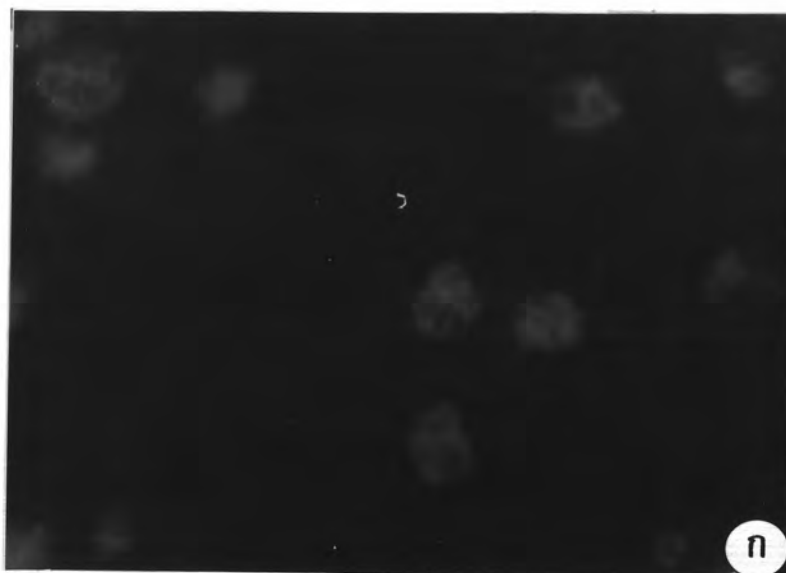
ภาพ ก) กำลังขยาย 880x

ภาพ ข), ค), ง) กำลังขยาย 2,200x



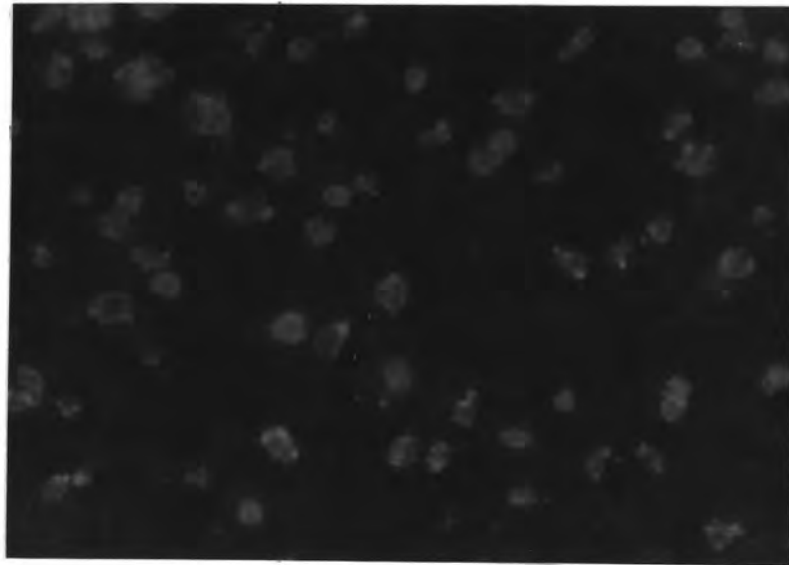
รูปที่ 13 รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 3 ทำปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 มีความจำเพาะกับเชื้อที่เจริญในระยะ schizont และ merozoite

หมายเหตุ: แสดงการติดสีสารเรืองแสงเป็นจุดเล็กๆที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและเรืองแสงเข้มปานกลางที่ไซโตพลาสซึมของเชื้อ (ภาพ ก) กำลังขยาย 880x, ภาพ ข) กำลังขยาย 2,200x)

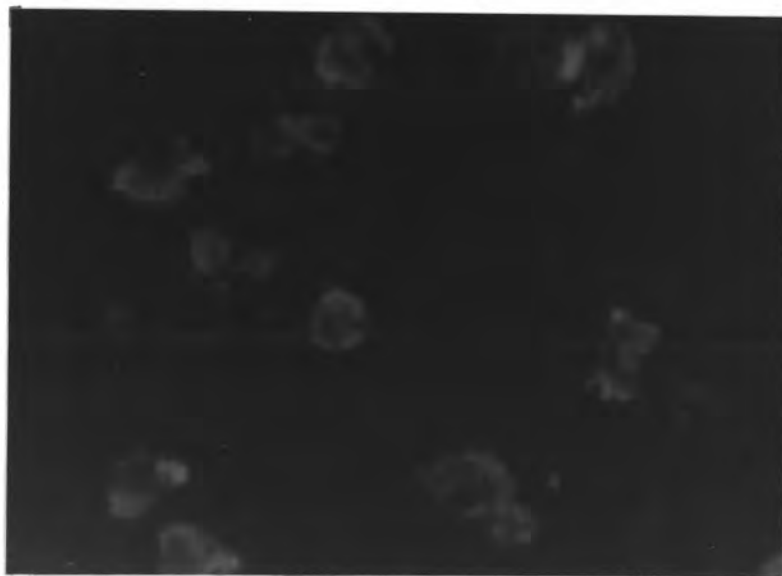


รูปที่ 14 ก) และ ข) รูปแบบการติดสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 4 ซึ่งติดสารเรืองแสงทั่วไปที่ไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย

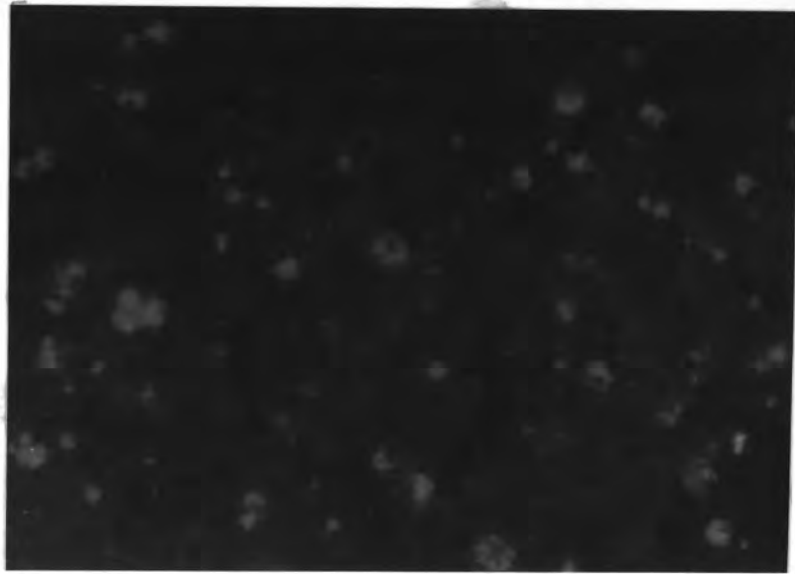
หมายเหตุ: จุดสีเขียวเล็กๆที่กระจายอยู่ทั่วไปในรูป ข เป็น background ของ FITC จากการย้อมสไลด์ด้วยวิธี IFA (กำลังขยาย 2,200x)



รูปที่ 15 รูปแบบการติดสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 5 ทำปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 มีความจำเพาะต่อเชื้อทุกระยะการเจริญ (กำลังขยาย 880x)

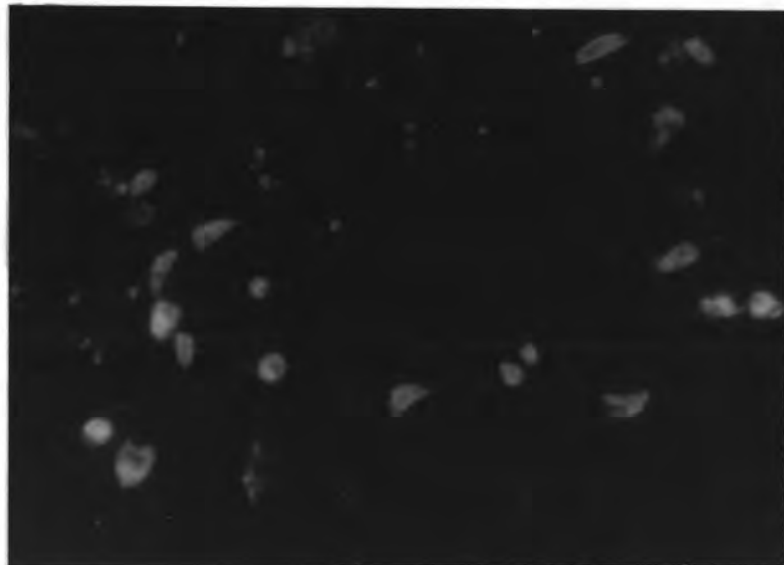


รูปที่ 16 ภาพขยายใหญ่ของรูปที่ 15 แสดงการติดสารเรืองแสงบริเวณเชื้อหุ้ม parasitophorous vacuole ของเชื้อ (กำลังขยาย 2200x)

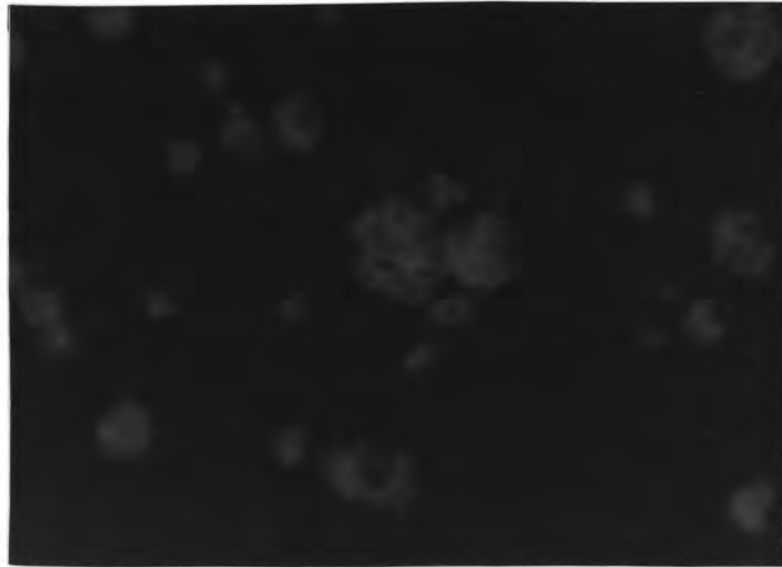


รูปที่ 17 รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 6 ทำปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์
T9/94(M1-1)b3 (กำลังขยาย 880x)

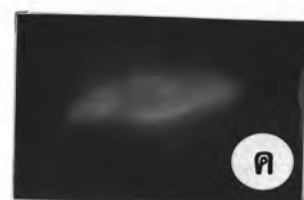
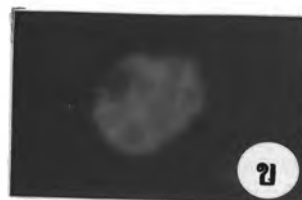
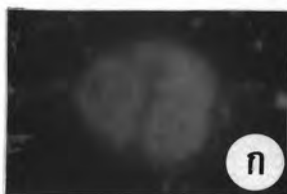
หมายเหตุ: background ที่เห็นมีสีแดงในภาพเกิดขึ้นเนื่องจากการย้อมครั้งที่ 2 ด้วยสี
Evans blue



รูปที่ 18 รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 6 ทำปฏิกิริยากับ gametocyte
ของเชื้อมาลาเรียไอโซเลต MMS15 (กำลังขยาย 880x)



รูปที่ 19 ภาพขยายรูปที่ 17 แสดงการติดสีสารเรืองแสงทั้งที่ผิวเซลล์และไซโตพลาสซึมของเชื้อมาลาเรีย (กำลังขยาย 2,200x)



รูปที่ 20 รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 6
 หมายเหตุ: ก) ระยะ schizont ในภาพสามารถเห็นเชื้อ 3 เซลล์อยู่ภายในเม็ดเลือดเดียวกัน, ข) ระยะ merozoite ที่อยู่ภายในเซลล์ schizont และ ค) ระยะ gametocyte มีการเรืองแสงทั้งที่เชื้อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึม (กำลังขยาย 2,200x)