# เอกสารอ้างอิง


ภาษาไทย

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง, วิทยาภูมิคุ้มกัน (ประพันธ์ ภานุภาค บรรณาธิการ), หน้า 25-49, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 2527.

ภาษาต่างประเทศ

Andrysiak, P.M., W.E. Collins, and G.H. Campbell, "Stage-Specific and Species-Specific Antigens of Plasmodium vivax and Plasmodium ovale Defined by Monoclonal Antibodies," Infect. Immun., 54(3), 609-612, 1986.

Barski, G., S. Sorieul, and Fr. Cornefert, "Hybrid Type Cells in Combined Cultures of Two Different Mammalian Cell Strains," Natl. Cancer Inst. J., 26, 1269-1291, 1961.

Burnet, F.M., The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, pp. 10-15, Cambridge University Press, London, 1959.

Ceccarini, C., and H. Eagle, "pH as a Determinant of Cellular Growth and Contact Inhibition," Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 1, 229-303, 1971.

Cotton, R.G.H., C. Milstein, "Fusion of the Two Immunoglobulin-producing Myeloma Cells," Nature, 244, 42-43, 1973.

Dame, J.B., J.L. Williams, T.F. McCutchan, J.L. Weber, R.A. Wirtz, W.T. Hockmeyer, W.L. Maloy, J.D. Haynes, I. Schneider, D. Roberts, G.S. Sanders, E.P. Reddy, C.L. Diggs, and L.H. Miller, "Structure of the Gene Encoding the Immunodominant Surface Antigen on the Sporozoite of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum," Science, 225, 593-599, 1984.

Eagle, H., "Buffer Combinations for Mammalian Cell Culture," Science, 174, 500-505, 1971.

Enea, V., J. Ellis, F. Zavala, D.E. Arnot, A. Asavanich, A. Masuda, I. Quakyi, and R.S. Nussenzweig, "DNA Cloning of Plasmodium falciparum Circumsporozoite Gene : Amino Acid Sequence of Repetitive Epitope," Science, 225, 628-630, 1984.

Freeman, R.R., A.J. Trejdosiewicz, and G.A.M. Cross, "Protective Monoclonal Antibodies Recognising Stage-Specific Merozoite Antigens of a Rodent Malaria Parasite," Nature, 284, 366-368, 1980.

Galfre, G., S.C. Howe, C. Milstein, G.W. Butcher, and J.C. Howard, "Antibodies to Major Histocompatibility Antigens Produced by Hybrid Cell Lines," Nature, 266, 550-552, 1977.

Goding, J.W., Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, pp. 5-55, Academic Press Limited, London, 1988.

Goodman, J.W., Basic and Clinical Immunology (Stites, D.P., J.D. Stobo, H.H. Fudenberg, and J.V. Wells eds.), pp. 30-42, Lange Medical Publications, U.S.A., 5th ed., 1984.

Hall, R., J. McBride, G. Morgan, A. Tait, J.W. Zolg, D. Walliker, and J. Scaife, "Antigens of the Erythrocytic Stages of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum Detected by Monoclonal Antibodies," Mol. Biochem. Parasitol., 7, 247-265, 1983.

Harlow, Ed., D. Lane, Antibodies a Laboratory Manual, pp. 139-242, Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A, 1988.

Herscowitz, I.H., Immunology Basic Processes (Bellanti, J.A. ed.), pp. 15-17, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1979.

Holder, A., and R.R. Freeman, "Immunization against Blood-Stage Rodent Malaria Using Purified Parasite Antigen," Nature, 294, 361-364, 1981.

Horibata, K., and A.W. Harris, "Mouse Myelomas and Lymphomas in Culture," Exp. Cell Res., 60, 61-77, 1970.

Khusmith, S., S. Tharavanij, J. Patarapotikul, and D. Koonrangsesom boon, "Characterisation of Monoclonal Antibodies Against Blood Forms of Plasmodium falciparum by the Immunofluorescent assay," Asian Pacific J. Allergy Immunol., 2(1), 91-95, 1984.

_____, S. Tharavanij, J. Patarapotikul, R. Kasemsuth, and D. Bunnag, "Solid Phase Radioimmunoassay for Detection of Malaria Antigen," Nuclear Medicine and Related Radionuclide Applications in Developing Countries (Flitton, S. ed.), pp. 123-134, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1986.

_____, S. Tharavanij, M. Chongsanguan, P. Tapchaisri, A. Sabcharion, and D. Bunnag, "Human Monoclonal Anti-Plasmodium falciparum Antibodies Produced by Stable EBV-Transformed Lymphocytes from Patients with Falciparum Malaria," Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 18(1), 24-32, 1987a.

Khusmith, S., S. Tharavanij, R. Kasemsuth, C. Vejvongvarn, and D. Bunnag, "Two-Site Immunoradiometric Assay for Detection of Plasmodium falciparum Antigen in Blood Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies," J. Clin. Microbiol., 25(8), 1467-1471, 1987b.

_____, S. Tharavanij, M. Chongsanguan, C. Vejvongvarn, and R. Kasemsuth, "Field Applications of an Immunoradiometric Assay for the Detection of Plasmodium falciparum Antigen in a Population in a Malaria-Endemic Area in Thailand," Am. J. Trop. Med. Hyg.", 38(1), 3-6, 1988.

Kimball, J.W., Introduction to Immunology, pp. 157-159, Macmillan Publishing Co., New York, 1983.

Köhler, G., and C. Milstein, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," Nature, 256, 495-500, 1975.

_____, S.C. Howe, and C. Milstein, "Fusion between Immunoglobulin-Secreting and Nonsecreting Myeloma Cell Lines," Eur. J. Immunol., 6, 292-295, 1976.

Lopes, S.D., and M.J.M. Alves, Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual (Morel, L.M. ed.), pp. 149-431, McGraw-Hill Book Co., New York, 2nd ed., 1984.

Littlefield, J.W., "Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants," Science, 145, 709-710, 1964.

McBride, J.S., D. Walliker, and G. Morgan, "Antigenic Diversity in the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum," Science, 217, 254-257, 1982.

McBride, J.S., P.D. Welsby, and D. Walliker, "Serotyping Plasmodium falciparum from Acute Human Infections Using Monoclonal Antibodies," Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78, 32-34, 1984.

Milstein, C., "Monoclonal Antibodies," Scientific American, 243(4), 66-74, 1980.

Mishell, B.B., S.M. Shiigi, C. Henry, E.L. Chan, J. North, R. Gallily, M. Slomich, K. Miller, J. Marbrook, D. Parks, and A.H. Good, Selected Methods in Cellular Immunology (Mishell, B.B., and S. M. Shiigi eds.), pp. 14-16, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.

Nardin, E.H. and R.S. Nussenzweig, "Stage-Specific Antigens on the Surface Membrane of Sporozoites of Malaria Parasites," Nature, 274, 55-57, 1978.

———, R.S. Nussenzweig, and R. Gwadz, "Characterization of Sporozoite Surface Antigens by Indirect Immunofluorescence : Application of this Technique to Detect Stage and Species Specific Antimalarial Antibodies," Bull. W.H.O., Vol. 57, pp. 211-216, Geneva, 1979.

———, V. Nussenzweig, R.S. Nussenzweig, W.E. Collins, K.T. Harinasuta, P. Tapchaisri, and Y. Chomcharn, "Circumsporozoite Proteins of Human Malaria Parasites Plasmodium falciparum Plasmodium vivax," J. Exp. Med., 156, 20-30, 1982.

Perrin, L.H., E. Ramirez, P.H. Lambert, and P.A. Miescher, "Inhibition of Plasmodium falciparum Growth in Human Erythrocytes by Monoclonal Antibodies," Nature, 289, 301-303, 1981.

Peterson, G.L., "Determination of Total Protien," Methods Enzymol., 91, 95-119, 1983.

Pontecorvo, G., "Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids by Means of Polyethylene Glycol Treatment," Somatic Cell Genetic, 1, 397-400, 1975.

Potocnjak, P., N. Yoshida, R.S. Nussenzweig, and V. Nussenzweig, "Monovalent Fragments (Fab) of Monoclonal Antibodies to a Sporozoite Surface Antigen (Pb 44) Protect Mice Against Malaria Infection," J. Exp. Med., 151, 1504-1513, 1980.

Roitt, I., J. Brostoff, D. Male, Immunology, pp. 1.6-1.7, Gower Medical Publishing Ltd., London, 1986.

Schofield, L., A. Saul, P. Myler, and C. Kidson, "Antigenic Differences Among Isolates of Plasmodium falciparum Demonstrated by Monoclonal Antibodies," Infect. Immun., 38(3), 893-897, 1982.

_____, G.R. Bushell, J.A. Cooper, A.J. Saul, J.A. Upcroft, and C. Kidson, "A Rhoptry Antigen of Plasmodium falciparum Contains Conserved and Variable Epitopes Recognized by Inhibitory Monoclonal Antibodies," Mol. Biochem, Parasit., 18, 183-195, 1986.

Scholtyseck, E., Fine Structure of Parasitic Protozoa, an Atlas of Micrographs, Drawings and Diagrams, pp. 148-151, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1979.

Shulman, M., C.D. Wilde, and G. Koher, "A Better Cell Line for Making Hybridomas Secreting Specific Antibodies," Nature, 276, 269-270, 1978.

Sikora, K., and H.M. Smedley, Monoclonal Antibodies (Finan, P. ed.), pp. 1-11, Blackwell Scientific Publications, Great Britain, 1984.

Smith, E.L., R.L. Hill, I.R. Lehman, R.J. Lefkowitz, P. Handler, A. White, Principles of Biochemistry : General Aspects, pp. 672-681, 7 th ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1983.

Steward, M.W., Antibodies : Their Structure and Function (Brammar, W.J. and M. Edidin eds.), pp. 15-20, J.W. Arrowsmith Ltd., Bristol, 1984.

Thaithong, S., G.H. Beale, B. Fenton, J. McBride, V. Rosario, A. Walker, and D. Walliker, "Clonal Diversity in a Single Isolate of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum," Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78, 242-245, 1984.

————, S.W. Chan, S. Songsomboon, P. Wilairat, N. Seesod, T. Seublinwong, M. Goman, R. Ridley, and G.H. Beale, "Pyrimethamine Resistant Mutations in Plasmodium falciparum," Mol. Biochem. Parasito., 1992 (in press).

Tijssen, P., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Burdon, R.H., and P.H. van Knippenberg eds.), pp. 43-93, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1985.

Trager, W., and J.B. Jensen, "Human Malaria Parasites in Continuous Culture," Science, 193, 673-675, 1976.

W.H.O "Recent Progress in the Development of Malaria Vaccines : Memorandum from a WHO Meeting," Bull. W.H.O., Vol. 62, No. 5, pp. 715-727, Geneva,1984.

Yoshida, N., P. Potocnjak, and M. Aikawa, "Hybridoma Produces Protec tive Antibodies Directed Against the Sporozoite Stage of Malaria Parasite," Science, 207, 71-73, 1980.

Zaman, V., Atlas of Medical Parasitology, pp. 81-89, PG Publishing Pte Ltd., Singapore, 2nd ed., 1984.

# ภาคผนวก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียและเพาะเลี้ยงเซลล์

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดจะเตรียมโดยละลาย RPMI 1640 จำนวน 10.4 กรัม (1 ซอง) และ HEPES จำนวน 5.94 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่น 3 ครั้ง (Glass distilled water) ประมาณ 900 มิลลิลิตร เติม garamycin 1 มิลลิลิตร (40 มิลลิกรัม) ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เท่ากับ 960 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านเครื่องกรองมิลลิพอร์ซึ่งมี pore size 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดแก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขวดละ 100 มิลลิลิตร เก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ ต้องเติม 5% ของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ในปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร และซีรั่มของคนในปริมาตร 10.4 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

ซีรั่มของคนเตรียมได้จากเลือดของคนหมู่ O, A, B และ AB โดยทิ้งให้เลือดแข็งตัวจับกันเป็นก้อนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงใช้ปิเปตดูดเอาเฉพาะชั้นของเหลวส่วนบนใส่หลอดทดลอง ปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกจากซีรั่มด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดเก็บส่วนซีรั่มที่มีสีเหลืองอ่อนใสชั้นบนแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อ inactivated ซีรั่ม เก็บซีรั่มที่เตรียมได้นี้ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ 5% สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตว่าเรียกว่า "อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรั่ม" ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้ง 5% สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตและซีรั่มของคนเรียกว่า "อาหารเลี้ยงเชื้อ"

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

ละลายอาหารเลี้ยง RPMI 1640 จำนวน 1 ซอง และ HEPES 4.766 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่น 3 ครั้งให้เข้ากัน ปรับค่า pH ให้เป็น 7.2 ด้วย 10% สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านเครื่องกรองมิลลิพอร์ที่มีแผ่นกรองซึ่งมี pore size 0.22 ไมโครเมตร ใช้ปิเปตขนาด 50 มิลลิลิตรดูดแบ่งใส่ขวดแก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขวดละ 50 มิลลิลิตร เติม 0.2 โมล sodium pyruvate และ 200 มิลลิโมล L-glutamine ที่ถูกกรองผ่านเครื่องกรองมิลลิพอร์แล้ว ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 0.5 และ 1 มิลลิลิตรตามลำดับ พร้อมทั้งเติม pennicillin-streptomycin ลงไป 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 100 มิลลิลิตร ได้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่ไม่มีซีรั่ม และถ้าเติม Fetal Calf Serum หรือ Fetal Bovine Serum ลงไปจะเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม โดยกำหนดให้ใช้คำว่า RP นำหน้าและต่อท้ายด้วยตัวเลขที่แสดงเปอร์เซนต์ของซีรั่มที่เติมลงไปแทน เช่น RP20 หมายถึงอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 20% เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำการผสมซีรั่มลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อจะนำไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์

ภาคผนวก ข

# การเตรียมสารละลาย, วิธีการย้อมเชื้อมาลาเรียและเซลล์, วิธีการนับจำนวนเชื้อและเซลล์

การเตรียม Freezing Medium โดยใช้

| | | |
|---|---|---|
| อาหารเลี้ยงเซลล์ RP | 4 | มิลลิลิตร |
| DMSO | 1 | มิลลิลิตร |
| fetal calf serum | 5 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากันใส่ขวดแก้วขนาดเล็กที่อบฆ่าเชื้อแล้วเก็บใส่ตู้เย็นที่ 4°c

การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.01 M โดยละลาย

| | | |
|---|---|---|
| $NaH_2PO_4$ | 1.62 | กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 8.733 | กรัม |
| NaCl | 4.5 | กรัม |

ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วที่สะอาด

การเตรียม Coating Buffer

| | | |
|---|---|---|
| ชั่ง $Na_2CO_3$ | 1.59 | กรัม |
| $NaHCO_3$ | 2.93 | กรัม |
| $NaN_3$ | 200 | มิลลิกรัม |

ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม 100% และ 60% Percoll

1. การเตรียม 100% Percoll

ดูด Percoll จากขวด stock มา 9 มิลลิลิตร ผสมกับ 10xPBS ปริมาตร 1

มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันใส่ในหลอดแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม 60% Percoll

เตรียมได้โดยเจือจาง 100% Percoll ด้วย 1xPBS ในอัตราส่วน 3:2 ใส่ในหลอดแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสียิมซ่า

| | | | |
|---|---|---|---|
| ส่วนประกอบมี | ผงสียิมซ่า | 0.6 | กรัม |
| | กลีเซอรอล | 50.0 | มิลลิลิตร |
| | แอบโซลูทเมธิลแอลกอฮอล์ | 50.0 | มิลลิลิตร |

บดสียิมซ่ากับกลีเซอรอลทีละน้อยให้ละเอียดในโกร่งจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทำเช่นนี้ต่อไปจนกว่าสีจะหมด ล้างสีที่ติดโกร่งด้วยกลีเซอรอลและนำไปเทรวมใส่ในขวดแก้ว แล้วจึงนำขวดแก้วนั้นไปอุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียสนาน 6-8 ชั่วโมง คอยเขย่าขวดให้สีอุ่นทั่วกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมแอบโซลูทเมธิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 2 สัปดาห์ กรองสารละลายสีลงในขวดสีชาแล้วเก็บไว้ใช้ต่อไป

การย้อมสไลด์ที่มีเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ในการย้อมสไลด์จะต้องทำการผสมสียิมซ่ากับสารละลาย phosphate buffer โดยใช้สารละลาย dihydrogenphosphate 6 ส่วน และสารละลาย potassiumdihydrogen-phosphate 4 ส่วนผสมกับสียิมซ่า 1 ส่วนให้เข้ากันก่อนจะนำไปย้อมสไลด์ หยดสีที่ผสมไว้แล้วลงบนสไลด์ให้ท่วมบริเวณที่มีเม็ดเลือดอยู่ ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000x เพื่อนับจำนวนเชื้อ

การนับจำนวนเชื้อมาลาเรียคิดเป็นเปอร์เซนต์ของ parasitemia

วางสไลด์ที่ย้อมสียิมซ่าแล้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้ objective ที่มีกำลังขยาย 10 เท่า เลื่อนหาบริเวณที่มีเม็ดเลือดแดงกระจายสม่ำเสมอและเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ซึ่งมักพบอยู่

บริเวณปลายฟิลม์เลือด หยด oil immersion ลงไปตรงบริเวณที่จะตรวจนับ แล้วเปลี่ยนมาใช้ objective ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนของเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบในวงกล้อง 3 วงรวมกันแล้วคำนวณหาจำนวนของวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ว่ามีค่าเท่าใด นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในแต่ละวงกล้องรวมกันแล้วหารด้วย 10,000 คูณด้วย 100 จะได้เป็นค่า parasitemia ดังตัวอย่างเช่น ถ้านับจำนวนเม็ดเลือดแดงในวงกล้อง 3 วงได้เท่ากับ 855 เซลล์ จำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์มีค่าเท่ากับ $\frac{10,000}{855} \times 3 = 35$ วงกล้อง และนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อใน 35 วงกล้องได้เท่ากับ 800 เซลล์ ดังนั้นเปอร์เซนต์ parasitemia เท่ากับ $\frac{800}{10,000} \times 100 = 8\%$

การย้อมสีเซลล์และการนับจำนวนเซลล์

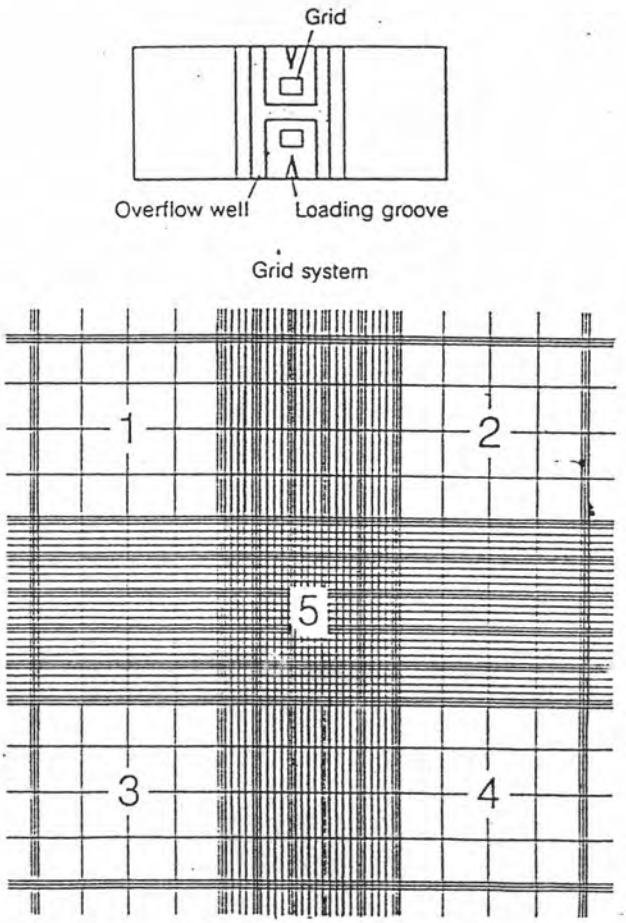
ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมที่มี acridine orange และ ethidium bromide ใช้อัตราส่วนของเซลล์ต่อสีย้อมเท่ากับ 1:1 ดูดส่วนผสมนี้ใส่ในสไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด (Blood counting chamber) นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence นับจำนวนเซลล์ที่ติดสีเขียวซึ่งเป็นเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ติดสีส้มซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว

วิธีนับจำนวนเซลล์กระทำได้ โดยนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีเขียวและสีส้มที่อยู่ภายในช่องที่ 1-4 ของสไลด์ ดังแสดงในรูปที่ 20 แล้วจึงคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรและค่า viability ของเซลล์

การคำนวณหาจำนวนเซลล์และค่า viability ของเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ใน 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต}}{4} \times 10^4 \times 2$$

$$\text{ค่า viability (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$




รูปที่ 21 Hematocytometer และ บริเวณที่ใช้นับจำนวนเซลล์ (1-4) (Mishell et al., 1980)

ภาคผนวก ค

ผลการตรวจหา titre ในน้ำเลี้ยงเซลล์และ ascitic fluid

ตารางที่ 14 ผลการตรวจหา titre ในน้ำเลี้ยงเซลล์

| Culture supernate | Titre | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 |
| 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 | +++ | ++ | ++ | + | - |
| CU 6.1-3 | +++ | ++ | + | - | - |
| CU 6.1-3-1 | ++++ | +++ | ++ | + | - |
| CU 6.1-3-2 | +++ | ++ | + | - | - |
| CU 6.1-4 | ++++ | +++ | ++ | + | - |
| CU 6.1-4-1 | ++++ | +++ | ++ | ++ | + |
| CU 6.1-4-2 | ++++ | +++ | +++ | ++ | + |

ตารางที่ 14 (ต่อ)

| Culture supernate | Titre | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 |
| CU 6.1-4-3 | +++ | ++ | ++ | + | - |
| CU 6.2 | ++ | ++ | ++ | + | + |
| CU 6.2-1 | ++ | ++ | + | - | - |
| CU 6.2-2 | ++ | ++ | + | - | - |
| CU 6.2-3 | ++ | ++ | + | - | - |
| CU 6.2-4 | ++ | ++ | + | - | - |
| CU 7.3 | +++ | ++ | - | - | - |
| CU 7.3-1 | ++ | - | - | - | - |
| CU 7.3-1-1 | ++++ | +++ | ++ | - | - |
| 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 | ++++ | +++ | ++ | - | - |

ตารางที่ 14 (ต่อ)

| Culture supernate | Titre | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 |
| CU 8.1-4 | ++ | + | - | - | - |
| CU 8.1-5 | ++ | + | - | - | - |
| CU 8.4 | +++ | +++ | ++ | + | - |
| CU 8.4-1 | ++++ | +++ | ++ | + | - |
| CU 8.4-1-1 | +++ | ++ | + | - | - |
| 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 | ++++ | +++ | ++ | + | - |

หมายเหตุ + แสดงว่ามีการเรืองแสง โดยเทียบกับ positive control ซึ่งกำหนดให้ระดับการเรืองแสงเข้มเป็น ++++

ตารางที่ 15 ผลการตรวจหา titre ใน ascitic fluid

| Ascitic fluid | Titre | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 | 1:31250 |
| CU 4.1-2 | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - |
| CU 6.2-3 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | - |
| CU 7.3 | ++++ | +++ | +++ | ++ | ++ | - |
| CU 7.3-1 | +++ | ++ | + | - | - | - |
| CU 7.5-4 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | ++ |
| CU 8.4 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | ++ |
| CU 8.4-2 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | + |
| CU 8.4-1-1 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |

หมายเหตุ + แสดงว่ามีการเรืองแสง โดยเทียบกับ positive control ซึ่งกำหนดให้ระดับการเรืองแสงเข้มมากเป็น ++++

# ประวัติผู้เขียน

นางสาว วรรณี อังคศิริสรรพ เกิดวันที่ 11 ธันวาคม พ.ศ. 2507 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2530 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2530