

นำ plasmid ที่สกัดจากโคลนที่คาดว่ามี *tcpA* insert ไปตัดด้วย enzyme *ClaI* แล้วนำไป run ใน gel electrophoresis จากนั้นนำ electrophoresis gel ที่มี insert ที่ 4 kb ไปทำ Southern hybridization กับ *tcpA* probe ชิ้นส่วน *ClaI* DNA ที่มีผลบวกเท่านั้นจึงเป็นโคลนที่ต้องการ

5. Automated DNA sequencing

นำ plasmid DNA ของ clone ที่ให้ผลบวกไปยืนยันว่ามี *tcpA* โดยกระบวนการ sequencing โดยใช้ ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit. Oligo primers ที่ใช้เป็น primers มาตรฐานที่มีอยู่ใน pBluescript plasmid vector คือ RP และ UP ซึ่งมีตำแหน่งอยู่คนละข้างของ multiple cloning site ผลจากลำดับ nucleotide ของ plasmid จาก clone VC1 ที่ได้สามารถยืนยันได้ว่า clone นี้มีความคล้ายคลึงกับ *tcp* locus ของ *V. cholerae* จาก Classical biotype accession no. X 74730

6. การ subclone VC1

เพื่อยืนยันความคล้ายคลึงต่อ *tcpA* sequence ของ El Tor biotype และเพื่อหา subclone ที่เหมาะสมที่จะ express protein จาก *tcpA* gene จากการ subclone VC1

การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหา *tcpA* gene ว่าอยู่ที่ตำแหน่ง restriction site ใด เพราะต้องการที่จะ express เฉพาะส่วน *TcpA* โปรตีนเท่านั้น ในการ subclone ได้ใช้ restriction enzyme 1 ชนิดตัด DNA เป็นชิ้นขนาดเล็กลง แล้วจึงนำไป ligate กับ pBluescript II KS ที่ตัดด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน โดยก่อนนำ vector ไป ligate ได้ทำปฏิกิริยา phosphatase กับ vector นั้นเพื่อป้องกัน กระบวนการ re-ligation ของ vector ต่อมานำ ligated DNA ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5α จากการเลี้ยง *E. coli* บน LB agar plate เฉพาะ clones ที่มี insert ของ pBluescript II KS เท่านั้น จึงจะขึ้นบน LB agar ที่มี Ampicillin เป็นองค์ประกอบ ต่อมาสกัด plasmid จาก *E. coli* แต่ละ clone แล้วย่อยด้วย restriction enzyme เดียวกันที่ใช้ตัดก่อนทำ ligation นำไป run electrophoresis ซึ่ง electrophoresis profiles จะแสดงให้เห็นขนาดของ insert ในแต่ละ clone

ได้ใช้ universal primer และ reverse primer ของ vector เพื่อหาว่า *tcpA* gene อยู่ที่ subclone ใด ดังแสดงใน รูปที่ 3.3 *tcpA* gene ที่ครบชุดจะพบใน *EcoRV* insert ขนาดประมาณ 0.8 kb เมื่อวิเคราะห์ DNA sequence ของ clone นี้ซึ่งชื่อว่า VC7 พบว่ามีขนาดความยาว 869 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ protein translation พบว่า start codon ATG ซึ่งจะสร้าง methionine เริ่มที่ลำดับเบสที่ 119 และสิ้นสุดที่ลำดับเบสที่ 791 แล้วจึงตามด้วย stop codon TTA ดังแสดงใน รูปที่ 3.4 โปรดสังเกตว่า VC7 clone มี ribosome binding site หรือ Shine-Dalgarno sequence ที่สมบูรณ์ โปรตีนจาก VC7 clone ประกอบด้วย 224 amino acids และมี molecular weight 23234 daltons ข้อ

สังเกตเกี่ยวกับ promoter region ที่ควบคุม expression ของ VC7 clone ดังแสดงใน รูปที่ 3.5 plasmid map ของ pBluescript II KS พบว่า start codon ของ *tcpA* อยู่ภายใต้การควบคุมจาก T7 promotor ไม่ใช่ T3 promoter หรือ *lacZ*

ต่อมาจึงนำ clone VC7 ไปศึกษาว่า จะสามารถ express protein ได้หรือไม่ โดยใช้ pBluescript II KS เป็น negative control ในการนี้เราใช้วิธีการมาตรฐานในการเตรียม whole cell lysate, soluble protein fraction และ insoluble fraction ดังมีรายละเอียดการเตรียมดังนี้

Whole cell lysate เตรียมโดยนำ culture 1 ml ไป centrifuge ที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาทีหลังจากดูด supernatant ทิ้งแล้วนำ pellet ไปละลายใน sample buffer (for SDS-PAGE) 100 μ l

Soluble และ insoluble protein fractions เตรียมโดยนำ culture 1 ml ไป centrifuge ที่ $4,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากดูด supernatant ทิ้งไปแล้วนำ pellet ไปละลายใน lysis buffer (0.1M NaH_2PO_4 , 0.01M Tris-HCl pH8.0; 8M urea) 100 μ l ต่อจากนั้นนำไป mix โดย Vortex และ sonicate ที่ 4°C , 3 ครั้ง ครั้งละ 20 วินาที แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20-30 นาที ส่วน supernatant คือ soluble protein fraction และส่วน pellet คือ insoluble fraction นำทั้ง 2 ส่วนนี้ไปต้มใน sample buffer เพื่อทำ electrophoresis ในการแยก proteins ต่อไป

ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ใช้สาร IPTG ในการ induction ทำ เพราะทิศทางของ promoter ที่ควบคุม start codon ของ *tcpA* ไม่ได้มาจาก *lacZ* จากผลการวิเคราะห์ protein fraction ต่างๆ โดย SDS-PAGE ไม่พบความแตกต่างในระหว่าง vector และ VC7 clone แต่อย่างใด

7. การ subclone *EcoRV* insert จาก VC7 เพื่อให้ start codon ของ *tcpA* อยู่ใต้การควบคุมของ *lacZ*

7.1 การโคลน *tcpA* gene เข้าสู่ low copy number plasmid, pWSK29

จากผล sequencing และ restriction map ของ pBluescript II KS ได้ตัด VC7 clone ด้วย enzyme *Bam*HI และ *Cla*I ซึ่งจะสามารถตัดแยก vector และ insert ออกจากกัน และขนาดของ insert ประมาณ 800 bp ตามที่คาดไว้ ผล sequencing แสดงได้ว่า ส่วน start codon อยู่ที่ด้าน *Bam*HI site ส่วนของ insert ที่ได้จากการตัดด้วย enzyme ข้างต้น เมื่อนำไปแยกใน agarose gel electrophoresis จะเห็นส่วนของ vector (2.9 kb) และ insert (0.8 kb) ต่อจากนั้นตัดเฉพาะส่วนของ insert ออกจาก gel แล้วจึงทำการ elute DNA ออกมาโดยใช้ QIAEX II Gel extraction kit (QIAGEN) ต่อจากนั้นตัด vector pWSK29 ด้วย enzyme *Bam*HI และ *Cla*I แล้วนำไป ligate กับ DNA insert ที่ extract ออกจาก gel นำ ligation mixture นี้ไป transform เข้า *E. coli* DH5 α host

จากการทดลองนี้เราได้ clone ชื่อ VC13 ซึ่งเมื่อ sequence insert ของ clone สามารถยืนยันได้ว่า เป็น *tcpA* gene จริง และมีทิศทางของ start codon อยู่ใต้การควบคุมของ *lacZα* (รูปที่ 3.6)

7.2 การโคลน *tcpA* gene เข้าสู่ pUC18 derived plasmid, pHSG 398 (Takara Biochemical)

เหตุผลที่ผู้วิจัยเลือกใช้ pHSG 398 vector เพราะ vector นี้มีจำนวน copy number ของ plasmid สูงคือ 500-700 copies ใน 1 cell และ pHSG 398 มียีนส์ดื้อยา chloramphenicol (Cm[®]) จึงค่อนข้างง่ายในการโคลน insert จาก VC7 ที่มี Ampicilin resistant gene โดยได้เลือกโคลนที่มีการดื้อยา chloramphenicol เท่านั้น ในการทดลองนี้ได้ตัด insert จาก VC7 และ pHSG 398 vector ด้วย restriction enzyme *EcoRI* และ *HincII* หลังจาก heat-inactivated enzyme ที่ 70°C เป็นเวลา 15 นาที จึงนำ vector และ insert มาต่อกันโดยขบวนการ ligation ต่อมาจึงนำ ligated plasmid ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5α host แล้วจึงเลือกเฉพาะ clone ที่เป็น white colony (มี insert) และมีการดื้อยา chloramphenicol ได้ clone ชื่อ VC20, VC21 ซึ่งเมื่อ confirm โดยวิธี sequencing สามารถยืนยันได้ว่ามี *tcpA* gene จริง และมีทิศทางของ start codon อยู่ใต้การควบคุมของ *lacZα* (รูปที่ 3.7)

8. Protein expression ของ clone ที่มี *tcpA* gene และทิศทางของ initiation codon อยู่ในทิศทางที่ควบคุมโดย *lacZ* หรือ T3 promoter

การทดลองนี้ใช้ clone ที่มี vector อย่างเดียวเปรียบเทียบกับ clone ที่มี insert ของ *tcpA* และเนื่องจาก clones ต่างๆที่สร้างขึ้นอยู่ในทิศทางการควบคุมของ *lacZα* ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการ induction ด้วย 1mM IPTG โดยเตรียม overnight culture ใน LB broth 5 ml และเช้าวันรุ่งขึ้น subculture 0.5 ml ของ overnight culture ลงใน LB broth 5 ml หลอดใหม่ นำไป incubate พร้อมเขย่าที่ 200 rpm และ 37°C เป็นเวลา 1-2 ชม. จนกระทั่งได้ OD ประมาณ 0.6 แบ่ง culture 1 ml ไปใช้สำหรับเตรียม pre-induction whole cell lysate แล้วเติม IPTG ลงไปใน culture ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1 mM แล้วจึง incubate ต่ออีกประมาณ 3 ชม. แบ่ง 1 ml เพื่อทำ whole cell lysate และอีก 1 ml เพื่อทำ soluble protein fraction และ non-soluble protein fraction ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อที่ 1 รูปที่ 3.8 แสดง protein profiles ของ clone ที่มี insert เปรียบเทียบกับ clone ที่มี vector อย่างเดียว จาก samples ที่เก็บตอนเริ่มต้นก่อน induction และ 3 ชม. หลังจาก induction ด้วย 1 mM IPTG โดย VC13 clone (specimen B) เปรียบเทียบกับ parental vector pWSK29 (specimen A) ส่วน VC20 (specimen D) และ VC21 (specimen E) เปรียบเทียบกับ parental vector pHSG398 (specimen C) ผลการทดลองนี้ ไม่พบความแตกต่างระหว่าง clone ที่มี insert และ parental vector ใน protein ที่เตรียมจากส่วนต่างๆทั้ง whole cell lysate, soluble และ insoluble protein fractions

9. Protein expression โดยใช้ระบบของ T7 RNA polymerase promoter

การแสดงออกของยีนส์ภายใต้การควบคุมของ T7 RNA polymerase มีข้อได้เปรียบ *E. coli* RNA polymerase หลายประการ เช่นเป็น enzyme ที่ active ซึ่งสามารถที่จะสังเคราะห์ RNA ในอัตราที่สูงกว่า RNA polymerase ของ *E. coli* หลายเท่า โดยมีความถี่ที่น้อยมากในการหยุด transcription นอกจากนี้ T7 RNA polymerase ยังมีความจำเพาะที่จะสังเคราะห์จาก T7 promoter (P_{T7}) เท่านั้น และจะไม่มี การเริ่มต้น transcription จาก promoter sequence อื่นๆของ *E. coli* DNA

ผู้วิจัยใช้ระบบ Two-plasmid system ในกระบวนการ expression โดยระบบแรกใช้ expression vector pBlueScript II KS (Stratagene) ซึ่งมี DNA sequence ของ T7 promoter เป็นองค์ประกอบ จากรูปที่ 3.5 โปรดสังเกตว่า สำหรับ VC7 clone ทิศทางของ start codon ของ *tcp* อยู่ในทิศทางเดียวกับ T7 promoter ส่วน plasmid ในระบบที่ 2 ได้รับความอนุเคราะห์ *E. coli* strain ที่มี plasmid pGP1-2 (Tabor and Richardson, 1985) (E-2096) จาก University of Adelaide, Australia (รูปที่ 3.9) ใน plasmid นี้ enzyme T7 RNA polymerase จะอยู่ใต้การควบคุมของ λp_L promoter และสามารถถูกยับยั้งโดย repressor protein C1857 ซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิ กล่าวคือ ที่อุณหภูมิต่ำ (30°C) repressor protein จะยับยั้งกระบวนการ transcription จาก λp_L promoter ในขณะที่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง (42°C) repressor protein จะถูก inactivate มีผลให้เกิดการสร้าง enzyme T7 RNA polymerase นอกจากนี้ plasmid pGP1-2 ยังประกอบด้วยยีนส์ที่ดื้อยา Kanamycin ซึ่งจะสะดวกในการเลือกโคลนที่มียีนส์ที่ต้องการ

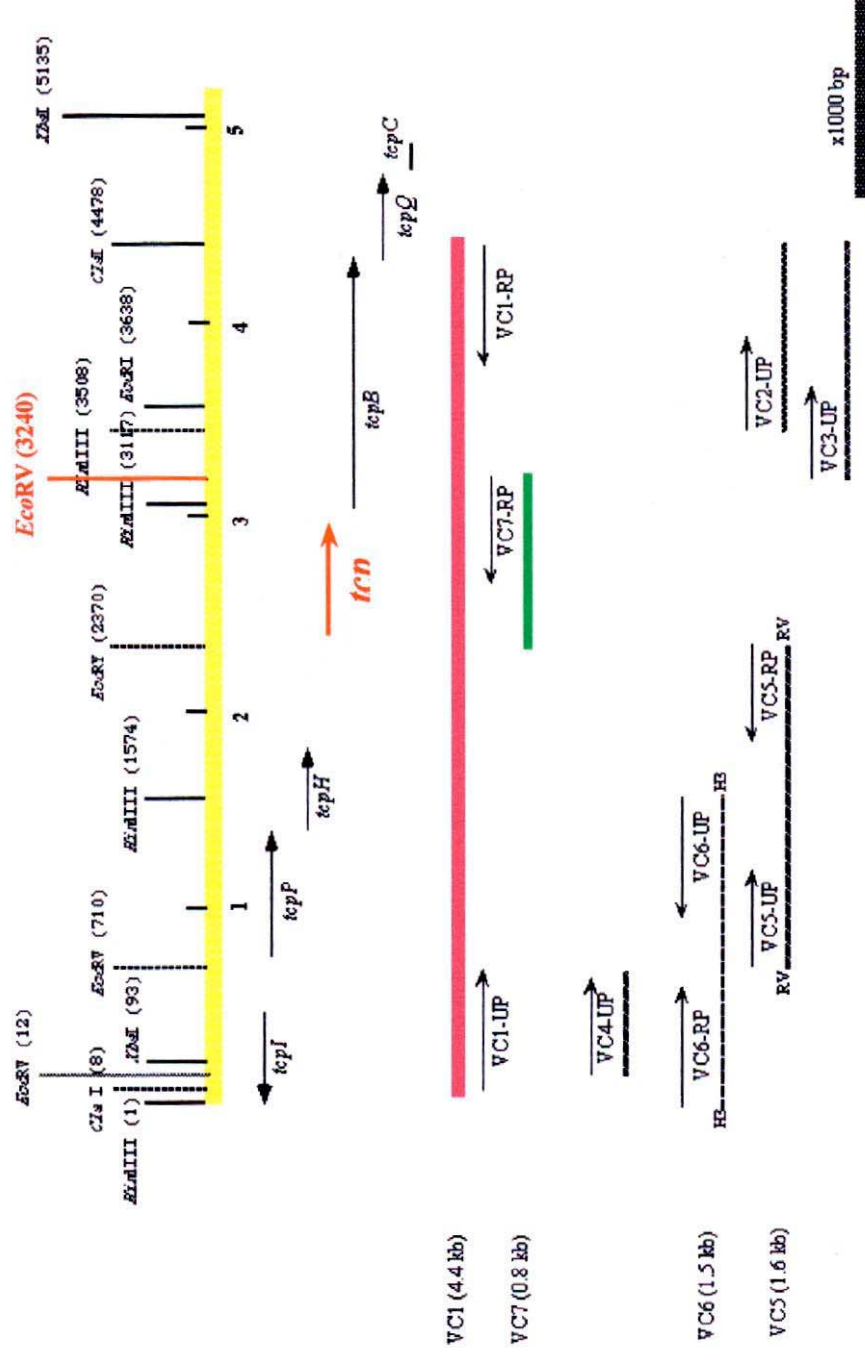
ผู้วิจัยจึง transform gene ที่ต้องการ express เข้าสู่ *E. coli* strain ที่มี plasmid pGP1-2 (E-2096) โดยเตรียม chemical competent ของ E-2096 โดยวิธีของ Hanahan (1970) ข้อควรระวังในการเลี้ยงเชื้อ E-2096 คือต้องพยายามเลี้ยงที่อุณหภูมิไม่เกิน 30°C และ chemical competent cells ที่ได้สามารถเก็บเป็น aliquots ไว้ที่ -70°C ต่อมาจึงทำกระบวนการ transformation gene ที่ต้องการ โดยทดลองเปรียบเทียบกับ parental plasmid vector ซึ่งในที่นี้คือ pBlueScript II KS vector

ในการ transformation เข้า chemical competent cells ได้ใส่ plasmid ปริมาณ 500 ng-1 μg ในปริมาตร 1-5 μl แล้วนำไป incubate กับ chemical competent cells ที่ 4°C เป็นเวลาประมาณ 30-40 นาที ต่อจากนั้นนำ cells ไป heat-shock ที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งที่ 4°C อีกเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปใส่ใน LB broth 1 ml นำไป incubate 30°C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชม. ต่อจากนั้นนำไป spread ลงบน selective medium ที่ผสมด้วย Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) และ Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) แล้ว incubate ที่ 30°C , 2-3 วัน colonies ที่ขึ้น บน plates ได้แสดงว่ามี Ampicillin resistant gene จาก pBlueScript ได้ถูกนำเข้าสู่ E-2096 ที่มี Kanamycin resistant gene แล้วนำ clone ที่ได้ไปทำ expression ต่อไป

ในการ express protein ได้เตรียม overnight culture ใน LB broth ปริมาณ 5 ml ที่มี Kanamycin และ Ampicillin ผสมอยู่ เช้าวันต่อมานำ overnight culture ปริมาตร 100 μ l ไป inoculate ลงใน medium หลอดใหม่ และนำไป incubate ที่ 30°C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 3-5 ชม. จนกระทั่ง OD₅₉₀ $\cong$ 0.4 ต่อจากนั้นนำไป incubate ที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเขย่าต่อที่ 37°C จากนั้นเก็บตัวอย่างหลังจาก incubate ที่ 60 นาที 120 นาที และ 150 นาที ตามลำดับ เพื่อนำมาเตรียม whole cell lysates, soluble protein fractions และ insoluble protein fractions เพื่อศึกษาว่ามีการสร้างโปรตีนเป้าหมายเพิ่มใน clone ที่มี DNA insert หรือไม่

รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบ expressed proteins ของ *E. coli* strain E-2096 ซึ่งมี pBlueScript II KS vector (**3.10 a**) และ E-2096 ซึ่งประกอบด้วย VC7 clone (**3.10 b**) จะเห็นว่า VC7 clone ซึ่งมี insert ของ *tcpA* สามารถสร้างโปรตีนที่ molecular weight ประมาณ 23 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนที่คาดหวังที่เสนอไว้ใน **รูปที่ 3.4** โดยเมื่อเทียบกับ E-2096 ที่มี vector อย่างเดียว ไม่มี protein ที่ 23 kDa อย่างชัดเจน

โดยสรุปผู้วิจัยสามารถ express toxin-coregulated pillus protein (TcpA) ซึ่งได้มีรายงานว่า เป็น subunit protein ที่มีความสำคัญในการก่อโรค (pathogenesis) อหิวาต์ โดยเชื้อ *V. cholerae* และ TcpA มีความสามารถในการกระตุ้น host ให้สร้างภูมิคุ้มกัน จึงเป็น vaccine candidate (Attridge *et al.*, 1999) และภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ของ TcpA protein มีความจำเพาะต่อแต่ละ biotype เท่านั้น เช่น ภูมิคุ้มกันต่อ TcpA จาก El Tor biotype จะไม่สามารถป้องกัน host จาก อหิวาต์ที่เกิดจากเชื้อ Classical biotype ได้ (Attridge *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้เลือกที่จะ clone และ express *tcpA* gene จาก El Tor biotype ซึ่งมีรายงานการระบาดในสอง-สามทศวรรษ หลังนี้



รูปที่ 3.3 โครงสร้างของ *tcp* locus จาก *V. cholerae* El Tor, biotype (genebank accessionno. X74730) แสดงตำแหน่งและทิศทางการของ *orf* ต่าง ๆ

ข้อมูลจาก sequencing จากส่วนปลาย 5' และ 3' ของ clone VC1 assembly ที่ตำแหน่ง *Cla*I site และขนาดของ insert ประมาณ 4.4 kb ตรงกับผลการทดลองที่ได้ ส่วนผลจาก sequencing ของ subclones ต่างๆ คือ VC2, VC3, VC4, VC5, VC6 และ VC7 ได้ assembly เข้าใน *tcp* locus ตรงตามชนิดของ restriction enzyme ที่ใช้ในการ subcloning โปรดสังเกตว่า *tcpA* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิต subunit ที่สำคัญของ pilin จะอยู่ที่ *EcoRV* fragment ของ VC7 clone

รูปที่ 3.4 Translation of VC7 clone แสดง Open reading frame จากตำแหน่ง base ที่ 119-791

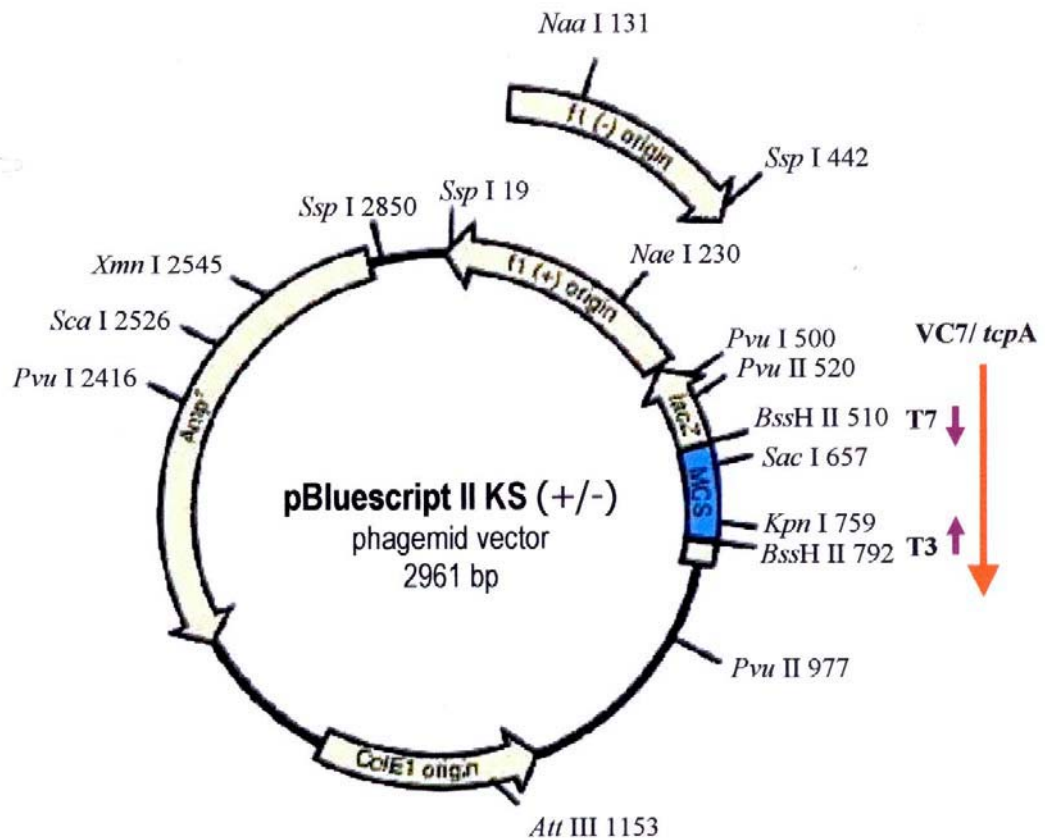
NA	61	TTAAAAAAGGACCAAGCAATGCATTTTCCTTAAACACAAATGGT	<u>GGAG</u>	TTATATAAAT	<u>AT</u>
AA	1				M
NA	121	<u>G</u> CAATTATTAAACAGCTTTTTAAGAAGAAGTTTGTAAGAAGAACACGATAAGAAAAC			
AA	2		Q	L	L
			K	Q	L
			F	K	K
			K	F	V
			K	E	E
			H	D	K
			K	K	T
NA	181	CGGTCAAGAGGGTATGACATTACTCGAAGTAATCATTGTTCTGGGTATTATGGGTGTGGT			
AA	22		G	Q	E
			G	M	T
			L	L	E
			V	I	I
			V	L	G
			I	M	G
			V	V	
NA	241	CTCAGCGGGTGTTGTTACGCTGGCTCAGCGTGCGATTGATTTCGCAGAATATGACTAAGGC			
AA	42		S	A	G
			V	V	T
			L	A	Q
			R	A	I
			D	S	Q
			N	M	T
			K	A	
NA	301	TGCGCAAAATCTAAACAGCGTGCAAATTGCAATGACACAACTTATCGTAGTCTTGGTAA			
AA	62		A	Q	N
			L	N	S
			V	Q	I
			A	M	T
			Q	T	Y
			R	S	L
			G	N	
NA	361	TTATCCAGCTACCGCAAACGCAAATGCTGCTACACAGCTAGCTAATGGTTTGGTCAGCCT			
AA	82		Y	P	A
			T	A	N
			A	N	A
			A	A	T
			Q	L	A
			N	G	L
			V	S	L
NA	421	TGGTAAGGTTTCAGCTGATGAGGCAAAGAATCCTTTCACTGGTACAGCTATGGGGATTTT			
AA	102		G	K	V
			S	A	D
			E	A	K
			N	P	F
			T	G	T
			A	M	G
			I	F	
NA	481	CTCATTTCCACGAAACTCTGCAGCGAATAAAGCATTTCGCAATTACAGTCGGTGGCTTGAC			
AA	122		S	F	P
			R	N	S
			A	A	N
			K	A	F
			A	I	T
			V	G	G
			L	T	
NA	541	CCAAGCACAATGTAAGACTTTGGTTACAAGCGTAGGGGATATGTTTCCATTTATCAACGT			
AA	142		Q	A	Q
			C	K	T
			L	V	T
			S	V	G
			D	M	F
			P	F	I
			N	V	
NA	601	GAAAGAAGGTGCTTTTCGCTGCTGTGCTGATCTTGGTGATTTTCGAAACGAGTGTCGCAGA			
AA	162		K	E	G
			A	F	A
			A	V	A
			D	L	G
			D	F	E
			T	S	V
			A	D	
NA	661	TGCTGCTACTGGCGCTGGCGTAATTAAGTCCATTGCACCAGGAAGTGCCAACTTAAACCT			
AA	182		A	A	T
			G	A	G
			V	I	K
			S	I	A
			P	G	S
			A	N	L
			N	L	
NA	721	AACTAATATCACGCATGTTGAGAAGCTTTGTACAGGAAGTCTCCATTACAGTAGCTTT			
AA	202		T	N	I
			T	H	V
			E	K	L
			C	T	G
			T	A	P
			F	T	V
			A	F	
NA	781	TGGTAACAG	<u>TTA</u>	ATCTACACCATTATCTTGATAATTTAATAATAATTTGCCCATGGAAAT	
AA	222		G	N	S

Universal code; Total amino acid number: 224, MW=23234 daltons

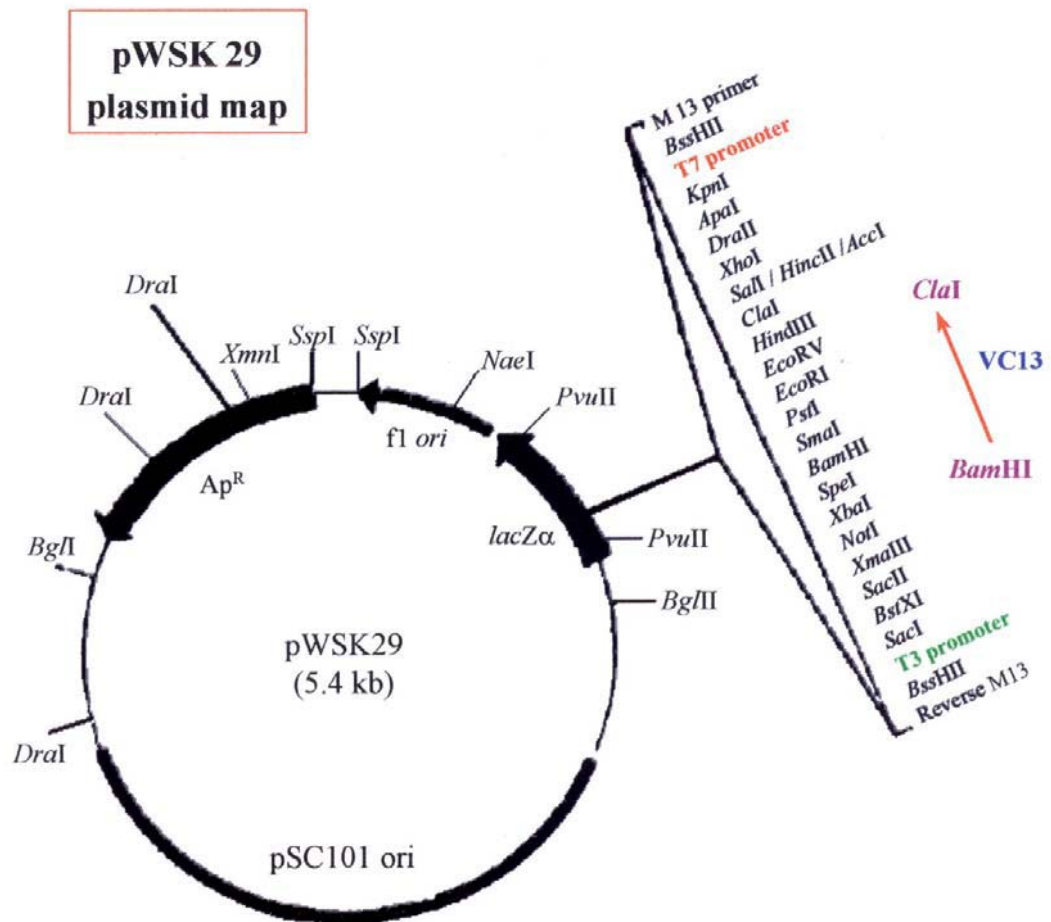
หมายเหตุ NA = Nucleic acid

AA = Amino acid

รูปที่ 3.5 แสดง plasmid vector pBluescript II KS vector ที่ใช้ในการ cloning เข้าใน VC7 ประกอบด้วย *tcpA* gene ที่สมบูรณ์ และทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ T7 promoter

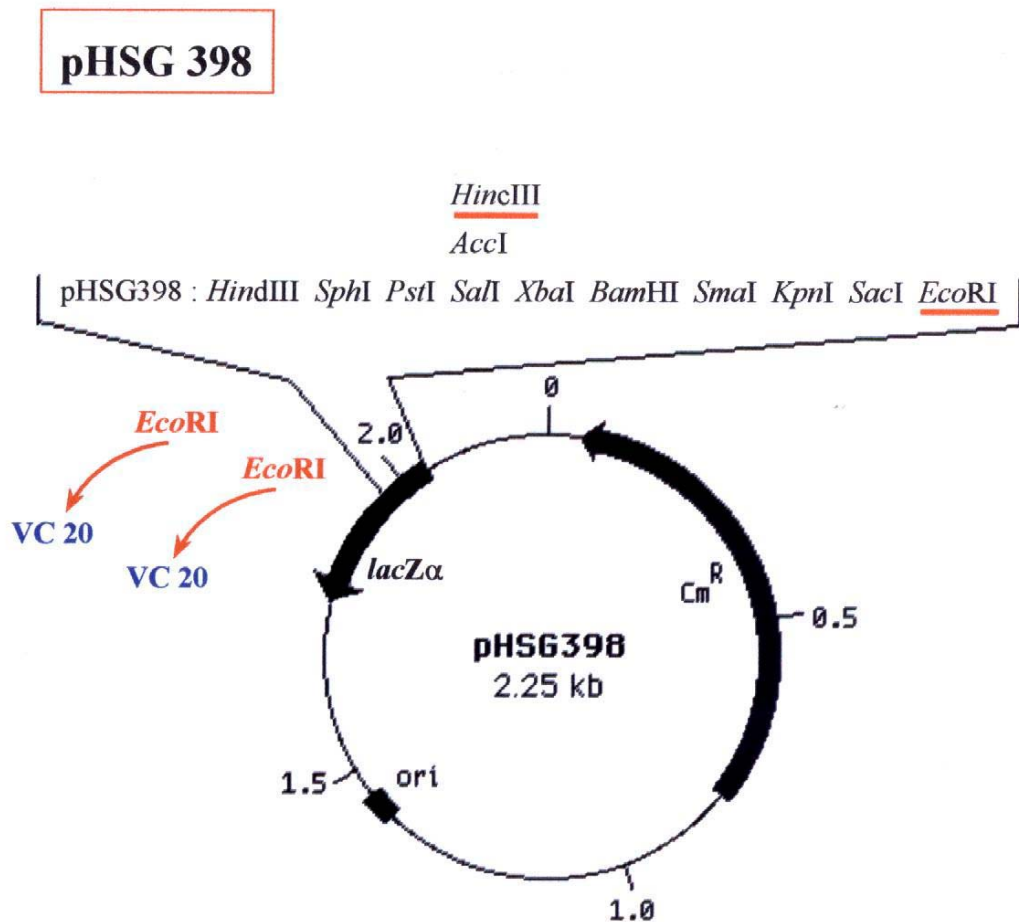


รูปที่ 3.6 แสดง plasmid vector pWSK29 ที่ใช้ในการ clone fragment จาก VC7 เพื่อให้ทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ *lacZ α* promoter



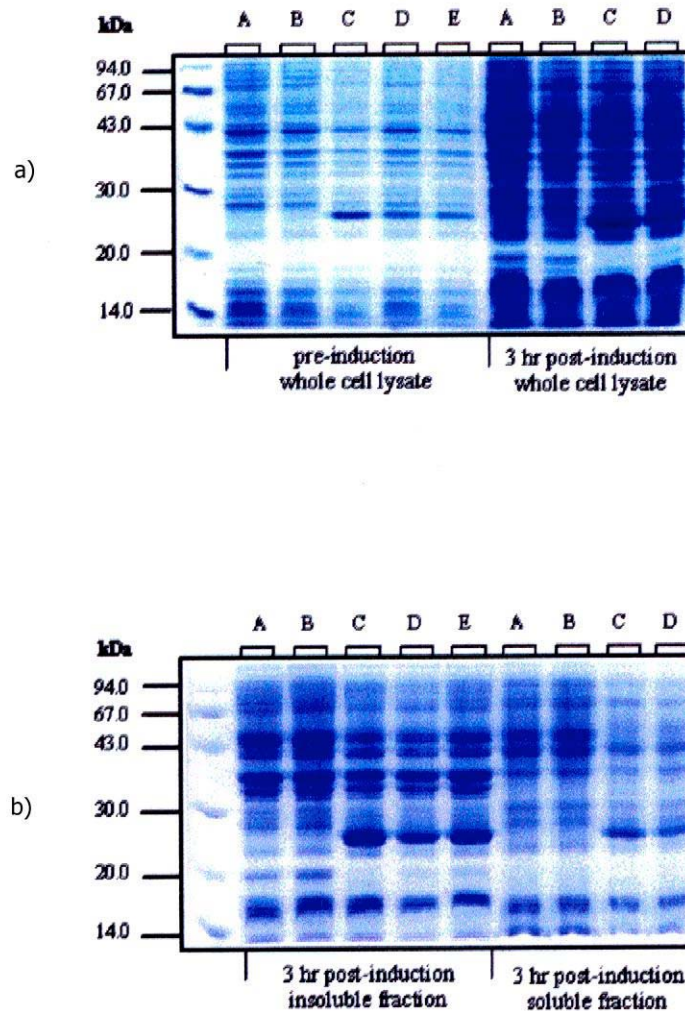
ดังแสดงในรูป clone VC13 ได้มาจากการตัด insert ของ VC7 ด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Cla*I และ clone เข้าสู่ pWSK29 ที่ตัดด้วย enzyme ขุดเดียวกัน

รูปที่ 3.7 แสดง plasmid vector pHSG398 (Takara) ที่ใช้ในการ clone fragment จาก VC7 เพื่อให้ทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ *lacZ α* promoter



ดังแสดงในรูป clone VC20 และ VC21 ได้มาจากการตัด insert ของ VC7 ด้วย restriction enzyme *EcoRI* และ *HindII* และ clone เข้าสู่ pHSG398 ที่ตัดด้วย enzyme ชุดเดียวกัน

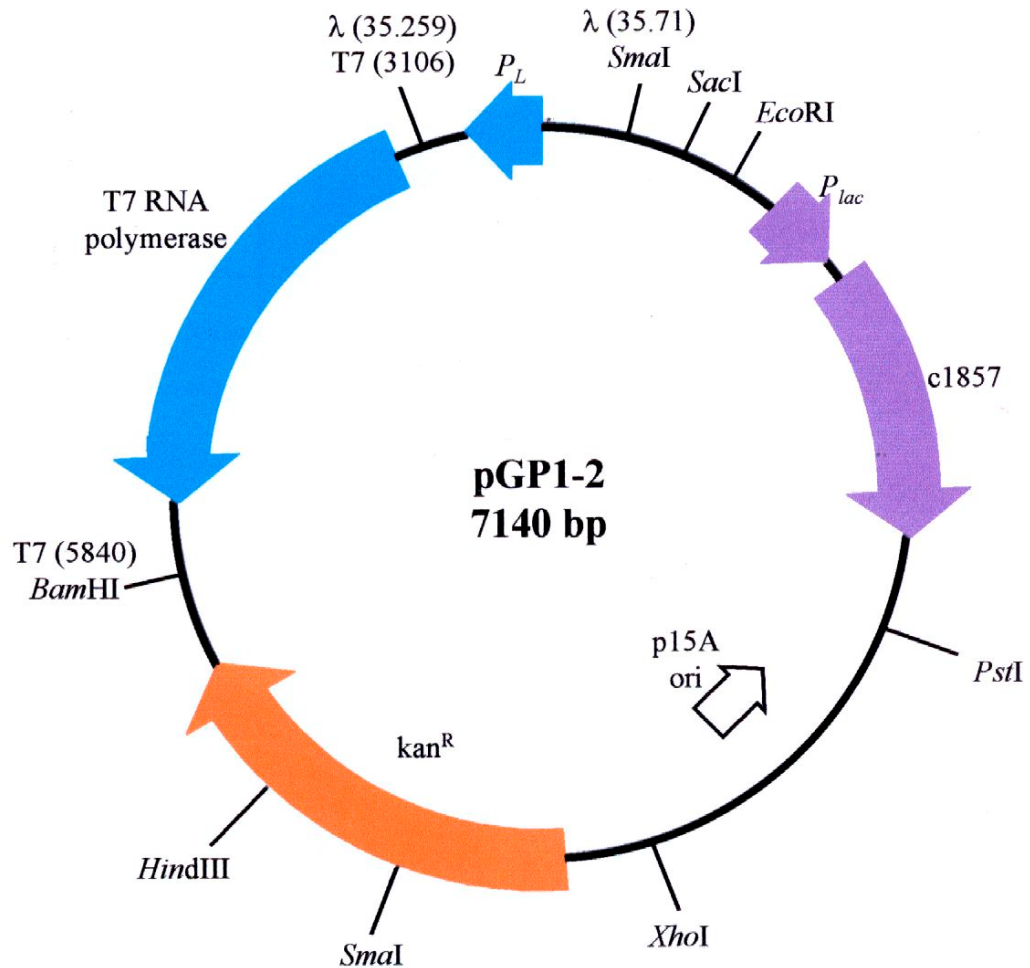
รูปที่ 3.8 แสดง protein expression ใน clone ที่มี gene *tcpA* ที่สมบรูณ์ โดยที่ initiation codon ของ clone เหล่านี้อยู่ในทิศทางที่ควบคุมโดย *lacZ* และอยู่ในทิศทางของ T3 promoter



- A, Clone ที่มีเฉพาะ vector pWSK29
 B, VC13 clone (vector pWSK29 ที่มี insert ของ *tcpA* ขนาดประมาณ 0.8 kb)
 C, Clone ที่มีเฉพาะ vector pHSG398
 D, VC20 clone (vector pHSG398 ที่มี insert ของ *tcpA* ขนาดประมาณ 0.8 kb)
 E, VC21 clone (vector pHSG398 ที่มี insert ของ *tcpA* ขนาดประมาณ 0.8 kb)

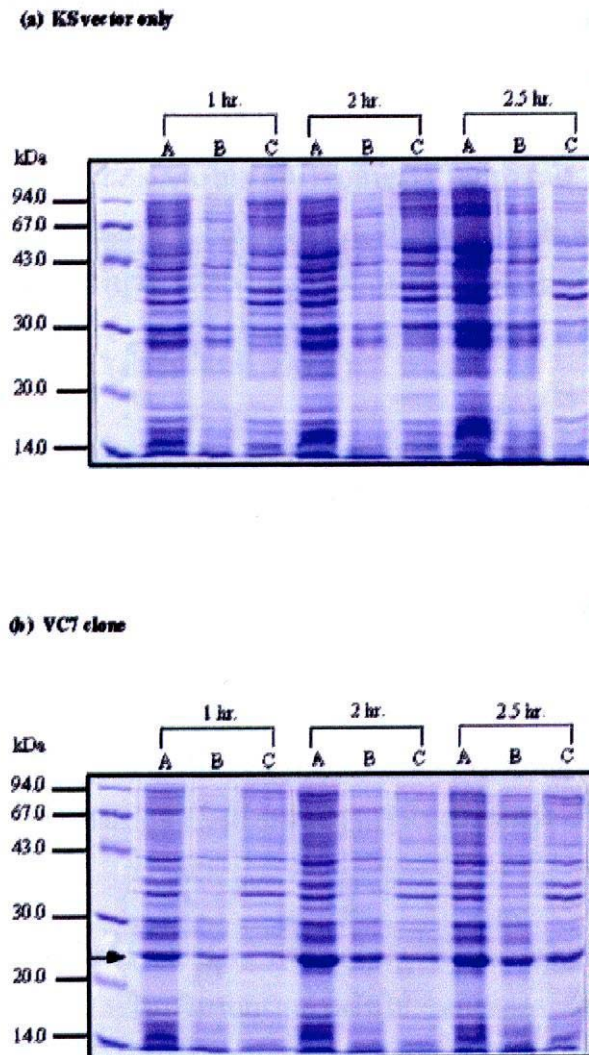
เนื่องจาก clone ต่างๆเหล่านี้ อยู่ภายใต้การควบคุมโดย *lacZ* ดังนั้นจึงมีการ induce ด้วย IPTG 1 mM เมื่อ bacterial cells เติบโตเข้าสู่ exponential phase จากนั้นจึงเปรียบเทียบกับ electrophoresis ของ proteins ที่ได้จาก whole cell lysate, insoluble fraction และ soluble fraction ของ bacterial cells

รูปที่ 3.9 plasmid vector pGP1-2 ประกอบด้วย gene ที่ทำหน้าที่สร้าง T7 RNA polymerase ซึ่งอยู่ใต้การควบคุมของ λp_L promoter



Vector นี้ยังประกอบด้วย gene *c1857* ที่สร้างโปรตีน λ repressor ซึ่งจะ express ภายใต้การควบคุมของ *E. coli lac* promoter ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำโปรตีน repressor นี้จะยับยั้งกระบวนการ transcription จาก λp_L promoter อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 42°C repressor protein จะถูก inactivate ซึ่งจะมีผลให้เกิดการ induction ของ λp_L promoter และนำไปสู่กระบวนการสร้าง T7 RNA polymerase

รูปที่ 3.10 Protein expression จาก *E. coli* strain E-2096 ซึ่งได้ transform plasmid จาก pBlueScript II KS (a) และ VC7 (b)



A = whole cell lysate preparation

B = soluble protein fraction

C = insoluble protein fraction ในการทดลองเราเก็บ specimen ที่เวลาต่างๆ คือ 1, 2 และ 2 1/2 ชม. หลังจาก induction ของ enzyme T7-RNA polymerase

โปรตีนสังเกตว่า VC7 clone จะให้ protein ขนาด 23 kDa ที่ชัดเจน ซึ่งไม่พบใน clone ที่มีเฉพาะ vector

10. การพัฒนากระบวนการเพื่อผลิต TcpA protein ในปริมาณมาก

จาก *E. coli* strain E-2096 ที่ประกอบด้วย plasmid 2 ชนิดคือ pGP1-2 และ VC7 ได้ทดลองเพิ่มปริมาณ โดยเลี้ยงใน 50 ml LB broth ที่มี kanamycin 50 µg/ml ใน flask ขนาด 250 ml โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 30°C ก่อน จนได้ OD₅₅₀ ประมาณ 0.6 ต่อจากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อ inactivate repressor protein เพื่อให้มีการสร้าง enzyme T7 RNA polymerase และ enzyme นี้จะกระตุ้น T7 promoter ให้เกิด transcription ของ VC7 plasmid ซึ่งมีส่วนประกอบของ T7 promoter อยู่หน้ายีนส์ *tcpA* ต่อจากนั้นจึงเลี้ยงเชื้อต่อไปที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม ก่อนนำ bacterial culture ไป centrifuge ที่ $8,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที นำ cell pellet ที่ได้ไปละลายใน inclusion body solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; 8 M urea) ในสัดส่วน 3 ml ต่อ bacterial wet weight 1 กรัม ต่อจากนั้นจึงนำไป sonicate เพื่อช่วยให้เซลล์แตกดีขึ้น แล้วนำ cell lysate ที่ได้ไป centrifuge ที่ $10,000 \times g$ เพื่อแยกเอา cell debris ออกและนำ supernatant ที่ได้ไป dialyse ในน้ำกลั่น เมื่อนำ crude protein (ใน supernatant) ที่ได้ไปแยกด้วย acrylamide gel electrophoresis พบว่ามี protein band ที่ประมาณ 25 kDa ซึ่งคาดว่าเป็น TcpA ชัดเจน โดยได้ปริมาณโปรตีนจาก LB broth 2 ลิตร ประมาณ 15 กรัม

11. Immunogenicity ของ TcpA protein

ผู้วิจัยได้ immunize หนู mice ด้วย crude bacterial lysate (lysate ของ recombinant *E. coli*) เพื่อศึกษาว่า TcpA สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองตอบสนองด้วยระบบภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีต่อ TcpA ได้หรือไม่ (immunogenicity ของ TcpA) โดยได้ immunize ทั้งทาง intraperitoneal และ oral routes ในการ immunize ทาง intraperitoneal route ได้ใช้ crude bacterial lysate ปริมาณ 250 µg โดยผสม immunogen กับ adjuvant และฉีดทั้งหมดสาม doses ห่างกันครั้งละสองสัปดาห์ ใน dose แรกผสม immunogen กับ complete Freund adjuvant และใช้ incomplete Freund adjuvant ใน doses ที่สองและสาม หลังจากฉีดโดสที่สามแล้วหนึ่งสัปดาห์จึงจะเลือดหนูที่ immunized ไปทดสอบหาแอนติบอดีต่อ homologous antigen

สำหรับการ immunize ทาง oral route ได้ใช้ crude bacterial lysate 1 mg ป้อนหนูแต่ละตัว โดยให้ทั้งหมดสามโดสด้วยกันและเว้นระยะห่างแต่ละครั้งสองสัปดาห์ หลังจาก immunize ครั้งสุดท้ายหนึ่งสัปดาห์ได้จะเลือดหนูแต่ละตัวเพื่อนำไปตรวจวัดระดับแอนติบอดีเช่นเดียวกัน (ในการป้อนหนูกลุ่มนี้ได้ให้หนูทดลองกินสารละลาย 5% sodium bicarbonate ปริมาตร 0.1 ml ก่อนป้อน immunogen เพื่อไม่ให้ immunogen ถูกทำลายจากกรดในกระเพาะ)

นอกจากนี้ยังได้ทำ Western blot analysis เพื่อตรวจว่าซีรัมของหนูทดลองที่ถูก immunized ด้วย crude bacterial lysate มีการสร้างแอนติบอดีต่อ TcpA protein หรือไม่ โดยนำ nitrocellulose membrane ที่ blot ไว้ด้วย SDS-PAGE separated-crude bacterial lysate ไปทำ ปฏิกิริยากับซีรัมของ immunized mice ที่เจือจาง 1:200 (ซีรัมที่จะทดสอบ ได้ถูกนำไป absorbed ด้วย *E. coli* 2096 ก่อนเพื่อลด background antibody ต่อ *E. coli* 2096 ซึ่งเป็น host strain) ผลการทดลองทำ Western blot analysis พบว่า mice ที่ถูก immunized ด้วย TcpA + adjuvant ทาง intraperitoneal route สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ molecular weight ประมาณ 25 kDa (Figure 3.11, lanes 3 และ 4) โดยไม่พบ antibody นี้ใน serum ก่อน immunize (Figure 3.11, lanes 1 และ 2) ส่วน mice ที่ถูก immunize ทาง oral route ก็สามารถสร้าง antibody ต่อโปรตีนที่ molecular weight ตรงกับที่สร้างใน mice กลุ่มที่ immunized โดย intraperitoneal injection เช่นกัน (Figure 3.11, lanes 7 และ 8)

12. การผลิต purified TcpA protein

ในการศึกษา immunogenicity ของ TcpA มีความจำเป็นต้องใช้ purified TcpA protein ในการตรวจว่าสัตว์ทดลองเหล่านั้นสร้างแอนติบอดีต่อ TcpA จริง ดังนั้นจึงได้พยายาม purified TcpA โดยใช้ Sephadex G-75 gel filtration chromatography และ DEAE 52 anion exchange chromatography แต่ไม่สามารถ purify TcpA ให้บริสุทธิ์ 100% ได้สำเร็จ ต่อมาจึงได้ใช้วิธี affinity column chromatography โดยสร้างโปรตีน TcpA ที่มี histidine 6 โมเลกุลติดอยู่ที่ส่วน C-terminal และ histidines เหล่านี้สามารถจับกับ resin ที่มีโลหะ nickel เป็นองค์ประกอบ จึงทำให้สามารถ elute โปรตีนที่มีความจำเพาะนั้นๆ ออกมาจาก column ได้ภายหลังจากการล้างเอาส่วนประกอบอื่น ๆ ของ *E. coli* ใน host ที่ไม่จับกับ column ออกไปหมดแล้ว

การวิจัยส่วนนี้มี 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนที่หนึ่งเป็นการโคลน *tcpA* gene เข้าสู่ vector pTrcHis2 (Invitrogen) ที่มี histidine จำนวน 6 โมเลกุลติดอยู่ที่ส่วน C-terminal และเมื่อได้ clone ที่สร้างโปรตีนที่ต้องการแล้ว จึงนำไป induce ให้สร้างโปรตีนปริมาณมากๆ ก่อนนำไปสู่ขั้นตอนที่สองคือการนำโปรตีนไปผ่าน Probond resin affinity column ซึ่งจับได้ดีกับโมเลกุลของ histidine แล้วจึง elute โปรตีนออกมาหลังจากล้างส่วนอื่นที่ไม่จับกับ column ออกไปแล้ว

ในขั้นตอน cloning ได้นำ plasmid จาก VC7 clone มาตัดด้วย restriction enzymes *Bam*HI และ *Xho*I แล้วนำไป clone เข้าสู่ vector สามชนิด คือ pTrcHis2A, pTrcHis2B และ pTrcHis2C ซึ่ง vector สามชนิดนี้มีความแตกต่างกันที่ส่วนของ multiple cloning site อันเป็นผลให้ reading frames ของโปรตีนที่จะ transtate ออกมาต่างกัน ได้นำ vector ทั้งสามชนิดนี้มาตัดด้วย enzyme ทั้งสองชนิดข้างต้นคือ *Bam*HI และ *Xho*I แล้วนำมา ligate กับ 0.8 kb DNA fragments ของ VC7 clone ที่ elute ออกมาจาก agarose gel ต่อมาจึงนำ ligated DNA ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α host แล้ว screen หา clone ที่ได้โดยการเตรียม plasmid (miniprep) แล้วตัด plasmid DNA ด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Xho*I และได้เลือก

โคลนที่มี insert นำไป express โดยทำการ induce ด้วย 1 mM IPTG ในช่วง early log phase growth ของ recombinant clone แล้ว culture ต่อไปอีก 2 ชม จนถึง late log phase จากนั้นจึงนำแบคทีเรียจาก clone ต่างๆไปเตรียม whole cell lysates แล้วตรวจว่ามีการสร้าง recombinant protein จาก insert DNA หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับ whole cell lysate จาก vector ตัวเดียวกันที่ไม่มี insert

ในการ clone *tcpA* gene เข้าไปยัง vector ทั้งสามชนิด พบว่า *tcpA* insert ที่ clone เข้าสู่ pTrcHis2A เท่านั้นที่สร้าง recombinant protein จาก Figure 3.12 จะเห็นว่า clone ที่มีเพียง vector pTrcHis2A ก่อน (lane 1) และหลัง (lane 2) การ induce ด้วย 1 mM IPTG จะไม่มีการสร้างโปรตีนพิเศษใดๆ เพิ่มขึ้นจากโปรตีนปกติ แต่โปรตีนจาก clones A3, A5, A6 ที่มี *tcpA* insert พบว่ามีการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 25 kDa เมื่อการ induce ด้วย 1 mM IPTG (lanes 4, 6, และ 8) และเปรียบเทียบกับ protein profile ก่อน IPTG induction (lanes 3, 5 และ 7)

เมื่อพบว่า recombinant clone สามารถ express โปรตีนเป้าหมายได้แล้วจึงนำ *E. coli* clone มาเลี้ยงเพื่อเตรียม cell lysate ขั้นตอนการเตรียมโดยย่อ คือนำ bacterial culture ที่ induce ด้วย 1 mM IPTG 50 ml ไป centrifuge ให้ได้ cell pellet แล้วจึงนำไปละลายใน guanidinium lysis buffer, pH 7.8 ปริมาตร 10 ml โดยปล่อยให้ cell lysis ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ต่อจากนั้นจึงนำไป sonicate ในที่เย็น เพื่อ shear DNA และ RNA ก่อนนำไป centrifuge เพื่อแยก cell debris ออกไป แล้วนำส่วน supernatant มาแบ่งเป็น 2 ส่วนๆละ 5 ml เพื่อทำ affinity column ต่อไป

นำ *E. coli* lysate 5 ml แรกมา incubate กับ Invitrogen's Probond resin เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ polyhistidine-tagged protein จับกับ nickle บน resin แล้วทิ้งให้ resin ตกตะกอนลงมาเอง (หรืออาจใช้ low speed centrifugation; $800 \times g$ ก็ได้) ต่อจากนั้นแยกส่วนที่เป็นน้ำออกไป และนำ 5 ml lysate ส่วนที่ 2 ทำซ้ำข้างต้น หลังจากนั้นล้าง protein อื่นๆ ที่ไม่จับกับ nickle บน resin ดังนี้

- ล้าง 2 ครั้งด้วย denaturing binding buffer (ปริมาตร 4 ml $\times$ 2) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 7.8)
- ล้าง 2 ครั้งด้วย denaturing wash buffer 6.0 (4 ml $\times$ 2) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 6.0)
- ล้าง 2 ครั้งด้วย denaturing wash buffer 5.3 (4 ml $\times$ 2) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 5.3)

ขั้นตอนสุดท้ายคือการ elute protein เป้าหมายออกมาจาก column ด้วย denaturing elution buffer 4.0 (5 ml) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 4.0) โดยเก็บแยก elute เป็น fractions (1 ml) และนำแต่ละ fraction ไปวัด OD₂₈₀ ว่ามี protein ถูก elute ออกมาจริง ต่อจากนั้นนำโปรตีนในแต่ละ fraction มา dialyse ใน 10 mM Tris, pH 8.0, 0.1% Triton X-100 เพื่อกำจัด urea ออกไป แล้วนำแต่ละ fraction ไปตรวจดู protein profile ด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อดูว่า protein บริสุทธิ์ที่ต้องการอยู่ที่ fraction ใด จาก Figure 3.13 จะเห็นว่า protein profile ของ fractions 1 และ 2 ที่ถูก elute จาก affinity column มีโปรตีนขนาด 25 kDa ซึ่งน่าจะเป็น TcpA

13. การเตรียม recombinant cholera toxin (rCT) และ procholera toxin (P)

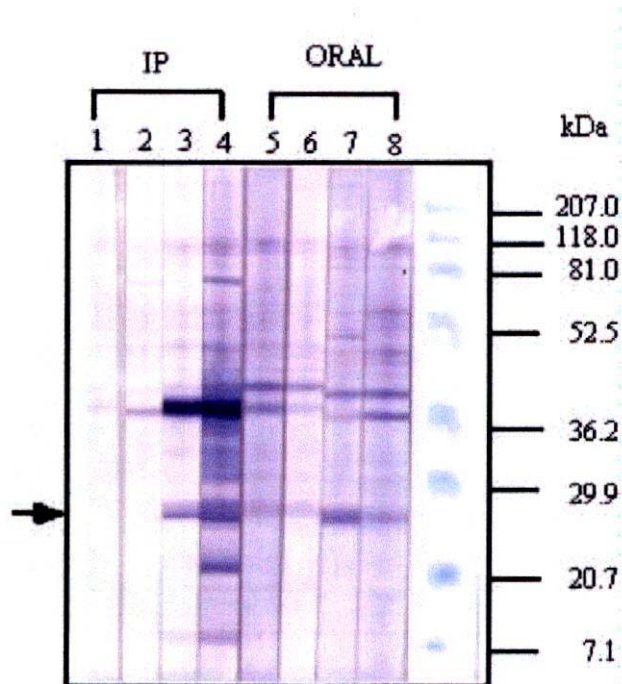
ส่วนประกอบหลักของ oral cholera vaccine ที่คณะผู้วิจัยได้เสนอไว้คือ lipopolysaccharide, TcpA (fimbriae) และ procholera toxin (P) ซึ่ง P ก็คือ heat-inactivated, high molecular weight cholera toxin (CT) ซึ่งส่วนที่เป็นพิษคือ A-subunit จะถูกทำลายไปเกือบหมด เหลือ B-subunit ซึ่งเป็น immunogen ที่สำคัญของ oral vaccine ที่จะกระตุ้นให้ร่างกายของโฮสต์สร้างแอนติบอดีต่อ B-subunit ซึ่งจะขัดขวางการจับของ CT กับ GM1 ganglioside ผู้วิจัยได้ใช้ recombinant *E. coli* strain MC1061 ซึ่งผลิต cholera toxin (CT) ได้ในปริมาณมากมาใช้เป็น source ของ cholera toxin โดยใช้วิธีการเตรียม cholera toxin ซึ่งได้อธิบายไว้โดย Uresaka *et al.*, 1994 ซึ่งสรุปได้โดยย่อคือเลี้ยง *E. coli* strain MC1061 ใน LB broth ที่มี ampicillin ผสมอยู่ 100 µg/ml โดยเขย่าเชื้อที่ 37°C ข้ามคืน แล้วจึงเก็บ cell pellet โดย centrifugation ต่อจากนั้นนำ cell pellet มาละลายใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6 ซึ่งผสม 0.9% NaCl แล้วนำ bacterial cell suspension ไป sonicate เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้น centrifuge เพื่อแยก cell debris ออกไปก่อนนำส่วน supernatant ไปตกตะกอนโปรตีน โดยเติมสาร ammonium sulfate ให้ได้ความเข้มข้น 65% saturation (516 g/litre) แล้วจึงเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้โดย centrifuge ที่ 10,000 × *g* เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนโปรตีนที่ได้นำไปละลายใน TEAN buffer (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 0.2 M NaCl, 3 mM NaN₃, 1 mM EDTA) แล้วนำไป dialyse ข้ามคืน ใน buffer เดียวกันนี้ โปรตีนที่ได้นำไปผ่าน immobilized galactose column และเนื่องจาก B-subunit ของ CT มีน้ำตาล galactose จึงสามารถจับกับ column นี้ได้ ต่อจากนั้นล้างโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* host ออกไปให้หมดด้วย TEAN buffer จนกระทั่ง eluate มีค่า OD₂₈₀ เป็น 0 ต่อจากนั้นจึง elute CT ออกจาก immobilized column ด้วย 0.5 M galactose ใน TEAN buffer และเก็บ 1 ml fractions นำมา dialyse ในน้ำกลั่น และตรวจดู protein profile ด้วยวิธี SDS-PAGE จะเห็นจาก Figure 3.14 ว่า CT ที่ถูก elute ออกมาเมื่อนำไปต้มใน sample buffer ที่มี 2-mercaptoethanol ผสมอยู่จะได้ protein bands ที่ molecular weights 30 และ 10 kDa ซึ่งตรงกับ น้ำหนักของ A และ B subunits ของ CT ตามลำดับ

Recombinant CT protein ที่ผลิตได้นี้เมื่อนำไป heat-inactivated เพื่อทำลายส่วน A-subunit ซึ่งเป็นส่วน active toxin ที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงเรียกว่า procholeraegenoid (P) ซึ่งจะใช้เป็นส่วประกอบของ oral cholera vaccine สำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

โครงการย่อยที่ 3 ส่วนที่ 2:

การทดสอบประสิทธิภาพของ liposome และ CpG DNA

องค์ประกอบของ oral cholera vaccine ที่เสนอโดยคณะผู้วิจัยจะประกอบด้วย fimbriae หรือ toxin co-regulated pili protein (TcpA), procholeraeoid และ lipopolysaccharide จาก *V. cholerae* O1 ผู้วิจัยจะทดสอบวัคซีนโดยใช้ adjuvant 2 ชนิด คือ liposome และ CpG DNA ว่า adjuvants ทั้งสองชนิดนี้จะสามารถเพิ่ม immunogenicity ของ vaccine ได้หรือไม่ โดยจะทำการทดลองในหนู rat และจะตรวจว่าหนูเหล่านี้สร้างแอนติบอดีต่อ immunogen แต่ละอย่างมาก-น้อยเพียงใด โดยจะตรวจดูจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี (plasma cells) ที่มีความจำเพาะต่อ immunogen แต่ละชนิด ใน lamina propria tissue section

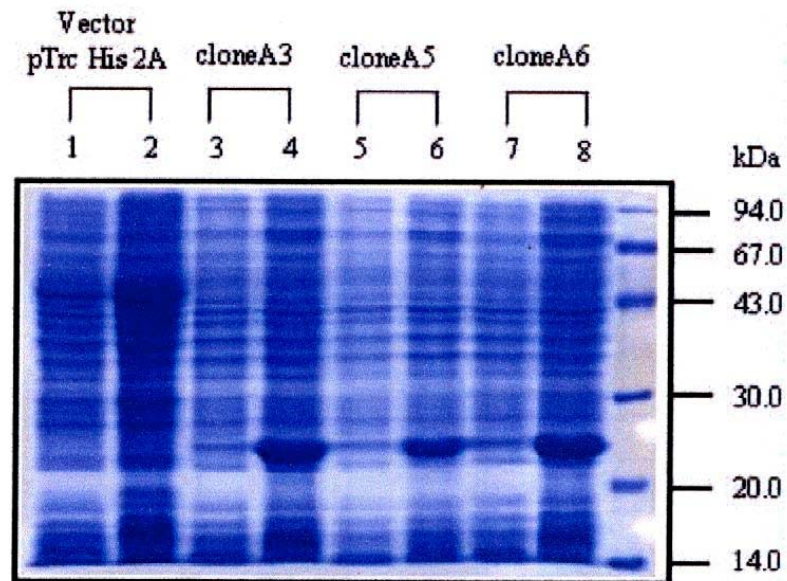


รูปที่ 3.11 Western blot analysis ของ mouse serum ต่อ bacterial lysate ของ *E. coli* clone ที่ผลิต TcpA protein

หนูกลุ่มแรกถูก immunize โดยทาง intraperitoneal route; Lanes 1 และ 2 เป็น serum samples ของหนูปกติก่อนถูก immunize ด้วย TcpA + adjuvant ทาง intraperitoneal route และ lanes 3 และ 4 เป็น serum samples ของหนูสองตัว เดิมหลังจากถูก immunized ด้วย TcpA แล้ว 3 doses

หนูกลุ่มที่สองถูก immunized โดยทาง oral route; Lanes 5 และ 6 เป็น serum samples ก่อนได้รับ immunogen และ lanes 7 และ 8 เป็น serum samples หลังจาก immunized แล้ว 3 doses

ลูกศรชี้ตรงระดับ protein band ที่คาดว่าจะจะเป็น band ของ immuno complex ของ TcpA protein กับแอนติบอดี



รูปที่ 3.12 แสดง SDS-PAGE patterns ของโปรตีน ของ expression vector pTrcHis2A ที่มีและไม่มี insert ของ *tcpA* gene

lane 1, bacterial lysate ของ *E. coli* strain ที่มี vector pTrcHis2A ก่อน IPTG induction

lane 2, bacterial lysate ของ *E. coli* strain ที่มี vector pTrcHis2A หลัง IPTG induction

lane 3, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A3 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert ก่อน IPTG induction

lane 4, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A3 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert หลัง IPTG induction

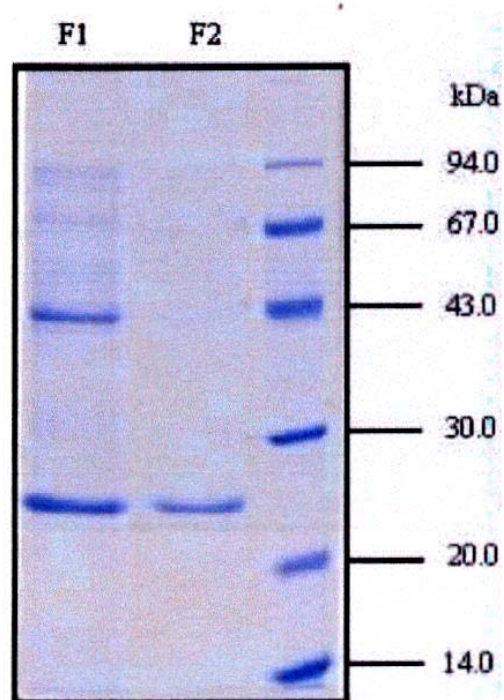
lane 5, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A5 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert ก่อน IPTG induction

lane 6, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A5 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert หลัง IPTG induction

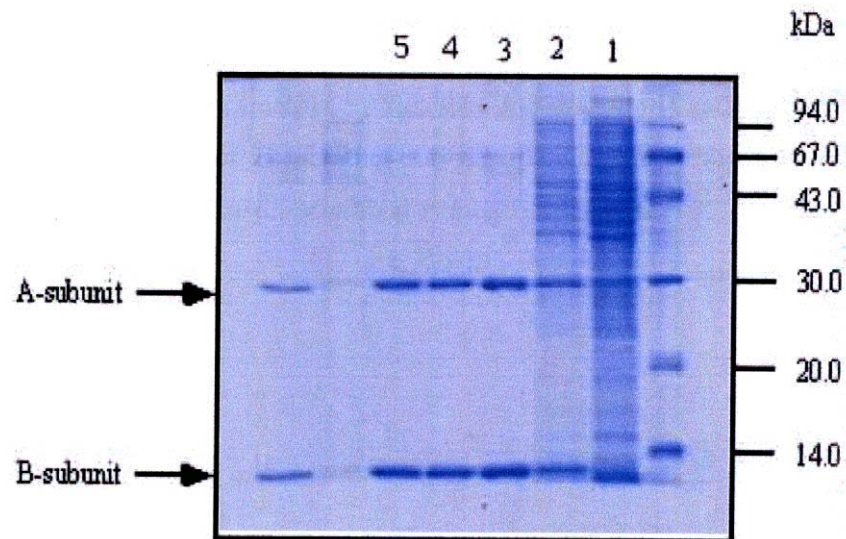
lane 7, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A6 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert ก่อน IPTG induction

lane 8, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A6 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert หลัง IPTG induction

Lane ขวาสุดคือ standard molecular weights



รูปที่ 3.13 Protein profile ของ purified TcpA protein fractions 1 (F_1) และ 2 (F_2) ที่ถูก elute จาก Probond Nickle affinity column ซึ่ง purified protein มี molecular weight ประมาณ 25 kDa



รูปที่ 3.14 แสดง protein profiles ในขั้นตอนการเตรียม recombinant CT

Lane 1, protein profile ของ *E. coli* MC1061

Lanes 2-5, protein profiles จาก fractions ต่างๆ ที่ elute ออกมาจาก immobilized galactose column

ลูกศรชี้ bands ของ CT-A (≈ 30 kDa) และ CT-B (≈ 10 kDa) subunits

วัคซีนอหิวาต์ซึ่งประกอบด้วย immunogens สามชนิดนี้ได้นำไปทดสอบหา immunogenicity ในสัตว์ทดลองคือ rat model ใน formulations ต่างๆกันคือ:

- Vaccine 1:** ประกอบด้วย TcpA, P, LPS (immunogens), liposomes (delivery vehicle) และ CpGDNA (ODN#1826) ซึ่งทำหน้าที่เป็น adjuvant ทั้งนี้โดยใช้ TcpA 5 mg, P 200 µg, LPS 5 mg, CpGDNA 100 µg [โดยเตรียม liposomes จาก cholesterol และ sphingomyelin ตามวิธีของ Chaicumpa *et al.* (1990)] ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 2:** ประกอบด้วย immunogens ทั้งสามชนิด (คือ TcpA, P และ LPS โดสเท่ากับ vaccine 1), liposomes และ non-CpGDNA (ODN#1928) (100 µg) ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 3:** ประกอบด้วย TcpA, P และ LPS และ liposomes โดยไม่มี CpGDNA (ODN#1826) โดสเท่ากับ vaccine 1 ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 4:** ประกอบด้วย TcpA, P และ LPS และ CpGDNA (ODN#1826) โดยไม่มี liposomes โดสเท่ากับ vaccine 1 ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 5:** ประกอบด้วย TcpA, P และ LPS และ non-CpGDNA (ODN#1928) โดยไม่มี liposomes โดสเท่ากับ vaccine 2 ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 6:** ประกอบด้วย immunogens ทั้งสามชนิด (TcpA, P และ LPS) เท่านั้น โดสเท่ากับ vaccine 1 ใน 3 ml 5% NaHCO₃

นอกจากนี้ได้เตรียม Placebos อีกสามสูตรคือ

- Placebo 1:** ประกอบด้วย liposomes เพียงอย่างเดียว ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Placebo 2:** ประกอบด้วย CpG DNA (ODN#1826) เพียงอย่างเดียว (100 µg) ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Placebo 3:** ประกอบด้วย 5% NaHCO₃ solution ปริมาตร 3 ml ซึ่งใช้เป็น diluent ของ vaccine ทุก formulation ใน 3 ml 5% NaHCO₃

การเตรียม recombinant TcpA

ใช้ VC7 clone ซึ่ง carry *tcpA* gene ที่ ligated อยู่กับ vector pBluescript II KS โดยปกติ plasmid system นี้จะต้อง maintain ที่อุณหภูมิต่ำคือ 30°C แต่เมื่อนำไปเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42°C จะสามารถ inactivate repressor protein และทำให้มีการสร้าง T7 RNA polymerase และผลสุดท้ายมีการ express TcpA ซึ่ง TcpA มีขนาดประมาณ 23-25 kDa แต่เนื่องจากการ purify *tcpA* โดย gel filtration หรือ ion exchange column chromatographies มีความยุ่งยาก เราจึงได้ subclone เข้าไปใน vectors pTrcHis 2 A, B และ C แล้วจึง transform vectors เข้าใน *E. coli* DH5 α พบว่า plasmid TrcHis 2 A ซึ่ง transform เข้า *E. coli* DH5 α สามารถ express TcpA ได้ แต่ TrcHis 2 B และ TrcHis 2 C ไม่ express TcpA

ในการเตรียม TcpA ได้นำ recombinant *E. coli* ไป inoculate ลงใน LB broth 3 ml ซึ่งผสม ampicillin 50 μ g/ml แล้ว incubate ที่ 37°C พร้อมเขย่าข้ามคืน วันรุ่งขึ้นได้ inoculate overnight culture ปริมาณ 1 ml ลงใน LB broth 50 ml (ผสม ampicillin 50 μ g/ml) incubate ที่ 37°C พร้อมเขย่า 3 ชั่วโมง จนมี OD ที่ 600 nm = 0.6 (เซลล์อยู่ใน mid-log phase) เติม IPTG ลงใน culture ให้ได้ความเข้มข้น 1 mM (0.5 ml ของ 100 mM IPTG) แล้ว incubate ต่ออีก 2 ชั่วโมงที่ 37°C จากนั้นนำ culture ไปปั่นที่ 8,000 $\times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำ pellet ไป resuspend ใน denaturing binding buffer แล้วนำไปผ่าน purify ProBond Purification System เพื่อใช้เป็นวัคซีนต่อไป

การเตรียม LPS

ได้ extract LPS จาก *Vibrio cholerae* biotype El Tor strain O17SR โดย phenol-water extraction method (Westphal and Jann, 1965)

การเตรียม Procholeragenoid (P)

Procholeragenoid (P) คือ heat-mediated conversion of CT (cholera toxin หรือ cholera toxin) เพื่อให้เป็น cholera toxoid (B-subunits ซึ่งมี trace activity of A-subunit เหลืออยู่ไม่เกิน 5% ของ holotoxin) ทั้งนี้โดยการนำ CT ไป heat ที่ 65°C เป็นเวลา 15 นาที ถ้า heat นานกว่านี้ (25 นาที) จะมี activity ของ subunit A (toxicity) เหลือ 1 % การที่ไม่ทำลาย activity ของ CT A-subunit ให้หมดก็เพราะต้องการให้ A-subunit เป็น adjuvant และ break oral tolerance ต่อ protein antigen ด้วย

ได้เตรียม CT จาก recombinant *E. coli* MC 1061 (pKTJ5-15X) ซึ่งได้ clone *ctx* genes ไว้แล้ว โดยนำ recombinant *E. coli* มา streak บน agar plate ซึ่งมี ampicillin ผสมอยู่ 100 μ g/ml เพื่อให้ได้ single colonies หลังจาก incubate ข้ามคืนที่ 37°C นำ colonies จาก

plate ประมาณ 1 loop ไป inoculate ใน LB broth ซึ่งผสม ampicillin (100 µg/ml) แล้ว incubate พร้อมเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไป inoculate ลงใน LB broth 500 ml (ผสม ampicillin 100 µg/ml) แล้ว incubate พร้อมเขย่าที่ 37°C ข้ามคืน

ในวันรุ่งขึ้นนำ culture มาปั่นเพื่อให้ได้ cell pellet จากนั้น resuspended pellet ใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6 ซึ่งผสม 0.9% NaCl จากนั้นนำ cell suspension ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonication ที่ 20 kHz, 2 นาที 5 ครั้ง ปั่นเอา supernatant แล้วนำไปตกตะกอนด้วยการเติม ammonium sulfate ให้เป็น 65% saturation (516 g/liter) แล้วนำ precipitate ไปละลายใน TEAN buffer, pH 7.4 หลังจาก dialyse เอา ammonium sulfate ออกใน buffer เดียวกันแล้วจะได้ “crude CT”

นำ crude CT ไป purify ให้ได้ pure CT โดยใช้ galactose column chromatography (Pierce Co., Rockford, USA) และใช้ technique เหมือนกับวิธีเตรียม LT จาก ETEC (โปรดดูวิธีการในโครงการย่อยที่ 2 หน้า 41 และ 42)

การเตรียม rabbit anti-CT immunoglobulins

ได้ immunized กระจ่าย (2-2.5 kg) ด้วย cholera toxin ตามตารางที่ 3.1

ได้เจาะเลือดจากหัวใจกระจ่ายในวันที่ 64 (Day 64) แล้วแยกซีรัมเพื่อนำไปตกตะกอนเอา immunoglobulins โดยใช้ ammonium sulfate precipitation (50% saturation)

การเตรียม rabbit anti-TcpA

ได้ immunized กระจ่าย ด้วย purified TcpA

หลังจาก immunized ครั้งสุดท้ายแล้วสองสัปดาห์ ได้เจาะเลือดจากหัวใจกระจ่ายไปแยกเอาซีรัมเพื่อเตรียม immunoglobulins เช่นเดียวกับการเตรียม rabbit anti-CT immunoglobulins

การเตรียม Anti-*V. cholerae* O1 LPS

ใช้ mouse monoclonal antibodies ซึ่ง specific ต่อ *V. cholerae* O1 LPS จาก hybridoma clone 27E10 โดยได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Sciences Development and Management Ltd. ซึ่งซื้อสิทธิบัตร clone ดังกล่าวไปจาก สวทช. (Chaicumpa *et al.*, 1995)

ตารางที่ 3.1 Rabbit immunization schedule and dosages of CT

Day	CT ($\mu\text{g/ml}$ NSS)
0	4
8	10
15	20
33	40
43	40
50	40

สัตว์ทดลองและการ immunize

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัยส่วนนี้คือ Wistar rats ซึ่งมีอายุ 8 สัปดาห์ขณะเริ่มการทดลอง โดยซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว(เลี้ยงรวมกัน 5 ตัวต่อหนึ่งกรง) ใช้ sterile woodchips เป็น bedding และเลี้ยงด้วยอาหารหนูซื้อจากบริษัท ซี พี ส่วนน้ำดื่มเป็นน้ำกรองและห้องปรับอากาศ

ก่อนเริ่มการทดลองได้เลี้ยงหนูให้อยู่ในห้องเลี้ยงสัตว์ที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อนเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์เพื่อให้ชินกับสภาวะห้องเลี้ยงใหม่ และคลายความเครียดลง

ได้ให้หนูอดอาหารเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ก่อนป้อนวัคซีนตัวละหนึ่งโดสซึ่งละลายอยู่ใน 5% NaHCO₃ ปริมาณ 3 ml โดยใช้ Luer fitting cannula ซึ่งปลายเป็นโลหะกลม สอดเข้าไปใน esophagus (Campbell, 1991)

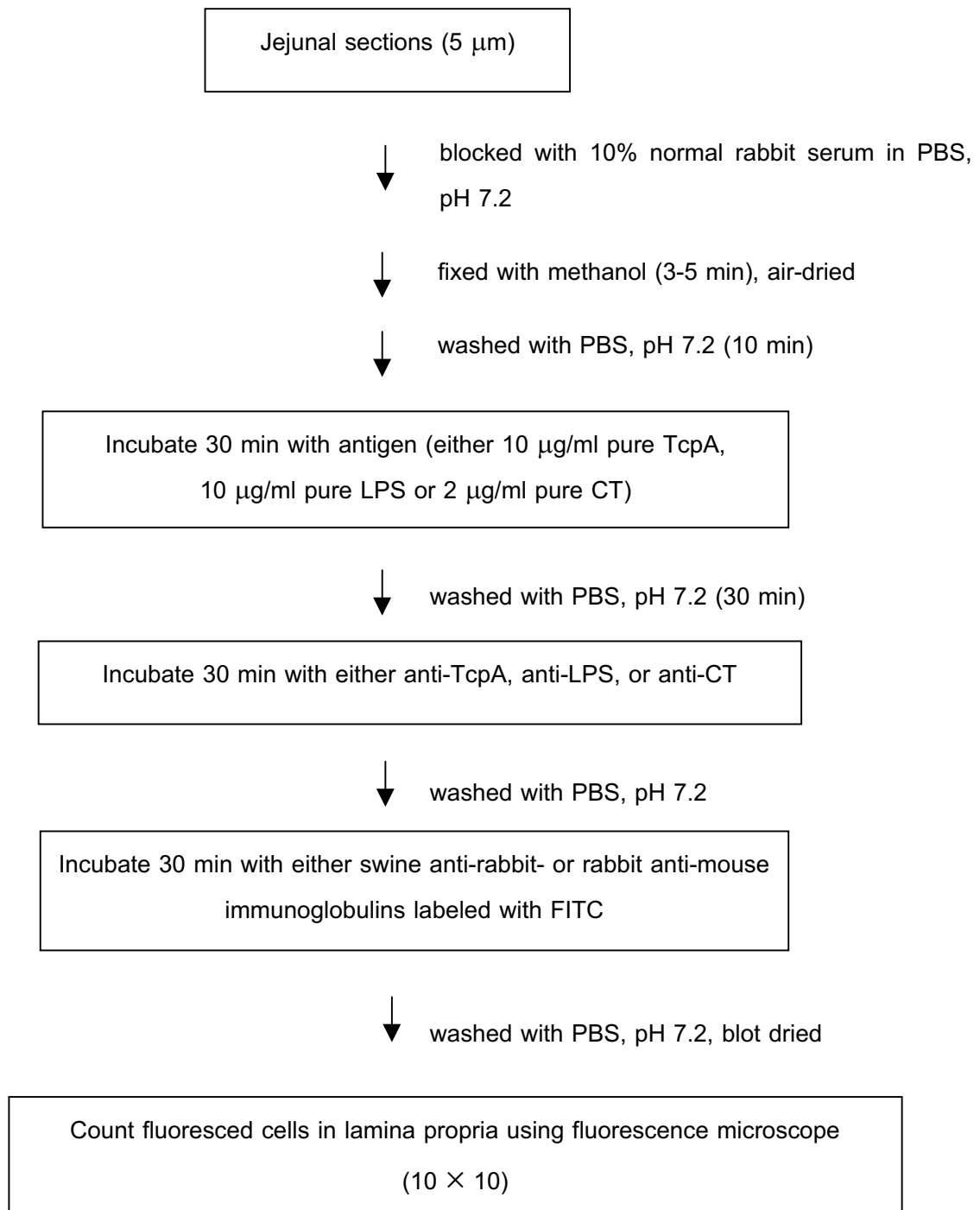
หนูแต่ละกลุ่มได้รับ oral vaccine หรือ placebo รวมทั้งสิ้นตัวละสามโดส โดยเว้นระยะห่างระหว่างโดสสองสัปดาห์

การเก็บตัวอย่างและการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีในลำไส้

หลังจากป้อนวัคซีนโดสสุดท้ายครบเจ็ดวัน ได้ให้หนู rats อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ) วางยาสลบหนู rat แต่ละตัวด้วย diethylether จนสลบดีแล้ว จึงเจาะเลือดเพื่อแยกเอาซีรัม และ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ก่อนฆ่าหนูโดยวิธี cervical dislocation จากนั้นผ่าเปิดหน้าท้องหนูแต่ละตัว ตัดเอาลำไส้เล็กตลอดความยาวออกมาล้างทั้งด้าน serosal และ mucosal surface ด้วย cold PBS, pH 7.2 ตัดลำไส้เล็กจาก pylorus ประมาณ 28-32 ซม. เป็นชิ้นยาวประมาณชิ้นละ 1 ซม. เก็บใน disposable molds ซึ่งมี OCT (frozen section medium) บรรจุอยู่ นำไปเก็บที่ -70°C เพื่อใช้ตรวจหาและนับจำนวน antibody producing cell (AbPC) ใน lamina propria ต่อไป ด้วยวิธี double antibody sandwich method of immunofluorescence ซึ่งมีขั้นตอนดัง Diagram 2

ในการนับจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง fluorescein (AbPC) ต่อแอนติเจนแต่ละชนิดใช้ tissue sections จำนวน 2 sections ต่อหนู 1 ตัว รวม 10 sections ใน แต่ละกลุ่ม (กลุ่มละ 5 ตัว) ในแต่ละ section ได้นับจำนวน AbPC ใน 25 microscopic fields (กำลังขยายขณะนับเซลล์ 10 ocular × 10 objective) รวมทั้งสิ้นในแต่ละกลุ่มจะนับเซลล์ทั้งหมดใน 250 microscopic fields เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และ standard deviation (SD)

Diagram 2 : แสดงขั้นตอนการตรวจหาและนับจำนวน antibody producing cells (AbPC) ใน jejunal sections ของ immunized rats ด้วยวิธี double antibody sandwich method of immunofluorescence



ผลการวิจัย

การทดสอบ Immunogenicity ของวัคซีนทั้ง 6 formulations และ 3 placebos ในการ induce AbPC ในลำไส้ของหนู rat ทดลอง เพื่อดูว่า CpGDNA จะใช้เป็น oral adjuvant ใน mucosal vaccine ได้หรือไม่ เปรียบเทียบกับ placebos 3 กลุ่ม ได้ผลดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.2 แสดงจำนวน antibody producing cells (ค่าเฉลี่ยและ standard deviation) เมื่อนับด้วย microscopic magnification 10× และ objective 10× ต่อ 1 microscopic field

พบว่า จำนวน anti-LPS ของกลุ่มที่ 1-9 คือ 118.72 ± 2.47 , 109.23 ± 2.59 , 108.06 ± 2.27 , 86.85 ± 2.11 , 80.11 ± 2.20 , 80.08 ± 2.58 , 12.15 ± 0.39 , 8.48 ± 0.31 , และ 8.02 ± 0.41 ตามลำดับ

ส่วนค่าเฉลี่ยจำนวน anti-TCP producing cells ของกลุ่มที่ 1-9 คือ 47.70 ± 0.54 , 43.10 ± 0.67 , 43.17 ± 0.64 , 37.30 ± 0.58 , 34.24 ± 0.65 , 34.68 ± 0.43 , 7.10 ± 0.23 , 5.70 ± 0.19 , และ 5.74 ± 0.17 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยจำนวน anti-CT producing cells ต่อ 1 microscopic field คือ 111.73 ± 2.55 , 94.38 ± 2.13 , 93.51 ± 2.27 , 83.44 ± 2.21 , 74.74 ± 2.16 , 74.80 ± 2.02 , 9.04 ± 0.41 , 5.59 ± 0.44 , และ 5.01 ± 0.18 ตามลำดับ

ดังนั้น vaccine formulation 1 ซึ่งมีแอนติเจนทั้งสามชนิดคือ LPS, TCP และ procholera toxin (P) associate กับ liposome (L) และผสม bacterial CpG DNA (# OKN 1826) จึงมี immunogenicity สูงที่สุด ซึ่งสามารถเขียน order of magnitude ของ immunogenicity ได้ ดังนี้

$1 > 2, 3 > 4, 5, 6 > 7, 8, 9$ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3.2 แสดงจำนวน antigen specific antibody producing cells ใน intestinal (jejunal) sections ของหนู rats ทั้งเก้ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งหก formulations และ placebos สามชนิด

Group no.	Average numbers ($\pm$ S.E.) of AbPCs specific to:		
	Anti-LPS	Anti-TcpA	Anti-CT
1	118.72 ($\pm$ 2.47)*	47.70 ($\pm$ 0.54)*	111.73 ($\pm$ 2.55)*
2	109.23 ($\pm$ 2.59)	43.10 ($\pm$ 0.67)	94.38 ($\pm$ 2.13)
3	108.06 ($\pm$ 2.27)	43.17 ($\pm$ 0.64)	93.51 ($\pm$ 2.27)
4	86.85 ($\pm$ 2.11)	37.30 ($\pm$ 0.58)	83.44 ($\pm$ 2.21)
5	80.11 ($\pm$ 2.20)	34.24 ($\pm$ 0.65)	74.74 ($\pm$ 2.16)
6	80.08 ($\pm$ 2.58)	34.68 ($\pm$ 0.43)	74.80 ($\pm$ 2.02)
7	12.15 ($\pm$ 0.39)	7.10 ($\pm$ 0.23)	9.04 ($\pm$ 0.41)
8	8.48 ($\pm$ 0.31)	5.70 ($\pm$ 0.19)	5.59 ($\pm$ 0.44)
9	8.02 ($\pm$ 0.41)	5.74 ($\pm$ 0.17)	5.01 ($\pm$ 0.18)

* นับจาก 2 sections ของหนูแต่ละตัว section ละ 10 microscopic fields ซึ่งในแต่ละกลุ่มมีหนู 5 ตัว ดังนั้นในแต่ละกลุ่มจึงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 250 microscopic fields (กำลังขยาย 10 ocular $\times$ 10 objective)

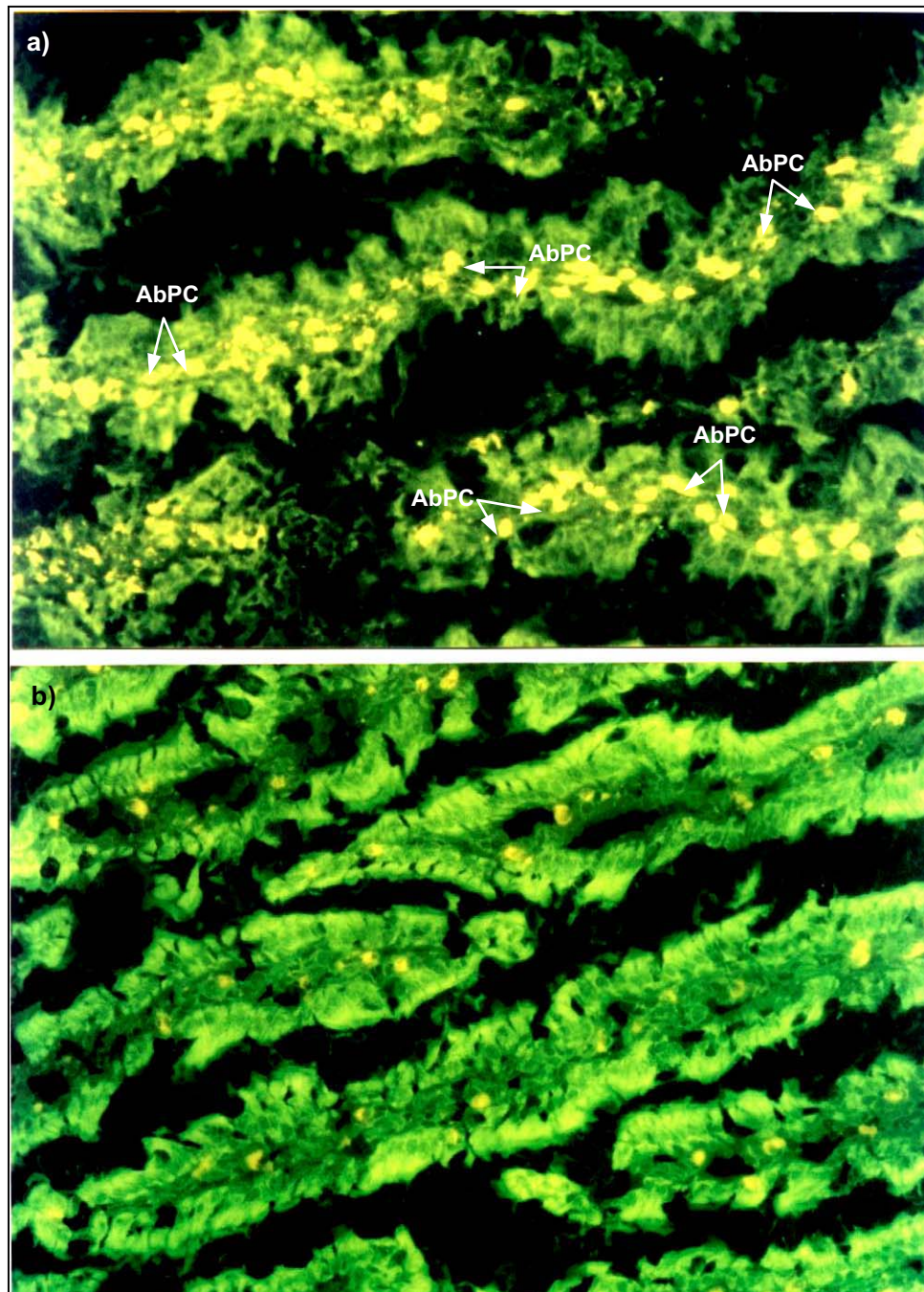


Figure 3.15 a) Anti-LPS producing cells in jejunal lamina propria of rat at villous core (group 1); 10 × ocular, 10 × objective
b) Liposome control

Selected References

- Attridge, S R, Voss, E and Manning, P A. Pathogenic and vaccine significance of toxin-coregulated pili of *Vibrio cholerae* E1 Tor. *Journal of Biotechnology* 1999; 73: 109-17.
- Cooper, G N and Narendranathan, R. Antibacterial immunity to *Vibrio cholerae* in rats. *Journal of Medical Microbiology* 1986; 22: 133.
- Hanahan, D. Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning : a practical approach, Glover, D M (ed.). 1970; Vol. 1. IRL Press, Oxford and Washington D.C.
- Tabor, S and Richardson, CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1074-8.

References

- Anderson PM, Hanson DC, Haz DE, Halet MR, Blazar BR, Ochoa AC. Cytokines in liposomes: preliminary studies with IL-1, IL-2, IL-6, GM-CSF and interferon- γ . *Cytokine* 1994; 6: 92-101.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Chaicumpa W, Chaisri U, Tapchaisri P, *et al*. Oral vaccine against cholera prepared from *V. cholerae* antigens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987; 18: 142-8.
- Chaicumpa W, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, *et al*. Immunogenicity of liposome-associated and refined antigen oral cholera vaccines in Thai volunteers. *Vaccine* 1998; 16(7): 678-84.
- Chaicumpa W, Parairo J, New RC, *et al*. Immunogenicity of liposome-associated oral cholera vaccine prepared from combined *Vibrio cholerae* antigens. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1990; 8: 87-94.

- Chaicumpa W, Parairo J. Liposomes and their potential in oral cholera vaccines. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1988; 6: 70-6.
- Chaicumpa W, Thattiyaphong A, Chongsa-nguan M, *et al.* Rapid detection of *V. cholerae* O1. *Serodiag Immunother Infect Dis* 1995; 7(4): 161-72.
- Ehara M, Ishibashi M, Ichinose Y, *et al.* Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine* 1987; 5: 283-5.
- Ehara M, Iwami M, Ichinose Y, *et al.* Purification and partial characterization of fimbriated of *Vibrio cholerae* O1 strain Bgd 17. *Trop Med* 1991; 33(4): 109-25.
- Finkelstein RA, Boesman- Finkelstein M, Chang Y, Hase CC. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun* 1992; 60(2): 472-8.
- Freter R, Jones GW. Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 647-58.
- Freter R. Mechanism of association of bacteria with mucosal surfaces. *Ciba Found Symp* 1981; 80: 36-55.
- Gregoriadis G, Gursel I, Gursel M, McCormack B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Control Release* 1996; 41: 49-56.
- Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM. Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system. *Infect Immun* 1998; 66 (9): 4299-304.
- Holmgren J, Lonnroth I, Mansson J-E, Svennerholm AM. Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of the small intestine. *Proc Natl Acad USA* 1975; 72: 2520-4.
- Holmgren J, Lonnroth I, Svennerholm AM. Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure studies with GM1 ganglioside and related glycolipids. *Infect Immun* 1973; 8: 208-14.
- Honda T, Lertpocasombat K, Hata A, Miwatani T, Finkelstein RA. Purification and characterization of protease produced by *Vibrio cholerae* non -O1 and

- comparison with protease of *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* 1989; 57(9): 2799-803.
- Husband AJ. Mucosal memory-maintenance and recruitment. *Vet Immunol and Immunopathol* 2002; 87: 131-6.
- Kalambaheti T, Chaisri U, Srimanote P, *et al.* Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. *Vaccine* 1998; 16 (2-3): 201-7.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, *et al.* CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin-6, interleukin-12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (7): 2879-83.
- Krieg AM, Hartmann G, Yi AK. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 247: 1-21.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374 (6522): 546-549.
- Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1): 35-43.
- McCluskie MJ, Weeratna RD, Krieg AM, *et al.* CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. *Vaccine* 2001; 19: 950-7.
- Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, *et al.* CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 1998; 16 (11-12): 1216-24.
- Newby JJ and Stokes CR. Local immune responses of the gut. CRC Press, Boca Raton, 1984; p. 143.
- Ogierman MA, Zobihi S, Mourtzios L and Manning PA. Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*. *Gene* 1993; 126: 51-60.
- Szoka F Jr, Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; (9): 4194-8.

- Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, et al. Randomized, double-blind, placebo controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect Immun* 1999; 67 (12): 6341-6345.
- Tacket CO, Kotloff KL, Losonsky G, et al. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *V. cholerae* O1 vaccine strain CVD111. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 533-7.
- Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, et al. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD110, a $\Delta ctxA \Delta zot \Delta ace$ derivative of El Tor Ogawa *V. cholerae*. *J Infect Dis* 1993; 168: 1536-1540.
- Wagner H, Hacker H, Lipford GB. Immunostimulatory DNA sequences help to eradicate intracellular pathogens. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22: 147-52.
- Wang Z, Karras JG, Colarusso TP, et al. Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 1997; 180:162-7.
- WHO Memorandum. Intestinal immunity and vaccine development. *Bull WHO* 1979; 57: 719-734.
- Yoshihiko U, Yoko O, Zaw L, et al. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb Pathog* 1994; 16: 71-6.

3. Output ของการวิจัย

1. จำนวน publications, manuscripts ที่ส่งไปตีพิมพ์แล้ว และที่กำลังเตรียมเพื่อตีพิมพ์

- 1.1. Ittiprasert W, Chongsa-nguan M, Manatrakul D, Jongsuksuntigul P, Meesomboon V, Wongsaroj T, Kitikoon V, Sakolvaree Y, Hayashi H, **Chaicumpa W**. Prevalence of antibodies to *Schistosoma mekongi* among inhabitants of the high-risk area of Thailand. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology* 1999; 22(1): 7-14.
- 1.2. Srimanote P, Ittiprasert W, Sermsart B, Chaisri U, Mahannop P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Maleewong W, Kurazono H, Hayashi H, **Chaicumpa W**. *Trichinella spiralis*-specific monoclonal antibodies and affinity-purified antigen-based diagnosis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2000; 18: 37-45.
- 1.3. Ittiprasert W, Butraporn P, Kitikoon V, Klongkamnuankarn K, Pholsena K, Vanisaveth V, Sakolvaree Y, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Mahakunkijcharoen Y, Hayashi H, **Chaicumpa W**. Differential diagnosis of schistosomiasis mekongi and trichinellosis in human. *Parasitology International* 2000; 49: 209-18.
- 1.4. Suppadit T, Kitikoon V, Key JP, **Chaicumpa W**, Jaturasitha S, Pongpichan P. Development of broiler litter as valuable animal feed ingredient by mixing casava meal or effective microorganism by fermentation method. The Second Symposium on Sustainable Utilization of Agricultural Byproducts for Animal Production, Chulalongkorn University Press 2001 ISBN 974-13-1427-2; 19-28.
- 1.5. Chaisri U, Nagata M, Kurazono H, Horie H, Tongtawe P, Hayashi H, Watanabe T, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, **Chaicumpa W**. Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. *Microbial Pathogenesis* 2001; 31(2): 59-67.
- 1.6. Sonjai K, Soisangwan R, Sakolvaree Y, Kurazono H, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Mahakunkijcharoen Y, Nair GB, Hayashi H, **Chaicumpa W**. Validation of salmonellosis and shigellosis diagnostic test kits at a provincial hospital in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19: 115-27.
- 1.7. Wongsaroj T, Sakolvaree Y, **Chaicumpa W**, Maleewong W, Kittikoon V, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Cross JH. Affinity purified oval antigen for diagnosis of opisthorchiasis viverri. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19: 245-58.
- 1.8. Saengjaruk P, **Chaicumpa W**, Watt G, Tapchaisri P, Sittinont C, Tomnakan K, Wambongco MAL, Chongsa-nguan M, Mahakunkijcharoen Y, Kalambaheti T, Sakolvaree Y, Naigowit P, Kurazono H, Hayashi H. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody based-antigen detection in urine. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2): 480-9.

- 1.9. Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, Zambrano CH, Sufit RL, Sakolvaree Y, **Chaicumpa W**, Herwaldt BL, Johnson S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from Caribbean. *New Engl J Med* 2002; 436(9): 668-75.
- 1.10. Suppadit T, Kitikoon V, Key JP, **Chaicumpa W**, Pongpiachan P, Jaturasitha S. Utilization of broiler litter as a source of crude protein for cattle: I. The nutritional effect of different feed modification. *Thai J Agric Sci* 2002; 35(4): 427-36.
- 1.11. Taweetawornsawat P, **Chaicumpa W**, Chaisri U, Chuanbal U, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Wongsaroj T. Specific monoclonal antibodies to *Strongyloides stercoralis*: A potential diagnostic reagent for strongyloidiasis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2002; 20: 247-56.
- 1.12. Sookrung N, Diraphat P, **Chaicumpa W**, Tongtawe P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Mahakittikul V, Tungtrongchitr A, Vichyanond P, Bunnag C. Development of a test kit for detection of cockroach allergens and the study of cockroach allergens in Thai allergic patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003; 21(1):1-9.
- 1.13. Diraphat P, Sookrung N, **Chaicumpa W**, Pumhirun P, Vichyanond P, Tapchaisri P, Sookroong N, Kalambaheti T, Mahakunkijcharoen, Sakolvaree Y, Bunnag C. Recombinant american cockroach component, Per a1, reactive to IgE of Thai allergic patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003; 21(1):11-20.
- 1.14. Samosornsuk S, Von Seidleim L, Robertson S, Ali M, Clemens J, **Chaicumpa W**. Use of cluster survey to estimate treatment preference for diarrhea and dysentery Kangkoi district, Saraburi province. Manuscript in preparation
- 1.15. Wongkamchai S, Choochote W, Jitpuckdee A, Suvanadabba S, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Loymak S, **Chaicumpa W**. An antigen detection assay for diagnosis of brugian filariasis. Submitted to *Int J Parasitol*
- 1.16. Leelawongtawon R, **Chaicumpa W**, Somroop S, Chaisri U, Tongtawe P, Chongsanguan M, Kalambaheti T, Tapchaisri P, Pichayangoon S, Kurazono H, Hayashi H. Role of CpG DNA and liposome in immune response to oral cholera vaccine. Submitted to "Vaccine".
- 1.17. Panutdaporn N, Chongsanguan M, Nair GB, Ramamurthy T, Yamasaki S, Chaisri U, Tongtawe P, Eampokalarp B, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Kurazono H, Ba Thein W, Hayashi H, Takeda Y, **Chaicumpa W**. Genotypes and phenotypes of Shiga toxin producing-*Escherichia coli* Isolated from healthy cattle in Thailand. Accepted for publication in the *Journal of Infections* (in press).

- 1.18. Na Ubol M, Chaiyaroj S, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Sakolvaree Y, Yamazaki S, Hayashi H, Kurazono H, **Chaicumpa W**. Virulence genes of *Vibrio cholerae* Thailand isolates. Manuscript in preparation.
- 1.19. Lintaworndee S, Sakolvaree Y, **Chaicumpa W**, Johnson S, Wongsaroj T, Maleewong W. Analysis of *Angiostrongylus cantonensis* antigenic components cross-reactive to antibodies incited by other helminthes. Manuscript in preparation
- 1.20. Suwimolteerabut J, **Chaicumpa W**, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, Ramasoota P, Saengjaruk P, Sakolvaree Y, Virakul P. Detection of *Leptospira* antigenuria among cattle at farms in Thailand. Accepted for publication in Asian Pacific J Allergy Immunol.
- 1.21. Khan A, Nandi RK, Ramamurthy T, Khanam J, Shimizu T, Yamasaki S, Bhattacharya SK, **Chaicumpa W**, Takeda Y and Nair GB. Environmental isolates of *Citrobacter braakii* that agglutinate with *Escherichia coli* O157 antiserum but do not possess the genes responsible for the biosynthesis of O157 somatic antigen. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 179-86.

2. บทความทางวิชาการ/หนังสือ

- 2.1 หนังสือที่ระลึก 40 ปี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เรื่อง
 - Diarrhea and Enteric Fever
 - Trichinellosis
- 2.2 หนังสือรายงานประจำปี (Annual Report) ของคณะเวชศาสตร์เขตร้อนปี 2000, 2001, 2002 เรื่อง "Special Laboratory Services"
- 2.3 Proceedings of the 12th Workshop on Diarrheal Diseases จัดโดยมหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุข และ World Health Organization เมื่อ 24-26 ตุลาคม 2543 ห้องประชุม อารีย์ วัลยเสวี คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี เรื่อง "Vaccine for Diarrhea : Bacterial Vaccines"
- 2.4 หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) รายงานเสนอขออนุญาตขึ้นทะเบียนว่ามีการกระทรวงสาธารณสุข เพื่อกำหนดนโยบายด้านสมุนไพรและพืชเศรษฐกิจของประเทศ มกราคม 2545
- 2.5 ผลไม้ไทย (Exotic Thai Fruits) บทความเสนอขออนุญาตขึ้นทะเบียน พ.ต.ท. ทักษิณ ชินวัตร เพื่อปรับปรุงกลยุทธ์การส่งออกผลไม้ไทย

3. การให้การฝึกอบรมและดูงาน ตัวอย่างเช่น :

3.1 ให้การสาธิตและฝึกปฏิบัติการ : การประยุกต์ใช้เทคนิค dot-blot ELISA เพื่อวินิจฉัยโรคทริคิเนลโลสิส (trichinellosis) และโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด (schistosomiasis) และการวินิจฉัยแยกโรคทั้งสองโรคด้วยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาแก่เจ้าหน้าที่ชั้นสูตรสาธารณสุข จำนวน 30 คน

3.2 ให้การดูงานด้านเลปโตสไปโรซิสและให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยแก่ อาจารย์นายสัตวแพทย์กำลัง ชุมพลบุญชร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.3 ให้การฝึกอบรมและดูงาน เรื่อง “การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสรวดเร็วโดยการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ” แก่ แพทย์หญิง มาริสสา อะเลจันเดรีย จาก Section of Infectious Diseases, General Philippines Hospital, The University of Philippines เมื่อ 9 พฤษภาคม 2544

3.4 ให้การดูงานและบรรยาย เรื่อง “โรคติดเชื้อในเขตร้อน” แก่นักศึกษาแพทย์ชาวญี่ปุ่นจาก University of Kyoto ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 2 คน เมื่อ 22-23 สิงหาคม 2544

3.5 ให้การดูงานด้านการตรวจวินิจฉัยไทฟอยด์และ *Salmonella* septicemia อย่างรวดเร็วแก่ แพทย์ชาวต่างประเทศซึ่งเป็นแพทย์ดูแลผู้ป่วยพลีภัยที่ค่ายผู้ป่วยพลีภัย จังหวัดราชบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2544

3.6 บรรยายและให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ Mrs. Chee Chean Gan, WHO Fellow จากประเทศมาเลเซีย ระหว่างวันที่ 7-9 พฤศจิกายน 2001 เรื่อง “Immunodiagnosis of Parasitic Infections: Western blot analysis” เพื่อวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ด (gnathostomiasis) และพยาธิหอยโข่ง (angiostrongyliasis), urine antigen detection เพื่อวินิจฉัยโรคเท้าช้าง (filariasis) การวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยใช้ affinity purified-egg antigen ของ *Opisthorchis viverrini* เพื่อตรวจหา serum antibodies โดย dot-ELISA การวินิจฉัยแยกโรคพยาธิใบไม้เลือด โรคทริคิเนลโลสิส พยาธิใบไม้ปอด และ strongyloidiasis โดยกรรมวิธีทางอิมมูโนวิทยา

3.7 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ Dr. Bo A. Claesson แพทย์จาก Department of Infectious Diseases, Sahlgrenska University ประเทศสวีเดน เมื่อวันที่ 31 ตุลาคม 2544

3.8 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขต 5, 6, 7 และเจ้าหน้าที่จากส่วนกลาง จำนวน 13 คน เรื่อง “การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะ”

3.9 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ Dr. Masashiro Ishikawa เรื่อง “Immunodiagnosis of Infectious Diseases” เมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2545

3.10 ให้การฝึกอบรมและดูงาน เรื่อง “โรคติดเชื้อในเขตร้อน” แก่แพทย์ 4 รายและพยาบาล 2 รายจากประเทศญี่ปุ่น เมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน 2544

3.11 สอนและให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ fellow สาขาโรคติดเชื้อจากภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้านการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเขตร้อน (พญ. รังสิมา โล่ห์เลขา พญ. วันทปรียา พงษ์สามารถ และ พญ. อุไร วงศ์สวัสดิ์) เมื่อวันที่ 6-9 พฤศจิกายน 2544

3.12 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่บุคลากรทางการแพทย์จากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ตามพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จำนวน 4 คน โดยบรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่พบในเมืองร้อนด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา” เมื่อวันที่ 23 มกราคม 2545

3.13 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่นักวิทยาศาสตร์ของโรงพยาบาลสุวรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด และโรงพยาบาลจังหวัดขอนแก่น

เป็นต้น

4. จำนวนผลงานจดสิทธิบัตร

- 4.1 กำลังดำเนินการเพื่อขอจดสิทธิบัตรต่อยอด “ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส” โดยต่อยอดจากสิทธิบัตรการผลิตไฮบริโดมาเฉพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา และสายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งเป็นของบริษัทพัฒนานวัตกรรมและการจัดการ (SDM)
- 4.2 กำลังดำเนินการเพื่อขอสิทธิบัตรเรื่องไฮบริโดมาเฉพาะต่อ O157 LPS และ Shiga-toxin producing *E. coli* และชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ STEC และ *E. coli* O157 อย่างรวดเร็ว
- 4.3 กำลังดำเนินการเพื่อจดสิทธิบัตรการตรวจวินิจฉัยโรค Brugian filariasis

5. นักวิจัยรุ่นใหม่

ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ทำหน้าที่เป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง (mentor) ของนักวิจัยรุ่นใหม่ รวม 7 คน ดังนี้

- 5.1 ดร. พงศ์ราม รามสูต
อาจารย์ระดับ 6 ได้เลื่อนเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6 ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.2 ดร. ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ
อาจารย์ระดับ 6 ได้เลื่อนเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6 ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.3 ดร. ธาวัชรัตน์ กะลัมพะเหติ
อาจารย์ระดับ 6 กำลังรวบรวมผลงานเพื่อขอตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.4 ดร. สันนิภา สุรทัต
อาจารย์ระดับ 5 ได้เลื่อนเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุน post-doc สกว.)
- 5.5 ผศ. แพทย์หญิง ดร. อัญชลี ตั้งตรงจิตร
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.6 สพ.ญ. วีระวรรณ ดิละนันท์กร

สาขาวิชาคลินิกโคนม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ วช.)

5.7 ดร. พชรินทร์ แสงจารีก

อาจารย์ระดับ 7 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร วิโรฒ ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตน์ฯ (ทุน post-doc สกว.)

5.8 นาง ยุพพร สากลวารี นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 5 เลื่อนเป็นผู้ชำนาญการระดับ 6

6. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (2000-2003)

ศาสตราจารย์ วันเพ็ญ ชัยคำภา เมธีวิจัยอาวุโสทำหน้าที่ :

6.1 เป็นประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (major advisor) ระดับปริญญาเอก หลักสูตร Ph. D. (Trop. Med.) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สำเร็จการศึกษาแล้ว จำนวน 10 คน

1. นางสาวอุไร ไชยศรี สำเร็จการศึกษาปี 2543 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7 ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นางพชรินทร์ แสงจารีก สำเร็จการศึกษาปี 2544 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตน์ฯ
3. นางสาวจิตติมา วงศาโรจน์ สำเร็จการศึกษาปี 2544 นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ 8 สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
4. นายธวัชชัย ศุภดิษฐ์ สำเร็จการศึกษาปี 2544 ปัจจุบัน อาจารย์ สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์
5. นางสาววรรณพร อิทธิประเสริฐ สำเร็จการศึกษาปี 2544 ปัจจุบัน นักวิจัย P3 โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
6. นางสาวสิริจิต วงศ์กำชัย สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7 ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล
7. นางราตรี ลีละวงศ์เทวัญ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 6 สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
8. นางสาวพรพรรณ ดีระพัฒน์ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 5 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปัจจุบันเป็น post-doctoral fellow ของ the University of Harvard, USA
9. นางสาวนันทิกา ปนัดดาภรณ์ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน Post-doctoral fellow, Obihara, Japan

10. นายสัตวแพทย์ปิยะนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน อาจารย์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

6.2 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (co-advisor) ระดับปริญญาเอก หลักสูตร Ph. D. (Trop. Med.) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 2 คน ยังไม่สำเร็จการศึกษา

11. พันตรีหญิงเพชร ทศนา
12. นายสัตวแพทย์รองเดช ตั้งตระการพงษ์

6.3 เป็นประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 9 คน สำเร็จการศึกษาแล้วทุกคนในปีการศึกษา 2544 และ 2545

13. นางสาวกาญจนา สนใจ ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี
14. นางสาวบังอร เสริมสาตร์ ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
15. นางสาวจันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 6 ภาควิชาสูติศาสตร์-เณรเวชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
16. นางสาวเกษร บุญยรักษ์โยธิน ปัจจุบัน นักเทคนิคการแพทย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภาคใต้ จังหวัดตรัง
17. นายนิทัศน์ สุขรุ่ง ปัจจุบัน ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ หลักสูตรนานาชาติ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ด้วยทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สกว. รุ่นที่ 4
18. นายวงศ์สวรรค์ ผงสีเสี ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก Melbourne, Australia ด้วยทุนผู้ช่วยวิจัย
19. นางสาวสุนีย์ สังขะวาลี ปัจจุบัน นักเทคนิคการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
20. นางสาวสุปราณี หลินถาวร ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายไวรัสตับอักเสบบี กองสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
21. นางสาวมธุกร ณ อุบล ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6.4 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 3 คน

22. นางสาวกาญจนา อุสุวรรณทิม จบการศึกษาระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2545 ปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 5 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ลาศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ หลักสูตรนานาชาติ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย

23. นางพิมลรัตน์ ทองงาม ยังไม่สำเร็จการศึกษา
24. นางสาวอรนุช พงศ์เพชรสถิตย์ ยังไม่สำเร็จการศึกษา

6.5 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคติดเชื้อ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำเร็จการศึกษาแล้วทั้ง 2 คน ในปีการศึกษา 2545

25. นางสาวยุพา เกิดพีชน์ ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
26. นางสาวอุษา ชื่นบาล ปัจจุบัน เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 โรงพยาบาลราชวิถี กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

6.6 เป็น Home Advisor นักศึกษา Ph. D. (Epidemiology), London School of Hygiene and Tropical Medicine ประเทศสหราชอาณาจักร

27. นางสาวพรทิพย์ จอมพุก จบการศึกษานปี 2546

6.7 เป็นประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 10 คน

28. นายนิทัศน์ สุขรุ่ง คปก. รุ่นที่ 4
29. นายเกษม กุลแก้ว คปก. รุ่นที่ 5
30. นางยุวพร สากลวารี คปก. รุ่นที่ 5
31. นางสาวศุภีพร พ่วงแพ คปก. รุ่นที่ 6
32. นางสาวมุสตี โตบันลือภพ ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
33. นายเสกสรรค์ สโมสรสุข ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
34. นางสาววรรณ โควะวินทวีวัฒน์ ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
35. นายเอนก ภูทอง ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
36. นางสาวกาญจนา อุสุวรรณทิม ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
37. นายวงศ์สวรรค์ ผงสีใส (ลาออกเพื่อศึกษาต่อ ณ ประเทศออสเตรเลีย ในภาคการศึกษาที่ 1 ของหลักสูตร Ph. D. (Biomed. Sci.)

6.8 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 2 คน

38. นายสันติ มณีวัชรระรังษี ทุน คปก. รุ่นที่ 3
39. นายภูมิ อติศักดิ์วัฒนา ทุน คปก. รุ่นที่ 3

6.9 เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 2 คน

40. นางสาวศรีนวล สมรูป
41. นางสาวอัญญา ถาวรวรรณ

สรุป

ขณะเป็นเมธีวิจัยอาวุโส (2000-2003) ศ. วันเพ็ญ ชัยคำภา เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
รวมทั้งสิ้นจำนวน 41 คน :-

ปริญญาเอก หลักสูตรนานาชาติ จำนวน 25 คน

เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 20 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว 10 คน ยังไม่สำเร็จอีก 10 คน
เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 5 คน ยังไม่สำเร็จการศึกษาทั้ง 5 คน

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จำนวน 16 คน

เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 11 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว 9 คน ยังไม่สำเร็จอีก 2 คน
เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 5 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว 3 คน ยังไม่สำเร็จการศึกษา 2 คน

7. การเป็นวิทยากรบรรยาย ตัวอย่างเช่น

ระดับชาติ

1. การอบรมฟื้นฟูความรู้ด้านชั้นสูตรสาธารณสุข เรื่อง “การประยุกต์ใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา และอณูชีววิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อปรสิต” ณ โรงแรมรอยัลซิดี

1.1 ได้รับเชิญให้บรรยายพิเศษเรื่อง “สถานภาพปัจจุบันและแนวทางการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อปรสิต”

1.2 ได้รับเชิญให้เป็นผู้อภิปรายร่วมกับวิทยากรอื่นอีก 2 ท่าน เรื่อง “การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อหนองพยาธิโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาและอณูชีววิทยา”

2. การประชุมวิชาการสมาคมโลหิตวิทยา ณ โรงแรมสยามซิตี กรุงเทพมหานคร มกราคม 2544 เสนอผลงานเรื่อง “PAIgG and platelet dysfunction in idiopathic thrombocytopenia purpura” โดยนางสาวยุพนา คคกลิ่นกุล นักศึกษาปริญญาโทเป็นผู้นำเสนอ

3. การประชุมปฏิบัติการออกจรรว้ง ครั้งที่ 12 ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Update on diarrhea vaccines: Bacterial Vaccines” ณ ห้องประชุมอารี วิลละเสวี โรงพยาบาลรามารับดี 25 ตุลาคม 2543

4. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส” และเป็นประธานกลุ่มย่อยเรื่องทิศทางการวิจัยเรื่องเลปโตสไปโรซิส ในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง “มาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทย” เมื่อวันที่ 28-29 มิถุนายน 2544 โรงแรมเซ็นจูรี่พาร์ค กรุงเทพฯ จัดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทย์ทหารบก ร่วมกับคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

5. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “ประสบการณ์การศึกษาและชีวิตการทำงานวิจัยให้ประสบความสำเร็จ” แก่ผู้รับทุนโครงการ พสวท. ศึกษาต่างประเทศ ประจำปีการศึกษา 2545 วันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ. 2544 ให้แก่สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

6. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “โรคติดเชื้อจากปรสิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ” วันที่ 22-23 พฤศจิกายน 2544 ณ โรงแรมโซฟิเทล จังหวัดขอนแก่น จัดโดยภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

7. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “การทำ Bacterial Vaccine R + D ที่กำลังพัฒนาในประเทศไทย” ในการประชุมเชิงวิชาการสถานภาพ งานวิจัย พัฒนา และผลิตวัคซีนในประเทศไทยในโอกาสฉลองครบรอบ 20 ปี วันสถาปนาสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 30 พฤศจิกายน 2544

8. บรรยายเรื่อง “การตรวจวินิจฉัยและตรวจหาเชื้อ *Salmonella* อย่างรวดเร็ว โดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป” ศช. เมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2545

9. บรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ” ในการประชุมโรคสัตว์สู่คน จัดโดยกระทรวงสาธารณสุข ณ โรงแรม เจบี หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เมื่อ มีนาคม 2546

10. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Liposome associated vaccine” ในการประชุมวิชาการประจำปี ของสมาคมเภสัชกรรมแห่งประเทศไทย วันที่ 28 มีนาคม 2546

11. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Emerging and re-emerging Bacterial Enteric Infections” ในการประชุมวิชาการเรื่อง “โรคติดต่อทางอาหารและน้ำ” กรมควบคุมโรค จัดที่โรงแรมเดอะแกรนด์ กรุงเทพฯ เมื่อ 5 สิงหาคม 2546

12. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Update on Vaccine of Bacterial Enteric Infection” ในการประชุมวิชาการเกี่ยวกับข้อ (11) ในวันที่ 7 สิงหาคม 2546 และได้รับเชิญให้เป็นผู้เชี่ยวชาญใน session อภิปรายทั่วไปในช่วงสุดท้ายของการประชุมวิชาการ

เป็นต้น

ระดับนานาชาติ

1. ได้รับเชิญให้เสนอผลงานเรื่อง “Enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from cattle in Bangkok” ที่ Fourth International Symposium and Workshop on “Shiga-toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections” หรือ VTEC 2000, Oct 29 – Nov 2, 2000, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan. Abstract หมายเลข 107 ใน Program and Abstract Book โดยรัฐบาลญี่ปุ่นออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น

2. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Severe Diarrhea in Thailand” The XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Cartagena, Colombia, Aug 20-25, 2000 โดยผู้จัดการประชุม ออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น
3. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Diagnosis of trichinellosis” The Third Seminar on Food-borne Parasitic Zoonoses. Dec 7, 2000, the Royal River Hotel, Bangkok
4. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Diagnosis of leptospirosis” The Joint International Tropical Medicine Meeting 2000. Dec 7, 2000, the Royal River Hotel, Bangkok
5. เสนอผลงานเรื่อง “Localization of Stx(s) in intoxicated mice and hemolytic uremic syndrome (HUS) patients”. The 30th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Sendai International Center and Miyagi Sports Center, Sendai, Japan. Nov 14-16, 2000. โดยนางสาวอุไร ไชยศรี นักศึกษาปริญญาเอกในขณะนั้นเป็นผู้นำเสนอ ได้รับทุนค่าใช้จ่ายในการเดินทางและเบี้ยเลี้ยงจาก Japanese Association of Clinical Immunology
6. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Diarrheal Diseases in Thailand” Presented at “The Sixth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim”. US – Japan Cooperative Medical Sciences Program in Support of the Common Agenda. At the Westin Phillipines Plaza Hotel, Manila, the Phillipines. Jan 13-15, 2001. Full Sponsored by the Government of Japan.
7. เสนองานวิจัยเรื่อง “Eosinophilic meningitis outbreak among American students travelled to *Angiostrongylus* spp. endemic area” Presented at the Conference on Infectious Diseases, New Orleans, USA. September, 2000 โดย collaborator คือ Dr. Stuart Johnson จาก Division of Infectious Diseases, Northwestern University Medical School, USA เป็นผู้นำเสนอ
8. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Leptospirosis” ในการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ” ที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน จัดโดยสำนักเลปโตสไปโรซิส กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข เมื่อ 27 กรกฎาคม 2544
9. บรรยายเรื่อง “Immunodiagnosis of Tropical Infections” ใน Training for the International Infectious Diseases Control (Oversea Training in Thailand October 29 – November 23, 2001)
10. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Shigellosis” ใน “Training of the Trainers” จัดโดย International Vaccine Institute, WHO, Korean Office ที่โรงพยาบาลอำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี เมื่อ พฤษภาคม 2544
11. ได้รับเชิญจาก “The Indian College of Allergy, Asthma and Applied Immunology” ให้บรรยายเรื่อง “Development of Diagnostic Test kits for Developing Countries” ใน The 35th ICAAI Convention 2001, South India, Trivendrum

12. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Immunodiagnosis of food-borne parasitic infections: from research experiences to practical applications” ในการประชุม The 9th Asian Conference on Diarrheal Diseases and Nutrition ที่ Delhi, India, 28-29 กันยายน 2544

13. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Development of Diagnostic Test Kits for Developing Countries” ใน Symposium of the International Federation of Tropical Medicine and Malaria, The 450th Anniversary of the National Autonomous University of Mexico, October 18-19, 2001

14. บรรยายเรื่อง “Rapid diagnosis of shigellosis” ที่ London School of Hygiene and Tropical Medicine เมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2545

15. บรรยายเรื่อง “Body resistance to infections and rapid diagnosis of infectious diseases” แก่สัตวแพทย์ของประเทศที่สาม ที่สำนักสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมปศุสัตว์ เมื่อ มีนาคม 2545 และ มิถุนายน 2546

16. เป็น Invited speaker ใน BioThailand 2001: From Research to Market เรื่อง “Invention of Ready to Use Diagnostic Test Kits for Tropical Infections” November 8, 2001, Queen Sirikit Convention Center, Bangkok

17. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Mucosal Vaccine” ที่ Department of Agriculture Osaka Prefecture University วันที่ 25 มีนาคม 2546

18. บรรยายเรื่อง Emerging and re-emerging pathogens ในการประชุมวิชาการประจำปี สัตวแพทย์สมาคมในพระบรมราชูปถัมภ์ เมื่อ ธันวาคม 2545 ณ โรงแรมอิมพีเรียลคีนส์ปาร์ค

เป็นต้น

8. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อประเมินโครงการวิจัย รายงานการวิจัยและติดตามงานวิจัย

1. T2-Programme เรื่อง “Efficacy and tolerability of Ivermectin on gnathostomiasis”

2. ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เรื่อง “Molecular epidemiology of the pandemic clones of *Vibrio parahaemolyticus* in Bangladesh”

3. ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เรื่อง “Molecular epidemiology and evolution of clinical significant *Shigella* species in Bangladesh”

4. ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เรื่อง “Phenotypic and genotypic analysis of clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 to identify pathologic clones and their pathogenic mechanisms”

5. International Vaccine Institute, WHO, Korea โครงการวิจัย เรื่อง “Long-term efficacy of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in Baoying county, Jiangsu, China

following the 1994-1995 individually randomized double-blind placebo-controlled trial” ของ Dr. Ning Wang ประเทศจีน

6. T-2 Programme เรื่อง “A comparative molecular study and antibiotic susceptibility of *V. cholerae* O1 and non-O1 non-O139 isolated from southern Thailand”

7. T-2 Programme โครงการวิจัยเรื่อง “The study of genetic variation of *Blastocystis hominis* in Thailand”

8. โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความชุกและลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุลของ *Salmonella* ในไข่ไก่และภาชนะบรรจุจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร” กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

9. “การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium parvum* ด้วยพีซีอาร์” กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

10. “การศึกษาความชุกของ *Legionella* and *Acanthamoeba* ในแหล่งน้ำธรรมชาติและสถานประกอบการในกรุงเทพมหานคร ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงและเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์” ของกองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

11. โครงการวิจัย เรื่อง “การตรวจวิเคราะห์เชื้อฮิวาต์ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA ในสิ่งส่งตรวจที่ผ่านการแยกเชื้อด้วย immunomagnetic enrichment” กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

12. โครงการเรื่อง “การศึกษาความผิดปกติด้านอนุเซลล์พันธุศาสตร์ของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคน โดยเทคนิคคอมพิวเตอร์ฟิสิกส์ไฮบริดไฮบริด” สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธี Latex agglutination ที่ใช้แอนติเจนจำเพาะของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola hepatica* สำหรับปัจจัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ (Fascioliasis)” มหาวิทยาลัยขอนแก่น

14. โครงการวิจัยเรื่อง “คุณลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่แยกได้จากการระบาดต่างๆ ในปศุสัตว์ของประเทศไทย” สกว. กรกฎาคม 2544

15. โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหยิกเหลืองมะเขือเทศ” ของศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ส.ว.ท.ช. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม สิงหาคม 2544

17. โครงการวิจัยเรื่อง “Emerging Filariasis infection in *Wuchereria bancrofti* nonepidemic patient with human immunodeficiency virus infection” ทุน China Medical Board คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

18. โครงการ “การพัฒนาและการผลิตน้ำยาอิมมูโนเคมีเพื่อตรวจหาสารแอมเฟตามีน (ยาบ้าและยาอี)” ศ. ดร. กวี รัตนบรรณางกูร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หัวหน้าโครงการ ได้รับทุนจาก ส.ว.ท.ช.

19. โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโรคใบหงิกของต้นข้าว เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสในพืชและในแมลง” นายชัยวัฒน์ กิตติกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หัวหน้าโครงการ ได้รับทุนจาก ส.ว.ท.ช.

20. โครงการวิจัยเรื่อง “การแก้ไขปรับปรุงระเบียบว่าด้วยการอนุญาตให้นักวิจัยชาวต่างประเทศเข้ามาทำการวิจัยในประเทศไทย” รศ. ดร. สืบศักดิ์ นันทวานิช สถาบันวิจัยมหาชาติ สิริธร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หัวหน้าโครงการ ได้รับทุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

21. โครงการเรื่อง “การศึกษาเพื่อหาศักยภาพของแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ในการใช้เป็นวัคซีนและปรับปรุงการตรวจวินิจฉัยโรค” ศ.ดร. วิฑูรย์ ไวยนันท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หัวหน้าโครงการได้รับทุนจาก ส.ว.ท.ช.

22. โครงการเรื่อง “Development of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* in stools and its application in therapeutic treatment” รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หัวหน้าโครงการ ได้รับทุน T-2 Programme

23. โครงการพยาธิใบไม้ตับเรื่อง “การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิใบไม้ตับ และความผิดปกติของท่อน้ำดี” ของ รศ. ไพบุลย์ สุทธิถาวรและคณะ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับประเทศเกาหลี ทุนของสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

24. โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตาแดงขาว เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ” ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ส.ว.ท.ช. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

25. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง “การใช้เทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโค : การวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและอีสตราไดออล โดยวิธีอิมมิวโนแอสเส” ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ส.ว.ท.ช. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

26. ประเมินความก้าวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ” ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (12 กันยายน 2544)

27. ประเมินโครงการวิจัยเรื่อง “Production and characterization of monoclonal antibodies to novel functional rare epitopes in dengue proteins” โครงการของ ศช. 12 กันยายน 2544

28. ประเมินรายงานการวิจัยตามโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-เกาหลี) เรื่อง “การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิใบไม้ตับ และความผิดปกติของระบบท่อน้ำดี” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
29. ประเมินรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาและ การผลิตน้ำยา อิมมูโนเคมีเพื่อการตรวจหาสารแอมเฟตามีน (ยาบ้าและยาอี)” ศช. เมื่อวันที่ 14 กันยายน 2544
30. เป็นประธานอนุกรรมการติดตามประเมินผลการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ไวรัสใบหยิกเหลืองมะเขือเทศโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา” ศช. เมื่อ 6 พฤศจิกายน 2544
31. พิจารณารายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโรคใบหยิกของต้นข้าว เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสในพืชและในแมลง” ศช.
32. พิจารณาโครงการวิจัย เรื่อง “การวินิจฉัยอาการไข้จากโรคเลปโตสไปโรซิส ด้วยอาการทางคลินิกและการตรวจภูมิคุ้มกันในน้ำเหลือง” กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข 22 พฤศจิกายน 2544
33. ประเมินโครงการวิจัยเรื่อง “Genetic variants of *Vibrio cholerae* O139 and development of a vaccine against O139 cholera” ของ ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ 21 พฤศจิกายน 2544
34. ตรวจ manuscript เรื่อง *Citrobacter* ให้แก่ ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เมื่อวันที่ 6 ธันวาคม 2544
35. ประเมินโครงการวิจัยเรื่อง “Assessment of virulence associated gene pool in environmental *Vibrio* species and its relation to the emergence of clinically significant new pathogenic clone” ให้แก่ ICDDR – B ประเทศบังกลาเทศ
36. ประเมินรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง “การพัฒนา Dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาในห้องที่สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวและแบคทีเรียในโคนม” สกว. เมื่อวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2545
37. ประเมินรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อนิวโรเปปไทด์ฮอร์โมนในก้านตากลุ่มกูด้า” ศช. เมื่อวันที่ 19 กุมภาพันธ์ 2545
38. โครงการวิจัยเรื่อง “Utilization of human cell line stably expressing various forms of dengue virus NS1 protein study contributions of NS1 in Dengue virus infection” T-2 เมื่อวันที่ 24 มกราคม 2545
39. โครงการวิจัยเรื่อง “พยาธิวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ” สกว. เมื่อมกราคม 2545

40. โครงร่างวิจัยเรื่อง “Interaction between plaque bacteria and dendritic cells” สกว. เมื่อ ธันวาคม 2544

41. ประเมินรายงานการวิจัยเรื่อง “A comparative molecular study and antibiotic susceptibility of *V. cholerae* O1 and non-O1 non –O139 isolated from southern Thailand” T-2 เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2545

42. โครงร่างการวิจัยเรื่อง “Effect of BIOLAC and MICRO-GUARD on Broiler Performance and Prevent *Salmonella* Intection” คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

43. โครงร่างการวิจัยเรื่อง “Molecular epidemiology and evolution of clinically significant *Shigella* species in Bangladesh” ของ ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ

44. ประเมินโครงร่างทุนพัฒนาที่วิจัยของ ศช. 5 โครงการ

45. ประเมินหนังสือ เรื่อง “การประกันคุณภาพ การบริหารความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ ชันสูตรโรค” ของชมรมคุณภาพและมาตรฐานห้องปฏิบัติการชันสูตรโรค บรรณาธิการคือ สุดารัตน์ มโน เชี่ยวพินิจ กุลนารี สิริสาลี ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ จำรัส พร้อมมาศ

เป็นต้น

9. การจัดประชุมวิชาการนานาชาติ

1 เป็นประธานจัดประชุมวิชาการนานาชาติ (The DOMI Program: Shigellosis Workshop) ให้แก่ International Vaccine Institute, WHO, Korea ที่โรงแรมเซ็นจูรี่ปาร์ค 6-11 พฤศจิกายน 2543

2 The Third Seminar on Food-borne Parasitic Zoonoses ในฐานะกรรมการอำนวยการและที่ปรึกษา Scientific Committee เป็นประธานภาคการประชุม Symposium เรื่อง “Trichinellosis” และติดต่อวิทยากรท่านอื่น ๆ จากต่างประเทศและสถาบันอื่น เมื่อ 6-8 ธันวาคม 2543 ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์ กรุงเทพฯ

3 Joint International Tropical Medicine Meeting ในฐานะคณะกรรมการอำนวยการและที่ปรึกษา Scientific Committee เป็นผู้จัด Symposium เรื่อง Pyrexia of Unknown Origin และติดต่อวิทยากรท่านอื่น ๆ จากต่างประเทศและสถาบันอื่นรวมทั้งเป็นประธานร่วมในภาคการประชุม 6-8 ธันวาคม 2543 ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์ กรุงเทพฯ

4 การประชุมปฏิบัติการออกจากร่าง ครั้งที่ 12 “การควบคุมออกจากร่าง: ปัญหาและแนวทางการแก้ไขในทศวรรษที่ 21” จัดโดยมหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุขและองค์การอนามัยโลก 24-26 ตุลาคม 2543 ที่ห้องประชุมอารี วิลยะสวีย์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ทำหน้าที่คณะกรรมการจัดประชุม และ Scientific Committee

5 เป็นประธานจัด Close Workshop on Social Science Aspects of Shigellosis, Typhoid and Cholera ให้แก่ International Vaccine Institute ประเทศเกาหลี ณ โรงแรมเซ็นจูรี่ปาร์ค กรุงเทพฯ วันที่ 18 – 22 กุมภาพันธ์ 2545

6 เป็นที่ปรึกษาและคณะกรรมการอำนวยการจัดประชุมวิชาการนานาชาติ “2002 ICLAS Regional Scientific Meeting on a Search for Quality and Better Welfare” คำสั่งมหาวิทยาลัยมหิดล ที่ 2121/2544

7 เป็นประธานจัด Workshop on Leptospirosis Diagnosis by Antigen Detection ให้แก่สำนักเลบโอสไปโรซีส กรมควบคุมโรคติดต่อ เมื่อ 27 กรกฎาคม 2544

8 เป็น International Scientific Committee จัดประชุม The 9th & the 10th Asian Conference on Diarrheal Diseases and Nutrition, Delhi, India, September 28-30, 2001, และที่ ICDDR-B, Bangladesh, 7-8 ธันวาคม 2546 ตามลำดับ

9 เป็นประธานจัดการประชุมวิชาการ RGJ Seminar Series: Immunology of Infectious Diseases, Thailand Research Fund เมื่อวันที่ 19 กรกฎาคม 2544

10 คณะกรรมการอำนวยการจัดประชุมนานาชาติ Joint International Tropical Medicine เมื่อ สิงหาคม 2544

เป็นต้น

10. เป็นกรรมการเป็นที่ปรึกษา ผู้ทรงคุณวุฒิ และ resource person

1. เป็นที่ปรึกษา ฯพณฯ รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงสาธารณสุข นายแพทย์สุรพงษ์ สืบวงศ์ลี คำสั่งกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 474/2544 ลว. 12 มิถุนายน 2544

2. เป็นกรรมการที่ปรึกษาสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข คำสั่ง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 167/2544 ลว. 22 มีนาคม 2544

3. เป็น JICA Expert ในโครงการ South to South ถ่ายทอดเทคโนโลยี และเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ WHO Collaborating Center, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Calcutta, India เมื่อ กุมภาพันธ์ 2544 โดยเป็น JICA Expert คนแรกของ Project นี้ที่ไม่ใช่ชาวญี่ปุ่น

4. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของทบวงมหาวิทยาลัยเพื่อประเมินผลงานทางวิชาการของผู้ขอกำหนด ตำแหน่งศาสตราจารย์และศาสตราจารย์ระดับ 11

5. เป็นกรรมการพิจารณาตำแหน่งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยมหิดล จนถึง กันยายน 2545

6. ประเมินผลงานของผู้ขอกำหนดตำแหน่งทางวิชาการและตำแหน่งในระดับที่สูงขึ้นของหน่วยงานในต่างประเทศคือ

1). University of Malaya 2 ราย คือ

- Dr. Zurainee bt. Mohamed Nor
- Dr. Jamaiah bt. Ibrahim

2). Laboratory Science Division, Institute of Cholera and Diarrheal Diseases Research of Bangladesh (ICDDR-B) 2 รายคือ

- Dr. Tasmin Azine
- Dr. Anowar Hossain

7. เป็น External Evaluator ของ Laboratory Science Division, International Center for Diarrheal Diseases Research of Bangladesh, Dhaka, Bangladesh เมื่อ 2-5 มิถุนายน 2545

8. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของหน่วยงานต่างๆ เช่น

- มหาวิทยาลัยต่างๆ เพื่อประเมินผลงานของผู้เสนอกำหนดตำแหน่งทางวิชาการที่สูงขึ้น อาทิ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศิลปากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์
- เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของกระทรวงสาธารณสุข สร้าง “คู่มือแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในผู้ใหญ่”
- เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเพื่อพิจารณานักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ ผลงานวิจัยดีเยี่ยมแห่งชาติและวิทยานิพนธ์ประจำปีและรางวัลนักประดิษฐ์คิดค้นแห่งชาติ

9. เป็นคณะกรรมการสภานักวิจัยแห่งชาติสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

10. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิในคณะกรรมการวัคซีนแห่งชาติ

11. กำหนดนโยบายการวิจัยระดับชาติ

กำหนดนโยบายแห่งชาติฉบับที่ 6 ด้านสุขภาพชุดโครงการที่ 8 : ชุดตรวจวินิจฉัยโรคสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

12. เป็น Resource person เช่น:

- เป็น Resource person ในการประชุมเรื่อง “บทบาทของเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ต่อระบบการวิจัยแห่งชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี” ระหว่าง 14-16 ธันวาคม 2544 ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี และที่จังหวัดเชียงใหม่ ธันวาคม 2545
- เป็น Resource person ให้แก่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขเรื่อง “ผลิตภัณฑ์เชื้อกำจัดหนูชีวภาพ Biorat โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis*” เมื่อวันที่ 8 ตุลาคม 2544
- เป็น Resource person ในการประชุมโต๊ะกลมให้แก่ ศช. เรื่อง “สถานภาพการวิจัยและการพัฒนาวัคซีน และแนวทางการวิจัยด้านวัคซีนในอนาคต” เมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2544 ที่โรงแรมโนโวเทล โลตัส สุขุมวิท ซอย 33
- เป็น Resource person ให้แก่สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในการทำแผนการวิจัยแห่งชาติฉบับที่ 6 เมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2545

เป็นต้น

13. เป็นบรรณาธิการวารสารนานาชาติ

- Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology ซึ่งเป็นวารสารทางการแพทย์ของ Federation of Allergology and Immunology ซึ่ง Launched โดยสมาคมโรคภูมิแพ้และอิมมูนวิทยาแห่งประเทศไทย และเป็นวารสารนานาชาติเพียงวารสารเดียวในประเทศไทยที่อยู่ใน ISI และมี Impact factor ตั้งแต่ volume 10-volume 21 (ปัจจุบัน)
- เป็นที่ปรึกษาคณะบรรณาธิการของ The Journal of Tropical Medicine and Parasitology
- เป็นที่ปรึกษากองบรรณาธิการ “เขตร้อนสัมพันธ์”

14. งานบริการวิชาการ

14.1 การตรวจพิเศษทางอิมมูนวิทยา

ให้บริการการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อทางอิมมูนวิทยาโดยวิธีพิเศษที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูนโโลยีพัฒนาขึ้นมาเอง ได้แก่ การวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๋ว ไข้ไทฟอยด์ ทริคิเนลโลสิส โรคพยาธิหอยโข่ง และซัลโมเนลโลสิส ซึ่งทำเป็นประจำและโรคอื่นๆ ซึ่งให้บริการเป็นครั้งคราว

14.2 เป็นหัวหน้าโครงการของศูนย์ประยุกต์และบริการวิชาการ คือ โครงการ tmwcc tropical infection diagnostic test kits ซึ่งเตรียม (manufacture) จัดจำหน่ายและจัดส่งชุดตรวจโรคติดเชื้อในเขตร้อนสำเร็จรูป พร้อมทั้งประสานงานกับผู้ใช้ อธิบายและให้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์

14.3 ให้บริการต่างๆ เช่น

- ให้แอนติเจน monoclonal antibodies ซึ่รุ่มและสารเคมีเพื่อใช้ในการวิจัยและการบริการแก่นักวิชาการและหน่วยงานต่างๆ

14.4 จัดแสดงนิทรรศการ เรื่องการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* อย่างรวดเร็วโดยชุดตรวจสำเร็จรูปวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2545 ณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

- ผลงานนิทรรศการเรื่อง “การวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเขตร้อนและการพัฒนาวัคซีน” ในงานฉลองครบรอบ 40 ปี เพื่อถวายสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ราชานุสรณ์ครบ 40 พรรษาในการเปิดอาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน เมื่อ ธันวาคม 2543

- รายการโทรทัศน์ “หน้าต่างสุขภาพ” ของช่อง 11 เรื่อง “โรคปัสสาวะหนู” 25 กรกฎาคม 2544 และ 11 สิงหาคม 2544

- บริการความรู้แก่ประชาชนในหนังสือพิมพ์บางกอกโพสต์เรื่อง “การตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนู” สิงหาคม 2544

- ให้คำปรึกษาแนะนำการเขียน กม.03 กม.07 กจ.08 กจ.07 การขอตำแหน่งวิชาการระดับต่าง ๆ ผู้ชำนาญการ ผู้เชี่ยวชาญ และอื่น ๆ
- ให้คำปรึกษาแนะนำการทำวิจัยแบบครบวงจรตั้งแต่การ identify ปัญหา การเขียนโครงร่างการวิจัย และเสนอขอทุน โดยชี้แนะแหล่งทุนที่เหมาะสม การวางแผนและขั้นตอนการทำวิจัย การส่งข้อและจัดหาวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ การแปรผลการทดลอง การวิเคราะห์ข้อมูล การวิจารณ์ผลสรุปการทดลอง การเขียนรายงาน การเขียน manuscript ตามคำแนะนำ ดิชม และข้อคิดเห็นของวารสาร การ revise manuscript และอื่น ๆ
- ให้คำปรึกษาแนะนำการทำหลักสูตรใหม่ การปรับปรุงหลักสูตร แกไขรหัสวิชาคำอธิบายรายวิชา และอื่น ๆ
- ออกจดหมายรับรองการเข้าศึกษาต่อ และการสมัครงานแก่บัณฑิตที่จบการศึกษาไปแล้วหรือเจ้าหน้าที่ในภาควิชา/คณะ
- ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ/อุปกรณ์ต่างๆ หรือช่วย operate เครื่องมือในบางครั้งแก่นักวิจัย
- ให้คำแนะนำเทคนิคต่างๆ ในงานวิจัยแก่นักวิจัย และนักศึกษาทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- เสนอแนะการจัดซื้อตำราหรือวารสารวิชาการที่เหมาะสมแก่การเรียนการสอน/การวิจัยของคณะฯ และอื่น ๆ
- ตอบคำถามและให้ข้อมูลใน questionnaires ต่าง ๆ เพื่อการบริหารงาน การพัฒนาหน่วยงานและการวิจัยแก่หน่วยงานต่างๆ นักวิจัยและนักศึกษา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- เป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย อาทิ:
 - โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสของโคมนในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน” รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิชัย โรจนเสถียร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นหัวหน้าโครงการ
 - โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่างๆ ในการกำจัดสภาวะรังโรคเลปโตสไปโรซิสในโค” สถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
 - โครงการวิจัยเรื่อง “Recombinant *Gnathostoma spinigerum* specific antigen” นายแพทย์พิชาติ อุปรานุเคราะห์ เป็นหัวหน้าโครงการ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในการปรึกษาหารือเรื่อง “โรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส [Leptospirosis])” ให้คำปรึกษาหารือเรื่อง “การศึกษาวิจัยการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสและโรคสครับไทฟัสทางอาการ ทางห้องปฏิบัติการในคนและสัตว์รังโรค”

□ ประเมิน manuscripts ที่ขอลงตีพิมพ์ในวารสารต่างๆ อาทิ Sciences Asia, Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, International Journal for Parasitology, Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health

15. งานในลักษณะอื่น ๆ

1. เป็นประธานกรรมการคัดเลือกนักศึกษาผู้รับทุน “รางวัลนักศึกษาแพทย์ดีเด่นกองทุนนายแพทย์ทรงกิจ อติวานิชยพงศ์” คำสั่งคณะแพทย์โรงพยาบาลรามารับดี ที่ 298/2544
2. เป็นผู้แทนสภามหาวิทยาลัยในกรรมการสรรหาผู้อำนวยการสถาบันวิจัยภาษาและวัฒนธรรมเพื่อพัฒนาชนบท
3. เป็นคณะกรรมการกลุ่มสภาวិชาการ/ตำแหน่งทางวิชาการ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. เป็นกรรมการประเมินผลการปฏิบัติงานของข้าราชการและลูกจ้างของคณะเวชศาสตร์เขตร้อน
5. เป็นกรรมการสรรหาหัวหน้าภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ในฐานะผู้ทรงคุณวุฒิที่ภาควิชาฯเสนอ คำสั่งมหาวิทยาลัยที่ 2156/2544 ลงวันที่ 20 ธันวาคม 2544
6. เป็นกรรมการเตรียมการด้านการบริหารวิชาการและกรรมการด้านบริหารงานบุคคล เพื่อเตรียมการออกนอกระบบราชการของมหาวิทยาลัยมหิดล
7. เป็นกรรมการสรรหาผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
8. เป็นผู้แทนคณาจารย์ในคณะกรรมการพิจารณาตำแหน่งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยมหิดล
9. เป็นกรรมการ ก.พ. เพื่อสอบคัดเลือกนักเรียนทุนเพื่อศึกษาต่อ ณ ต่างประเทศ เป็นต้น

16. กิจกรรมเพื่อสังคม

1. ได้รับเชิญให้ร่วมเป็นเกียรติในกิจกรรมต่าง ๆ ของคณะฯ คณะอื่น ๆ มหาวิทยาลัยและสถาบันอื่น ๆ ซึ่งได้กระทำโดยสม่ำเสมอเพื่อสร้างความสัมพันธ์อันดี
2. สนับสนุนกิจกรรมของหน่วยงานต่าง ๆ เช่น การร่วมเสนอชื่อผู้สมควรได้รับรางวัล นักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ ผู้สมควรได้รับรางวัลมูลนิธิโรเทม ผู้สมควรได้รับรางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ เสนอชื่อ New Member of the Royal Academy of Sciences of Thailand เป็นต้น
3. เป็นสมาชิกสมาคมวิชาชีพต่าง ๆ เช่น
 - เป็นกรรมการบริหารสมาชิกผู้ก่อตั้งบัณฑิตสภาวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย สมาคมโรคภูมิแพ้และอิมมูนวิทยาแห่งประเทศไทย

- สมาคมสัตวแพทย์แห่งประเทศไทย
- สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
- Malaysian Association of Tropical Medicine and Parasitology
- สมาคม Thai-Australian Association
- สมาคมอายุรศาสตร์เขตร้อน และปรสิตวิทยาแห่งประเทศไทย
- สมาคมนักเรียนทุนรัฐบาลไทย
- สมาคมศิษย์เก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Federation of Allergy and Immunology
- กรรมการบริหารสมาคมศิษย์เก่าสายปัญญาในพระบรมราชินูปถัมภ์ และอื่นๆ

17. กิจกรรมเพื่อการพัฒนาตนเอง

ติดตามความก้าวหน้าของวิทยาการและพัฒนาตนเองโดยเข้าร่วมฝึกอบรม เข้าร่วมประชุมวิชาการ และเข้าฟังการบรรยายทางวิชาการต่างๆ เช่น เข้าร่วมประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ เข้าร่วมสัมมนาวิชาการ

18. กิจกรรมเกียรติยศ

1. ได้รับรางวัล Asian Innovation Award จาก Asian Brain Power, Far-Eastern Economic Review เมื่อธันวาคม 2544
2. ได้รับรางวัลสัตวแพทย์ดีเด่นประจำปี 2544 จากสมาคมสัตวแพทย์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ เมื่อธันวาคม 2544
3. เป็นที่ปรึกษาฝ่ายวิชาการ ฯพณฯ รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงสาธารณสุข นายแพทย์สุรพงษ์ สืบวงศ์ลี พ.ศ. 2544-2545
4. เป็นที่ปรึกษา ประธานที่ประชุมประธานสภาอาจารย์ มหาวิทยาลัยทั่วประเทศ (ปอมท.) ระหว่างวันที่ 19 ส.ค. 2544 ถึง 14 ก.ค. 2545 ประกาศ ปอมท. ลงวันที่ 19 สิงหาคม 2544
5. เป็นคณะกรรมการที่ปรึกษาสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 167/2544
6. เป็นคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิการให้ทุนพัฒนาการวิจัย คณะแพทยศิริราชพยาบาล คำสั่งที่ 814/2544
7. เป็นที่ปรึกษาสมาคมวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลองแห่งประเทศไทย
8. ได้รับการทาบทามให้เป็นอธิการบดีมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ได้รับการทาบทามให้เป็นคณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เป็นต้น

9. เป็นเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2543 – 2546
10. ได้รับเชิญให้เป็นผู้กำหนดนโยบายการวิจัยแห่งชาติ ฉบับที่ 6 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
11. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของหน่วยงานต่าง ๆ เช่น สกว. สวทช. กรมปศุสัตว์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมควบคุมโรคติดต่อ เป็นต้น
12. ได้รับรางวัลอาจารย์ดีเด่นแห่งชาติ ปอมท. เมื่อ 31 กรกฎาคม 2545 จาก ฯพณฯ นายกรัฐมนตรี
13. ได้รับรางวัล “สตรีไทยในงานวิทยาศาสตร์ที่โลกชื่นชม” จากบริษัท ลอรีอัล และองค์การยูเนสโก เมื่อ พฤศจิกายน 2545
14. ได้รับการแต่งตั้งจาก ฯพณฯ นายกรัฐมนตรีให้เป็นกรรมการสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ และอื่นๆ

Appendix

1. Test Kits for detection of pathogenic *Leptospira* antigen in Urine

The diagnostic test kits, namely Lepto-Dot, for detection of *Leptospira* antigenuria was provided by Science Development and Management Ltd. (SDM), Thailand.

General description of the test kits

A. Starter kit

Each starter kit contains :

- A.1 Slot-blot device
- A.2 Suction pump
- A.3 Water trapping flasks
- A.4 Rubber bungs and vacuum tubing (A.4)
- A.5 Plastic boxes ; Test (T) box (A.5.1) and Control (C) box (A.5.2)
- A.6 Antibody conjugate (0.3 ml)
- A.7 Enzyme conjugate (0.3 ml)
- A.8 Substrate (40 ml)

B. Test kit

Each test kit contains :

- B.1 Monoclonal antibodies, 100 ml
- B.2 Blocking Solution, 100 ml
- B.3 Washing buffer A (100 ml of stock solution). Working solution of washing buffer A is prepared by mixing 100 ml of the stock solution provided in the test kit with 2.4 litres of distilled water. This diluted buffer A should be kept in a tightly sealed container at room temperature for future use.
- B.4 Washing buffer B, 100 ml
- B.5 Control pieces, 20 pieces contained in a small plastic vial with cap
- B.6 Nitrocellulose membrane (NC); 80 x 100 mm, 2 pieces
- B.7 Filter paper; 80 X 110 mm, 2 pieces
- B.8 Work sheet

* Note : Always store the following reagents/materials at 4°C : A.6, A.7, A.8, B.1, B.2, B.4, B.5 and B.6

2. Specimen

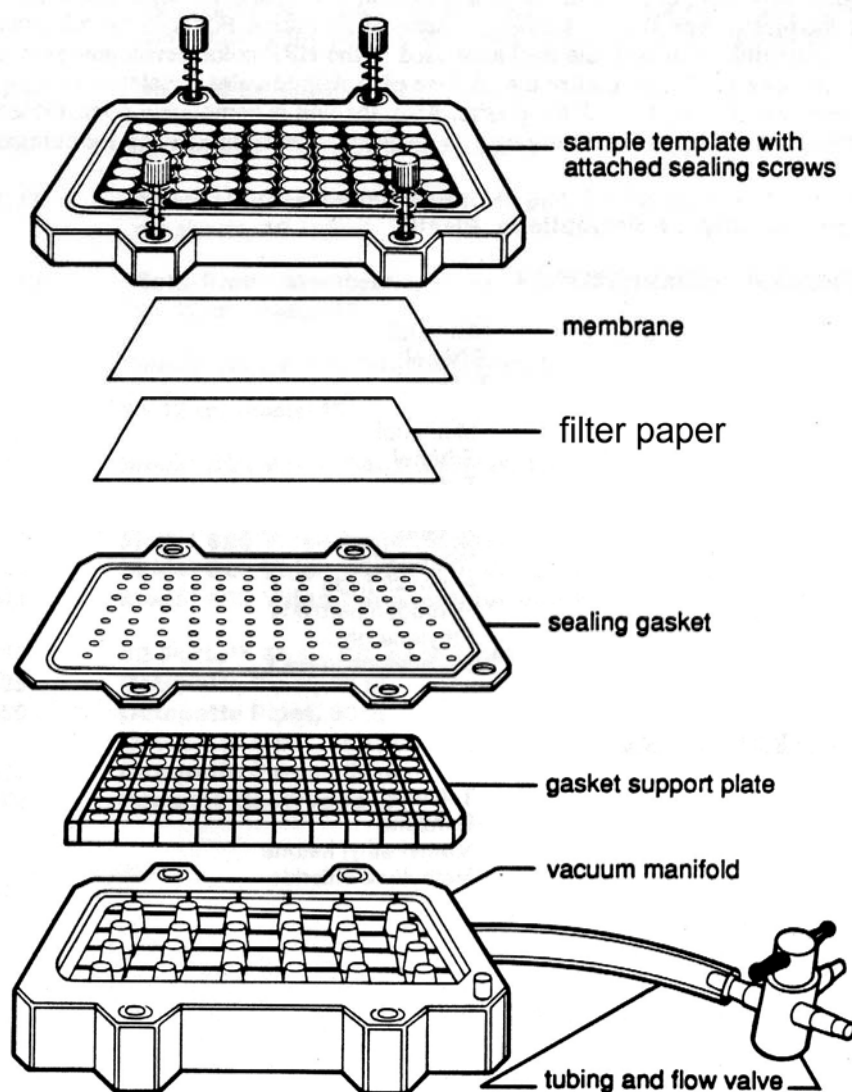
- 2.1 Fresh urine samples, urine stored at 4°C not over than 24 hours or urine stored at -20°C (to wait till the sample is dissolved).
- 2.2 Aliquot individually 1.5 ml of samples to 4 Eppendorf and mark appropriately. Six ml of urine samples was centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min at room temperature; 5.5 ml of the supernatant was discarded. Boil at 100°C in the water bath for 20 minutes.

3. Procedure of the test

- 3.1 One NC sheet can be used for 48 urine samples by dividing the NC into two portions, i.e. Test NC (T1-T48) and Control NC (C1-C48), as shown below:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1	T2	T3	T4	T5	T6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
B	T7	T8	T9	T10	T11	T12	C7	C8	C9	C10	C11	C12
C	T13	T14	T15	T16	T17	T18	C13	C14	C15	C16	C17	C18
D	T19	T20	T21	T22	T23	T24	C19	C20	C21	C22	C23	C24
E	T25	T26	T27	T28	T29	T30	C25	C26	C27	C28	C29	C30
F	T31	T32	T33	T34	T35	T36	C31	C32	C33	C34	C35	C36
G	T37	T38	T39	T40	T41	T42	C37	C38	C39	C40	C41	C42
H	T43	T44	T45	T46	T47	T48	C43	C44	C45	C46	C47	C48

Place filter paper (B.7) on the sealed gasket of the Slot-blot device (A.1). Place the NC on top, then cover with upper plate of the Slot-blot device and assemble slightly screws. Connect the device to the suction pump (A.2) which was linked with water trapping flasks (A.3) by vacuum tubing (A.4)



- 3.3 Open suction pump and use automatic pipette and tip pipette 200 μ l of urine sample and dot onto the plate of Slot-blot device correlating to the work sheet, i.e. urine sample no. 1 = T1. Dot the same specimen onto the C1 to make duplicate. Dot specimens no. 2 and so on onto the second and respective

holes of Slot-blot device. Use 1 pipette tip for 1 urine sample only. When finished, screw off the plate, mark the corner of right low paper and place Test NC and Control NC into the T box (A.7). Allow air-dry (about 5 minutes).

- 3.4 Place a control piece (B.5) into T box. Pour adequate volume of blocking solution (B.2) to cover the two NC pieces and the control piece. Leave the box at room temperature for 10 minutes with occasional rocking then discard the blocking solution.
- 3.5 Wash the NC pieces and control piece three times with diluted washing buffer A (B.3).
- 3.6 Place Control NC (C1-C48) into C box (A.5.2) while keeping Test NC and control piece in T box.
- 3.7 Pour MAb (B.1) to cover the Test NC and the control piece in the T box; pour washing buffer A into C box to cover the Control NC. Leave the two boxes at room temperature for 30 minutes with occasional shaking. Discard the MAb from the T box.

T1	T2	T3	T4	T5	T6
T7	T8	T9	T10	T11	T12
T13	T14	T15	T16	T17	T18
T19	T20	T21	T22	T23	T24
T25	T26	T27	T28	T29	T30
T31	T32	T33	T34	T35	T36
T37	T38	T39	T40	T41	T42
T43	T44	T45	T46	T47	T48

C1	C2	C3	C4	C5	C6
C7	C8	C9	C10	C11	C12
C13	C14	C15	C16	C17	C18
C19	C20	C21	C22	C23	C24
C25	C26	C27	C28	C29	C30
C31	C32	C33	C34	C35	C36
C37	C38	C39	C40	C41	C42
C43	C44	C45	C46	C47	C48

- 3.8 Wash Test NC and control piece in the T box 2-3 times with washing buffer A.
- 3.9 Dilute antibody conjugate (A.6) 1:2,000 with washing buffer A. Discard washing buffer A from both boxes and pour the diluted antibody conjugate to the two boxes. Leave the boxes at room temperature for 20 minutes with occasional shaking. Discard the conjugate and wash the membranes in the two boxes 2-3 times with washing buffer A.

- 3.10 Dilute enzyme conjugate (A.7) 1:2,000 with washing buffer A. Pour the diluted enzyme conjugate to the two reaction boxes to cover the NC. Leave at room temperature with occasional rocking for 20 minutes. Discard the conjugate and wash the NC 2-3 times with washing buffer A. **Wash all membranes in the two boxes 2 times with washing buffer B (B.4).**
- 3.11 Dilute substrate (A.8) 1:2 with washing buffer B. Pour the diluted substrate into the two boxes after discarding the washing buffer B. Cover both boxes with aluminium foil or keep the boxes in the dark for 5 minutes. Observe the control piece. The positive control on the control piece should develop a purplish-blue spot while the negative control shows a clear area. Discard the substrate solution from the two boxes and wash all membranes with distilled water.
- 3.12 Place the membranes on a filter paper and let air-dry. Read the results on the Test NC; any spot which contains *Leptospira* should appear as a purplish-blue spot on the Test NC distinguishable from the same on the Control NC which should reveal either clear area or spot of other "non-specific" color.

Note: Wash the plastic boxes thoroughly after use. Also, always use the same boxes as "Test" and "Control" boxes; as MAb might stick to the box and alternate use might give positive reaction to the "C" NC renders indistinguishable results between the "T" NC and the "C" NC in subsequent test. The forceps used with MAb must be thoroughly wash before using the same for the "C" series.

(ลงนาม)

(ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา)

เมธีวิจัยอาวุโส รุ่นที่ 5 (2543-2546)

ผู้รายงาน

วันที่ 14 สิงหาคม พ.ศ. 2546