

การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโน
เมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน



นางสาว อูมาพร พิมพิทักษ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC
FOR 3-AMINO-5-MORPHOLINOMETHYL-2-OXAZOLIDINONE



Miss Umaporn Pimpitak

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตและลักษณะสมบัติของ โมนาโคลนอลแอนติบอดีที่
จำเพาะต่อ 3-อะมิโน-5-เมอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน

โดย

นางสาว อูมาพร พิมพิทักษ์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

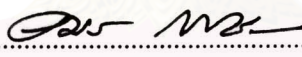
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
นางทรงจันทร์ ภูทอง


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

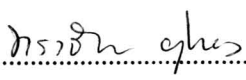

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ออมร เพชรสม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นางทรงจันทร์ ภูทอง)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุตัน เจริญพรวัฒนา)

อุมาพร พิมพิทักษ์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 3-อะมิโน-5-เมอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR 3-AMINO-5-MORPHOLINOMETHYL-2-OXAZOLIDINONE) อ.ที่ปรึกษา : ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, ทรงจันทร์ ภู่ทอง, 130 หน้า.

3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) เป็นสารเมแทบอลิต์ของฟูรัลทาโคน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มสารไนโตรฟูแรน ใช้สำหรับป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ และยังใช้เติมในอาหารสัตว์เพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามสารตกค้าง AMOZ ถูกจัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นจึงได้มีการห้ามใช้สารชนิดนี้ในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทยด้วย

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AMOZ เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ในการสร้างแอนติเจน AMOZ จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ ด้วย 3-carboxybenzaldehyde ได้เป็นสาร CPAMOZ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 333.3 g/mol นำ CPAMOZ มาเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ cBSA ได้เป็น CPAMOZ-cBSA ซึ่งให้ค่าการเชื่อมเป็น 84% นำไปฉีดกระตุ้นหนูทดลอง BALB/c เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเมแทบอลิต์ AMOZ ได้ทำการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมดจำนวน 5 ครั้งได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 21 โคลน จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนที่ได้โดยตรวจสอบไอโซไทป์ ทดสอบความไว ทดสอบความจำเพาะและการเกิดปฏิกิริยาข้าม โดยไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1F2 2E5.1 5A7 และ 7H8 ที่ได้เป็น IgG2b และโคลน 4F1 จะเป็น IgG2a สำหรับโคลนที่เหลือทั้งหมดจะมีไอโซไทป์เป็น IgG1 โดยโคลนที่มีความไวสูงสุดคือ 2E5.1(AM0Z#2) ซึ่งให้ค่า IC50 และ LOD ต่อสารอิสระ AMOZ เท่ากับ 14.98 ng/ml และ 1.42 ng/ml ตามลำดับ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อสารอิสระ CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ และยาปฏิชีวนะตัวอื่นๆที่ใช้ทดสอบ แอนติบอดี AMOZ#2 ที่บริสุทธิ์แล้วจะให้ความไวต่อสารอิสระ AMOZ ที่ใช้ตรวจสอบสูงขึ้นโดยจะให้ค่า IC50 และ LOD ต่อ AMOZ เท่ากับ 5.333 ng/ml และ 0.150 ng/ml ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ AMOZ ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบสารตกค้างได้

สาขาวิชา...เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา...2549....

ลายมือชื่อนิสิต.....อุมาพร พิมพิทักษ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อรุณ A.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....กิตตินันท์ โกมลภิส.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ทรงจันทร์ ภู่ทอง.....

4772576823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: AMOZ / NITROFURANS / MONOCLONAL ANTIBODY / ELISA

UMAPORN PIMPITAK : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR 3-AMINO-5-MORPHOLINOMETHYL-2-OXAZOLIDINONE.

THESIS ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST.PROF.

TANAPAT PALAGA,Ph.D., SONGCHAN PUTHONG, M.Sc., 130 pp.

3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) is a metabolite of furaltadone, an antibiotic of nitrofurans, used for prevention and treatment of animal diseases and as a growth promotor in animal feed. However, AMOZ residue is considered to be a carcinogenic and mutagenic agent which is hazardous to consumers. Therefore, its use is not allowed in many countries including Thailand.

The aim of this work was to generate monoclonal antibodies specific for AMOZ for the development of ELISA test kit. To generate hapten, AMOZ was derivatized with 3-carboxybenzaldehyde to obtain CPMOZ with a molecular weight of 333.3 g/mol. CPMOZ was conjugated to cationized carrier protein bovine serum albumin (cBSA), yielding CPAMOZ-cBSA. The percentage of the conjugation between CPAMOZ and the carrier proteins was approximately 84%. The hapten carrier conjugates were used to immunize BALB/c mice. To generate hybridoma cells secreting monoclonal antibodies against tissue bound nitrofurans metabolite AMOZ, somatic cell fusion technique was performed five times, yielding twenty-one clones. The properties of monoclonal antibodies such as isotype, specificity and cross-reactivity were characterized. Isotype of monoclonal antibodies clone 1F2, 2E5.1, 5A7 and 7H8 was identified as IgG2b and that of clone 4F1 was identified as IgG2a, while other clones were all identified as IgG1. MAbs 2E5.1 (AMOZ#2) gave highest sensitivity with an IC50 value and a LOD value against free AMOZ of 14.98 and 1.42 ng/ml, respectively. The monoclonal antibodies obtained were highly specific for CPAMOZ, NPAMOZ, AMOZ and FTD, and did not cross react with other nitrofurans and other antibiotics tested. The purified antibody of AMOZ#2 gave higher sensitivity to free antigen AMOZ with the IC50 value and the LOD value of 5.333 and 0.150 ng/ml, respectively. In conclusion monoclonal antibodies were generated which show specificity for AMOZ and have a potential to be used in the development of immunoassay-based test kit for AMOZ detection.

Field of study Biotechnology

Academic year 2006.....

Student's signature..... *Chon Pim*

Advisor's signature..... *K. Kittinan*

Co-advisor's signature..... *Tanapat Palaga*

Co-advisor's signature..... *Songchan Puthong*

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ และ นางทรงจันทร์ ภูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็น และ คำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ และผู้บริหารของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านสำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ นักวิจัยโดยเฉพาะ ดร. นันทิกา คงเจริญพร คุณอนุมาศ บัวเขียว และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งเพื่อน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในทุก ๆ เรื่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณมารดาบิดาผู้ให้กำเนิด ทุกคนในครอบครัวและบุคคลที่ให้ความรัก ให้ความเข้าใจ ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 สารไนโตรฟูแรน	4
2.1.2 วิธีการแยกและตรวจวิเคราะห์สารไนโตรฟูแรน.....	11
2.1.3 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunoassay).....	13
2.1.4 หลักการ ELISA.....	21
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	25
3.3 การดำเนินงานวิจัย.....	29
3.4 วิธีการวิจัย.....	30
3.4.1 การเตรียมแอนติเจน.....	30
3.4.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAMoz.....	33

บทที่

3.4.3	การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AMOZ	34
3.4.4	การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	38
3.4.5	การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์	40
3.4.6	การทดสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	42
3.4.7	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์	43
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	44
4.1	การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง	44
4.2	การเตรียมแอนติเจนสำหรับใช้ในการทำ Screening test	50
4.3	การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ	53
4.4	ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอีโลมา	61
4.5	การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	67
4.6	การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี	80
4.7	การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์	87
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	91
	รายการอ้างอิง	94
	ภาคผนวก	98
	ภาคผนวก ก	99
	ภาคผนวก ข	122
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	130

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนในรูปยาตั้งต้นและการเปลี่ยนแปลงของสารไนโตรฟูแรนเมื่อเข้าสู่ร่างกายเป็นสารเมแทบอลิต์.....6
2.2	ขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุดของสารอนุพันธ์ไนโตรฟูแรน ณ ประเทศต่างๆ.....9
2.3	แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....16
3.1	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....24
3.2	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....25
4.1	ผลของค่าความเข้มข้นของโปรตีนพาหะ cBSA ที่เตรียมได้.....47
4.2	ผลทดสอบการเพิ่มหมู่เอมีนในโมเลกุลของโปรตีน BSA.....47
4.3	ค่าความเข้มข้นโปรตีนของแอนติเจน CPAMoz-cBSA สำหรับใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง.....49
4.4	ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติระหว่าง CPAMoz กับโปรตีน cBSA.....49
4.5	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน CPAMoz-OVA ที่เตรียมสำหรับใช้ในการทำ Screening test.....51
4.6	ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติระหว่าง CPAMoz กับโปรตีน OVA.....51
4.7	สรุปปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมและอัตราส่วน โมเลกุลการติดแฮปแทนกับโปรตีนของแอนติเจนชนิดต่างๆที่เตรียมได้.....53
4.8	ระดับแอนติบอดี (antibody titer) จากซีรัมของหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAMoz-cBSA ที่ระดับความเจือจางของซีรัมที่ระดับต่างๆ.....54
4.9	ผลการทดสอบความสามารถในการจับกับสารแอนติเจนอิสระของซีรัมจากหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น.....59
4.10	การทดสอบแอนติบอดีต่อ CPAMoz ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาของการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4.....63
4.11	การทดสอบแอนติบอดีต่อ CPAMoz ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการโคลนเซลล์ทั้งหมดจำนวน 3 ครั้งของการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5.....65
4.12	สรุปผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง.....66
4.13	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA.....68

ตารางที่	หน้า
4.14 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAMOZ , NPAMOZ , AMOZ และ FTD.....	70
4.15 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรในการหาความเข้มข้นของแอนติเจน และความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม ด้วยวิธี indirect ELISA.....	72
4.16 ค่า IC50 LOD และ LOQ ในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD.....	77
4.17 ค่า IC50 และการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity ; CR) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ FTD สารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน...79	79
4.18 ผลปริมาณโปรตีน ปริมาณแอนติบอดี เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และหลังให้บริสุทธิ์แล้ว.....	85
4.19 ค่า IC50 LOD และ LOQ ในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	89
ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA..	99
ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA....	100
ก.3 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน OVA....	100
ก.4 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลอง ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1.....	101
ก.5 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลอง ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2.....	102
ก.6 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลอง ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3.....	102
ก.7 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลอง ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4.....	103
ก.8 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลอง ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ได้แสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.8.5.....	103
ก.9 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#1 (1F2) AMOZ#2 (2E5.1) AMOZ#3 (2E9) และ AMOZ#4 (2H6).....	110

ตารางที่	หน้า
ก.10 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#5 (4F1) AMOZ#6 (4H3) AMOZ#7 (5A7) และ AMOZ#8 (5F1).....	111
ก.11 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#9 (5G10.2) AMOZ#10 (5G10.3) AMOZ#11 (5H7) และ AMOZ#12 (6B3.1).....	112
ก.12 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#13 (6B3.2) AMOZ#14 (6B3.3) AMOZ#15 (6G2) และ AMOZ#16 (7G4).....	113
ก.13 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#17 (7H8) AMOZ#18 (8B1.1) AMOZ#19 (8B4) และ AMOZ#20 (8E2)	114
ก.14 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#1 (1F2) AMOZ#2 (2E5.1) AMOZ#3 (2E9) และ AMOZ#4 (2H6).....	115
ก.15 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#5 (4F1) AMOZ#6 (4H3) AMOZ#7 (5A7) และ AMOZ#8 (5F1).....	116
ก.16 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#9 (5G10.2) AMOZ#10 (5G10.3) AMOZ#11 (5H7) และ AMOZ#12 (6B3.1).....	117
ก.17 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#13 (6B3.2) AMOZ#14 (6B3.3) AMOZ#15 (6G2) และ AMOZ#16 (7G4).....	118
ก.18 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA กับ สารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#17 (7H8) AMOZ#18 (8B1.1) AMOZ#19 (8B4) และ AMOZ#20 (8E2).....	119
ก.19 แสดงค่า Rf กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa) ที่ได้จากการหาตำแหน่งโมเลกุลของแอนติบอดีด้วย เทคนิค SDS-PAGE.....	121

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงกลไกในการเกิด bound residues ของฟูราโซลิโคนในสุกร และการปลดปล่อย AOZ ในกระเพาะอาหารของคน.....	7
2.2 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน.....	14
2.3 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	18
2.4 เซลล์ที่ได้จากการเชื่อม บีเซลล์ เข้ากับ มัยอีโลมาและการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม.....	20
3.1 แสดงการจัดวางแผ่นเจล แผ่น membrane และกระดาษกรอง ในขั้นตอนการถ่ายโอน แอปโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่น membrane ด้วยเครื่อง SCAI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD)	43
4.1 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ เป็น CPAMOZ.....	44
4.2 แสดงแผ่นทินเลเซอร์โครมาโทกราฟีที่แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ เป็น CPAMOZ.....	45
4.3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการหาน้ำหนักโมเลกุล ของสาร CPAMOZ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS	46
4.4 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ของโปรตีน BSA และ cBSA.....	48
4.5 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ของแอนติเจน CPAMOZ-cBSA	50
4.6 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ของโปรตีน OVA และ แอนติเจน CPAMOZ-OVA	52
4.7 ระดับแอนติบอดีของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPAMOZ-cBSA.....	55
4.8 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองตัวที่ 1-5..	56
4.9 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CPAMOZ, NPAMOZ และ AMOZ ในซีรัมหนูทดลอง.....	60
4.10 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAMOZ.....	73
4.11 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดีต่อ NPAMOZ.....	74
4.12 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดีต่อ AMOZ.....	74
4.13 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดีต่อ FTD.....	75
4.14 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ให้บริสุทธิ์.....	81

รูปที่	หน้า
4.15 โครมาโทแกรมการทำโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ ด้วยเครื่องแยกโปรตีน.....	82
4.16 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมนิโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#18 ให้บริสุทธิ์.....	83
4.17 แสดงแถบของสาย Heavy chain และ Light chain ของโมนิโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และหลังจากบริสุทธิ์.....	86
4.18 การทดสอบความจำเพาะของโมนิโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร AMOZ.....	87
4.19 การทดสอบความจำเพาะของโมนิโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร CPAMOZ.....	88
4.20 การทดสอบความจำเพาะของโมนิโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร NPAMOZ.....	88
4.21 การทดสอบความจำเพาะของโมนิโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร FTD.....	88
ก.1 กราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน.....	99
ก.2 กราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน.....	100
ก.3 กราฟโปรตีน OVA มาตรฐาน.....	101
ก.4 กราฟหาค่า IC50 โโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อ CPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	104
ก.5 กราฟหาค่า IC50 โโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อ CPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	104
ก.6 กราฟหาค่า IC50 โโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#5 ต่อ CPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	104
ก.7 กราฟหาค่า IC50 โโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#17 ต่อ CPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	105
ก.8 กราฟหาค่า IC50 โโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ต่อ CPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	105
ก.9 กราฟหาค่า IC50 โโมนิโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อ NPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	105

รูปที่	หน้า
ก.10 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อ NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	106
ก.11 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#5 ต่อ NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	106
ก.12 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#17 ต่อ NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	106
ก.13 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ต่อ NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	107
ก.14 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อ AMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	107
ก.15 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อ AMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	107
ก.16 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อ FTD ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	108
ก.17 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อ FTD ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	108
ก.18 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#5 ต่อ FTD ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	108
ก.19 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#17 ต่อ FTD ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	109
ก.20 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ต่อ FTD ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....	109
ก.21 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี BCA....	120
ก.22 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแอนติบอดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA.....	120
ก.23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (หลังจากทำให้บริสุทธิ์) ด้วย เทคนิค SDS-PAGE.....	121

ตัวย่อลักษณะและคำย่อ

AHD	1-Aminohydantoin
AMOZ	3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
AOZ	3-amino-2-oxazolidone
APS	Ammoniumpersulfat
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine Serum Albumin
cBSA	cationize Bovine Serum Albumin
CAP	Chloramphenicol
CBA	3-carboxybenzaldehyde
CPAMOZ	3-[(3-carboxyphenyl)methylene]amino}-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EIA	enzyme immuno assay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FTD	Furaltadone
FZD	Furazolidone
HAT	Hypoxanthine, Aminopiter และ Thymidine
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradise peroxidase
LC-MS	Liquid Chromatography/Mass spectrometry
LC-MS-MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LOD	limiting of detection
M	molar
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MRLs	maximum residue limits

NBA	2-Nitrobenzaldehyde
NFT	Nitrofurantoin
NFZ	Nitrofurazone
NPAHD	1-[(2-Nitro-benzylidene)-amino]-imidazolidin-2,4-dione
NPAMOZ	5-Morpholin-4-ylmethyl-3-[(2-nitro-benzylidene)-amino]-oxazolidin-2-one
NPAOZ	3-[(2-Nitro-benzylidene)-amino]-oxazolidin-2-one
NPSCA	2-Nitro-benzaldehydesemicarbazone
OPD	O-phenylenediamine
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphate buffer saline
PEG	polyethylene glycol
ppb	part per billion
ppm	part per million
Rf	Relative mobility
SCA	Semicarbazide
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis
v	volume
w	weight
%	percent

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ มาใช้ในการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคอย่างต่อเนื่อง และ สิ่ง ที่นิยมคือ การใช้ยาปฏิชีวนะ ผสมลงในอาหารสัตว์ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์ หากกลุ่ม หนึ่ง ที่นิยมใช้ในการป้องกัน และ รักษาโรคสัตว์ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อ *Salmonella sp.* , *Escherichia coli* , *Coccidia* คือยาในกลุ่ม ไนโตรฟูแรน ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone, NFZ) ไนโตรฟูแรน โทอิน (nitrofurantoin, NFT) ฟุราโซลิโดน (furazolidone, FZD) และ ฟุรัลทาโดน (furaltadone, FTD) ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิดนี้ มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อ สัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสาร เมแทบอลิต์ ได้แก่ เซมิคาร์บาไซด์ (SCAicarbazine; SCA), 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-Aminohydantoin; AHD), 3-อะมิโน-2-ออกซาโซ ลิดิโนน (3-amino-2-oxazolido; AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone; AMOZ) ตามลำดับ โดยจะถูกดูดซึมผ่านเยื่อเมือกของลำ ไส้ ของสัตว์ (Kumar และคณะ, 1994; Keefe และคณะ, 2004)

สารในกลุ่มดังกล่าวมีรายงานว่า มีแนวโน้มที่จะเป็นสารก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะถูกเมแทบอลิต์เร็วมาก ภายใน 2-3 ชั่วโมง หลังเข้าสู่ร่างกายนั้นจะไม่สามารถ ตรวจพบได้ ซึ่งสาร เมแทบอลิต์ ที่ได้ จะอยู่ในรูปที่ ติดอยู่ที่เนื้อเยื่อ ซึ่งจะคงอยู่นานหลายสัปดาห์ ใน การใช้ยาและสารเหล่านี้จะใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกัน เป็นเวลานาน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ เช่น ในนม เนื้อ หรือ ไข่ เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ ซึ่งจะส่งผล กระทบต่อผู้บริโภค (Bryan, 1978) จากสาเหตุดังกล่าว จึงทำให้หลายประเทศหันมาเน้นเรื่องความปลอดภัย ของอาหาร โดย ไนโตรฟูแรน เป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะที่มีการสั่งห้ามไม่ให้ใช้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อการ บริโภคในหลายประเทศโดยเฉพาะประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป และ สหรัฐอเมริกา จึงได้มีการตรวจ วิเคราะห์หาสารตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติ การ โดยวิธี ทางเคมี ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS-MS) (Leitner, Zöllner and Lindner, 2001; Keefe และคณะ, 2004) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลามาก ทำให้การตรวจ วิเคราะห์ตัวอย่างทำได้ไม่ครอบคลุมดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการตรวจสอบที่ง่าย สะดวก ได้ผลเร็วแม่นยำและ ค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อใช้ในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ก่อนการนำเข้า

และ ก่อนการนำไปใช้เลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้มีสารต้องห้ามเข้ามาในระบบการผลิตสัตว์ ซึ่งเป็นหลักการขั้นพื้นฐานที่ต้องปฏิบัติเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาตั้งแต่ต้นดีกว่าการไปตรวจในผลผลิตสุดท้าย สำหรับชุดตรวจสอบที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีมักไม่ยุ่งยากซับซ้อนมาก มีราคาถูก ใช้งาน และยังสามารถใช้บ่อยครั้งหรือปริมาณสารที่ต้องการตรวจวัดได้ค่อนข้างแน่นอนแต่มีข้อจำกัดคือมักมีความจำเพาะน้อยกว่าชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารที่จัดได้ว่าได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขจะต้องพบปริมาณสาร AMOZ ซึ่งเป็นสารในกระบวนการหมักของ ฟูลิธาโคน ปนเปื้อนน้อยกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2546)

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้าง ในสัตว์เลี้ยงและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการตรวจวัดปริมาณ แอนติเจน โดยการใช้อันติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่าใช้จ่ายต่ำ รวดเร็ว และ มีความแม่นยำสูง เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีการรายงานการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ AMOZ โดยวิธี ทางภูมิคุ้มกันวิทยา ดังนั้น จึงควรมีการพัฒนาความสามารถในการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสาร AMOZ ทำให้การตรวจโดยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยามีความจำเพาะสูงขึ้นและสามารถควบคุมคุณภาพการผลิตได้ง่ายขึ้น เพื่อนำไปพัฒนาต่อในขั้นทำชุดตรวจ (ELISA test kit) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบนี้ลดลง มีความสะดวกในการใช้งานได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งยังสามารถทำให้รู้ปริมาณของสารในระดับต่ำที่เทคนิคทางเคมีไม่สามารถตรวจพบได้ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงได้รับความนิยมสูงขึ้นมากจนทำให้การตรวจโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจหลักในปัจจุบัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 3-อะมิโน-5-เมอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (AMOZ)
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร 3-อะมิโน-5-เมอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (AMOZ) และเชื่อมต่อกับ โปรตีนพาหะ เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

3. ศึกษาระดับระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ สาร AMOZ ที่เปลี่ยนแปลงอนุพันธ์เป็น 3-[[[3-carboxyphenyl)methylene]amino]-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (CPAMOZ)
4. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี
5. คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้าง โมโน โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AMOZ โดยวิธี ELISA
6. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ โมโน โคลนอลแอนติบอดีที่ได้
 - 6.1 การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของ โมโน โคลนอลแอนติบอดีต่อ AMOZ โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich, USA)
 - 6.2 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มโมโน โคลนอลแอนติบอดี และสารนอกกลุ่มด้วยวิธี Indirect competitive ELISA
7. การทำโมโน โคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
8. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต โมโน โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AMOZ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

แนวคิดและทฤษฎีได้กล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับ คุณสมบัติเบื้องต้นของยาปฏิชีวนะไนโตรฟูแรน รวมถึงสูตรโครงสร้างทางเคมีที่สามารถเปลี่ยนรูปเป็นสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ส่งผลให้เกิดพิษของสารตกค้างและก่อให้เกิดมะเร็งต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการกำหนดค่าเกณฑ์มาตรฐานของสารตกค้าง ที่ปัจจุบันสามารถตรวจติดตามได้ภายในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางเคมี ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทำให้การตรวจติดตามทำได้ไม่ครอบคลุม ปัจจุบันวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยใช้หลักการของ ELISA เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจหาสารตกค้างเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก และรวดเร็ว ดังนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการตรวจติดตามสารตกค้างได้เป็นอย่างดี ดังได้กล่าวถึงในทฤษฎีเบื้องต้นของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำมาพัฒนาต่อในการตรวจหาสารตกค้างโดยใช้หลักการ ELISA ต่อไป รายละเอียดทั้งหมดกล่าวได้ดังนี้

2.1.1 สารไนโตรฟูแรน (Nitrofurans)

ประโยชน์และการใช้งาน

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตและเป็นยาต้านจุลชีพ ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้อากาศ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และออกฤทธิ์ต่อเชื้ออหิวา โพรโทซัว รวมทั้งเชื้อราบางชนิด ซึ่งนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้ในการป้องกันรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ ภาวะอาหารและโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของสัตว์โดยเกิดจาก แบคทีเรีย เช่น *Salmonella spp.* (โรค Salmonellosis) *Escherichia coli* (โรค Colibacillosis) โรคที่เกิดจาก *Coccidia* (โรค Coccidiosis) ชื่อเทออักเสบจากการติดเชื้อ (infectious synovitis) โรคหงอนดำ (Blackhead) หรือ Histomoniasis ที่พบในสัตว์ ได้แก่ สุกร แพะ แกะ โค กระบือ เป็ด ไก่ และ กุ้ง เป็นต้น สำหรับการใช้อย่างในสัตว์มีหลายวิธี เช่น สัตว์ที่มีขนาดใหญ่ใช้การ ฉีด สัตว์ที่มีขนาดเล็กที่เลี้ยงแบบแออัดจะใช้ยาผสมน้ำหรืออาหารในการป้องกันรักษาโรคสัตว์ (Bryan, 1978)

สูตร โครงสร้างทางเคมี ลักษณะและสมบัติของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน

ไนโตรฟูแรนมีรูปร่างเป็นผลึกสีเหลืองอ่อนถึงสีส้ม ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้เล็กน้อย สลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกแสง อนุพันธ์ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่เป็นยาตั้งต้น (parent drugs) มีหลายร้อยชนิด แต่ที่

นิยมใช้ เช่น ฟุรัลทาโคน (Furaltadone, FTD; 5-morpholinomethyl-3-[5-nitrofurfurylideneamino]-2-oxazolidinone) ฟุราโซลิโคน (Furazolidone, FZD; N-[5-nitro-2-furfurylidene]-3-amino-2-oxazolidone) ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone, NFZ; 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) และ ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin, NFT; N-[5-nitro-2-furfurylidene]-1-aminohydantoin) ฯลฯ (ศักดิ์สิทธิ์ สุสเกตุ, 2545) โครงสร้างเคมีของสารดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 2.1

โดยสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ประกอบด้วยวงแหวนฟูแรนเกาะด้วยกลุ่มไนโตร เรียกว่า 5-Nitrofuraldehyde และมีรูปร่างเป็นผลึกสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองส้ม ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำได้เล็กน้อย สลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสง (Rupp และ คณะ, 1994)

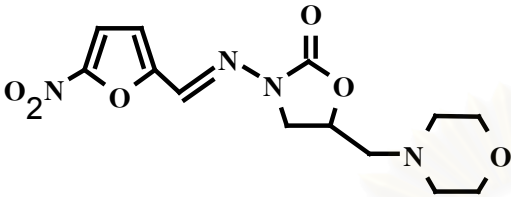
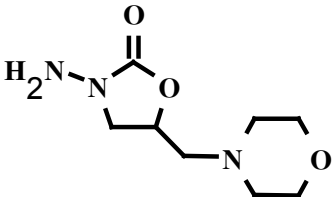
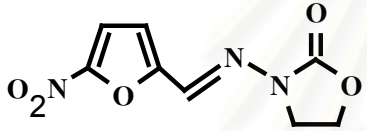
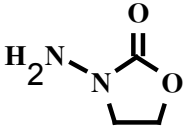
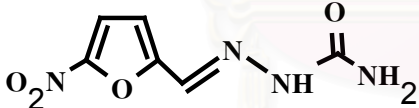
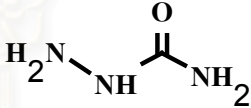
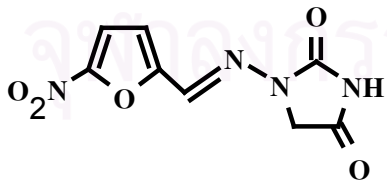
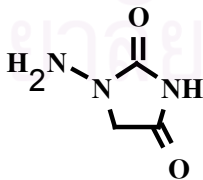
สารไนโตรฟูแรน เมื่อเข้าสู่ร่างกาย

เมื่อยาหรือสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย สิ่งมีชีวิตจะมีวิธีการกำจัดสารเคมีเหล่านั้นโดยกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งยาส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารที่ละลายได้และถูกกำจัดออกไปจากร่างกาย แต่ในบางกรณีสารเมแทบอลิต์ อาจไปจับกับโปรตีนในร่างกายสัตว์ เป็นผลให้ขบวนการขับออกไปเป็นไปได้ช้า และมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหาร เพราะสามารถคงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นเวลานานภายหลังจากการหยุดให้ยาไปแล้ว เมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มียาสัตว์ตกค้างในรูปของ bound residues เหล่านี้จะถูกกรดในกระเพาะอาหารย่อยและปลดปล่อยสารตกค้างออกมาจากโปรตีนที่เกาะอยู่ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Keefle และ Home , 1999)

ยาตั้งต้นทั้ง 4 ชนิดนี้จัดเป็นสารประกอบไนโตร (nitro compounds) มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อยาตั้งต้นทั้ง 4 ชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้เกิดสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญ ได้แก่ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิโคน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone; AMOZ) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโคน (3-amino-2-oxazolidone; AOZ) เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide; SCA) และ 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin; AHD) (Leitner และ คณะ, 2001) แสดงดังตารางที่ 2.1

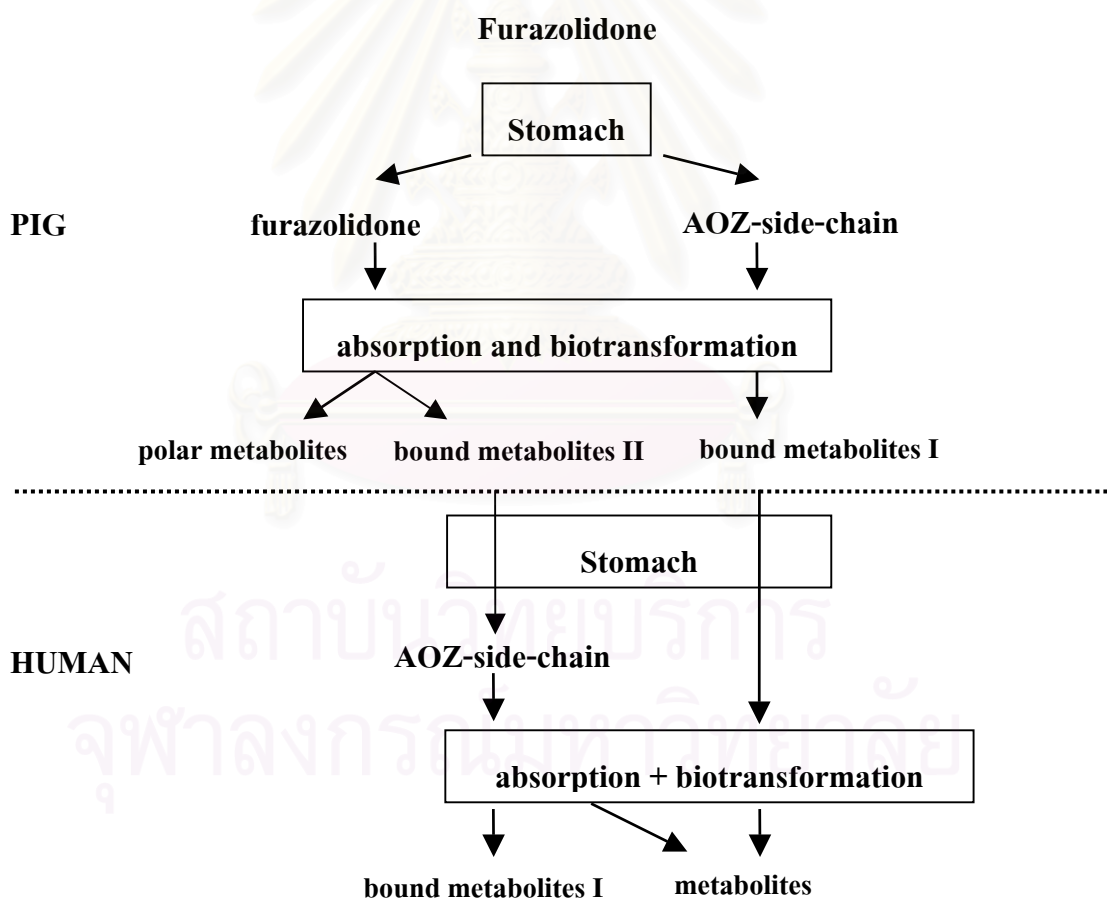
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนในรูปยาตั้งต้น และการเปลี่ยนแปลงของสารไนโตรฟูแรน เมื่อเข้าสู่ร่างกายเป็นสารเมแทบอไลต์

Parent drugs	Metabolites
 <p>ฟูรัลทาโดน (Furaltadone; FTD) (5-morpholinomethyl-3-[5-nitrofurfurylidene amino]-2-oxazolidinone)</p>	 <p>3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone; AMOZ)</p>
 <p>ฟูราโซลิดิโนน (Furazolidone; FZD) (N-[5-nitro-2-furfurylidene]-3-amino-2-oxazolidone)</p>	 <p>3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-2-oxazolidone; AOZ)</p>
 <p>ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone; NFZ) (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone)</p>	 <p>เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide; SCA)</p>
 <p>ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin; NFT) (N-[5-nitro-2-furfurylidene]-1-aminohydantoin)</p>	 <p>1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-Aminohydantoin; AHD)</p>

พิษของสารตกค้างไนโตรฟูแรน

จากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ถ้าได้รับการบริโภคเป็นระยะเวลานาน โดยพบว่า ฟูราโซลิโดน มีผลยับยั้งหน้าที่เอนไซม์บางประเภท โดยข้อมูลจาก Irish Agriculture and Food Development Authority ตามโครงการศึกษา Project Armis No. 4036 ของสหภาพยุโรปในปี 1999 พบว่าเมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีสารเมแทบอลิต์จับกับโปรตีนในเนื้อเยื่อสุกรเข้าไปกรดในกระเพาะจะย่อย AOZ side-chain ออกมาและเปลี่ยนรูปไปเป็น β -hydroxyethylhydrazine ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อมะเร็งซึ่งในการประเมินความปลอดภัยจากยาสัตว์ตกค้าง ต้องศึกษาว่า protein-bound residue สามารถปลดปล่อยรีแอกทีฟเมแทบอลิต์จากการถูกย่อยโดยเอนไซม์หรือภายใต้สภาวะความเป็นกรดอ่อนภายในกระเพาะอาหารของผู้บริโภค ดังตัวอย่างยา ฟูราโซลิโดน ที่ให้ในสุกร ดังรูป 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงกลไกในการเกิด bound residues ของ furazolidone ในสุกร และการปลดปล่อย AOZ ในกระเพาะอาหารของคน (Keefle และ Home, 1999)

การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenecity) คือ ความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของยีนภายในเซลล์ซึ่งสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนอาจทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ด้วย (Botsoglou และ Fletouris, 2001)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า ฟุราโซลิโคน จะมีการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อ โดยจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของฮัยดราซีน (hydrazine) ซึ่งเป็นพิษต่อยีน จะไปรวมตัวกับดีเอ็นเอ (DNA) ภายในเซลล์ (Hoogenboom และ Polman ,1993 อ้างโดย มาลินี 2541)

เนื่องจากไนโตรฟูแรน เป็นสารก่อมะเร็งชนิดที่มีความเป็นพิษต่อยีน (genotoxic carcinogens) คือ สารก่อมะเร็งซึ่งออกฤทธิ์โดยตรงต่อ DNA และจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้แม้ได้รับเพียงแคครั้งเดียว โดยสารที่เป็นสารก่อมะเร็งชนิดที่มีความเป็นพิษต่อยีนจะมีการห้ามนำมาใช้ในสัตว์เพื่อการบริโภคและห้ามมีตกค้างไม่ว่าในปริมาณเท่าใดแม้ว่าจะอยู่ในรูปยาตั้งต้น หรือเมแทบอลิต์ ซึ่งส่งผลทำให้หลายๆ ประเทศ จำกัดการใช้ โดยเฉพาะการใช้ผสมในอาหารสัตว์ที่ใช้สำหรับบริโภค สารกลุ่มนี้จึงถูกห้ามใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น สิงคโปร์ บังคลาเทศ และกลุ่มสหภาพยุโรป (Bryan, 1978)

มาตรฐานสารตกค้างไนโตรฟูแรน

จากอันตรายของสารในกลุ่มนี้ทำให้เกิดความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับอันตรายจากสารตกค้างเหล่านี้ ดังนั้นบางประเทศจึงห้ามไม่ให้ใช้ยาในกลุ่มนี้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อใช้สำหรับการบริโภค เช่น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป, สหรัฐอเมริกา และแคนาดา ส่งผลทำให้ประเทศต่างๆ ได้ออกกฎหมายควบคุมระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ของสารตกค้างกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ โดยปกติจะกำหนดเป็นขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุด ซึ่งเรียกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) แต่ค่า MRL ของแต่ละประเทศอาจไม่ตรงกัน ดังนั้น องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) องค์การอาหารและเกษตรกรรมขององค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) จึงร่วมกันตั้งคณะกรรมการร่วม (Codex Committee on Residue of Animal Drugs, CCRVDF) ขึ้น เพื่อเสนอค่า MRL ที่เป็นสากลมากขึ้น โดยสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีการกำหนดค่า MRL อยู่ในระดับที่เรียกว่า zero tolerance level คือต้องไม่มีการตกค้างของสารกลุ่มนี้อยู่ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (European Commission , 2001)

ทำให้หลายประเทศได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์และได้กำหนดค่าขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์สารไนโตรฟูแรนซึ่งในขณะนี้สหภาพยุโรปได้จัดตั้งโครงการชื่อ FoodBRAND ขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ โครงการนี้อยู่ภายใต้การร่วมมือของตัวแทนกลุ่มต่างๆ ได้แก่ National Reference Laboratories (NRLs) ที่ได้รับการรับรอง GLP/EN45000 กลุ่ม SCA กลุ่มห้องปฏิบัติการวิจัยต่างๆ และกลุ่มผู้บริโภค ซึ่งได้ข้อสรุปว่า จะให้ห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถใช้วิธี ELISA ในการตรวจวิเคราะห์ ได้ตามความเหมาะสม และอาจยืนยันผลการตรวจวัดสารดังกล่าวด้วยเทคนิคอื่น เช่น High Performance Liquid

Chromatography (HPLC) หรือ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS-MS) สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้เพิกถอนทะเบียนตำรับยาที่ใช้สำหรับสัตว์ที่มีตัวยากุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน และฟูราโซลิโดน นอกจากนี้ยังห้ามนำเข้ายา เกสซ์เคมีภัณฑ์ และเกลือของเกสซ์เคมีภัณฑ์เหล่านี้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีการลักลอบนำสารเหล่านี้เข้าภายในประเทศได้ในรูปของอาหารสัตว์ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อนจึงเป็นสิ่งสำคัญ แต่เนื่องจากการวัดปริมาณยาตกค้างดังกล่าวสามารถทำได้ในขีดจำกัดเนื่องจากต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีราคาแพงมาก สำหรับค่ามาตรฐานสารตกค้างไนโตรฟูแรนที่ประกาศโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร (คานิส ทวีติยานนท์, 2545) ได้แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุดของสารอนุพันธ์ไนโตรฟูแรน ณ ประเทศต่างๆ

ประเทศ	ปริมาณสารอนุพันธ์ของไนโตรฟูแรน ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	AMAZ	AOZ	SCA	AHD
1. สหภาพยุโรป	0.3	0.3	1.0	1.0
2. เยอรมัน	0.3	0.3	0.5	1.0
3. อเมริกา	x	x	x	x
4. ออสเตรเลีย	x	x	x	x
5. นิวซีแลนด์	x	x	x	x
6. แคนาดา	0.3	0.3	1.0	1.0
7. สวิตเซอร์แลนด์	0.3	0.3	1.0	1.0
8. สาธารณรัฐเช็ก	0.3	0.3	1.0	1.0
9. ญี่ปุ่น	x	x	x	x
10. ไทย	0.3	0.3	1.0	1.0

หมายเหตุ x = zero tolerance level คือต้องไม่มีการตกค้างของสารกลุ่มนี้อยู่ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์

การประเมินความปลอดภัยจากยาสัตว์ตกค้าง

จากนิยามยาสัตว์ตกค้างของ CODEX ยาสัตว์ตกค้างที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูปแบบของยาตั้งต้น ที่ให้แก่สัตว์ แต่อาจอยู่ในรูปของสารที่เปลี่ยนรูปไปเป็นเมแทบอลิต์อิสระหรือ เมแทบอลิต์ที่ไปจับกับโมเลกุลอื่นหรือเนื้อเยื่อสัตว์ก็ได้ (tissue bound residues or bound metabolites) ซึ่งการสะสมสารตกค้างในเนื้อเยื่อสัตว์ขึ้นกับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. อัตราการดูดซึมยา (absorption)
2. ขอบเขตการแพร่กระจายของยา (distribution)
3. อัตราการเมแทบอลิต์
4. การขับออกของยาตั้งต้น (parent drug) และเมแทบอลิต์
5. อัตราส่วนของ สารประกอบตั้งต้น ต่อ เมแทบอลิต์ ที่มาจากยาชนิดเดียวกันจะแตกต่างกันไปในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด (กล้ามเนื้อ ตับ ไต)

โดยยาบางชนิดอาจขับออกจากร่างกายโดยไม่มี การเปลี่ยนรูปแต่ยาส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนรูป (biotransformation) ที่ตับและไตก่อนขับออกจากร่างกายในสภาพสารเมแทบอลิต์ชนิดต่างๆที่มีชีวสูงขึ้นกว่าสารเดิม โดยหลักการแล้ว ยาที่ให้กับสัตว์ทุกชนิดสามารถทำให้เกิดสารตกค้างได้ทั้งในเนื้อเยื่อ นม ไข่ที่บริโภค ทั้งนี้ขึ้นกับ

1. ขนาดยาที่ให้
2. ช่วงเวลาของการให้ยา
3. ระยะเวลาที่เหมาะสม

การตรวจติดตามสารตกค้างในโตรฟูแรน

เนื่องจากได้มีมาตรการควบคุมและติดตามการใช้สารกลุ่มนี้ ดังนั้น เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้า โดยพบว่า สารกลุ่มไนโตรฟูแรน ในรูปยาตั้งต้น ได้แก่ ฟุรลทาโดน ฟุราโซลิโดน ไนโตรฟูแรนโทอิน และ ไนโตรฟูราโซน จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ ภายใน 2-3 ชั่วโมง เปลี่ยนไปอยู่ในรูปสาร เมแทบอลิต์ คือ AMOZ AOZ SCA และ AHD ตามลำดับ ปกติสารเมแทบอลิต์ ของไนโตรฟูแรน จะอยู่ในรูปสารเมแทบอลิต์ที่จับกับโปรตีนโดยการทำให้สารเมแทบอลิต์ อยู่ในรูปอิสระโดยอาศัยการย่อยสลายพันธะด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) แต่สาร เมแทบอลิต์ ที่ได้จะมีขนาดโมเลกุลเล็กมากยากต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงต้องทำให้สาร เมแทบอลิต์ เหล่านี้อยู่ในรูปอนุพันธ์ุ เรียกกระบวนการนี้ว่า derivatization ซึ่งสารที่นิยมใช้ให้เกิดอนุพันธ์ุ คือ 2-Nitrobenzaldehyde (NBA) โดยการตรวจวิเคราะห์สารเมแทบอลิต์ ของไนโตรฟูแรน ปัจจุบัน นิยมใช้เทคนิค Liquid chromatography (LC) และ Mass spectrometry (MS) โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS เพื่อยืนยันชนิดของสารและปริมาณ เนื่องจากมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่

มีปริมาณเล็กน้อย ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะใช้ตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อยสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้น ด้วยวิธี colour test ส่วนการตรวจยืนยันผลใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) และวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) (Diblikova และ คณะ, 2005)

2.1.2 วิธีการแยกและตรวจวิเคราะห์สารในโตรฟูแรน

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในโตรฟูแรนเป็นสิ่งสำคัญในการตรวจสอบสารตกค้างในโตรฟูแรนที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ โดยวิธีการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต้องเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดสารในโตรฟูแรนที่มีปริมาณน้อยๆ ในระดับพีพีบี (หนึ่งส่วนในพันล้านส่วน; ppb) นอกจากนี้ควรเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็วในการตรวจสอบ ซึ่งวิธีการที่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สารในโตรฟูแรน ได้แก่

2.1.2.1 วิธีทางเคมี

(1) Thin Layer Chromatography (TLC)

วิธีการนี้เป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว แต่มีความแม่นยำ และ ความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ที่ต่ำและไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ ระดับพีพีบีได้ เนื่องจากเทคนิคนี้จะให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์สารอยู่ที่ ระดับปริมาณ 50 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน; ppm) เท่านั้น (Cieri และ คณะ 1978, McCracken และ คณะ 1997)

(2) High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การตรวจวิเคราะห์สารในโตรฟูแรน ด้วยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถใช้แยกสารในโตรฟูแรนได้ดีเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ reversed phase column (Angelini และคณะ, 1997) ซึ่งคอลัมน์ชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้แยกสารที่มีขั้วสูงได้ดี อย่างเช่นสารในโตรฟูแรน ซึ่งจัดเป็นสารประกอบไนโตร (nitro compounds) และยังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารดังกล่าวได้ โดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ultraviolet spectrophotometer) นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังใช้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดชนิดอื่นในการตรวจวัดหาสารในโตรฟูแรน เช่น เครื่องตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical detector) แต่เนื่องจากเครื่องตรวจวัดชนิดนี้ใช้งานได้อย่างจำกัดเนื่องจากตรวจวัดสารในโตรฟูแรนได้บางชนิดเท่านั้น (Cieri และคณะ, 1978) ข้อได้เปรียบของเทคนิค HPLC เมื่อเทียบกับเทคนิค TLC คือ จะใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ ได้ดี และให้ค่าความแม่นยำและเที่ยงตรงได้ดีกว่า จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์สารตกค้างที่ได้รับความนิยม แต่เนื่องจากเทคนิคต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและวิธีการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากกว่า

(3) Mass Spectrometry (MS), Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)

โดยจะใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี คู่กับอเล็กโตรแมสสเปกโตรเมตรี และแทนเต็มแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งวิธีการนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถตรวจสอบเพื่อยืนยันระบุชื่อสารในระดับน้อยมากๆ ได้แม่นยำสูง และยังใช้สารตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นวิธีการนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดี แต่เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก และยังต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญการ โดยเฉพาะ ดังนั้นเทคนิคจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้ในงานประจำ (McCracken และคณะ, 1995)

(4) ชุดตรวจสอบทางเคมี

เป็นการตรวจโดยอาศัย Colorimetric Method หลักการคือใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรนทำปฏิกิริยากับ ฟีนิลไฮดราซีนไฮโดรคลอไรด์จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ให้สีแล้วจึงทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Photometric Colorimeter (Buzard และคณะ, 1956) ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่าย ให้ค่าที่เที่ยงตรงและแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี แต่วิธีการนี้สามารถตรวจวัดสารได้ที่ละตัวเท่านั้นจึงทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน จึงทำให้ไม่เหมาะสมในการตรวจวัดสารตัวอย่างในปริมาณมาก การตรวจสอบโดยใช้ชุดทดสอบภาคสนามได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบภาคสนามเพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเกสรเคมีภัณฑ์ในกลุ่มไนโตรฟูแรน (แพรวพรรณ และคณะ 2544) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

การตรวจฟูราโซลิโดน ในโตรฟูราโซน

1. หยคน้ำยาทดสอบ Fura1 18 หยด หยดลงในจานหลุมและหยคน้ำยาทดสอบ Fura2 จำนวน 2 หยด (อัตราส่วน Fura1 : Fura2 = 9:1)
2. โรยตัวอย่างครั้งละน้อยๆ กระจายบางๆ ให้ทั่วหลุม
3. ตรวจผลทันทีด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ กำลังขยาย 20-40 เท่า สังเกตสีที่เกิดขึ้น
4. ตรวจสอบผลฟูราโซลิโดน เกิดจุดสีม่วงน้ำเงิน ในโตรฟูราโซนเกิดจุดสีแดงบานเย็น

เนื่องจากเทคนิคนี้ใช้สำหรับตรวจวัดสารตกค้างได้ในเชิงคุณภาพ ดังนั้นจึงควรยืนยันผลในเชิงปริมาณโดยวิธี HPLC ด้วย (แพรวพรรณ และคณะ , 2544)

2.1.1.2.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunological method)

ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออก ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ โดยใช้หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับตรวจวัดสารตกค้างโดยอาศัยหลักการการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน วิธี ELISA นี้เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว

2.1.3 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunoassay)

แอนติเจน (Antigen, Ag)

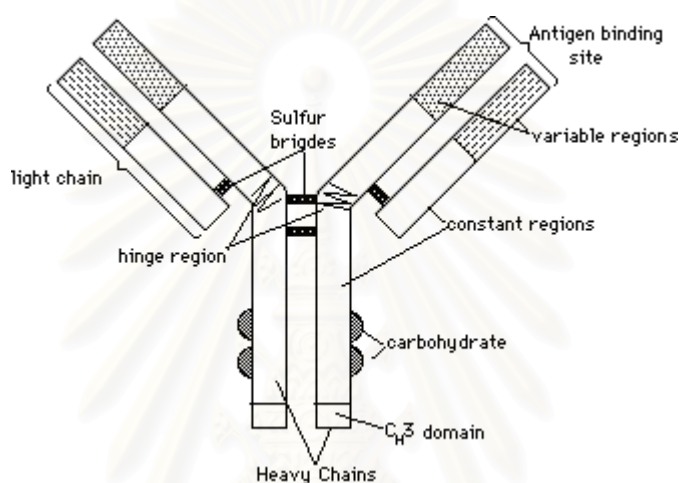
แอนติเจน คือ สารที่สามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีหรือ T-lymphocyte ชนิดจำเพาะ (Specific sensitized T lymphocyte) ได้ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดี หรือลิมโฟไซต์นั้นๆ

แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดี เป็นสารน้ำที่สร้างขึ้นและ หลังมาจากเซลล์พลาสมา ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก B cell ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีบนผิวของ B cell แอนติบอดีเป็นโปรตีนประเภทโกลโคโปรตีน มีโครงสร้างคล้ายตัว Y จะประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 82 – 96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4 – 18 เปอร์เซ็นต์ แอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในซีรัมส่วนแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) ถ้านำซีรัมของคนปกติมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จะแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ คือ อัลบูมิน และ โกลบูลินอีก 4 ส่วน คือ แอลฟา 1 (α_1) แอลฟา 2 (α_2) บีตา (β) และ แกมมา (γ) เนื่องจากแอนติบอดีเป็น โกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) หรือ Ig แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลินเป็นผลผลิตของเซลล์พลาสมา ไม่เพียงพบแต่ในซีรัมเท่านั้น ยังพบในสารน้ำอื่นๆของร่างกาย และในเนื้อเยื่อ เช่น ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อม้ำเหลือง ม้าม และนอกจากนี้ยังพบบนผิวของ บี-เซลล์ด้วย

แอนติบอดี 1 โมเลกุล (monomer) มีโครงสร้างพื้นฐานดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งจะประกอบด้วยสายโพลีเพปไทด์ 4 สาย คือสายที่ยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า Heavy chain (H) ซึ่งมี 2 สายที่เหมือนกัน ส่วนอีก 2 สายที่สั้นและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเรียกว่า Light chain (L) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สายเช่นเดียวกัน โดย Heavy chain และ Light chain ทั้ง 4 สายจะเชื่อมต่อ

กันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งสามารถแยกแรงยึดนี้ออกจากกันได้ด้วยสาร reducing agent เช่น เมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) ปลายข้างหนึ่งของแต่ละสายจะเป็น -N หรือ -NH₂ หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะเป็น -C หรือ -COOH หรือ carboxy terminal ทั้ง 4 สายจะหันปลายข้าง -NH₂ หรือ -COOH ไปทางเดียวกัน โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินมีรูปร่างคล้ายๆ กับตัว Y โดยมี hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น ได้มากทำให้แขนทั้ง 2 ข้าง ยืดห่างออกจากกันเพื่อจับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

(http://home.earthlink.net/~dayvdanls/Immune_lecture.html)

อิมมูโนโกลบูลิน สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ไอโซไทป์ ตามความแตกต่างของ H-chain คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE ซึ่งมี H-chain เป็น γ α μ δ และ ϵ ตามลำดับ H-chain แต่ละไอโซไทป์มีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล การลำดับของกรดอะมิโน ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต เอพิโทป (epitope) คุณสมบัติทางชีวภาพ และการเคลื่อนที่เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกันสามารถแบ่ง L chain ออกได้เป็น 2 ชนิด คือ แคปป์ (kappa; κ) และ แลมบ์ดา (lamda; λ) (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

การกระตุ้น บี-เซลล์ ให้สร้างแอนติบอดี

การผลิตแอนติบอดีทำได้โดยการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนเพื่อให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีขึ้นมาโดยการทำงานของ บี-เซลล์ ซึ่งจะรับรู้กับแอนติเจนที่จำเพาะด้วย membrane-bound บนผิวเซลล์และนำส่วนแอนติเจนเข้ามาในเซลล์เปลี่ยนแปลงและนำเสนอที่ผิวเซลล์ร่วมกับ

โมเลกุล HLA/MHC classII ซึ่งทำให้ T helper-cell มาจับและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ถูกเสนอจาก บี-เซลล์ จากนั้น ที-เซลล์ หลั่งสาร ลิมโฟไคน์ (lymphokines) ส่งผลให้ บี-เซลล์ เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์พลาสมา เพื่อสร้างแอนติบอดีต่อไป โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้จะเป็นชนิด พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งแอนติบอดีที่ได้จะมีความหลากหลายมาก เนื่องจากแอนติบอดีเหล่านี้ถูกสร้างมาจาก บี-เซลล์ หลายๆ โคลน ซึ่งจะแตกต่างจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ เอพิโทป เดียวกันบนแอนติเจน (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี

พอลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody)

เป็นกลุ่มแอนติบอดีที่มีความหลากหลายมากในความจำเพาะกับแอนติเจน โดยสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ เอพิโทป หลายตำแหน่ง บนแอนติเจน เนื่องจากแอนติบอดีเหล่านี้ถูกสร้างมาจาก บี-เซลล์ หลายๆ โคลน (บี-เซลล์ 1 โคลน สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะได้ 1 ชนิด)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

เป็นแอนติบอดีที่สร้างจากพลาสมาซึ่งกำเนิดมาจาก บี-เซลล์ โดยเซลล์เหล่านี้เกิดจากเซลล์เริ่มต้นเซลล์เดียว (single clone หรือ mono-clone) เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในส่วนของความจำเพาะต่อ เอพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น

ในภาวะปกติเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนจะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจาก บี-เซลล์ แต่ละเซลล์ ซึ่งเมื่อรวมกันเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) โมโนโคลนอลแอนติบอดีเมื่อเป็นโรคมะเร็งของ บี-เซลล์ ทำให้สร้างแอนติบอดีชนิดเดียวกันจำนวนมากจากโคลนเดียวกันออกมาทำให้สามารถตรวจพบได้ในซีรัม (ธารารัตต์, 2545)

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว พอลิโคลนอลแอนติบอดี คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกันซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยแอนติเจน แอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างดังตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบระหว่าง พอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 2.3 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
1. ความจำเพาะ (Specificity)	-ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ -มักไม่มีความจำเพาะสูง	-คงที่สามารถเลือกเป็นมาตรฐาน(standard)ได้ -อาจจะพบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะมากเกินไปจนต้องการซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้
2. Affinity	ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เจาะเลือดสัตว์ทดลอง	คงที่โดยสามารถคัดเลือกได้สูง หรือต่ำตามต้องการในระหว่าง ทำ cloning
3. ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิต	ประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	-ประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์เพาะเลี้ยง - ประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจาก ascitic fluid
4. ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่ปนเปื้อน	อาจสูงถึง 100%	ไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง และประมาณ 10% ใน ascitic fluid
5. ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	ต้องใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์มากหรือต้องทำ serum absorption	ใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์พอสมควร
6. ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในเวลาเริ่มต้น

ข้อดีและข้อเสียของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ข้อดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

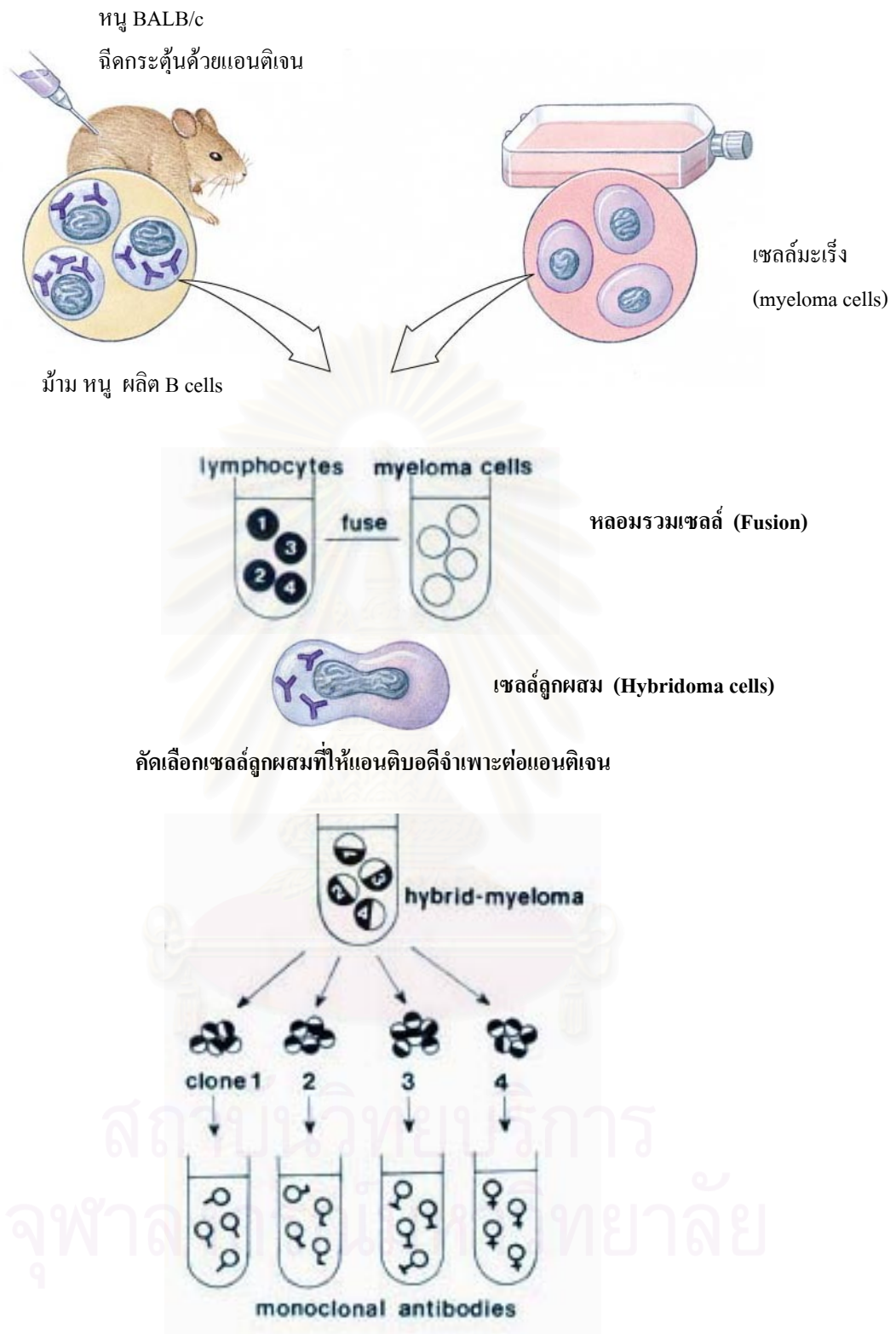
1. ใช้แอนติเจนน้อยและไม่ต้องบริสุทธิ์มากในการฉีดกระตุ้น
2. มีความเป็นมาตรฐานสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีลักษณะเหมือนกัน
3. มีความจำเพาะสูงโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะเข้าทำปฏิกิริยากับ เอพิโทป เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจนดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมาก
4. มี affinity สูงต่อแอนติเจนได้สามารถคัดเลือกได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูง สามารถนำไปใช้ได้ในความเจือจางสูง ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวน (background) ในการทดลองลงได้
5. การเก็บเซลล์สามารถเก็บเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถาวรในไนโตรเจนเหลวได้

ข้อเสียของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต้องใช้กำลังแรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายสูงกว่า การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี
2. ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจนเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงมาก จึงไวต่อการเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างของแอนติเจนเกาะกับพื้นผิวหรือสภาวะที่ใช้ในการทดลอง
3. คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงง่ายระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกรณีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีมักไวต่อการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้น้อยกว่า
4. ไม่สามารถทำปฏิกิริยาบางอย่างได้ เช่น ปฏิกิริยาการตกตะกอน

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้หลักการ somatic hybridization

ในร่างกายมี บี-เซลล์และเซลล์พลาสมาที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างๆได้ แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวมักจะแบ่งตัวได้แบบมีขีดจำกัด และตายในเวลาอันสั้นทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ในขณะที่เดียวกัน มีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งซึ่งกำเนิดมาจากเซลล์พลาสมา เรียกว่า เซลล์มัยอิโลมา (myeloma cell) มีคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง คือ สามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไป เซลล์กลุ่มนี้บางเซลล์อาจสูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดีทำให้ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ แต่จะสามารถสร้างแอนติบอดีได้ถ้าได้รับยีนอิมมูโนโกลบูลินจาก บี-เซลล์หรือเซลล์พลาสมาอื่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี somatic hybridization มีหลักการโดยการนำคุณสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มารวมไว้ในเซลล์เดียวกัน โดยในปี ค.ศ. 1975 Köhler และ Milstein ได้คิดค้นวิธีผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยอาศัยหลักการหลอมรวม (fusion) ระหว่าง เซลล์มัยอิโลมา กับ บี-เซลล์หรือเซลล์พลาสมาจากม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน เซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติพิเศษซึ่งได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 เซลล์ คือ มีความสามารถในการเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้ตลอดไปเหมือนเซลล์มัยอิโลมา และมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ได้จากบี-เซลล์ ดังนั้น ในหลอดทดลองจึงสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะได้ตลอดไปจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมดังกล่าว (ธารารักษ์ต์, 2545) ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ของหนู

1. การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ฉีดกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการ เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน

2. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลอง (immunization) เพื่อให้ได้ บี-เซลล์ ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ แอนติเจนที่ใช้กระตุ้นหนู มักนิยมผสมใน complete Freund's adjuvant (CFA) ให้เข้ากันจนเป็นอิมัลชัน (emulsion) เพื่อให้หนูสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 1-3 ครั้ง ทุกๆ 2 อาทิตย์ (booster immunization) โดยใช้แอนติเจนที่ผสมใน incomplete Freund's adjuvant (IFA) ทดลองเจาะเลือดทางหางเพื่อหาระดับของแอนติบอดีที่ต้องการ ถ้าระดับไคเตอร์สูงมากจะมีโอกาสได้ บี-เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนสูง ก่อนฆ่าหนู เพื่อนำเซลล์ม้ามมาใช้ ต้องกระตุ้นเป็นครั้งสุดท้าย (final booster) โดยละลายแอนติเจนในน้ำเกลือแล้วฉีดเข้าช่องท้องก่อนจะฆ่าหนู 3 วัน

3. การเชื่อมต่อเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization) เป็นการเชื่อมเซลล์มัยอิโลมา กับเซลล์จากม้ามของหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน การเชื่อมต่อระหว่างเซลล์จะอาศัยสารโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ซึ่งจะทำให้ผิวของเซลล์ทั้งสองเชื่อมรวมกันเป็นเซลล์เดียวกัน ทำให้เกิดการรวมกันของโครโมโซมจากเซลล์ต้นกำเนิด เซลล์ลูกผสมที่ได้จะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับจำนวนรวมของโครโมโซมเซลล์ต้นกำเนิด หลังจากนั้นเมื่อเซลล์ลูกผสมแบ่งตัวเพิ่มจำนวน บางเซลล์อาจมีการสูญหายของโครโมโซมบางอันไปบ้าง ถ้าโครโมโซมที่สูญหายมียีนของอิมมูโนโกลบูลิน จะส่งผลให้เซลล์ลูกผสมนั้นหยุดการสร้างแอนติบอดี และจะมีเซลล์ลูกผสมจำนวนหนึ่งที่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้โดยไม่มีสิ้นสุดและยังคงสามารถสร้างแอนติบอดีได้ หลังการหลอมรวมเซลล์จะพบเซลล์อยู่ 3 กลุ่ม คือ เซลล์ลูกผสม และเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองกลุ่มที่ไม่ได้ผสมกับเซลล์อื่น จึงจำเป็นต้องคัดเลือกเฉพาะเซลล์ลูกผสมเท่านั้น โดยกำจัดเซลล์ที่ไม่เชื่อมต่อออกไป

4. การกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกหลอมรวม

เซลล์ม้ามเป็นเซลล์ปกติของร่างกายจึงไม่สามารถเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้คือ เมื่อเลี้ยงเซลล์ประมาณ 2 สัปดาห์ เซลล์กลุ่มนี้ก็จะตายเอง

การกำจัดเซลล์มัยอิโลมาที่ไม่ต้องการ เนื่องจากเซลล์ที่ใช้นั้นเป็นเซลล์ที่มีความบกพร่องของยีนที่ใช้สร้างเอนไซม์ HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) มีความสำคัญในกลไกการสร้างสารนิวคลีโอไทด์โดยใช้ salvage pathway ซึ่งเซลล์ปกติสามารถสร้างสารนิวคลีโอไทด์ได้โดยใช้ทั้ง *de novo pathway* และ salvage pathway โดยนำเซลล์ที่ได้จากการเชื่อมต่อไปเลี้ยงใน selective medium หรือ HAT media ซึ่งมีสาร 3 ชนิด ได้แก่ hypoxanthine, aminopterin และ thymidine สำหรับสาร aminopterin จะเป็นสารที่ยับยั้งการสร้างสารนิวคลีโอไทด์โดยใช้ *de novo pathway* ได้ เซลล์มัยอิโลมา จึงตายไปเพราะไม่มีทั้ง salvage pathway (เพราะขาดเอนไซม์ HGPRT) และ *de novo pathway* (เพราะถูกยับยั้งโดยสาร aminopterin)

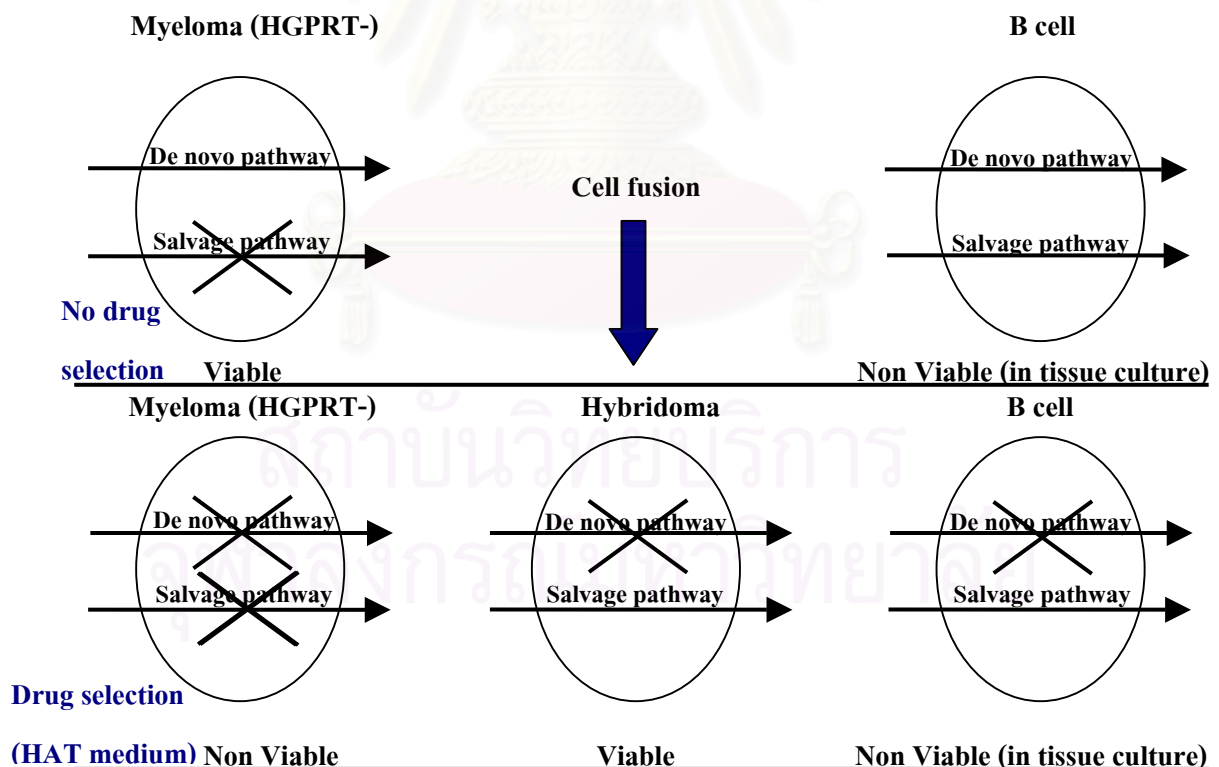
สำหรับเซลล์ลูกผสม จะสามารถเจริญเติบโตได้ใน HAT media เนื่องจากสามารถสร้างนิวคลีโอไทด์โดยใช้ salvage pathway ซึ่งอาศัย hypoxanthine และ thymidine จาก HAT media เพราะเซลล์นี้มียีนที่สร้างเอนไซม์ HGPRT ที่ได้จากยีนของเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 2.4

5. การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ต้องการ

เนื่องจากแต่ละโคลนอาจจะสามารถสร้างแอนติบอดีได้ต่างกัน จึงต้องคัดเลือกเอาเซลล์ลูกผสม ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามที่ต้องการ ทำได้โดยตรวจคัดหรือตรวจกรอง (screen) วัคซีนแอนติบอดีที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยใช้วิธีทดสอบทาง ELISA ซึ่งอาศัยความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ต้องการ เมื่อได้เซลล์ลูกผสมที่ต้องการแล้วเพื่อให้แน่ใจว่ามีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวสามารถนำมาทำ cloning ซ้ำอีกหลายครั้งตามวิธีในข้อ 6 เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นโมโนโคลนอลจริง และสามารถเก็บรักษาเซลล์ได้ตลอดไป โดยนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถนำออกมาเพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลา

6. การทำให้ได้เซลล์เดี่ยว (cloning)

เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยววิธีการที่นิยมใช้คือ วิธี limiting dilution โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากการเชื่อมต่อที่ความเจือจางเซลล์ระดับต่ำมากจนได้ 1 เซลล์ต่อหลุม ดังนั้นเซลล์ที่ได้จึงมีต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเริ่มต้นเพียงเซลล์เดียว



รูปที่ 2.4 เซลล์ที่ได้จากการเชื่อม บีเซลล์ เข้ากับ มัยอีโลมาและการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

(رنحیح ปรاررناผล, 2546)

2.1.4 หลักการ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

เทคนิค ELISA สามารถแบ่งตามหลักการได้เป็นสองประเภทใหญ่ๆ คือ

(1) Competitive ELISA

ใช้ในการตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดี หลักการของการทดสอบคือ เคลือบ 96 well plate ด้วยแอนติเจน เติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีลงไป ตรวจดูแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีของ substrate ที่เติมลงไปในช่วงตอนสุดท้าย การเปลี่ยนแปลงสีของ substrate จะเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจสอบ (นภาธร บานชื่น, 2541: 18)

หลักการอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (antigen-enzyme conjugate) หรือ ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (antibody-enzyme conjugate) เป็นรีเอเจนต์ (reagent) ในการทดสอบ ขั้นตอนแรกเคลือบ 96 well plate ด้วยแอนติเจน เติมแอนติบอดีจำเพาะ (ปริมาณคงที่) พร้อมกับแอนติเจนจำเพาะ (แอนติเจนมาตรฐานปริมาณต่างๆหรือแอนติเจนที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจ) ในหลอดทดลองที่เติมแอนติเจนลงไปด้วย แอนติเจนจะไปแย่งจับกับแอนติบอดีทำให้แอนติบอดีนั้นจับกับแอนติเจนที่เคลือบบน plate ได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาแล้วเติมแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme-labelled anti-immunoglobulin) แล้วจึงเติมซับสเตรตลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจหรือแอนติเจนมาตรฐานที่เติมลงไป (นภาธร บานชื่น, 2541: 6)

(2) Non-competitive ELISA

เป็นวิธีที่ตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดี เทคนิคการทำ non-competitive ELISA มีหลายวิธีแต่ที่นิยมและใช้ในงานวิจัย คือ Indirect ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติบอดี ทดสอบโดยให้แอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา ยึดติดกับผิววัสดุแล้วเติมตัวอย่างตรวจที่ต้องการหาแอนติบอดีลงไป แอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจน ล้างและเติมแอนติ-อิมมูโนโกลบูลินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป หลังจากล้างและเติมซับสเตรตสำหรับเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น ซึ่งสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างตรวจ (นภาธร บานชื่น, 2541: 6)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาสารตกค้างในกลุ่มไนโตรฟูแรนในประเทศไทย

จากการศึกษาปัญหาสารตกค้างกลุ่มไนโตรฟูแรนในเนื้อไก่ของพื้นที่สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 1 อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี ได้ทำการศึกษาจากการรวบรวมข้อมูลจากรายงานการตรวจพบสารตกค้างกลุ่มไนโตรฟูแรนในเนื้อไก่ รายงานสอบสวนฟาร์มและรายงานส่งตัวอย่างอาหารสัตว์ นำใช้ในฟาร์มส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2545-กันยายน 2546 พบว่าสารตก

ค้ำกลุ่มไนโตรฟูแรน ประเภทสารเมแทบอลิต์ กลุ่มไนโตรฟูแรนที่ตรวจพบมากที่สุดคือ สาร AMOZ รองลงมาคือ AOZ และ SCA คิดเป็นร้อยละได้เท่ากับ 41.38 36.78 และ 14.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สุริยะ กวางษ์กลาง และ อัจฉวัน โกมลเสวิน, 2546)

การตรวจติดตามสารตกค้างไนโตรฟูแรน

ในการใช้เทคนิค liquid chromatographic (LC) สำหรับตรวจติดตามหาปริมาณสารไนโตรฟูแรน NFZ, NFT และ FTD ในกล้ามเนื้อปลาตุ๊ก โดยการสกัดสารที่ตกค้างออกจากเนื้อเยื่อด้วย acetonitrile พบว่าเมื่อให้ยา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จะตรวจพบยาที่เนื้อเยื่อได้มากกว่า 400 นาโนกรัมต่อเนื้อเยื่อ 1 กรัมหลังจากให้ยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วที่ประมาณ 1 นาโนกรัมต่อเนื้อเยื่อ 1 กรัมหลังจากให้ยาเป็นเวลา 8 ชั่วโมง (Rupp และคณะ, 1994) และเมื่อตรวจติดตาม NFZ, FZD และ FTD ในเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อ เป็ด-ไก่ และสุกร โดยสกัดสารตกค้างในตัวอย่างด้วย สารละลายผสมระหว่าง dichloromethane และ ethyl acetate และในไข่เป็ด ไข่ไก่ โดยใช้สารละลายผสมดังกล่าวร่วมกับ acetonitrile สามารถตรวจพบ ไนโตรฟูราโซน FZD เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ FTD เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและไข่ ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณ FTD ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อจะลดน้อยลงอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอเมื่อเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่า FTD ที่พบในไข่เสถียรมากกว่าสารตัวอื่น (Kumar และคณะ, 1994)

นอกจากนี้ยังได้มีการใช้เทคนิค HPLC เพื่อกำหนดการแยกอนุพันธ์และการหาปริมาณของไนโตรฟูแรนทั้ง 3 ชนิดได้แก่ NFT, FZD และ FTD ที่ตกค้างในน้ำนมโดย mobile phase ที่เหมาะสมคือ สารละลาย 0.1 M acetonitrile ใน sodium perchlorate (28:72) กับ glacial acetic acid เปอร์เซ็นต์ 0.5 (Diaz และคณะ, 1997) ต่อมาได้มีการใช้ LC-MS-MS วิเคราะห์สารเมแทบอลิต์ของยาปฏิชีวนะไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ตัวได้แก่ FZD, FTD, NFZ และ NFT ในกล้ามเนื้อของสัตว์ได้พร้อมกัน โดยใช้การสกัดตัวอย่างกับ polystyrene sorbent โดยเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสารด้วย 2-nitrobenzaldehyde สามารถตรวจพบในเนื้อเยื่อได้ 0.5-5 นาโนกรัมต่อกรัม และตรวจเชิงปริมาณได้ในช่วง 2.5-10 นาโนกรัมต่อกรัม จึงได้มีการนำไปพัฒนาเป็นวิธีการวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีการปนเปื้อนของ FZD และ FTD ในหมู เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้และหาเชิงปริมาณของสาร เมแทบอลิต์ไนโตรฟูแรน (Leitner และคณะ, 2001)

ดังนั้นการตรวจติดตามสารตกค้างของยาปฏิชีวนะไนโตรฟูแรน จึงได้มุ่งไปที่การตรวจสารที่จับติดกับเนื้อเยื่อซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารเมแทบอลิต์ไนโตรฟูแรน (protein-bound nitrofurans metabolites) เปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจึงได้มีรายงานที่กล่าวถึงการทำให้ solid phase extraction clean-up สำหรับ FZD ที่เมแทบอลิซ์เป็น AOZ โดยสามารถตรวจสารเมแทบอลิต์ที่เปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ (NPAOZ) โดยทำการศึกษาจากตัวอย่างตับหมู โดยใช้เทคนิค Liquid chromatography, UV หรือ tandem mass spectrophotometer ในการตรวจติดตาม (Conneely และคณะ, 2003)

จากรายงานการวิจัยต่างๆพบว่า การตรวจโดยหลักภูมิคุ้มกันวิทยามีความจำเพาะสูงเนื่องจาก

สามารถตรวจติดตามสารตกค้างในปริมาณน้อยได้ดี จึงได้มีการศึกษาและผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ต่ออนุพันธ์ของสาร AOZ ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ AOZ ด้วย 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ได้ เป็น 3-[(3-carboxyphenyl) methylene]amino-2-oxazolidinone (CPAOZ) หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อกับ โปรตีนพาหะ (carrier protein) คือ human serum albumin (HAS) นำไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองได้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่เป็นแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับเทคนิควิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของ AOZ ซึ่ง จะให้ความไวเพียงพอเป็นไปตามหลักการสำหรับติดตามสารที่ตกค้างในสัตว์ แอนติบอดีที่ได้จะมีความจำเพาะสูงต่อ NPAOZ และจะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารเมแทบอลิต์ในโตรฟูแรนชนิดอื่นซึ่ง รายงานฉบับนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่ได้ศึกษาการตรวจหาสารตกค้างในโตรฟูแรนที่ถูกเมแทบอลิต์ ด้วยเทคนิคที่ใช้แอนติบอดีในการตรวจติดตามสารตกค้างในโตรฟูแรน (Cooper และคณะ 2004)

ในปีต่อมาได้มีรายงานการวิจัยที่ต่อเนื่องกับงานวิจัยเบื้องต้นในการตรวจติดตามสารตกค้าง ในโตรฟูแรน AOZ ในตัวอย่างอาหาร ได้แก่ กุ้ง เป็ด ไก่ เนื้อวัว เนื้อหมู ด้วยวิธี ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งการเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ในการวิเคราะห์นั้น จะทำการย่อยตัวอย่างด้วยกรด และเปลี่ยนอนุพันธ์ของสาร AOZ ที่หลุดออกจากเนื้อเยื่อ ด้วย *o*-nitrobenzaldehyde ได้สาร AOZ อยู่ในรูปของอนุพันธ์ *p*-nitrophenyl 3-amino-2-oxazolidinone (NPAOZ) ผลที่ได้พบว่าที่ระดับสารตกค้าง ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างอาหารจะไม่ส่งผลในการรบกวนค่าตัวควบคุมลบ และการตรวจติดตามที่ได้จะให้ผลความไวที่ใกล้เคียงกับเทคนิค LC-MS/MS (ซึ่งเป็นวิธีที่กำหนดให้ใช้ ตรวจยืนยันผล) โดยสามารถตรวจวัดสารตกค้างดังกล่าวได้ต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และให้ผลที่สอดคล้องกันคือ จะพบสารดังกล่าวปนเปื้อนในตัวอย่างเนื้อกุ้งและเนื้อเป็ด-ไก่ ปริมาณ 0-32.1 และ 0-10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Diblikora และคณะ 2005)

จากรายงานการตรวจติดตามสารตกค้าง AMOZ พบว่า นิยมตรวจติดตามโดยใช้เทคนิค LC-UV, LC-MS หรือ LC-MS/MS และเทคนิค enzyme immunoassays สำหรับวิธี ELISA นั้นจะมีข้อดี เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีโครมาโทกราฟี คือ จะมีความไวสูง ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ตรวจตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก และสามารถตรวจสอบได้ในเวลาที่รวดเร็ว ดังนั้นการทดสอบสารในโตรฟูแรน AMOZ จึงมีชุดตรวจสอบโดยใช้หลักการ ELISA ที่ใช้ชื่อทางการค้าว่า RIDASCREEN[®] ผลิตโดย บริษัท Prime biotech (Canada) ซึ่งสามารถตรวจติดตาม AMOZ ในเนื้อกุ้ง ไก่ หมู วัว โดยสกัดสารตกค้างออกจากเนื้อสัตว์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และเปลี่ยนอนุพันธ์สาร AMOZ ด้วย 2-Nitrobenzoic aldehyde (NBA) โดยพบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.2 ppb และให้ค่าเปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มในโตรฟูแรนกับสาร AOZ AHD และ SCA เป็น 0.05 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าโดยส่วนมากจะตรวจพบสาร AMOZ ในตัวอย่างมากกว่า สารเมแทบอลิต์ในโตรฟูแรนชนิดอื่น ดังนั้นโครงการนี้จึงเน้นที่จะพัฒนาความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสาร AMOZ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นชุดตรวจหาสารตกค้าง AMOZ โดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. สัตว์ทดลองใช้ หนู Mouse สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. เซลล์มะเร็งอีโคโนมาP3/NSI/1-4A4-1 (NS-I)	ATCC No: TIB 18
3. เครื่องมือต่างๆ <ul style="list-style-type: none"> - เครื่อง Lyophilizer - กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ - เครื่องปั่นเหวี่ยง - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง - เครื่อง Microtiterplate reader - เครื่องวัดการดูดกลืนแสง - เครื่องมือนับเซลล์ - ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ - ตู้ปลอดเชื้อ - หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ - ปีมลม - ปิเปตต์อัตโนมัติ - เครื่อง SCAI-DRY TRANSFER CELL - เครื่อง Thermo mixer compact - เครื่อง Compact ROCKER CR300 - กล้อง PL-B Type 8x10 INCH 	<ul style="list-style-type: none"> Yamato (Japan) Nikon (Japan) MSE (England) Mettler Toledo Titertek multiskan (Finland) BIO-TEK Instruments, Inc (USA) Boeco (Germany) Revco, Yamato (Japan) Cambrige (Thailand) Udono-RII (Japan) Iwaki (Japan) Gilson (France) BIO-RAD Eppendorf Finemould Precision ind.co. OKAMOTO

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
4. อุปกรณ์ต่างๆ	
- งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
- งานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
- ขวดแก้ว	Boro (Germany)
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
- กระจบอกลีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro (Thailand)
- ปิเปตต์แก้ว	HBG (Germany)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
1. Acrylamide gel	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
2. AHD (1-Aminohydantoin)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. Aminopterin	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. AMOZ (3-amino-5-morpholino methyl-2-oxazolidone)	ทดสอบความจำเพาะของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
5. Anti-mouse IgG Horseradish linked whole antibody	ใช้ในเทคนิค Western blot	GE Healthcare UK Ltd. Amersham Place , USA
6. AOZ (3-amino-2-oxazolidone)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
7. APS (Ammoniumpersulfat)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
8. BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
9. Beta-mercaptoethanol	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
10. Bovine serum albumin (BSA)	โปรตีนมาตรฐานและใช้เชื่อมกับ CPAMAZ	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
11. Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
12. Butanol	เตรียมสารละลาย นิโนไฮดริน	บริษัท Merck, Germany
13. Chloramphenicol (CAP)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
14. 3-carboxybenzaldehyde (CBA)	เปลี่ยนอนุพันธ์สาร AMOZ และทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
15. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
16. Clenbuteral	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
17. 3-[(3-carboxyphenyl)methylene]amino}-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (CPAMAZ)	เตรียมแอนติเจนและใช้ทดสอบความจำเพาะ	เตรียมที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ จุฬาฯ
18. CPAMAZ-cBSA conjugate	ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง	เตรียมที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ จุฬาฯ
19. CPAMAZ-OVA conjugate	เทคนิค ELISA	เตรียมที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ จุฬาฯ
20. Coomassie Brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	บริษัท Pierce, USA
21. Copper sulfate	เตรียมสารละลายวัดปริมาณโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
22. Developer and replenisher	ล้างฟิล์ม X-ray	Kodak GBX, USA
23. D-glucose	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
24. Diethyl ether	สลบหนูทดลอง	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
25. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	บริษัท Fluka, Switzerland
26. Disodium hydrogenphosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo erba, USA
27. 1-ethy-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. Enrofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
29. Fetal bovine serum	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
30. Fixer and replenisher	ล้างฟิล์ม X-ray	Kodak GBX, USA
31. Flumequine	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
32. Folin-ciocalteu phenol reagent	เตรียมสารละลายวัด ปริมาณโปรตีน	บริษัท Merck, Germany
33. Furaltadone (FTD)	ทดสอบความจำเพาะของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
34. Furazolidone (FZD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
35. glycerol	เตรียม Sample buffer	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
36. glycine	เตรียม Running buffer	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
37. Hydrochloric acid (HCl)	เตรียม Tris buffer	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
38. Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	เตรียมสับสเตรต	บริษัท Fluka, Switzerland
39. Hypoxanthine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
40. L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
41. Methanol	ตัวทำละลาย	บริษัท BDH, England
42. Ninhydrin	เตรียมสารละลายใช้ใน เทคนิค TLC	บริษัท Pierce, USA
43. Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
44. Nitrofurantoin (NFT)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
45. Nitrofurazone (NFZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
46. N-Hydroxysuccinimide (NHS)	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Fluka, china
47.1-((2-nitrophenyl)methylene amino)-2,4imidazolidinone (NPAHD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
48.5-methylmorpholine-3-((2-nitro phenyl)methylene)amino-2-oxazo lidinone (NPAMOZ)	ทดสอบความจำเพาะของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
49. 3-((2-nitrophenyl)methylene) amino-2-Oxazolidinone (NPAOZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
50. 2-nitrobenzaldehyde-semicarbazone (NPSCA)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
51. O-phenylenediamine (OPD)	เตรียมสับเตรต	บริษัท Abkem Iberia S.L., Spain
52. Ovalbumin (OVA)	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
53. Oxytetracycline	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
54. Penicillin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
55. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	บริษัท Zymed, USA
56. Picrylsulfonic acid	เตรียมสารละลายในการวัดประสิทธิภาพการเชื่อมติด	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
57. Polyethylene glycol (PEG)	สารสื่อในการหลอมรวมเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
58. Potassium tartate	เตรียมสารในการหาปริมาณโปรตีน	บริษัท Merck, Germany
59. Pyridine	สารกลางในการเปลี่ยนสาร AMOZ เป็น CPAMOZ	บริษัท Carlo Erba, USA
60. Pyruvic acid	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
61. RPMI 1640 medium	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
62. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
63. Semicarbazide (SCA)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
64. Sodium bicarbonate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
65. Sodium carbonate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Merck, Germany
66. Sodium chloride	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
67. Sodium dihydrogen phosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo Erba, USA
68. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
69. Sodium pyruvate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
70. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	บริษัท Merck, Germany
71. N,N,N,N -Tetramethyl-Ethylene diamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Pierce, USA
72. Thymidin	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
73. Tris (hydroxymethyl) aminomethane	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
74. Tween 20	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
75. นมพร่องมันเนย	ทดสอบ ELISA	บริษัท Mission health food, Thailand

3.3 การดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ AMOZ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ของยาไนโตรฟูแรนฟูรัลทาโคน ในขั้นต้นทำการเตรียมอนุพันธุ์ของ AMOZ ให้อยู่ในรูปของ CPAMOZ เพื่อนำไปเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ cBSA (BSA ที่ผ่านปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนหมู่เอมีน, cationized BSA) หลังจากนั้นนำสารเชื่อม CPAMOZ-cBSA ไปฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดี จากนั้นนำเซลล์จากม้ามของหนูที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมาของหนู เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติเด่นเหมือนเซลล์ทั้งสองชนิด คือ สามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดีและสามารถเจริญได้ไม่จำกัดในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CPAMOZ และ AMOZ แล้วนำเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกได้มาเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อให้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ ทดสอบไอโซไทป์ ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAMOZ และ AMOZ ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน และการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจน

3.4.1.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ เป็น CPAMOZ

โดยนำ 50 mM ของสาร AMOZ มาทำปฏิกิริยากับ 25 mM ของสาร 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ด้วยวิธีการ reflux ซึ่งมี dry pyridine 1 มิลลิลิตร เป็นตัวกลางช่วยให้เกิดปฏิกิริยา และมี molecular sieve ช่วยดูดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นดึง pyridine ออกจากระบบด้วยแก๊สไนโตรเจน ทดสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยหลักการของเทคนิค ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ที่ประกอบด้วย 10% เมทานอล ละลายใน chloroform คูแถบของสาร Pyridine, CBA และ CPAMOZ ด้วยแสงยูวี และคูแถบของสาร AMOZ โดยข้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน นำแถบที่ได้ไปคำนวณหาค่า Rf สูตรการคำนวณหาค่า ดังนี้

$$\text{Relative mobility (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

เก็บสาร CPAMOZ ที่เตรียมได้ไว้ที่ -4 องศาเซลเซียส

3.4.1.2 การเตรียม Super carrier Protein (cBSA) หรือ cationized BSA

นำ 50 มิลลิกรัม ของโปรตีน BSA ละลายในสารละลาย 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 1 M Ethylenediamine dihydrochlorid (EDA) 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 20 มิลลิกรัม กวนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis ด้วย 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน นำสารละลายที่ได้ทำให้แห้งด้วยเทคนิค Lyophilize นำไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry Protein assay และหาค่าเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น ด้วยเทคนิค TNBSA ยืนยันผลการเตรียม cBSA โดยการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ในรูปผงสีขาว (Coillie, 2004)

(1) การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

เชื่อมติดสาร CPAMAZ กับโปรตีน cBSA เตรียมได้จากนำสาร CPAMAZ ที่เตรียมได้จากข้อ ก. 0.044 M (5.33 มิลลิกรัม) ละลายใน ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) ที่ปราศจากน้ำปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก เติม 0.1 M EDC (19.17 มิลลิกรัม) ตามด้วย 0.025 M NHS (2.88 มิลลิกรัม) หลังจากนั้นค่อยๆ เติม cBSA 18.74 มิลลิกรัม ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี พีเอช 7.4 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดึงสารที่ไม่ได้เชื่อมติดออกจากระบบด้วยการนำไป ไคเอลิซิส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Lowry Protein assay (วิธีการในภาคผนวก ข ข้อ 2) และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร CPAMAZ-ed-cBSA ด้วยวิธี TNBSA (วิธีการในภาคผนวก ข ข้อ 3) และยืนยันผลการเชื่อมติดด้วยการส่งตัวอย่างหาน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วย MALDI-TOF MS หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองต่อไป

(2) การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการทำ Screening test ด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ทำการเชื่อมสาร CPAMAZ กับ OVA ได้เป็น CPAMAZ-ed-OVA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมและคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAMAZ โดยนำสาร CPAMAZ 0.044 M (5.83 มิลลิกรัม) ละลายใน DMF ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ค่อยๆ เติม 0.1 M EDC (19.17 มิลลิกรัม) หลังจากนั้นค่อยๆ เติม OVA 10 มิลลิกรัม ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี พีเอช 7.4 ปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Lowry Protein assay และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร CPAMAZ-ed-OVA ด้วยวิธี TNBSA และยืนยันผลการเชื่อมติดด้วยการส่งตัวอย่างหาน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วย วิธี MALDI-TOF-MS หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

3.4.1.3 การวัดปริมาณโปรตีนของ cBSA , CPAMAZ-cBSA และ CPAMAZ-OVA ด้วยวิธี Lowry Protein assay

เพื่อหาปริมาณโปรตีนของ cBSA ก่อนเชื่อมกับ CPAMAZ และหลังจากการเชื่อมกับ CPAMAZ และหาปริมาณโปรตีนของ OVA หลังจากเชื่อมกับ CPAMAZ มาทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Lowry Protein assay โดยทำการเจือจางตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานด้วย PBS ซึ่งโปรตีนมาตรฐานเจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างที่ไม่เจือจาง

และเจือจางสองเท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ลงไปในหลอดที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลอดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จับเวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

3.4.1.4 การวัดประสิทธิภาพในการเชื่อมติดสาร CPAMoz กับโปรตีน cBSA และ OVA

เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการติดและจำนวนโมเลกุลของสาร CPAMoz ที่ติดกับโปรตีน โดยใช้วิธี TNBSA สำหรับหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดและเทคนิค MALDI-TOF-MS สำหรับหาจำนวนโมเลกุลของสาร CPAMoz ที่ติดกับโปรตีน

(1) การหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการติดของสาร CPAMoz กับโปรตีน cBSA และ OVA ด้วยวิธีการ TNBSA โดยทำการเจือจางแอนติเจนที่เตรียมได้และโปรตีนมาตรฐานด้วย 0.1 M โซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 ซึ่งโปรตีนมาตรฐานเจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างที่เจือจาง 5 เท่าและ 8 เท่า แล้วเติมโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติม 0.05% TNBS ลงไปในหลอดที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลอดละ 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 10% SDS หลอดละ 75 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริก 37.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร

(2) การหาอัตราส่วนโมลาร์ของสาร CPAMoz ที่เชื่อมติดกับโปรตีน cBSA และ OVA ด้วยวิธี MALDI-TOF-MS โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อคณานุกรณโมเลกุลของสาร โดยคำนวณจาก

$$\text{จำนวนโมเลกุลของสาร CPAMoz} = \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลของสาร CPAMoz ติดกับโปรตีน} - \text{น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของสาร CPAMoz}}$$

3.4.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ

3.4.2.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.1 (CPAMOZ-cBSA) ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ใน PBS 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) อัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยผสมให้มีลักษณะเป็นอิมันชั่น ก่อนฉีดเข้าภายในช่องท้อง และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 3-4 ครั้ง ทุกๆ 2 อาทิตย์ โดยผสมแอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ใน PBS 100 ไมโครลิตร กับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (v/v) เช่นกัน จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบดูระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดียังอยู่ในระดับต่ำก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีการเดิมทุกๆ 2 อาทิตย์ เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอ ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ด้วยแอนติเจนที่ผสมกับน้ำเกลือเข้าช่องท้องในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนูทดลองหนึ่งตัว ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน ถัดไป

3.4.2.2 การเตรียมซีรัมจากเลือดหนูทดลอง

หลังจากเจาะเลือดจากหางหนูแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใสคือซีรัมออกมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2.3 การหาระดับของแอนติบอดี ในซีรัมโดยวิธี Indirect ELISA

เตรียมสาร CPAMOZ-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเติมในงานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมซีรัมจากหนูที่เจาะจากระดับต่าง ๆ ใน PBS และ PBS ที่มี 1%BSA ตั้งแต่ 1:500 – 1:128,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HRP-Rabbit anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:2000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมนสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน citrate buffer หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microtiterplate reader

3.4.2.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ในซีรัม โดยวิธี

Indirect competitive ELISA

นำซีรัมหนูมาทดสอบว่าหนูมีแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ หรือไม่ ถ้าหนูมีแอนติบอดีต่อ CPAMOZ แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะจับกับ CPAMOZ ที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่มี CPAMOZ โดยเตรียมสาร CPAMOZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1% BSA นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับซีรัมหนูที่เจือจางใน PBS ความเจือจาง 1:4000 โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ 4°C แช่คืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

3.4.3 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AMOZ

ทำการหลอมรวม (fusion) เซลล์ม้ามหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน กับเซลล์มัยอีโลมา โดยใช้สาร 50% PEG (w/v) เป็นสื่อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 การเตรียมสารสื่อในการหลอมรวมเซลล์

เตรียมได้จากน้ำ PEG มาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาตร 2 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้ 50% PEG (w/v) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำไปใช้ในการหลอมรวมเซลล์

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

โดยนำเซลล์มัยอีโลมา NS-I มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล เลี้ยงขยายปริมาณในจานเลี้ยงเซลล์ ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS เลี้ยงประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ จากนั้น

นำเซลล์มัชอีโลมาที่เลี้ยงอยู่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ออกมาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 1-2 ครั้ง โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีโดยรอบสุดท้ายของการปั่นล้างเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหลอมรวมเซลล์

3.4.3.3 การเตรียมเซลล์ม้าม

เตรียมได้จากนำหนู BALB/c ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย CPAM0Z-cBSA มาทำการสลับ โดยใช้ไดเอทิลอีเทอร์ หลังจากนั้นเจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัมเป็นตัวควบคุมบวกในเทคนิค ELISA แล้วจึงเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด เมื่อได้เซลล์ม้ามแล้วนำไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำเซลล์ม้ามไปทำการเชื่อมกับเซลล์มัชอีโลมา

3.4.3.4 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)

โดยนำเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน CPAM0Z-cBSA และสร้างแอนติบอดีที่ต้องการ และเซลล์มัชอีโลมา ในอัตราส่วน 1:2 โดยที่เซลล์ทั้งสองจะถูกนำมาเลี้ยงให้อยู่ในระยะที่กำลังจะแบ่งตัว มารวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองผสมกัน ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆ ให้เซลล์ผสมกันดี แล้วค่อยๆ หยด 50% พอลิเอทิลีน ไกลคอล (w/v) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับหมุนหลอดช้าๆ โดยควบคุมให้สารละลาย 50% PEG ไหลให้หมดภายใน 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีกครั้งละ 10 มิลลิลิตร จนครบ 40 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ อีกครั้ง เพื่อล้าง 50% PEG ออกให้หมด ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก โดยการเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FCS ลงไปประมาณ 80 มิลลิลิตร ก่อนนำเซลล์ไปหยอดในงานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ปริมาณหลุมละ 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂

3.4.3.5 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังจากหลอมรวมเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FCS ทุก 3-4 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 6-7 วัน สังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสงขึ้นเป็นกลุ่ม เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มหลุมแล้วจะต้องเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะให้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FCS ประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20% FCS โดยจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ถ้ามีสีเหลืองให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป ถ้าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อาหารเลี้ยงเซลล์จะมีสีเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าปกติ เมื่อดูกันหลุมจะเห็นหลุมที่มีการปนเปื้อนมีลักษณะขุ่น จึงต้องทำการกำจัดหลุมนั้นทิ้งโดยใช้ 50% Clorox และต้องตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาเป็นระยะๆ เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 2/3 ของพื้นที่กันหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

3.4.3.6 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMAZ โดยวิธี indirect ELISA

เพื่อตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMAZ จึงทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน 2 ชนิด คือ CPAMAZ-OVA , AMAZ-OVA , OVA และ BSA เพื่อเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ ELISA ถ้าเซลล์ในหลุมใดมีค่าดูดกลืนแสงของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย CPAMAZ-OVA และ AMAZ-OVA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย OVA และ BSA ต่ำ ก็จะเลือกเซลล์ในหลุมนั้นไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม และทำการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วให้ค่าเหมือนเดิมจึงทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวต่อไปซึ่งจะทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ต้องการมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

3.4.3.7 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution

หลังจากที่คัดเลือกจนได้เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่ต้องการแล้วเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่ละเซลล์มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยว ซึ่งวิธี limiting dilution ทำได้โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMAZ มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20% FCS โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า จนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปหยอดลงในจานชนิด 96 หลุมจำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม) ปริมาตรหลุมละ 0.2 มิลลิลิตร จะได้เซลล์ไฮบริโดมาปริมาณ 8 เซลล์ 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเริ่มต้นเซลล์เพียงเซลล์เดียว

3.4.3.8 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์โมโนโคลนที่ต้องการเก็บ มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี 10% FCS ให้อยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียลมาป็นเหยียงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาเก็บเซลล์ที่มี 10% โดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ Pasteur pipette เป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาเก็บเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.9 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวนำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาเก็บเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้างเป็นจำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นทุกๆ 2-3 วันทำการถ่ายเซลล์ ลงขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.4 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จะทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ โดยนำ Isotyping specific antibody ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:1000 นำไปเติมในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HRP-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:600 ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายสับสเตรทของแอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาแอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microtiterplate reader

3.4.4.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี

indirect ELISA

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยง เซลล์มีความเข้มข้นมากเมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA จะทำให้มีสัญญาณรบกวนส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จได้ และยังเป็นภาระสิ้นเปลืองแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย จึงต้องหาความเข้มข้นและความเจือจางที่เหมาะสมทั้งของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ประมาณ 1 เพื่อนำความเข้มข้นและความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป ซึ่งจะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติเจน CPAM0Z-OVA ความเข้มข้น 3, 2, 1, 0.5, 0.250, 0.125 และ 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS ที่ความเจือจาง 1:10 – 1:1,280 และแล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

3.4.4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเมแทบอลิต์ AMOZ และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน

เนื่องจากสารไนโตรฟูแรนฟูรัลทาโดนจะอยู่ในรูปยาปฏิชีวนะ (FTD) รูปสารเมแทบอลิต์ (AMOZ) รูปสารเมแทบอลิต์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ (CPAMOZ) สำหรับทำโมโนโคลนอลแอนติบอดี และรูปสารเมแทบอลิต์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ (NPAMOZ) สำหรับตรวจหาสารตกค้าง ด้วยวิธีทางเคมี เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะต่อสารไนโตรฟูแรนทั้ง 4 รูปหรือไม่ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสารดังกล่าว ก็จะทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าวที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้นำสารดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา ทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

โดยจะคิดเป็นค่า inhibition concentration (IC50) และ limit of detection (LOD)

ซึ่งค่า IC50 คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสารแข่งขัน

LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC50 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดเป็น 50% B/Bo

$$IC50 = 50\% B/Bo$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

Bo คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

และหาค่า limit of detection (LOD) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ โดยสูตรคำนวณดังนี้

$$LOD = Bo - 3SD$$

เมื่อ Bo คือ ค่าดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ผสมไนโตรฟูแรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิธีการทำนั้นทำเช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้หาค่า IC50 เป็นค่าที่ได้จากหลุมที่ไม่เติมสารแข่งขัน (หลุม B₀) นั้นให้มีทั้งหมด 18 หลุม

3.4.4.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มในโตรฟูแรน

เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ จะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มในโตรฟูแรนหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารอื่นที่อยู่ในกลุ่มในโตรฟูแรน ทั้งอยู่ในรูปยาตั้งต้น ได้แก่ FZD, NFZ และ NFT รูปสารเมแทบอลิต์ ได้แก่ AOZ, SCA และ AHD รูปอนุพันธ์ของสาร ได้แก่ NP-AOZ, NP-SCA และ NP-AHD ตามลำดับ สารนอกกลุ่มในโตรฟูแรน ที่นำมาทดสอบ คือ CBA ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์สาร AMOZ เป็น CPAMOZ สารในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล นอร์ฟลอกซาซิน เพนิซิลลินจี ฟูมิคิน และ ออกซีเตตราไซคลิน สารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ได้แก่ เคลนบูเทอรอล และ ซัลบูตามอล โดยเตรียมสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 0 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางใน PBS โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

เมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในโตรฟูแรนที่ต้องการ และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{\text{IC50 ของ CPAMOZ} \times 100}{\text{IC50 ของสารที่ทดสอบ}}$$

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์

3.4.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี

นำโมโนโคลนที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% FCS เพื่อให้เซลล์ไฮบริโดมาผลิตและหลั่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกมา ซึ่งจะสะสมรวมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

3.4.5.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

โดยนำโปรตีน เอ (Protein A) 0.5 กรัม มาทำให้พองตัว (swell) โดยแช่ใน PBS 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเติมใส่คอลัมน์ จากนั้นทำคอลัมน์ให้สมดุลโดยเติม 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้เท่ากับ pH 8.1 โดยใช้บัฟเฟอร์ 1 M Tris HCl, pH 9 ก่อนนำมาเติมลงในคอลัมน์โปรตีน เอ โดยให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยการเติม 0.1 M citrate buffer, pH 3.5 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมกับการใช้หลอดทดลองที่มี 4 M Tris HCl, pH 9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีค่าดูดกลืนแสงมารวมกันก่อนนำหาปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดีต่อไป

3.4.5.3 การหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี BCA assay

เตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0 – 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน และเจือจางแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในอัตราการเจือจาง 1 ต่อ 4 และ 1 ต่อ 8 โดยเติมสารละลาย BSA และแอนติบอดีที่เตรียมลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย A และ B (ข้อที่ 8 ในภาคผนวก ข) โดยเจือจางสารละลาย A ต่อสารละลาย B เท่ากับ 50:1 แล้วเติมลงในหลุมข้างต้นที่มีสารละลาย BSA และแอนติบอดีอยู่ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายในจาน มีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วย microtiterplate reader

3.4.5.4 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการทำให้ ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 0-0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA (3.4.2.3) สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร (รูปที่ ก 21 ภาคผนวกที่ ก) หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

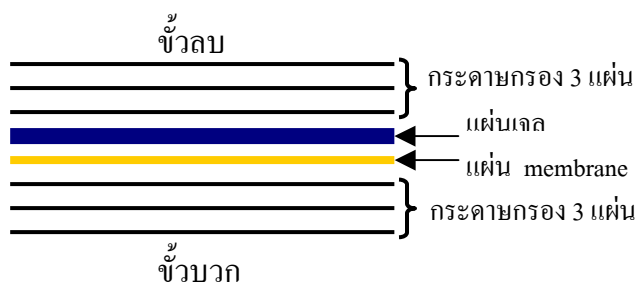
3.4.6 การทดสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการทดสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีหลักการคือ ใช้สนามไฟฟ้าแยกโปรตีนผ่าน poly-acrylamide ซึ่งมีรูพรุนขนาดต่างๆ กัน เป็นผลให้เกิด sieving properties โดยแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับ 2-Mercaptoethanol (2-ME) ทำให้พันธะไดซัลไฟด์แตกออกและโปรตีน ถูกทำให้มีประจุเป็นลบโดย SDS ทำให้โปรตีนที่มีขนาดต่างกัน จะนำ gel มาย้อมสีหาแถบโปรตีน เมื่อทำเทียบกับโปรตีนที่รู้ขนาดแน่นอน จะทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของ unknown ได้ (คู่มือปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา 322 หน้า 49-53)

การเตรียมเจล เตรียม 10% separating gel (ข้อที่ 10 ภาคผนวกที่ ข) ด้วย MiniProtean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, U.S.A.) โดยมีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตร เติมน้ำสโตว์ไรต์ ข้างละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ separating gel เกิด polymerization อย่างสมบูรณ์ เมื่อเจลแข็งตัวแล้วเท 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel ตั้งทิ้งไว้ให้ stacking gel เกิด polymerization อย่างน้อย 30 นาที โดยจะเตรียมเจล 2 แผ่น แผ่นแรกใช้สำหรับย้อมด้วย Coomassie blue อีกแผ่นใช้สำหรับนำไปทำ Western blot

การแยกแอนติบอดีโดย นำชุดของเจลที่เตรียมได้ไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งด้านบนและล่างของ chamber นำตัวอย่างแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์และหลังทำให้บริสุทธิ์ มีปริมาณโปรตีนรวมหลุมละ 5 ไมโครกรัม มาเติม Loading dye ที่มีเบอรัเซนต์ 10 ของ beta-mercaptoethanol ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อ Loading dye (1:1) นำไปต้มที่ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง thermo mixer compact (บริษัท eppendorf) ส่วนหลุมของ marker มีปริมาณ 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำชุดของเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งด้านบนและล่างของ chamber เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 V เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีของ 1xloading dye เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย Coomassie blue เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยสารละลาย destain (ข้อที่ 10.5 ภาคผนวกที่ ข)

การทำ Western transfer โดยการ transfer โปรตีนจากแผ่นเจลที่ผ่านการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ไปยังแผ่น membrane (PVDF membrane) ด้วยเครื่อง SCAidry transfer โดยจัดวางแผ่นเจลและอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังรูปที่ 3.1 ทั้งแผ่น membrane และกระดาษกรองต้องชุ่มด้วย transfer buffer จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปโดยให้มีค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 62 แอมแปร์เป็นเวลา 90 นาที โปรตีนบนแผ่นเจลจะถูก transfer ไปอยู่บนแผ่น membrane



รูปที่ 3.1 แสดงการจัดวางแผ่นเจล แผ่น membrane และกระดาษกรอง ในขั้นตอนการ transfer แอบโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่น membrane ด้วยเครื่อง SCAI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD)

การตรวจหาโปรตีนโดยใช้หลักการ immunoblotting หลังจากการทำโปรตีน transfer แล้ว ทำการตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี immunoblotting โดยนำแผ่น membrane ไปแช่ในสารละลาย blocking solution เขย่าเป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปป้อน กับ anti-mouse IgG ที่ติดฉลากด้วย เอนไซม์ HRP ซึ่งเป็นแบบ linked whole antibody ซึ่งเจือจาง 1:10,000 ใน PBS buffer pH 7.4 ที่มี 3 เปอร์เซ็นต์ของนมพร่องมันเนย ที่ไว้ข้ามคืน จากนั้นล้าง membrane ด้วย PBS-T buffer 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที 2 ครั้ง และ 15 นาที 3 ครั้ง พร้อมเขย่า เขย่า ECL chemiluminescent substrate (Amersham GE) ลงไปบนแผ่น membrane ประมาณ 30 วินาที และตรวจด้วยสัญญาณ โดยใช้แผ่นฟิล์ม X-ray

3.4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์ แล้วมาทดสอบความไว ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.4 ก.

บทที่ 4

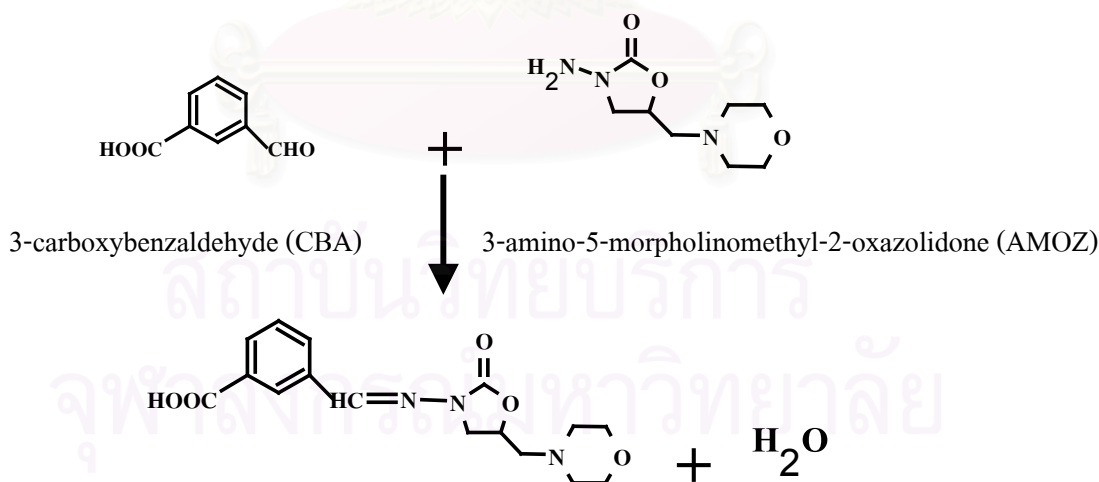
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

เนื่องจากสาร AMOZ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ของ ฟุรลทาโคน ในกลุ่มไนโตรฟูแรน ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก ที่เรียกว่า แฮปเทน (Hapten) จึงไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร AMOZ ได้ ดังนั้นจึงต้องเชื่อมสาร AMOZ กับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ก่อนนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง แต่เนื่องจากสาร AMOZ มีโครงสร้างที่ไม่พร้อมจับกับโครงสร้างของโปรตีนดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ ให้มีโครงสร้างพร้อมที่จะติดกับโปรตีนก่อนดังวิธีการต่อไปนี้

4.1.1 เปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ ให้เป็นสาร CPAMOZ

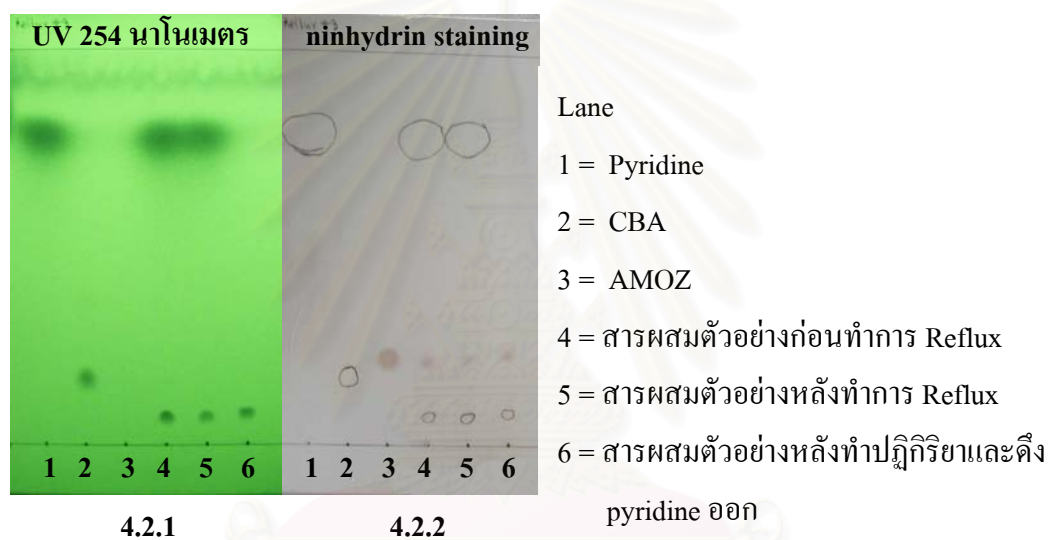
ผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 201.22 กรัมต่อโมล ให้เป็นสาร CPAMOZ โดยใช้สาร 3-carboxybenzaldehyde (CBA) เป็นตัวเพิ่มหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ให้แก่สาร AMOZ ตรงบริเวณหมู่เอมีน (NH_2) ได้เป็นสาร CPAMOZ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 333.33 กรัมต่อโมล พร้อมกับปลดปล่อยน้ำออกมา 1 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 4.1



3-[(3-carboxyphenyl)methylene]amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (CPAMOZ)

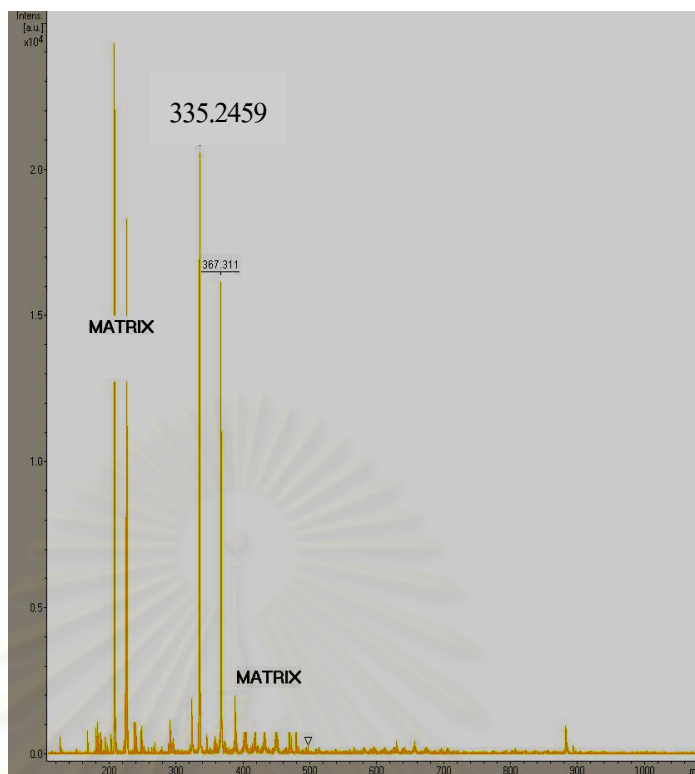
รูปที่ 4.1 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AMOZ เป็น CPAMOZ

จากการนำยาตั้งต้น และสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยามาทดสอบด้วยวิธี Thin-layer chromatography ผลปรากฏ ดังรูปที่ 4.2 จากการดูโครมาโทแกรมภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าจะเห็นแถบของสาร Pyridine (เป็นสารตัวกลางช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา) ในช่องที่ 1 ซึ่งมีค่า Rf อยู่ที่ 0.78 สำหรับในช่องที่ 2 จะแสดงให้เห็นแถบของสาร CBA มีค่า Rf เท่ากับ 0.18 สำหรับช่องที่ 4 และ 5 แสดงแถบของสารผสมตัวอย่างก่อนทำการ Reflux และสารผสมตัวอย่างหลังทำการ Reflux ตามลำดับ และช่องที่ 6 เป็นแถบของสารผสมตัวอย่างหลังทำปฏิกิริยาและดึง pyridine ออกจากระบบแล้ว (โดยใช้ไนโตรเจนดึงออก) ซึ่งสาร CPAMOZ ที่ได้จะมีค่า Rf อยู่ที่ 0.075 ส่วน AMOZ ในช่องที่ 3 นั้นจะไม่สามารถมองเห็นได้ ดังนั้นจึงต้องทำการข้อมแผ่นซิลิกาด้วยสารละลายนินไฮดริน (ดังแสดงในรูปที่ 4.2.2)



รูปที่ 4.2 แสดงแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟีที่แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของ AMOZ เป็น CPAMOZ 4.2.1) เมื่อดูด้วยแสงยูวีที่ 254 นาโนเมตร 4.2.2) ข้อมด้วยสารละลาย นินไฮดริน พบว่าจะเห็นแถบของสาร AMOZ ก่อนทำปฏิกิริยาในช่องที่ 3 และที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาในช่องที่ 4-6 ซึ่ง มีค่า Rf เป็น 0.23 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการแยกสารด้วยวิธี TLC ของสารผสมตัวอย่างในช่องที่ 4, 5 และ 6 กับยาตั้งต้น ในช่องที่ 1, 2 และ 3 พบว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.075 ซึ่งคาดว่าจะ เป็น CPAMOZ และพบสารที่ค่า Rf เท่ากับ 0.23 ซึ่งตรงกับค่า Rf ของยาตั้งต้น (ช่องที่ 1-3) ก่อนการทำปฏิกิริยา

หลังจากนั้นยืนยันผลการเปลี่ยนอนุพันธ์สาร AMOZ เป็น CPAMOZ ด้วยการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ดังรูป 4.3



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการหาน้ำหนักโมเลกุล ของสาร CPAMAZ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS

จากการทดลองวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเตรียมอนุพันธ์ CPAMAZ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่า สารที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 335.24 กรัมต่อโมล ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณซึ่งมีค่าเท่ากับ 333.33 กรัมต่อโมล ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันว่าสารผลิตภัณฑ์ คือ CPAMAZ

4.1.2 การเตรียมโปรตีนพาหะ BSA ให้เป็น cationized BSA (cBSA) หรือ Super carrier protein

เนื่องจาก cBSA เตรียมได้จากโปรตีน BSA ทำปฏิกิริยากับ EDA โดยมี EDC เป็นสารตัวกลางให้เกิดปฏิกิริยาโดยจะทำให้โปรตีน BSA มีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้นซึ่งจะเป็นการเพิ่มตำแหน่งการเชื่อมต่อกับสาร CPAMAZ ให้ได้มากขึ้น

เมื่อทำการเพิ่มหมู่เอมีนให้กับโปรตีนพาหะ BSA ให้เป็น cBSA แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry เพื่อหาความเข้มข้นโปรตีนสำหรับการนำไปเชื่อมติดกับสเปปแทน CPAMAZ ต่อไป โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรที่ความเจือจางต่างๆ เทียบกับค่า

ดูค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (กราฟมาตรฐาน BSA แสดงดังตารางที่ ก.1 และรูปที่ ก.1 ในภาคผนวก ก) ผลการทดลองแสดง ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของค่าความเข้มข้นของโปรตีนพหุ cBSA ที่เตรียมได้

ความเจือจาง โปรตีนพหุ cBSA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร	ความเข้มข้น โปรตีนพหุ cBSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1 : 2	0.645	0.678
1 : 4	0.372	0.782
1 : 8	0.195	0.821
ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย		0.761

จากผลการทดลอง พบว่า โปรตีน cBSA ที่เตรียมได้ที่ความเจือจาง 1:2 , 1:4 และ 1:8 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.645, 0.372 และ 0.195 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA และคำนวณเป็นปริมาณโปรตีน cBSA ได้เท่ากับ 0.678, 0.782 และ 0.821 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณโปรตีนเฉลี่ยได้เท่ากับ 0.761 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

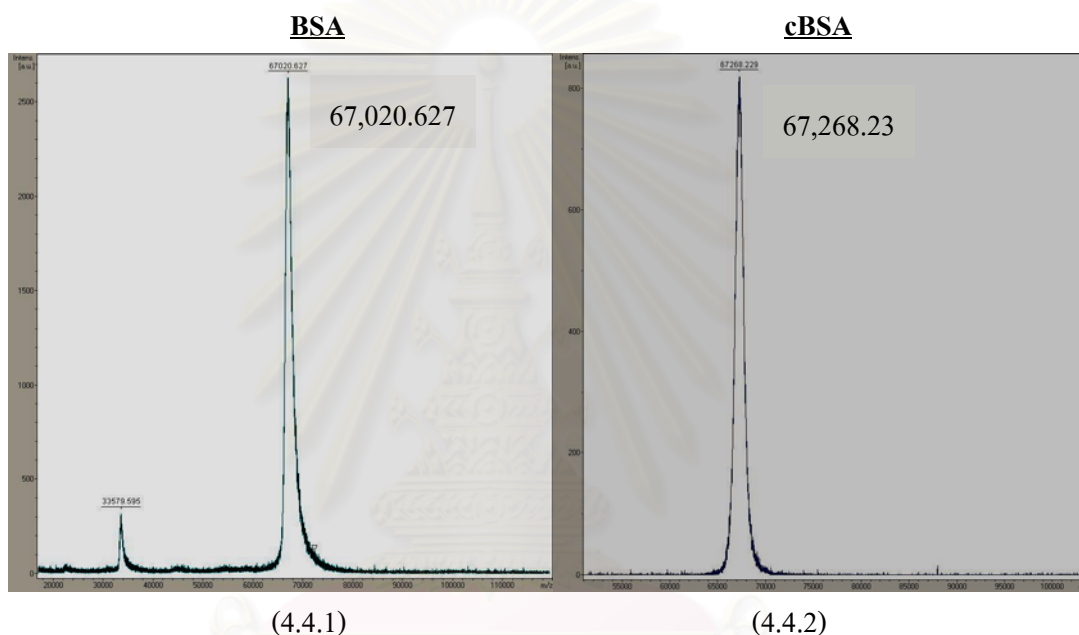
นำไปหาโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นในการเตรียม cBSA ด้วยวิธี TNBSA ซึ่งหลักการของวิธี TNBSA คือ สาร TNBS จะไปจับกับหมู่เอมีนอิสระแล้วเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีส้มสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ 335 นาโนเมตร ผลการทดสอบการเพิ่มหมู่เอมีนบนโมเลกุล cBSA แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลทดสอบการเพิ่มหมู่เอมีนในโมเลกุลของโปรตีน BSA

ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง โปรตีน BSA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสง โปรตีน cBSA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าเปอร์เซ็นต์ หมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น ของ cBSA
500	0.648	0.846	30.53
200	0.292	0.388	32.68
ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น			31.60

จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 200 และ 500 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร เท่ากับ 0.292 และ 0.648 ตามลำดับ เทียบกับโปรตีน cBSA ที่เตรียมได้ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.388 และ 0.846 ที่ความเข้มข้นโปรตีนที่เท่ากันตามลำดับ คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นเป็น 32.68 และ 30.53 % ตามลำดับ และคิดเป็นค่าเฉลี่ยได้เท่ากับ 31.60 %

ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลและโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นในการเตรียม cBSA ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS แสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ของโปรตีน BSA (รูป 4.4.1) และ cBSA (รูป 4.4.2)

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากเทคนิค MALDI-TOF MS ผลการวิเคราะห์พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน BSA มีค่าเท่ากับ 67,020.67 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของ cBSA ที่เตรียมได้เท่ากับ 67,268.23 ดาลตัน ดังนั้นจึงสามารถคิดเป็นอัตราส่วนโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน BSA 1 โมเลกุล เท่ากับ 15 โมเลกุล

4.1.3 การเชื่อมติด CPAMOZ กับ cBSA เพื่อให้ได้ CPAMOZ-cBSA

เตรียมสารที่จะใช้ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำการเชื่อมต่อกับ CPAMOZ กับโปรตีนพาหะ cBSA นำไปวัดปริมาณโปรตีนพาหะที่สามารถเชื่อมติดกับ แอนติเจนด้วย วิธี Lowry ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นโปรตีนของแอนติเจน CPAMoz-cBSA สำหรับใช้ในการฉีด กระตุ้นหนูทดลอง

ความเจือจาง CPAMoz-cBSA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร	ความเข้มข้น โปรตีนCPAMoz- cBSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
-	0.432	0.227
1 : 2	0.229	0.241
ปริมาณ โปรตีนเฉลี่ย		0.234
ปริมาณ โปรตีนทั้งหมด = 1.78 มิลลิกรัม		

จากผลการวัดปริมาณโปรตีนของแอนติเจน CPAMoz-cBSA ที่เตรียมได้พบว่าที่แอนติเจนที่ไม่ได้เจือจาง และ เจือจาง 1:2 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.432 และ 0.229 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (กราฟมาตรฐาน BSA แสดงดังตารางที่ ก.2 และรูปที่ ก.2 ในภาคผนวก ก) และคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนของแอนติเจน CPAMoz-cBSA ได้เท่ากับ 0.227 และ 0.241 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณ โปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 0.234 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 1.78 มิลลิกรัม

การวัดหมู่เอมีนอิสระของโปรตีนที่ใช้ติดด้วยวิธี TNBS เพื่อนำไปคำนวณค่าปริมาณการเชื่อมติระหว่าง แอนติเจนกับ โปรตีนพาหะ ซึ่งผลที่ได้ดังตารางที่ 4.4

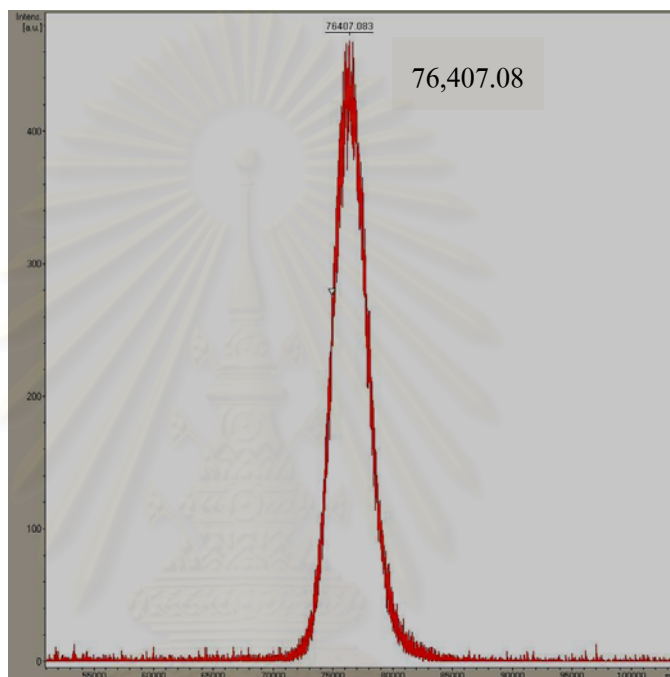
ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติระหว่าง CPAMoz กับโปรตีน cBSA

ความเข้มข้น โปรตีนมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง โปรตีน BSA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสง โปรตีน cBSA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสง CPAMoz-cBSA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าเปอร์เซ็นต์ การเชื่อมติ
200	0.292	0.388	0.061	84.20
125	0.195	0.235	0.040	83.07
ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติแอนติเจน CPAMoz-cBSA				83.63

จากผลการทดลองพบว่าโปรตีน cBSA ที่เตรียมได้ความเข้มข้น 125 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร เท่ากับ 0.388 และ 0.235

ที่ความเข้มข้นโปรตีนที่เท่ากับโปรตีน cBSA ของ แอนติเจน CPAMoz-cBSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.061 และ 0.040 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติระหว่าง CPAMoz กับ cBSA เป็น 84.20 และ 83.07 ตามลำดับ และคิดเป็นค่าเฉลี่ยได้เท่ากับ 83.63 เปอร์เซ็นต์

หาน้ำหนักโมเลกุลและโมเลกุลของสาร CPAMoz ที่เชื่อมติดกับโปรตีน cBSA ด้วย MALDI-TOF MS ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ของแอนติเจน CPAMoz-cBSA

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ cBSA มีค่าเท่ากับ 67,268.23 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลแอนติเจน CPAMoz-cBSA ที่เตรียมได้ มีค่าเท่ากับ 76,407.08 ดาลตัน ดังนั้นจึงสามารถคิดเป็นอัตราส่วนโมเลกุลของ CPAMoz ที่ติดกับโปรตีน cBSA 1 โมเลกุล เท่ากับ 27 โมเลกุล

4.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับการใช้ในการทำ Screening test

ในการทำ Screening test เพื่อคัดกรองโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการจะใช้ CPAMoz ที่เชื่อมต่อกับ OVA แทนการใช้ CPAMoz ที่เชื่อมต่อกับ BSA หรือ cBSA เพื่อลดการเกิดผลบวกที่เป็นเท็จ ที่เกิดเนื่องจากการจับกันของแอนติบอดี และโปรตีนพาหะ BSA หรือ cBSA โดยในการเชื่อม

CPAMOZ กับ OVA จะใช้ EDA เป็นตัวช่วยในการเชื่อมติด ซึ่งหลังจากปฏิกิริยา เชื่อมต่อได้ทำการวัดปริมาณ OVA ผลปรากฏดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน CPAMOZ-OVA ที่เตรียมสำหรับใช้ในการทำ

Screening test

ความเจือจาง CPAMOZ-OVA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร	ความเข้มข้น โปรตีนCPAMOZ- cBSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1 : 20	0.839	7.994
1 : 50	0.461	7.683
ปริมาณ โปรตีนเฉลี่ย		7.838

จากผลการวัดปริมาณ โปรตีนของแอนติเจน CPAMOZ-OVA ที่เตรียมได้พบว่าที่แอนติเจนที่เจือจางที่ 1:20 และ 1:50 พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.839 และ 0.461ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน OVA (กราฟมาตรฐาน OVA แสดงดังตารางที่ ก.7 และรูปที่ ก.3 ในภาคผนวก ก) และคำนวณเป็นปริมาณ โปรตีนของแอนติเจน CPAMOZ-OVA ได้เท่ากับ 7.994 และ 7.683 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณ โปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 7.838 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

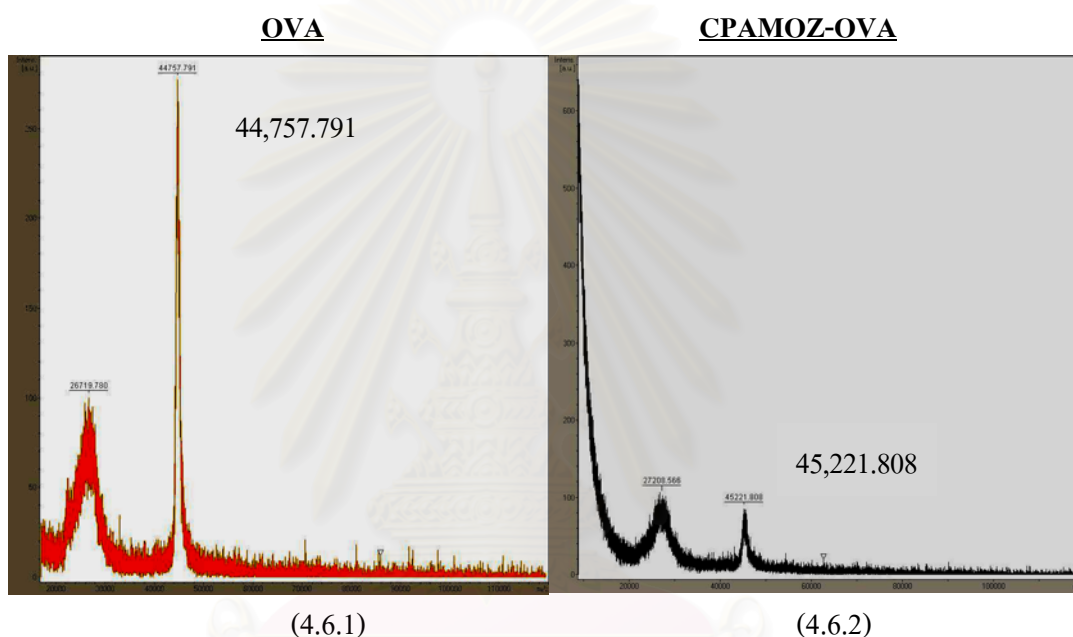
การวัดค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด และจำนวนโมเลกุลของสาร CPAMOZ ที่ติดกับโปรตีน OVA ได้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่าง CPAMOZ กับโปรตีน OVA

ความเข้มข้น โปรตีนมาตรฐาน OVA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง โปรตีน OVA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสง CPAMOZ- OVA ที่ 335 นาโนเมตร	ค่าเปอร์เซ็นต์ การเชื่อมติด
1000	0.709	0.617	12.96
500	0.500	0.403	19.35
ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดแอนติเจน CPAMOZ- OVA			16.20

จากตารางพบว่าแอนติเจน CPAMoz-OVA ที่เตรียมได้ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร ที่ได้จากวัดหมู่เอมีนอิสระที่เหลือจากการเชื่อมติดสาร CPAMoz กับโปรตีน OVA ที่วัดได้จากวิธี TNBSA นั้นจะให้ค่าดูดกลืนแสงเป็น 0.403 และ 0.617 ตามลำดับ ซึ่งสามารถคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดเป็น 19.35 และ 12.96 ตามลำดับ โดยจะคิดเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดเป็น 16.20 เปอร์เซ็นต์

นำมาหาน้ำหนักโมเลกุลและโมเลกุลของสาร CPAMoz ที่เชื่อมติดกับโปรตีน OVA ด้วย MALDI-TOF MS ดังผลแสดงในรูป 4.6



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ของโปรตีน OVA (รูป 4.6.1) และแอนติเจน CPAMoz-OVA (รูป 4.6.2)

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากเทคนิค MALDI-TOF MS ผลการวิเคราะห์พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ OVA มีค่าเท่ากับ 44,757.791 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลแอนติเจน CPAMoz-OVA ที่เตรียมได้ มีค่าเท่ากับ 45,221.808 ดาลตัน ดังนั้นจึงสามารถคิดเป็นอัตราส่วนโมเลกุลของ CPAMoz ที่ติดกับโปรตีน OVA 1 โมเลกุล เท่ากับ 1.4 โมเลกุล

จากการเชื่อมสาร CPAMoz และ AMoz กับโปรตีนพาหะ cBSA BSA และ OVA โดยใช้สาร EDC และ NHS เป็นสารช่วยให้เชื่อมติด และนำแอนติเจนที่เตรียมได้มาหาปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์การติดด้วยวิธี TNBS และหาน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยวิธี MALDI-TOF MS สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 สรุปปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมและอัตราส่วน โมเลกุลการติดแสบแทนกับโปรตีนของแอนติเจนชนิดต่างๆที่เตรียมได้

แอนติเจน	สารที่ใช้ Conjugate	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเชื่อมติดแสบแทนกับโปรตีนพาหะ		
			วิธี TNBSA (%)	MALDI-TOF MS น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	อัตราส่วนการติด แสบแทน : โปรตีน
cBSA	EDC	3.630	77.58	67,268.230	15 :1
CPAMoz-cBSA	EDC,NHS	0.234	83.63	76,407.080	27 :1
CPAMoz-OVA	EDC	7.838	19.00	45,221.808	1.4 :1
CPAMoz-BSA	EDC	7.898	9.00	-	2.4 :1
AMoz-OVA	EDC	0.761	39.76	-	-

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) คือ ไม่มีการส่งตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลเนื่องจากสามารถทดสอบได้ด้วยวิธี ELISA

จากตารางที่ 4.7 สามารถสรุปได้ว่า ในการเชื่อมสาร CPAMoz กับโปรตีนพาหะ cBSA จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์และอัตราการเชื่อมติดที่สูงกว่าโปรตีนพาหะ BSA และ OVA อาจมีผลมาจากโปรตีน cBSA มีหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นช่วยเพิ่มโอกาสให้สาร CPAMoz มาจับได้มากขึ้น

4.3 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAMoz

จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน CPAMoz-cBSA เพื่อให้หนูสร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAMoz ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตออกมานั้นเป็นชนิดพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMoz โดยนำซีรัมของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนดังกล่าวมาใช้ในการหาระดับแอนติบอดีก่อนทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

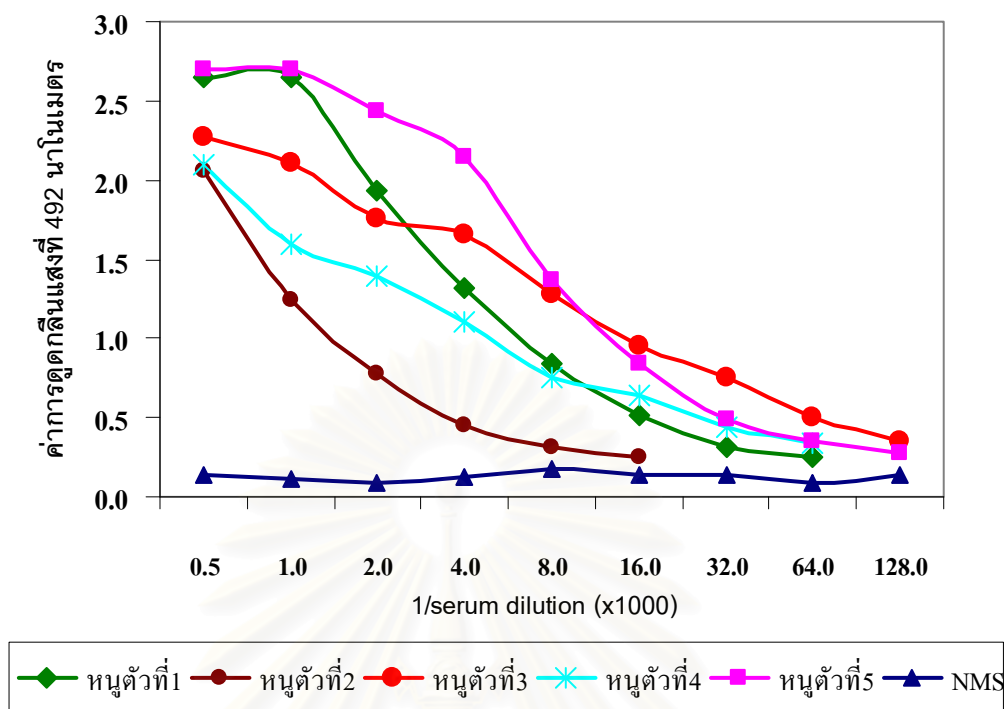
4.3.1 การหาระดับแอนติบอดีของซีรัมหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้น

จากการทดสอบหาระดับแอนติบอดี โดยทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA จะใช้ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ CPAMoz-OVA เป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบจานทดสอบ ELISA 96 หลุม จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ดังผลแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ระดับแอนติบอดี (antibody titer) จากซีรัมของหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAM0Z-cBSA ที่ระดับความเจือจางของซีรัมที่ระดับต่างๆ

ความเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของซีรัมหนูทดลอง										
	ซีรัมหนู ก่อนกระตุ้น	หนูตัวที่ 1		หนูตัวที่ 2		หนูตัวที่ 3		หนูตัวที่ 4		หนูตัวที่ 5	
		PBS	1 %BSA ใน PBS	PBS	1 %BSA ใน PBS	PBS	1 %BSA ใน PBS	PBS	1 %BSA ใน PBS	PBS	1 %BSA ใน PBS
	ตัวควบคุมลบ										
1:500	0.136	2.654	2.585	2.060	1.989	2.273	2.345	2.090	2.034	2.694	2.602
1:1000	0.117	2.653	2.638	1.239	1.494	2.112	2.112	1.592	1.362	2.701	2.390
1:2000	0.092	1.929	2.044	0.776	0.965	1.752	1.953	1.391	1.085	2.434	2.382
1:4000	0.131	1.313	1.673	0.450	0.756	1.654	1.789	1.106	0.874	2.145	1.907
1:8000	0.171	0.840	1.036	0.314	0.445	1.276	1.470	0.753	0.662	1.362	1.527
1:16000	0.141	0.509	0.767	0.255	0.318	0.956	1.268	0.645	0.539	0.847	0.908
1:32000	0.138	0.314	0.445	-	-	0.750	0.915	0.437	0.367	0.491	0.667
1:64000	0.088	0.255	0.318	-	-	0.498	0.544	0.339	0.266	0.347	0.703
1:128000	0.136	-	-	-	-	0.347	0.396	-	-	0.281	0.334

พบว่าหนูทดลองตัวที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ให้ระดับแอนติบอดี (antibody titer) ที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2 เท่าของค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบ อยู่ที่ระดับความเจือจาง 1:64000, 1:16000, 1:128000, 1:64000 และ 1:128000 ตามลำดับ ซึ่งสามารถแสดงกราฟของระดับแอนติบอดีของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว เปรียบเทียบกับซีรัมของหนูทดลองก่อนฉีดกระตุ้น (preimmuned serum) ดังรูปที่ 4.7

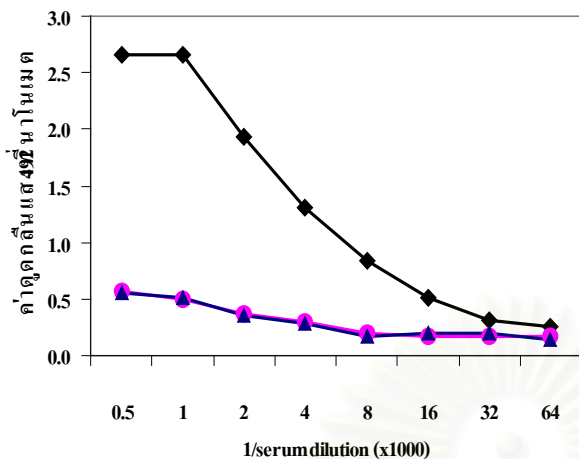


รูปที่ 4.7 ระดับแอนติบอดีของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPAM0Z-cBSA

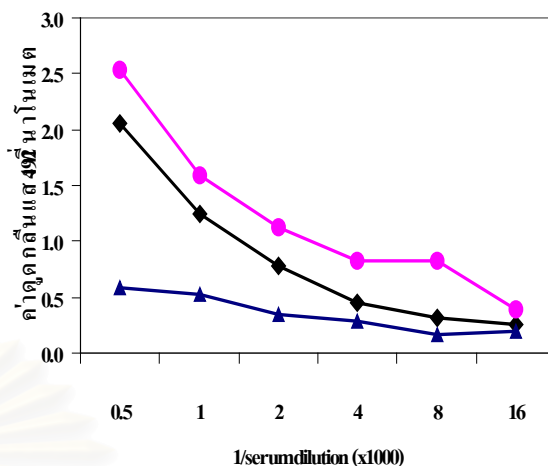
จากนั้นทำการทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับแอนติเจน CPAM0Z-OVA เปรียบเทียบกับ OVA และ BSA ด้วยวิธี indirect ELISA ดังแสดงให้เห็นดังรูปที่ 4.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

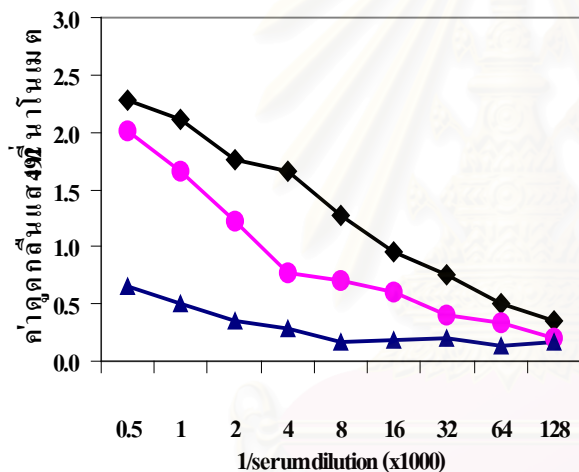
ครั้งที่ 1



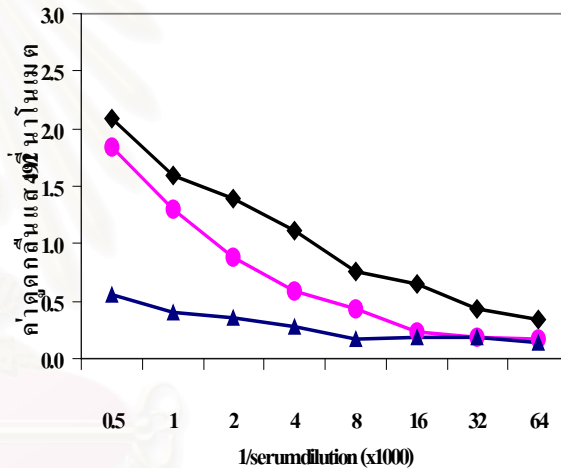
ครั้งที่ 2



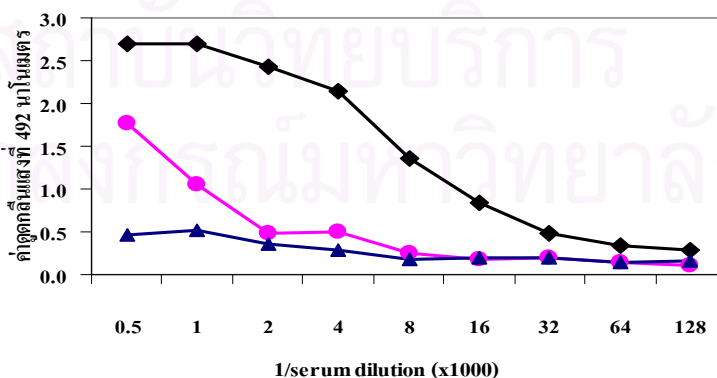
ครั้งที่ 3



ครั้งที่ 4



ครั้งที่ 5



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองตัวที่ 1-5 ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ ที่ความเจือจางต่างๆ โดยใช้สารเคลือบจาน 96 หลุม ดังนี้

■ CPAMoz-OVA, ● BSA และ ▲ OVA (ปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากผลการทดสอบระดับแอนติบอดีที่แสดงในรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า ในซีรัมของหนูก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 จะมีแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน BSA ได้เพียงเล็กน้อย ส่วนซีรัมก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 นั้นจะมีแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน BSA ได้สูงกว่า CPAMoz-OVA สำหรับซีรัมก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 และ 4 นั้นจะมีแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน BSA แต่น้อยกว่า CPAMoz-OVA และซีรัมของหนูที่หลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 เมื่อทดสอบซีรัมในงาน 96 หลุมที่เคลือบด้วย CPAMoz-OVA BSA และ OVA แสดงให้เห็นแนวโน้มว่าเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้น่าจะสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร CPAMoz ได้ เนื่องจากทำปฏิกิริยากับแอนติเจน CPAMoz-OVA ได้สูง และทำปฏิกิริยากับโปรตีน BSA ได้เล็กน้อย และไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน OVA (ตารางที่ ก.4-8 ในภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำซีรัมของหนูทดลองก่อนหลอมรวมเซลล์ที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับสารอิสระที่ต้องการตรวจสอบต่อไปโดยวิธี competitive ELISA

4.3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CPAMoz ในซีรัม โดยวิธี Indirect competitive ELISA

จากผลการหาระดับแอนติบอดีจากซีรัมหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นแล้วพบว่าหนูทดลองให้ระดับแอนติบอดีสูงเพียงพอที่จะทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาต่อไปได้ ดังนั้นก่อนหลอมรวมเซลล์จะทำการทดสอบความจำเพาะของซีรัมหนูกับสาร CPAMoz, NPAMoz และ AMoz ในรูปอิสระความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค Competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPAMoz-OVA ปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบบนจานทดสอบ ELISA 96 หลุม เพื่อแสดงให้เห็นทราบว่าหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นนั้นสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับสารที่อยู่ในรูปอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

จากตารางที่ 4.9 ผลที่ได้จากการทดสอบความจำเพาะของซีรัมหนูทดลองทั้ง 5 ตัว ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ พบว่าความเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ประมาณ 1 ของซีรัมของหนูตัวที่ 1-5 เป็น 1:8000, 1:2000, 1:8000, 1:4000 และ 1:8000 ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่ไม่ได้เติมสารอิสระ เป็น 0.840, 0.775, 1.276, 1.106 และ เมื่อเติมสารอิสระ CPAMoz ในซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 1-3 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงไป 50 เปอร์เซ็นต์ จากค่าดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่ไม่ได้เติมสารอิสระ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอิสระ CPAMoz เป็น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะลดลงเท่ากับค่าดูดกลืนแสงในหลุมที่ไม่ได้เติมแอนติบอดีลงไป (black ground) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมของหนูตัวที่ 1-3 มีความจำเพาะต่อสาร CPAMoz ในรูปอิสระ สำหรับสาร AMoz ที่เติมในซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 1-3 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารที่ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่ไม่

ได้เติมสารอิสระ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีบางส่วนที่ได้จากซีรัมของหนูตัวที่ 1-3 มีความจำเพาะต่อสาร AMOZ ในรูปอิสระ สำหรับซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 4 และ 5 นั้นเมื่อเติมสารอิสระ CPAMOZ และ NPAMOZ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงไป 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอิสระดังกล่าวเป็น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะลดลงเท่ากับค่าดูดกลืนแสงของ black ground และเมื่อเติมสารอิสระ AMOZ ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าทั้ง 3 ความเข้มข้น จะส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูตัวที่ 4 และ 5 ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้จากหนูทดลองตัวที่ 4 และ 5 นั้นมีความจำเพาะต่อสารอิสระ CPAMOZ NPAMOZ และ AMOZ

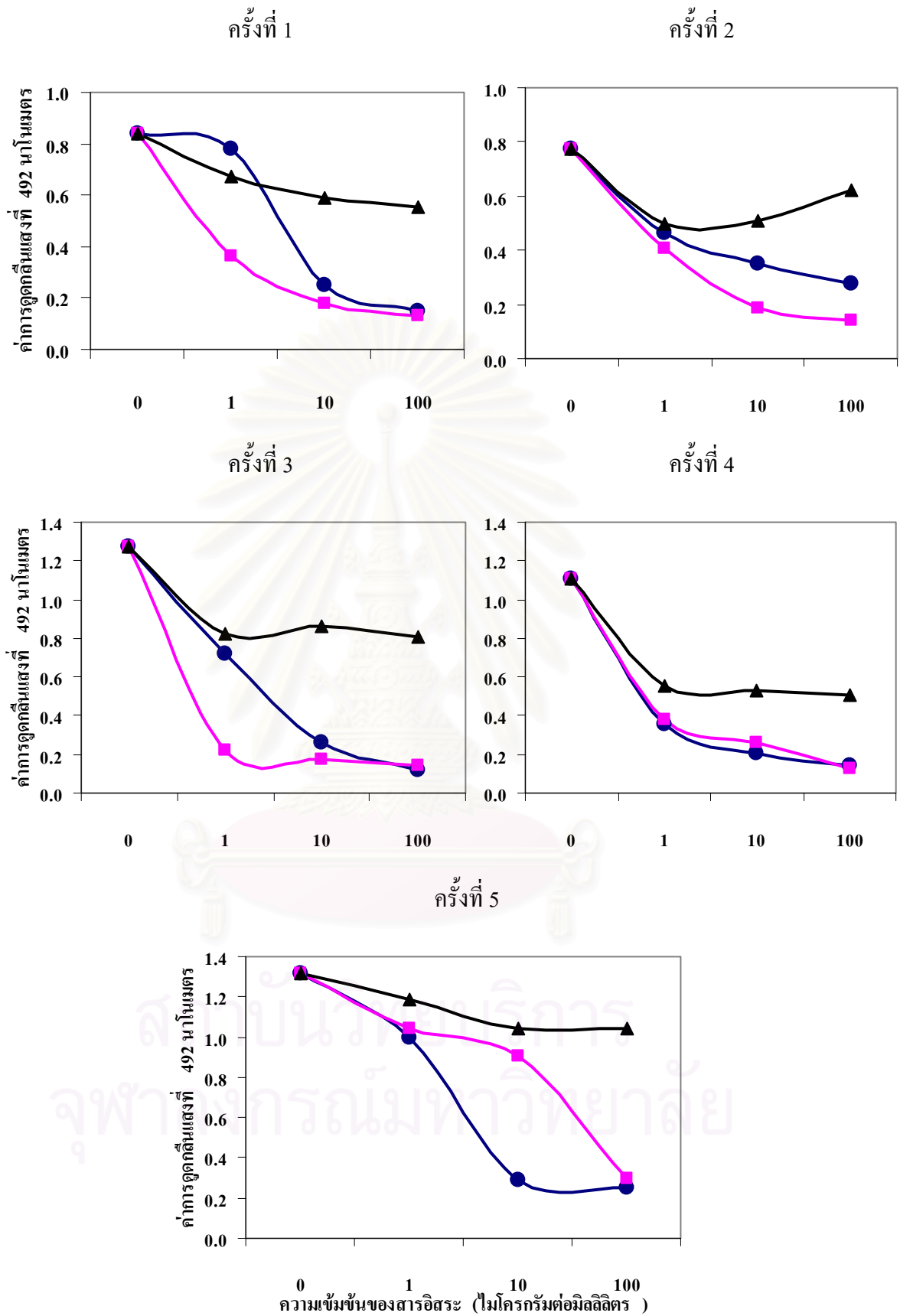
สรุปได้ว่าเมื่อนำซีรัมหนูตัวที่ 1-5 ที่ความเจือจางที่ 1:8000, 1:2000, 1:8000, 1:4000 และ 1:8000 ตามลำดับ มาตรวจสอบว่าหนูมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร CPAMOZ, NPAMOZ และ AMOZ ในรูปอิสระหรือไม่ โดยใช้ความเข้มข้นของสารในรูปอิสระที่ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าหนูมีแอนติบอดีต่อสารอิสระแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะทำปฏิกิริยากับ สารดังกล่าวในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่ได้นำสารดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา จากผลการทดลองแสดงดัง รูปที่ 4.9 พบว่า ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นของสาร CPAMOZ, NPAMOZ และ AMOZ เพิ่มขึ้น แสดงว่า ในซีรัมของหนูตัวที่ 1-5 มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารทั้ง 3 ในรูปอิสระจึงนำม้ามของหนูทดลองทั้ง 5 ตัวมาทำการหลอมรวมเซลล์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบความสามารถในการจับกับสารแอนติเจนอิสระของซีรัมจากหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น

ซีรัมหนูทดลอง (ความเจือจาง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร										
	ไม่เติม สารอิสระ	เติมสารอิสระ 1 เปรอร์เซ็นต์ BSA	เติมสารอิสระ CPAMoz (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			เติมสารอิสระ NPAMoz (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			เติมสารอิสระ AMoz (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
			1	10	100	1	10	100	1	10	100
หนูตัวที่1 (1:8000)	0.840	1.036	0.778	0.248	0.148	0.361	0.180	0.130	0.673	0.589	0.554
หนูตัวที่2 (1:2000)	0.775	0.965	0.463	0.349	0.279	0.404	0.184	0.144	0.500	0.511	0.620
หนูตัวที่3 (1:4000)	1.276	1.470	0.717	0.258	0.122	0.220	0.175	0.140	0.825	0.860	0.810
หนูตัวที่4 (1:4000)	1.106	0.874	0.352	0.205	0.143	0.383	0.258	0.130	0.551	0.531	0.508
หนูตัวที่5 (1:8000)	1.315	1.368	0.995	0.291	0.252	1.046	0.904	0.297	1.190	1.046	1.044
*ตัวควบคุมลบ	0.195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*ตัวควบคุมลบคือซีรัมของหนูก่อนได้รับการกระตุ้น (preimmuned serum) เจือจาง 1:2000 ใน PBS



รูปที่ 4.9 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CPAMOZ, NPAMOZ และ AMOZ ในซีรัมหนูทดลองตัวที่ 1-5 ก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้ง 1-5 ตามลำดับด้วยวิธี Indirect ELISA ดังนี้
 ● CPAMOZ, ■ NPAMOZ กับ ▲ AMOZ

4.4 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา

เมื่อนัดกระตุ้นหนูทดลองทั้ง 5 ตัว ด้วยแอนติเจน CPAM0Z-cBSA ที่มีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัมต่อครั้ง โดยฉีดกระตุ้นหนูตัวที่ 1 และ 2 ทั้งหมดจำนวน 5 ครั้ง หนูตัวที่ 3 จำนวน 6 ครั้ง สำหรับหนูตัวที่ 4 ฉีดกระตุ้นทั้งหมด 5 ครั้ง โดย 3 ครั้งกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่มีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม และ 2 ครั้งก่อนหลอมรวมเซลล์จะกระตุ้นด้วยแอนติเจนปริมาณ 100 ไมโครกรัม ส่วนหนูตัวที่ 5 ทำการฉีดกระตุ้นทั้งหมด 6 ครั้ง 3 ครั้งแรกฉีดแอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม ซึ่ง 3 ครั้งที่เหลือได้ฉีดกระตุ้นด้วย 100 ไมโครกรัมของปริมาณโปรตีนแอนติเจน โดยหนูทั้ง 5 ตัวให้ระดับแอนติบอดีอยู่ที่ระดับความเจือจางก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 1:64000, 1:16000, 1:128000, 1:64000 และ 1:128000 ตามลำดับ จึงนำเซลล์ม้ามของหนูไปทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งจะสรุปผลของการหลอมรวมเซลล์ม้ามทั้ง 5 ครั้งได้ดังนี้

4.4.1 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 1 กับเซลล์มัยอีโลมาแล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในงานชนิด 96 หลุม จำนวน 576 หลุม (6 งาน) โดยภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ นำงานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) พบว่าเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุมซึ่งมีประมาณ 222 หลุม หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนหลุมทั้งหมดได้ 39 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนโคโลนีเพิ่มจำนวนมากขึ้นประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPAM0Z โดยนำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งจะใช้อันติเจนสำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (Screening test) เป็น CPAM0Z-OVA (ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพบหลุมที่ให้ผลบวกจากการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ทั้งหมด 54 หลุม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 24 % ของจำนวนหลุมที่ให้เซลล์ไฮบริโดมา จึงทำการย้ายเซลล์จากหลุมในงานชนิด 96 หลุม ใส่ลงในหลุมของงานชนิด 24 หลุม เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปทำการแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ เมื่อทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ CPAM0Z ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมในงานชนิด 24 หลุม พบว่า เซลล์ได้สูญเสียคุณสมบัติการผลิตแอนติบอดีต่อ CPAM0Z ไป

4.4.2 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2

หลังจากหลอมรวมเซลล์ม้ามหนูตัวที่ 2 กับเซลล์มัยอีโลมาแล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในงานชนิด 96 หลุม จำนวน 576 หลุม (6 งาน) หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ นำงานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุมซึ่งมีประมาณ 103 หลุม หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนหลุมทั้งหมดได้ 18 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อจนโคโลนีเพิ่มจำนวนมากขึ้นประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต

แอนติบอดีต่อ CPAMOZ โดยนำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งจะใช้ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของ CPAMOZ-OVA เป็นแอนติเจนสำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (Screening test) เมื่อพบหลุมที่ให้ผลบวกจากการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ทั้งหมด 4 หลุม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 4 % ของจำนวนหลุมที่ให้เซลล์ไฮบริโดมา จึงทำการย้ายเซลล์จากหลุมในจานชนิด 96 หลุม ใส่งในหลุมของจานชนิด 24 หลุม เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปทำการแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ เมื่อทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมในจานชนิด 24 หลุม พบว่า เซลล์ได้สูญเสียคุณสมบัติการผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ไป

4.4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์มี้มของหนูทดลองตัวที่ 3 กับเซลล์ไมอีโกลมา เมื่อเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม จำนวน 576 หลุม (6 จาน) ภายหลังจาก 1 สัปดาห์ พบว่าในหลุมมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) จำนวนมาก และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุมเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อ 1 สัปดาห์ ให้มีขนาดโคโลนีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ต่อไป แต่ไม่พบเซลล์ไฮบริโดมาที่พบในช่วง 1 สัปดาห์แรกเหลืออยู่เนื่องจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์เจริญอย่างรวดเร็วและมีปริมาณมากกว่าเซลล์ไฮบริโดมาจึงส่งผลให้ไปบดบังการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาและเซลล์จึงตายไปในที่สุด

4.4.4 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

การหลอมรวมเซลล์มี้มของหนูทดลองตัวที่ 4 กับเซลล์ไมอีโกลมา พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม จำนวน 672 หลุม (7 จาน) หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ นำจานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุมซึ่งมีประมาณ 88 หลุม หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนหลุมทั้งหมดได้ 13 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อจนโคโลนีเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMOZ โดยนำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งจะใช้ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ของ CPAMOZ-OVA เป็นแอนติเจนสำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา เมื่อพบหลุมที่ให้ผลบวกจากการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ทั้งหมด 20 หลุม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 23 % ของจำนวนหลุมที่ให้เซลล์ไฮบริโดมา จึงทำการย้ายเซลล์จากหลุมในจานชนิด 96 หลุม ใส่งในหลุมของจานชนิด 24 หลุม เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปทำการแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ เมื่อทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมในจานชนิด 24 หลุม พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาโคลน 4G11 เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMOZ จึงทำการโคลนเซลล์และเจือจางให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยเทคนิค limiting dilution ซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นโมโนโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAMOZ โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA แต่ละครั้ง ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 การทดสอบแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาของ
การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร		
	โคลนเซลล์ครั้งที่ 1	โคลนเซลล์ครั้งที่ 2	โคลนเซลล์ครั้งที่ 3
4G11	2.469	2.649	2.589
*ตัวควบคุมบวก	1.583	1.655	1.241
*ตัวควบคุมลบ	0.113	0.172	0.154

* ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่ความเจือจาง 1:4000

* ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูทดลองก่อนฉีดกระตุ้น (preimmuned serum) ที่ความเจือ
จาง 1:4000

4.4.5 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 5 กับเซลล์มัยอีโลมาแล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในงานชนิด 96 หลุม จำนวน 768 หลุม (8 งาน) โดยภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ นำงานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่า เซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่หลอมรวมตายหมดแล้ว และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม โดยพบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมามี 642 หลุม หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 84 % ของหลุมทั้งหมดที่ทำการแบ่งเลี้ยง จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อ จนโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นและโตประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPAMOZ โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ในงานทดสอบ ELISA 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนสำหรับคัดเลือกลูกเซลล์ ได้แก่ CPAMOZ-OVA และ AMOZ-OVA (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบเซลล์ไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้ง 2 ที่ใช้ทดสอบ จำนวน 88 หลุม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 14 % ของหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด จึงทำการย้ายเซลล์จากหลุมในงานชนิด 96 หลุม ใส่ลงในหลุมของงานชนิด 24 หลุม เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวน เมื่อเซลล์เจริญในงานชนิด 24 หลุมประมาณ 2/3 ของหลุม แล้วนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เช่นเดียวกันเพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ยังสามารถผลิตแอนติบอดีที่ต้องการได้ ก่อนนำไปทำการแยกให้ได้เซลล์เดี่ยว ผลที่ได้จะได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกทั้งหมด 20 หลุม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทำปฏิกิริยาสูงกับ CPAMOZ-OVA แต่ทำปฏิกิริยต่ำกับ AMOZ-OVA มีทั้งหมด 7 โคลน ได้แก่ 2E9 4F1 4H3 5A7 7G4 7H8 และ 8B1.1 และกลุ่มที่ 2 ทำปฏิกิริยาจำเพาะทั้ง CPAMOZ-OVA และ AMOZ-OVA มีทั้งหมด 13 โคลน ได้แก่ 1F2 2E5.1 2H6 5F1 5G10.2 5G10.3 5H7 6B3.1 6B3.2 6B3.3 6G2 8B4 และ 8E2 หลังจากนั้นจึงทำการโคลนเซลล์และเจือจางให้ได้โคโลนีเดี่ยวซ้ำ 3 ครั้งจนแน่ใจว่าเป็นโมโนโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAMOZ และ AMOZ โดยมีค่าดูดกลืน

แสงที่ทำการตรวจสอบแต่ละครั้ง ดังตารางที่ 4.11 และได้สรุปผลของระดับแอนติบอดี พร้อมทั้งผลของการหลอมรวมเซลล์มี้มของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว ที่ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน CPAMoz-cBSA

สรุปผลที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์มี้มกับเซลล์ไมอีโดมา เพื่อเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา ที่จำเพาะต่อสาร CPAMoz และ AMoz นั้นพบว่า การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1-3 ไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีเลย สำหรับ การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 จะได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร CPAMoz มา 1 โคลน ส่วนการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 นั้นจะได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร CPAMoz และ AMoz จำนวน 20 โคลน ดังตารางที่ 4.11

จากผลการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 5 ครั้ง ของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว ที่ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน CPAMoz-cBSA จากตารางที่ 4.12 สรุปผลได้ว่าการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 และ 2 จะให้หลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกต่อ แอนติเจน CPAMoz-OVA คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้น เป็น 24 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อทำการโคลนเซลล์ซ้ำ เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ นั้นพบว่าเซลล์ที่ได้จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อสาร CPAMoz ไป เนื่องจากโคลนที่ได้มีความไม่คงตัว (stability) จึงทำให้ไม่ได้โคลนที่จำเพาะต่อสารดังกล่าว สำหรับการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 นั้น พบว่ามีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ขึ้นจำนวนมาก ส่งผลให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเติบโตได้ไม่ทันและตายไปในที่สุด จึงทำให้ไม่พบเซลล์ไฮบริโดมาขึ้นในจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ส่วนการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 จะให้หลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกเมื่อเทียบกับหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้นคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ เป็น 23 และ 14 %ตามลำดับ และเมื่อโคลนเซลล์ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จะได้จำนวนโคลนที่จำเพาะต่อสาร CPAMoz ได้ทั้งหมดจำนวน 1 และ 20 โคลน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 การทดสอบแอนติบอดีต่อ CPAMoz ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการโคลนเซลล์ทั้งหมดจำนวน 3 ครั้งของการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร					
	แอนติเจน CPAMoz-OVA			แอนติเจน AMoz-OVA		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1F2 (F5/1/1)	2.444	2.337	2.364	1.088	1.548	1.732
2E5.1 (F5/2/1)	2.397	1.988	2.077	1.387	1.324	1.127
2H6 (F5/4/3)	1.499	0.924	1.598	0.844	0.520	0.804
5F1 (F5/8/1)	1.241	1.468	1.790	0.708	0.546	0.979
5G10.2 (F5/9/2)	2.001	1.727	2.037	1.095	1.371	1.055
5G10.3 (F5/10/4)	2.331	2.239	1.945	0.913	0.925	1.030
5H7 (F5/11/4)	2.512	2.073	1.620	0.987	1.109	0.625
6B3.1 (F5/12/2)	1.571	1.730	1.832	0.463	0.721	0.775
6B3.2 (F5/13/1)	1.935	1.878	1.630	0.744	0.484	0.975
6B3.3 (F5/14/1)	1.820	1.555	1.018	0.625	0.804	0.567
6G2 (F5/15/1)	2.016	1.631	1.939	1.269	1.137	1.219
8B4 (F5/19/4)	2.154	2.438	2.250	1.129	1.266	1.330
8E2 (F5/20/3)	2.442	2.518	1.941	1.387	1.183	1.024
2E9 (F5/3/5)	2.048	2.042	1.863	0.354	0.423	0.521
4F1 (F5/5/1)	2.284	2.258	1.278	0.828	0.523	0.426
4H3 (F5/6/1)	1.830	2.109	2.063	0.679	0.316	0.348
5A7 (F5/7/1)	0.856	0.479	0.425	0.250	0.131	0.122
7G4 (F5/16/2)	1.989	1.821	1.765	0.546	0.430	0.350
7H8 (F5/17/4)	2.211	2.043	1.861	0.493	0.475	0.419
8B1.1 (F5/18/2)	1.907	2.199	2.165	1.024	1.151	1.007
*ตัวควบคุมบวก	1.223	1.107	1.382	0.830	0.842	0.715
*ตัวควบคุมลบ	0.119	0.080	0.146	0.150	0.172	0.187

* ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ที่ความเจือจาง 1: 8000

* ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูทดลองก่อนฉีดกระตุ้น (preimmunized serum) ที่ความเจือจาง 1: 8000

ตารางที่ 4.12 สรุปผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน CPAM0Z-cBSA , ผลการหาระดับแอนติบอดีจากซีรัมหนู, ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอิโลมา เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมา รวมจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง และ จำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

ครั้งที่หลอมรวมเซลล์	จำนวนครั้งที่ฉีดกระตุ้น	ระดับแอนติบอดี (antibody titer)	จำนวนหลุมตั้งต้น	หลุมที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา		หลุมที่ให้ผลบวก		จำนวนโคลนที่ได้
				จำนวนหลุม	เปอร์เซ็นต์ (%)	หลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง	เปอร์เซ็นต์ (%)	
1	5	1:64000	576	222	39	54	24	0
2	5	1:16000	576	103	18	4	4	0
3	6	1:128000	576	0	0	0	0	0
4	5	1:64000	672	88	13	20	23	1
5	6	1:128000	768	642	84	88	14	20

4.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา โคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 จำนวน 1 และ 20 โคลน ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.13) พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 จำนวน 1 โคลน ได้แก่ 4G11 มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG1 สำหรับการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 จำนวน 20 โคลนมีไอโซไทป์หลากหลายซึ่งแบ่งได้ 3 ไอโซไทป์ ได้ดังนี้ IgG2b มีทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ 1F2 2E5.1 5A7 7H8 IgG2a มีทั้งหมด 1 โคลน ได้แก่ 4F1 และอีก 15 โคลนที่เหลือ มีไอโซไทป์ เป็น IgG1 ได้แก่ 2E9 2H6 4H3 5F1 5G10.2 5G10.3 5H7 6B3.1 6B3.2 6B3.3 6G2 7G4 8B1.1 8B4 และ 8E2

ตารางที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA

เซลล์ไฮบริโดมา		แอนติบอดีที่ใช้เคลือบจาน 96 หลุม					
ชื่อ	รหัส	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
4G11/G8/B5/B2	F4/26	0.621	0.062	0.081	0.080	0.083	0.068
1F2/B3/G3/A2	F5/1/1	0.065	0.056	2.492	0.107	0.168	0.215
2E5.1/E2/E2/A8	F5/2/1	0.085	0.061	2.801	0.120	0.113	0.106
2E9/H2/F10/D11	F5/3/5	0.882	0.086	0.106	0.116	0.108	0.078
2H6/B5/E8/G8	F5/4/3	0.823	0.087	0.114	0.103	0.100	0.063
4F1/C3/C6/B8	F5/5/1	0.070	1.074	0.098	0.110	0.268	0.071
4H3/E6/E1/E9	F5/6/1	0.724	0.074	0.108	0.093	0.110	0.102
5A7/F9/A6/B3	F5/7/1	0.138	0.131	0.388	0.295	0.272	0.157
5F1/C2/C4/D10	F5/8/1	0.727	0.065	0.120	0.082	0.080	0.082
5G10.2/C8/D8/F8	F5/9/2	0.741	0.071	0.092	0.086	0.085	0.078
5G10.3/C9/D8/F5	F5/10/4	0.804	0.081	0.098	0.090	0.086	0.085
5H7/B2/E2/D1	F5/11/4	0.710	0.067	0.130	0.096	0.129	0.076
6B3.1/B1/A8/G5	F5/12/2	0.662	0.063	0.146	0.083	0.079	0.068
6B3.2/C4/E4/D8	F5/13/1	0.733	0.077	0.135	0.084	0.086	0.163
6B3.3/E8/A11/C12	F5/14/1	0.689	0.070	0.123	0.082	0.082	0.110
6G2/A11/D8/B8	F5/15/1	0.934	0.080	0.102	0.203	0.182	0.057
7G4/B8/D11/G6	F5/16/2	0.711	0.073	0.084	0.082	0.090	0.086
7H8/F8/A2/E9	F5/17/4	0.102	0.058	2.664	0.117	0.106	0.090
8B1.1/A8/E9/D5	F5/18/2	0.649	0.062	0.086	0.080	0.077	0.069
8B4/C9/C1/D7	F5/19/4	0.677	0.070	0.092	0.089	0.086	0.068
8E2/B3/C8/G2	F5/20/3	0.728	0.067	0.096	0.089	0.088	0.054
ตัวควบคุมบวก (IgG3)		0.091	0.273	0.280	1.332	0.184	0.078

หมายเหตุ

1. F4 (Fusion4) คือ หลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4
2. F5 (Fusion5) คือ หลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5
3. ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าที่ให้ผลบวก

4.5.2 การหาความเจือจางที่เหมาะสมและทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ใช้ในการคัดกรองโคลน

ในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ CPAMAZ-OVA AMOZ-OVA BSA และ OVA โดยใช้แอนติเจนเคลือบหลุมเพื่อทำ Indirect ELISA พบว่า ทั้ง 20 โคลน ให้ผลบวกทั้งหมดต่อแอนติเจน CPAMAZ-OVA สำหรับ AMOZ-OVA จะมีทั้งหมด 10 โคลนที่ให้ผลบวก และ BSA และ OVA นั้นไม่มีโคลนที่ให้ผลบวกเลย สรุปผลได้ดังแสดงในตารางที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า โคลนที่ได้ทั้งหมดนั้น จำเพาะต่อสาร CPAMAZ และมีบางโคลนที่จำเพาะต่อสาร AMOZ (แสดงค่าเป็นตัวเลขทึบในตาราง 4.14) โดยไม่มีโคลนใดที่ทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA ที่เชื่อมติดกับสาร CPAMAZ ที่ใช้ฉีดกระตุ้นและที่ใช้ในการคัดกรองโคลน หลังจากนั้นเมื่อทำการหาความเจือจางที่เหมาะสมในการทำ Indirect ELISA ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ประมาณ 0.8-1 ในจาน 96 หลุมที่เคลือบด้วย CPAMAZ-OVA (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะพบว่าแต่ละโคลนจะต้องใช้ความเจือจางที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ไม่เจือจางเลย, 1:25, 1:50 และ 1:100 ดังแสดงในตารางที่ 4.14 ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการสร้างแอนติบอดีของแต่ละโคลนจะแตกต่างกัน เมื่อได้ความเจือจางที่เหมาะสมแล้วนำไปหาไอโซไทป์ของแต่ละโคลนดังผลข้างต้นในข้อที่ 4.5.1 และนำแอนติบอดีไปทดสอบความจำเพาะกับตัวแข่งขันในรูปอิสระในโตรฟูแรนที่ต้องการทั้ง 4 รูป คือ CPAMAZ NPAMAZ AMOZ และ FTD ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับแอนติบอดีที่ไม่เติมตัวแข่งขันอิสระ ผลที่ได้พบว่าทั้ง 20 โคลนจะจำเพาะต่อสาร CPAMAZ NPAMAZ และ FTD เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเท่ากับค่าตัวควบคุมลบ สาเหตุเกิดจากการเติมตัวแข่งขันในรูปอิสระดังกล่าวลงไปพร้อมกับแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลน ส่งผลให้เกิดการแข่งขันระหว่างตัวแข่งขันในรูปอิสระกับแอนติเจนบนจาน 96 หลุม ทำให้เหลือแอนติบอดีที่จะไปจับกับแอนติเจนที่เคลือบบนหลุมน้อยลง เมื่อเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วยแอนติบอดี HRP จะส่งผลให้มีแอนติบอดีเพียงเล็กน้อยเข้าทำปฏิกิริยากับ Substrate OPD เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจึงให้ค่าที่ต่ำลงเมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่ได้เติมตัวแข่งขันในรูปอิสระ และพบว่า มี 2 โคลนที่จำเพาะต่อตัวแข่งขัน AMOZ ในรูปอิสระ ได้แก่ โคลน 2E5.1 (F5/2/1) และ 2H6 (F5/4/3) จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่จะนำไป ทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยคัดเลือกจากผลในตารางที่ 4.14 ได้ทั้งหมดจำนวน 5 โคลน ซึ่งเป็นโคลนที่มีความจำเพาะต่อตัวแข่งขันในรูปอิสระทั้ง 4 ตัว มีจำนวน 2 โคลน คือ 2E5.1 (F5/2/1) และ 2H6 (F5/4/3) สำหรับ 3 โคลนที่เลือกจะทำต่อสาร CPAMAZ NPAMAZ และ FTD ซึ่งได้แก่ 4F1 (F5/5/1) 7H8 (F5/17/4) และ 8B1.1 (F5/18/2)

ตารางที่ 4.14 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบความจำเพาะของ โมโน โคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAM0Z , NPAM0Z , AM0Z และ FTD

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	แอนติเจนเคลือบจาน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				ความเจือจาง ที่เหมาะสม	ไอโซไทป์	ตัวแข่งขันในรูปอิสระ (Competitor) 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร				
	CPAM0Z-OVA	AM0Z-OVA	BSA	OVA			ไม่เติม Competitor	CPAM0Z	NPAM0Z	AM0Z	FTD
1F2 (F5/1/1)	2.672	1.581	0.117	0.187	1:25	IgG2b	0.866	0.131	0.135	0.829	0.156
2E5.1 (F5/2/1)	2.494	1.706	0.150	0.170	1:100	IgG2b	1.011	0.124	0.103	0.127	0.140
2E9 (F5/3/5)	2.288	0.355	0.130	0.173	1:50	IgG1	0.947	0.150	0.139	1.111	0.180
2H6 (F5/4/3)	2.126	0.934	0.148	0.186	1:25	IgG1	0.992	0.127	0.105	0.124	0.089
4F1 (F5/5/1)	2.257	0.787	0.155	0.156	1:50	IgG2a	1.079	0.142	0.141	0.965	0.203
4H3 (F5/6/1)	2.388	0.554	0.171	0.138	1:25	IgG1	1.082	0.109	0.106	1.043	0.187
5A7 (F5/7/1)	1.309	0.163	0.155	0.237	ไม่เจือจาง	IgG2b	0.706	0.193	0.422	0.727	0.194
5F1 (F5/8/1)	1.981	0.830	0.130	0.171	1:25	IgG1	0.906	0.165	0.152	0.663	0.172
5G10.2 (F5/9/2)	2.507	1.242	0.139	0.175	1:50	IgG1	0.841	0.126	0.113	0.755	0.194
5G10.3 (F5/10/4)	2.531	1.329	0.151	0.159	1:50	IgG1	1.000	0.182	0.115	0.836	0.129
5H7 (F5/11/4)	2.412	1.179	0.147	0.156	1:25	IgG1	0.817	0.122	0.106	0.664	0.143
6B3.1 (F5/12/2)	2.274	0.798	0.164	0.166	1:25	IgG1	0.905	0.118	0.145	0.592	0.064
6B3.2 (F5/13/1)	1.948	0.715	0.085	0.093	1:25	IgG1	1.142	0.112	0.125	0.862	0.117
6B3.3 (F5/14/1)	2.121	0.752	0.136	0.155	1:25	IgG1	1.081	0.109	0.164	0.794	0.109
6G2 (F5/15/1)	2.355	1.398	0.124	0.129	1:50	IgG1	1.247	0.185	0.173	1.127	0.141
7G4 (F5/16/2)	2.543	0.496	0.087	0.158	1:50	IgG1	1.080	0.467	0.121	1.131	0.403
7H8 (F5/17/4)	2.715	0.578	0.147	0.205	1:100	IgG2b	0.885	0.513	0.330	0.971	0.267
8B1.1 (F5/18/2)	2.390	0.801	0.101	0.171	1:100	IgG1	0.786	0.136	0.106	0.690	0.121
8B4 (F5/19/4)	2.358	1.092	0.099	0.165	1:100	IgG1	0.767	0.139	0.084	0.740	0.119
8E2 (F5/20/3)	2.487	1.201	0.088	0.171	1:100	IgG1	0.843	0.130	0.124	0.753	0.096
*ตัวควบคุมบวก	1.069	0.765	0.624	0.288	-	-	-	-	-	-	-
*ตัวควบคุมลบ	0.237	0.224	0.261	0.257	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบคือค่าที่ให้ผลบวก

จากการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 20 โคลนด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ใช้เคลือบจานทดสอบ ELISA 96หลุม ได้แก่ CPAMAZ-OVA และ AMOZ-OVA จะเห็นได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 20 โคลนทำปฏิกิริยากับแอนติเจน CPAMAZ-OVA และแอนติบอดีจากบางโคลนทำปฏิกิริยากับ AMOZ-OVA ซึ่งจากการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี indirect competitive ELISA กับแอนติเจนในรูปอิสระทั้ง 4 รูป จะพบว่าโมโนโคลนทุกโคลนทำปฏิกิริยากับ CPAMAZ NPAMAZ และ FTD ในรูปอิสระได้ แต่จะมีโมโนโคลน 2 โคลนที่ทำปฏิกิริยา AMOZ ในรูปอิสระได้อย่างชัดเจนคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 2E5.1 และ 2H6 (ตารางที่ 4.14) จากการเปรียบเทียบการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับ AMOZ-OVA ก็จะไม่สามารถจับกับ AMOZ ในรูปอิสระได้ แต่แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับ AMOZ-OVA จากบางโคลนเท่านั้นที่จะสามารถจับกับ AMOZ ในรูปอิสระได้ อาจเนื่องมาจากความสามารถของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยากับ AMOZ บนเอพิโทปที่แตกต่างกันคือถ้าแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ทั้งในรูป AMOZ-OVA และ AMOZ แสดงว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับ เอพิโทปที่มีอยู่บนแอนติเจนในรูป conjugate และรูปอิสระ แต่ถ้าแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ AMOZ-OVA แต่ไม่ทำกับ AMOZ ในรูปอิสระแสดงว่าเอพิโทปนั้นมีเฉพาะบน AMOZ-OVA ซึ่งอยู่ในรูป conjugate เท่านั้น ซึ่ง เอพิโทปที่เปลี่ยนแปลงไปนี้อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาในระหว่างขั้นตอนการ conjugate

4.5.3 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม ด้วยวิธี indirect ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการคัดเลือกมาทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุมและของแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.8-1.0 โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของ CPAMAZ-OVA ในช่วง 0.0625-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีอยู่ในช่วง 1:10-1:1280 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกมา 5 โคลน ได้แก่ 2E5.1 (F5/2/1) 2H6 (F5/4/3) 4F1 (F5/5/1) 7H8 (F5/17/4) และ 8B1.1 (F5/18/2) ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากัน ได้ค่าดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ประมาณ 1 มีอยู่หลายความเข้มข้นแต่เนื่องจากการที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลนจึงเลือกใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมจาก 5 โคลน โดยเจือจางที่ 1:640 1:40 1:160 1:640 และ 1:320 ตามลำดับเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆด้วยวิธี indirect competitive ELISA ต่อไป

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรในการหาความเข้มข้นของแอนติเจน และ ความเงาของโมนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบ ความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม ด้วยวิธี indirect ELISA

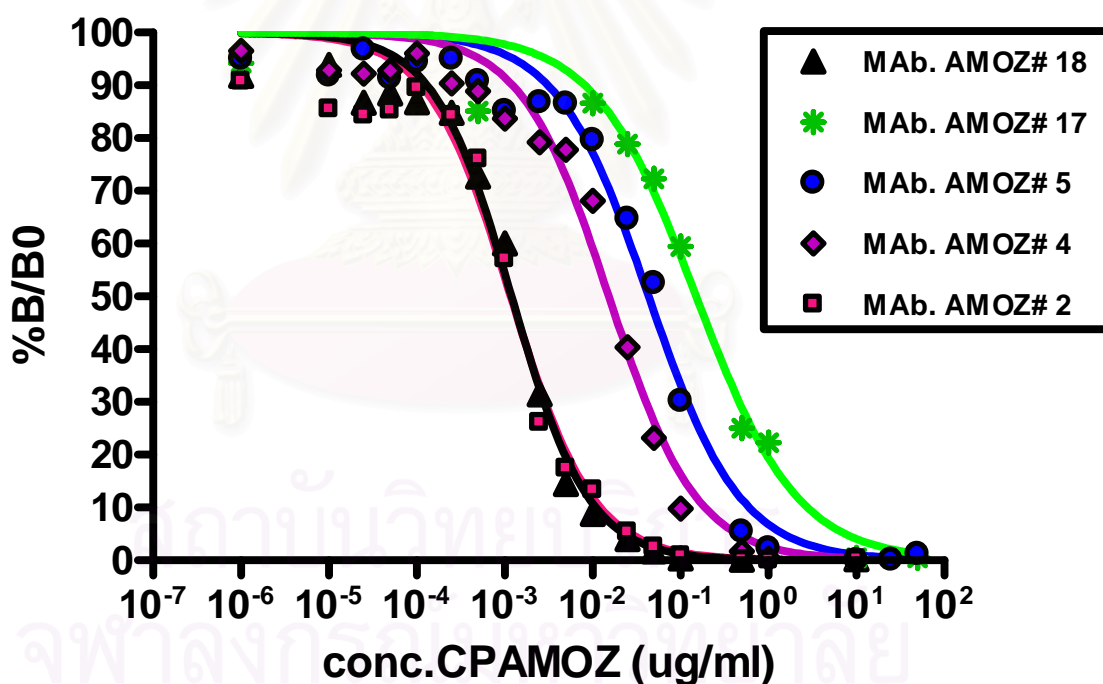
dilution	Clone F5/2/1					Clone F5/4/3					Clone F5/5/1					Clone F5/17/4					Clone F5/18/2				
	Ag. Coat plate CPAMoz-OVA (ug/ml)					Ag. Coat plate CPAMoz-OVA (ug/ml)					Ag. Coat plate CPAMoz-OVA (ug/ml)					Ag. Coat plate CPAMoz-OVA (ug/ml)					Ag. Coat plate CPAMoz-OVA (ug/ml)				
	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
1:10	2.946	2.817	2.424	2.042	1.571	2.687	2.314	1.658	1.039	0.460	2.887	2.634	1.952	1.389	0.500	2.792	2.638	2.094	1.889	0.774	2.854	2.673	1.856	1.803	0.519
1:20	2.867	2.756	2.283	1.956	1.428	2.486	1.767	1.501	0.584	0.304	2.766	2.357	1.854	1.059	0.457	2.758	2.551	2.070	1.608	0.747	2.713	2.487	1.831	1.660	0.480
1:40	2.771	2.627	2.321	1.814	1.324	2.396	1.627	1.062	0.563	0.261	2.671	2.279	1.791	1.000	0.398	2.726	2.427	2.032	1.470	0.704	2.652	2.424	1.842	1.194	0.449
1:80	2.799	2.533	2.134	1.583	1.132	2.159	1.317	0.722	0.364	0.199	2.642	2.146	1.498	0.874	0.338	2.629	2.242	1.885	1.343	0.606	2.691	2.301	1.720	1.029	0.399
1:160	2.617	2.251	1.823	1.249	0.917	1.657	0.848	0.470	0.234	0.139	2.529	1.811	1.176	0.657	0.285	2.333	1.906	1.534	1.155	0.538	2.489	2.050	1.441	0.826	0.305
1:320	2.501	1.975	1.540	1.069	0.393	1.268	0.622	0.313	0.101	0.102	2.208	1.511	0.936	0.444	0.165	2.109	1.684	1.416	0.933	0.323	2.208	1.738	1.139	0.725	0.217
1:640	2.055	1.509	1.187	0.411	0.271	0.956	0.400	0.166	0.054	0.073	1.746	1.015	0.697	0.339	0.150	1.539	1.244	0.977	0.645	0.281	1.763	1.230	0.764	0.357	0.160
1:1280	1.574	1.101	0.811	0.116	0.061	0.634	0.279	0.160	0.104	0.046	1.149	0.763	0.511	0.123	0.098	1.136	0.853	0.776	0.275	0.165	1.246	0.965	0.629	0.179	0.140

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการหาคุณสมบัติของโมนโคลนต่อไป

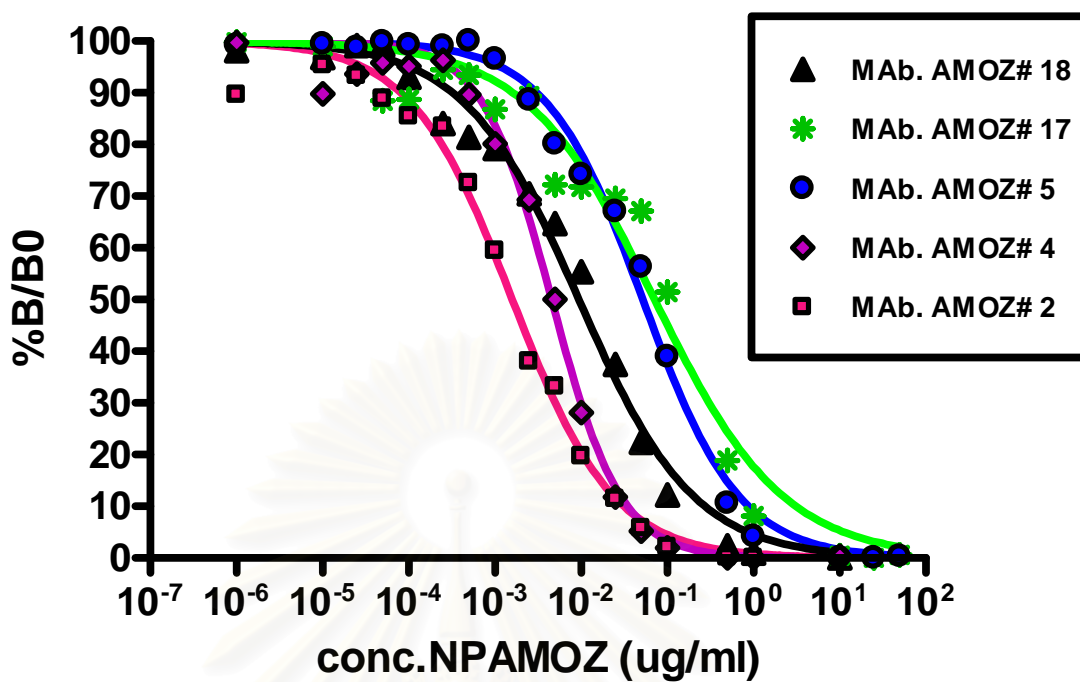
4.5.4 การทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

4.5.4.1 การทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMAZ NPAMAZ AMOZ และ FTD

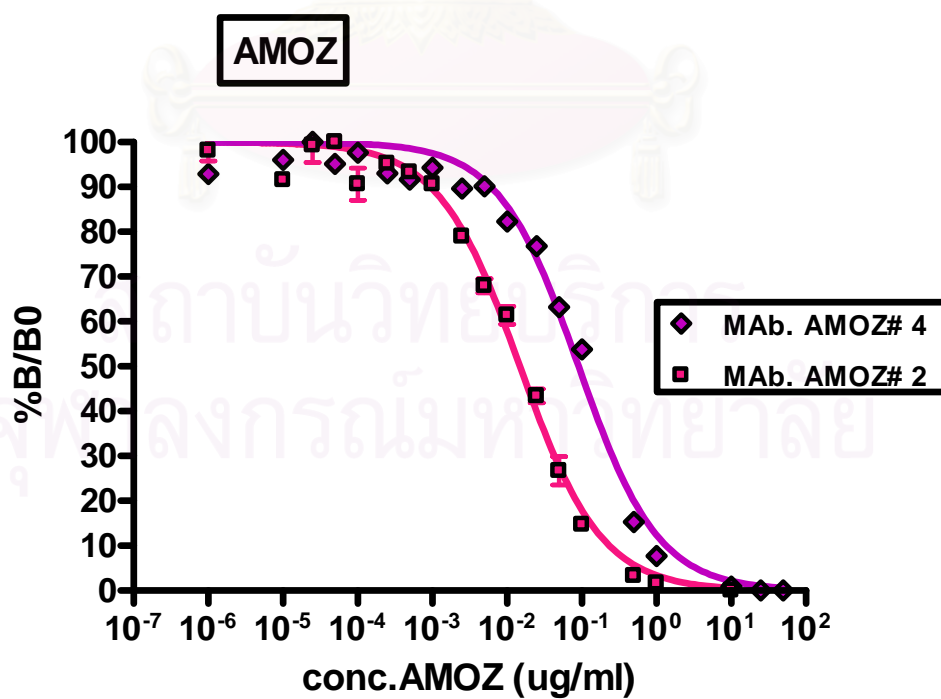
จากการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน ได้แก่ 2E5.1(F5/2/1) 2H6(F5/4/3) 4F1 (F5/5/1) 7H8 (F5/17/4) และ 8B1.1 (F5/18/2) เพื่อความสะดวกจึงตั้งชื่อโคลนใหม่เป็น AMOZ#2 AMOZ#4 AMOZ#5 AMOZ#17 และ AMOZ#18 ตามลำดับ มาทำการทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMAZ NPAMAZ AMOZ และ FTD ที่อยู่ในรูปอิสระโดยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังแสดงรูปที่ 4.10 - 4.13 ตามลำดับ พร้อมทั้งแสดงค่า 50 เปอร์เซ็นต์ inhibition concentration (IC₅₀) , Limit of Detection (LOD) และ ค่า Limit of quantification (LOQ) ดังตารางที่ 4.16



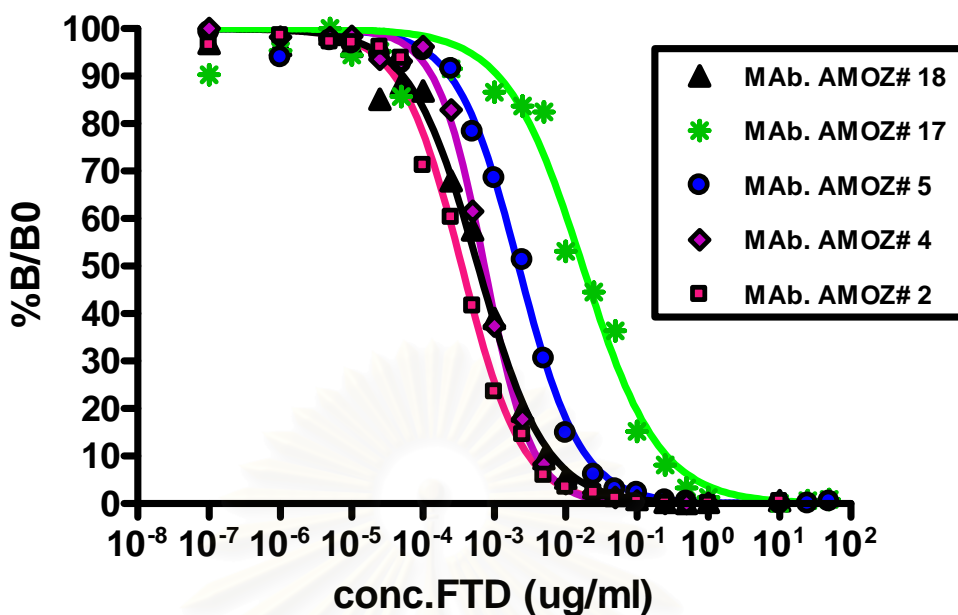
รูปที่ 4.10 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMAZ



รูปที่ 4.11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPAMOZ



รูปที่ 4.12 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AMOZ



รูปที่ 4.13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร FTD

การทดสอบหาค่า IC₅₀ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ AMOZ ในรูปอิสระได้ดังนี้คือ แอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ทำปฏิกิริยากับ AMOZ ได้แก่แอนติบอดี AMOZ#2 และ AMOZ#4 แอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ไม่ทำปฏิกิริยากับ AMOZ ได้แก่แอนติบอดี AMOZ#5 และ AMOZ#18 นำมาทำปฏิกิริยากับ CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD ด้วยวิธี indirect competitive ELISA จากผลการทดลอง (ดังรูปที่ 4.10-4.13 และตารางที่ 4.16) พบว่า

เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร CPAMOZ ให้ค่า IC₅₀ เป็น 1.536 20.750 56.160 217.700 และ 1.562 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.081 1.000 0.750 20.250 และ 0.180 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ ก.4-8 ในภาคผนวก ก)

เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร NPAMOZ ให้ค่า IC₅₀ เป็น 2.034 5.223 57.560 119.800 และ 12.770 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.110 0.160 4.570 3.130 และ 0.110 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ ก.9-13 ในภาคผนวก ก)

เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร FTD ให้ค่า IC₅₀ เป็น 0.355 0.743 2.449 22.180 และ 0.672 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.118 0.190 0.520 2.360 และ 0.129 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ ก.16-20 ในภาคผนวก ก)

สำหรับสาร AMOZ จะมี 2 โคลนเท่านั้นที่จำเพาะ ได้แก่โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#4 ซึ่งจะให้ค่า IC₅₀ เป็น 17.730 และ 112.900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า LOD อยู่ที่ 1.260 และ 8.750 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ ก.14-15 ในภาคผนวก ก)

จากผลการทดสอบหาค่า IC50 และ ค่า LOD ที่ได้จาก รูปที่ 4.10-4.13 และตารางที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 โคลน AMOZ#2 มีความไว (sensivity) สูงที่สุด และแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 คือ โคลน AMOZ#18 มีความไวสูงสุด ดังนั้นจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนมาเลี้ยงเพื่อให้ผลิตแอนติบอดีก่อนนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำห้บริสุทธิ์ต่อไปในข้อ 4.6



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 ค่า IC50 LOD และ LOQ ในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD

รหัสโมโนโคลน	ตัวแข่งขันในรูปอิสระ(Competitors)											
	CPAMOZ			NPAMOZ			AMOZ			FTD		
	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
AMOZ#2	1.185	0.170	0.561	1.594	0.135	0.446	14.980	1.420	4.686	0.355	0.118	0.389
AMOZ#4	15.320	1.350	4.455	4.553	0.376	1.241	90.630	4.710	15.542	0.743	0.190	0.627
AMOZ#5	43.380	2.420	7.986	57.560	4.570	15.081	-	-	-	2.189	0.502	1.657
AMOZ#17	150.900	22.450	74.085	72.340	3.761	12.411	-	-	-	17.560	2.550	8.415
AMOZ#18	1.196	0.200	0.660	12.770	0.135	0.446	-	-	-	0.591	0.122	0.403

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือค่า IC50 LOD และ LOQ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกมาทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.5.4.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน (Cross Reactivity)

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ได้ 1 โคลน และ ครั้งที่ 5 ได้ 20 โคลน รวมทั้งหมดเป็น 21 โคลน ซึ่งได้แสดงค่าการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนทั้ง 21 โคลน (ตารางที่ ก.9-13 ในภาคผนวก ก) ในที่นี้จะแสดงค่าในตารางที่ 4.17 เพียง 5 โคลนที่ทำการคัดเลือกมาได้ กับสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ FTD และสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ ทั้งรูปที่เป็น สารตั้งต้น, สารแม่แบบไลต์ และ สารอนุพันธ์ แล้ว นำมาคำนวณเป็นค่า 50 เปอร์เซ็นต์ inhibition concentration (IC50) และ เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม แสดงดังตารางที่ 4.17

จากผลในตารางที่ 4.17 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนจะทำปฏิกิริยาข้ามเฉพาะกับสารที่ต้องการทั้ง 4 รูปคือ CPAMOZ (ใช้ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง) NPAMOZ (อนุพันธ์ที่ใช้สำหรับตรวจหาสารตกค้างชนิดนี้ด้วยเทคนิคทางเคมี) AMOZ (สารแม่แบบไลต์) FTD (parent drug ที่ใช้เติมในอาหารสัตว์) และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ ซึ่งจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.17) การที่ทุกโคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารตัวอื่นๆ เลยนั้น แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารFTD และสารอนุพันธ์ของ FTD ได้สูง จึงไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ

4.5.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 21 โคลนที่ได้ กับสารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนต่างๆ ได้แก่ สารที่ใช้เปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ (CBA) สารกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ และ สารในกลุ่มยาปฏิชีวนะ พบว่า ทั้ง 21 โคลน (ตารางที่ ก.14-18 ในภาคผนวก ก) ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มเลย ดังตารางที่ 4.17 (ในตารางจะแสดงค่าเฉพาะ 5 โคลนที่ได้ทำการคัดเลือกมาแล้ว) โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการแข่งขันถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดูดกลืนแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับที่ไม่ใส่สาร โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ได้ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.17 ค่า IC₅₀ และการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity ; CR) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ FTD สารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูเร็น

Competitors		AMOZ# 2		AMOZ#4		AMOZ#5		AMOZ#17		AMOZ#18	
		CR (%)	IC ₅₀ (ng/ml)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/ml)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/ml)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/ml)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/ml)
Nitrofurans	CPAMOZ (Derivative form)	100.00	1.185	100.00	15.320	100.00	43.380	100.00	150.900	100.00	1.196
	NPAMOZ (Derivative form)	74.34	1.594	336.48	4.553	75.37	57.560	208.60	72.340	9.37	12.770
	AMOZ (Metabolite form)	7.91	14.980	16.90	90.630	-	-	-	-	-	-
	Furaltadone (FTD;parent drugs)	333.80	0.355	2061.91	0.743	1981.73	2.189	859.34	17.560	202.37	0.591
	Furazolidone (FZD)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	AOZ (Metabolite form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	NPAOZ (Derivative form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Nitrofurantoin (NFT)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	AHD (Metabolite form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	NPAHD (Derivative form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Nitrofurazone (NFZ)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	SCA (Metabolite form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
NPSCA (Derivative form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	
Derivatising reagent	3-carboxybenzaldehyde (CBA)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
β-agonists	Clenbuteral	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Salbutamal	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
Antibiotics	Chloramphenicol (CAP)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Norfloracin	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	PenicilinG	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Flumequine	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Oxytetracycline	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000

4.6 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

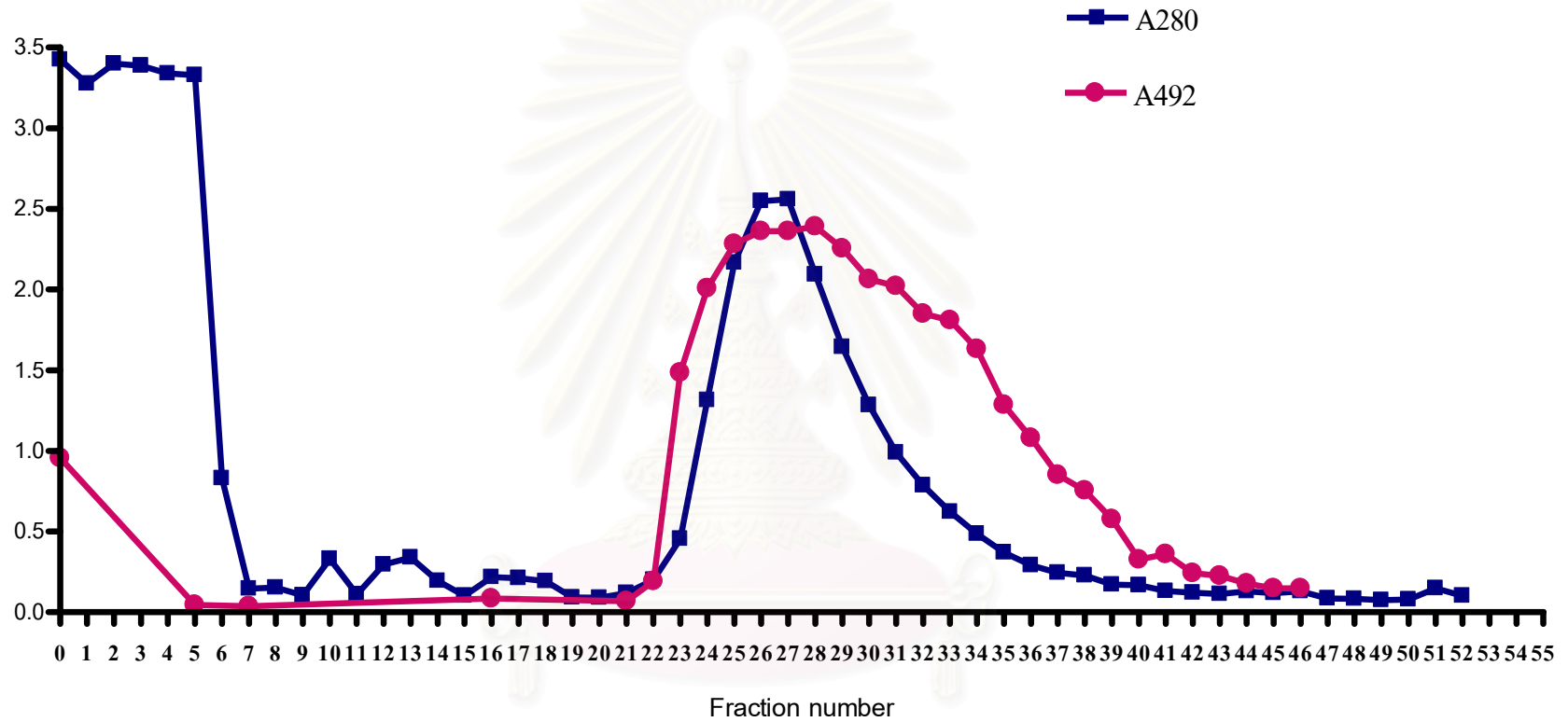
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 มีความไวสูง ดังนั้นจึงเลือกเซลล์ไฮบริโดมาจากโคลนดังกล่าวมาเพิ่มจำนวนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้แอนติบอดีปริมาณมากสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

4.6.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ

จากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีของ โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ซึ่งมีไอโซไทป์ เป็น IgG2b และ IgG1 ตามลำดับ มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ โปรตีน เอ แยกด้วยเครื่องแยกโปรตีน โดยแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีน เอ ที่ pH 8 โดยที่โปรตีนและสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่จับกับ โปรตีน เอ ซึ่งที่ค่า pH เป็น 6 และ 3.5 ค่าสัมพรรคภาพของแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ เป็น IgG1 และ IgG2b ต่อโปรตีน เอ จะลดลง ตามลำดับ ซึ่งจะส่งผลให้แอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ดังกล่าวจะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้

ผลจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ของโคลน AMOZ#2 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14 พบว่าเมื่อนำแต่ละ fraction ที่เก็บได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่าในหลอดทดลองที่ 21 ถึงหลอดที่ 38 นั้นมีแอนติบอดีที่บริสุทธิ์อยู่ในช่วงกราฟ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร) ที่เป็นพีคของแอนติบอดีที่บริสุทธิ์จึงได้นำแอนติบอดีมารวมกันและนำไปวัดปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดีต่อ (ตารางที่ 4.19) และเมื่อนำแต่ละ fraction ไปทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้ความเจือจางที่ 1:1000 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

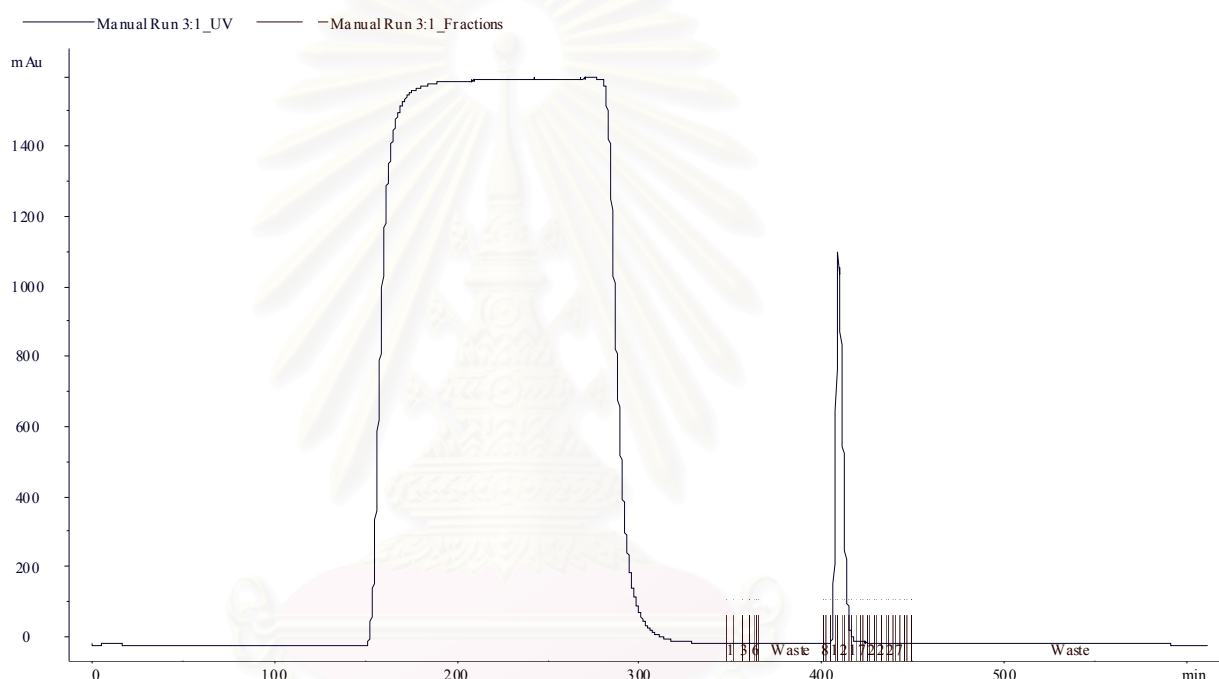
ค่าดูดกลืนแสง



รูปที่ 4.14 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ (-■-) แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (-●-) แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ทดสอบแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ผลจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องแยกโปรตีน แสดงผลที่ได้จากโปรแกรม Prime View Evaluation ดังรูปที่ 4.15 โดยพีคแรกจะเป็นพีคของ unbound ในขณะที่มีการ load น้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดี เข้าคอลัมของโปรตีนเอ และพีคที่ 2 เป็นพีคของแอนติบอดีที่บริสุทธิ์แล้ว

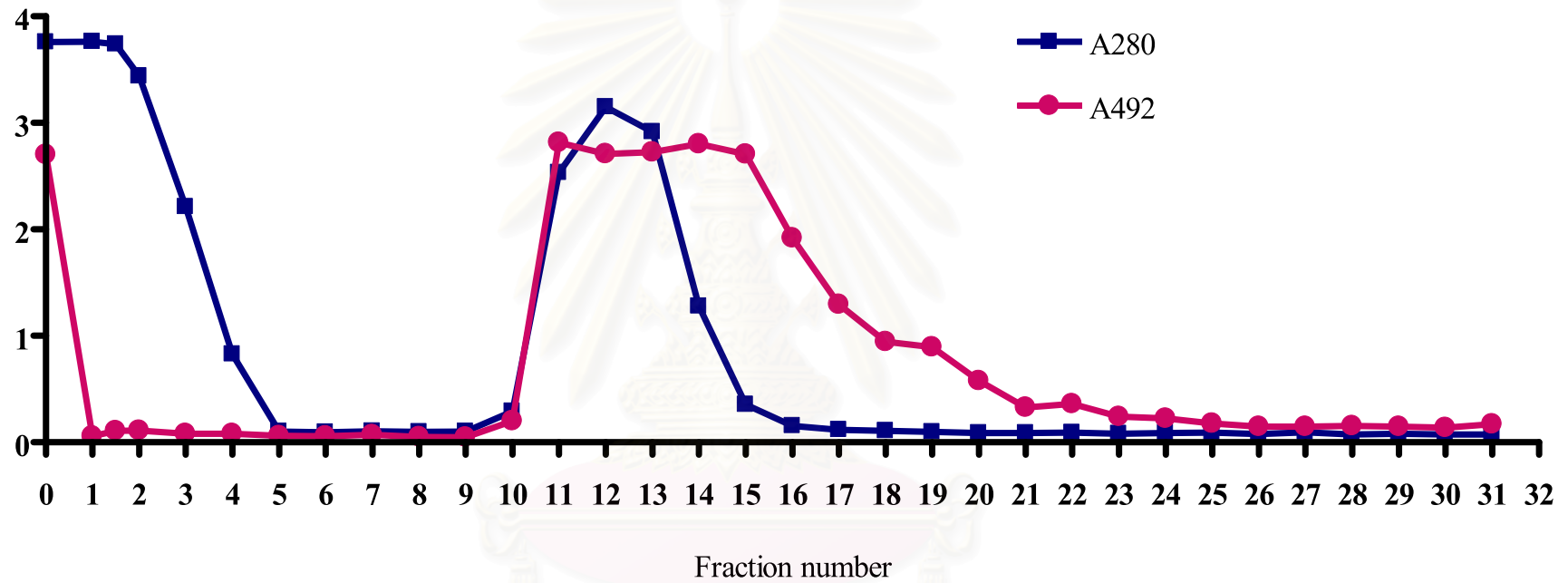
ที่ถูกชะออกมาจากคอลัม (ชะด้วย pH 3.5) หลังจากนั้นนำแต่ละ fraction ที่เก็บได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทดสอบแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA ต่อไป (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ ด้วยเครื่องแยกโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าดูดกลืนแสง



รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#18 ให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีนเอ (-■-) แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (-●-) แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ทดสอบแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 4.16 พบว่าเมื่อนำแต่ละ fraction ที่เก็บได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่าในหลอดทดลองที่ 10 ถึงหลอดที่ 16 นั้นมีแอนติบอดีที่บริสุทธิ์อยู่ในช่วงกราฟ(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร) ที่เป็นพีคของแอนติบอดีที่บริสุทธิ์จึงได้นำแอนติบอดีมารวมกันและนำไปวัดปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดีต่อ(ตารางที่ 4.18) และเมื่อนำแต่ละ fraction ไปทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้ความเจือจางที่ 1:1000 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

4.6.2 การหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยวิธี BCA

จากการนำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีจากสูตร พบว่าไม่สามารถคำนวณปริมาณโปรตีนได้เนื่องจากในสูตรได้กำหนดว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 260:280 ต้องได้ไม่เกิน 0.6 ผลที่ได้เกิน 0.6 สาเหตุเนื่องจาก ได้เติม 0.01% Thimerosal ลงไปในแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ จึงส่งผลให้ Thimerosal ที่เติมลงไป รบกวนค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ดังนั้นจึงนำแอนติบอดีที่ได้มาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.21 ในภาคผนวก ก) ได้ปริมาณโปรตีนดังตารางที่ 4.19 พบว่าปริมาณโปรตีน ของน้ำเลี้ยงเซลล์ของโคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 4.46 และ 3.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะมีปริมาณโปรตีนเป็น 1.50 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.18)

4.6.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

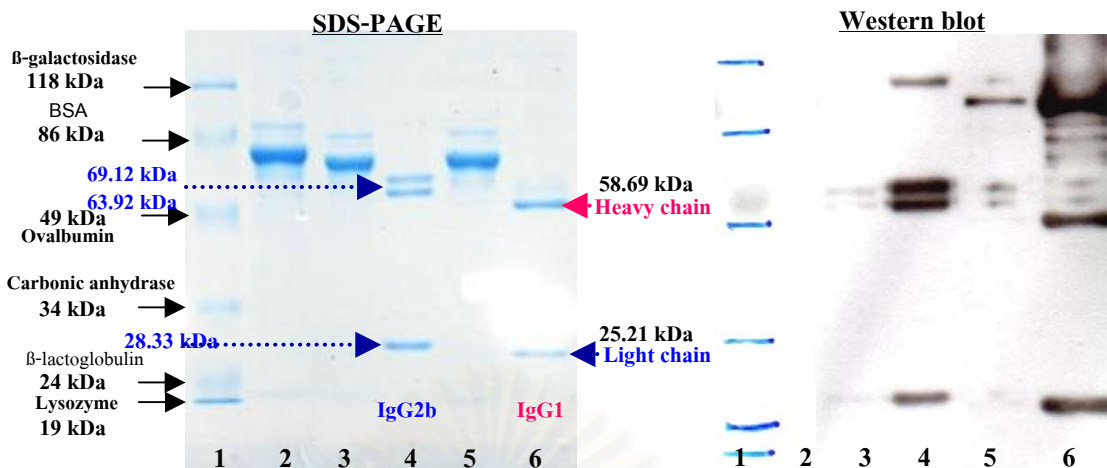
จากตารางที่ 4.18 แสดงผลการหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.22 ในภาคผนวก ก) ผลที่ได้พบว่า ปริมาณแอนติบอดีของน้ำเลี้ยงเซลล์ของโคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะมีปริมาณแอนติบอดีอยู่ที่ 1.48 และ 2.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ (%purity) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน ได้เป็น 98.7 และ 107.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.18 ผลปริมาณโปรตีน ปริมาณแอนติบอดี เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ตัวอย่าง		ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี BCA		ปริมาณแอนติบอดี (ELISA)		%recovery	%purity
		mg/ml	Total (mg)	mg/ml	Total (mg)		
AMOZ#2	ก่อนทำบริสุทธิ์	4.46	2.01x10 ³	0.55	247.50	-	12.3
	หลังทำบริสุทธิ์	1.50	54.0	1.48	53.28	22	98.7
AMOZ#18	ก่อนทำบริสุทธิ์	3.18	1.43x10 ³	1.92	211.20	-	14.8
	หลังทำบริสุทธิ์	1.90	28.5	2.04	30.60	14.5	107.4

4.6.4 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

เมื่อเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลจะทำให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของสาย Polypeptide ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ ดังรูปที่ 4.17



Lane

- 1 = โปรตีนมาตรฐาน (Standard protein marker ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร)
- 2 = ซีรัมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์โมโนโคลน (FBS ; 5 ไมโครกรัม)
- 3 = น้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#2 ก่อนทำให้บริสุทธ์มี 10 % FBS (5 ไมโครกรัม)
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี(AMOZ#2) หลังทำให้บริสุทธ์แล้ว (5 ไมโครกรัม) ; มีไอโซไทป์เป็น IgG2b
- 5 = น้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#18 ก่อนทำให้บริสุทธ์มี 10 % FBS (5 ไมโครกรัม)
- 6 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี(AMOZ#18) หลังทำให้บริสุทธ์แล้ว (5 ไมโครกรัม) ; มีไอโซไทป์เป็น IgG1

รูปที่ 4.17 แสดงแถบของสาย Heavy chain และ Light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ก่อนทำให้บริสุทธ์ และหลังจากบริสุทธ์

จากผลในรูปที่ 4.17 เมื่อนำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธ์แล้วไปตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE หลังจากย้อมด้วยสี Coomassie blue เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ก. 23 ในภาคผนวก ก) พบโปรตีน ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (AMOZ#2) ที่มีไอโซไทป์เป็น IgG2b นั้นมีแถบของสาย Heavy chain 2 สาย ซึ่งมีขนาด 69.12 และ 63.92 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot พบว่าทั้ง 2 สายนี้เป็นสายของแอนติบอดี เนื่องจากเกิดเป็นแถบของ Heavy chain ทั้ง 2 แถบ บนแผ่นฟิล์ม x-ray เช่นเดียวกับที่พบบนเจลจากวิธี SDS-PAGE โดยพบแถบของสาย Light chain ของ AMOZ#2 มีขนาด 28.33 กิโลดาลตัน สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (AMOZ#18) ที่มีไอโซไทป์เป็น IgG1 ภายหลังจากทำให้บริสุทธ์แล้วจะเห็นแถบของสาย Heavy chain และ Light chain มีขนาด 58.69 และ 25.21 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานในรูปที่ 4.17 ช่องที่ 1 ได้แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุล ในตารางที่ ก. 19 ในภาคผนวก ก

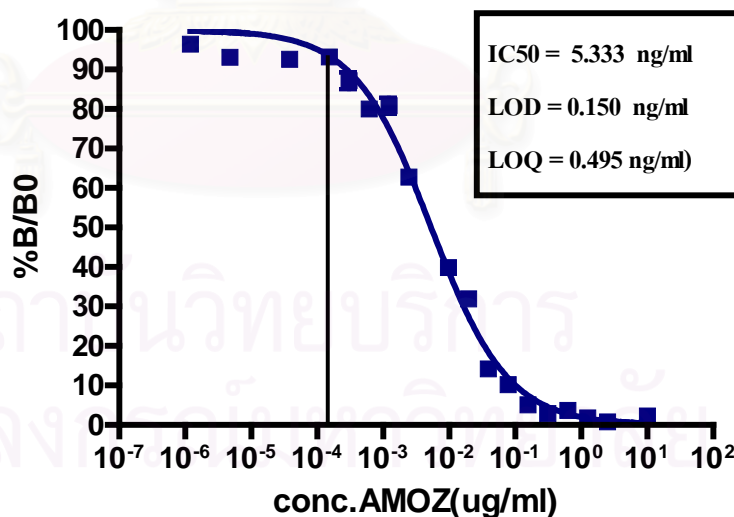
จากผลการทดลองที่ได้กล่าวได้ว่าสาเหตุที่แถบของสาย Heavy chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 (IgG2b) มี 2 แถบ ส่วน AMOZ#18 (IgG1) มี 1 แถบ อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 มีความแตกต่างกันเพราะเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ที่ต่างกัน

4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

4.7.1 การทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD

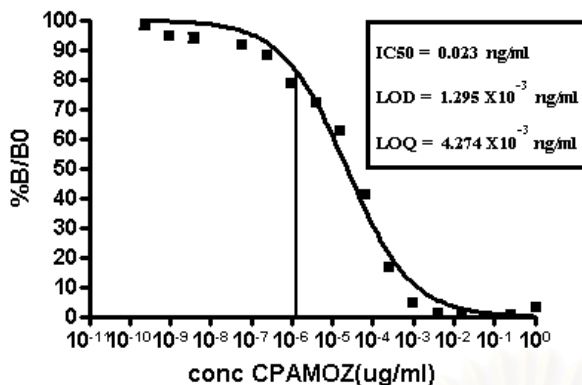
จากการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีมา 2 โคลน ได้แก่ 2E5.1(AMOZ#2) และ 8B1.1 (AMOZ#18) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการ affinity chromatography ด้วยโปรตีนเอ แล้วจึงนำแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในโตรฟูเรนฟูรีลทาโคนทั้ง 4 รูป ได้แก่ CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD ที่อยู่ในรูปอิสระ ดังแสดงผลใน รูปที่ 4.18

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2

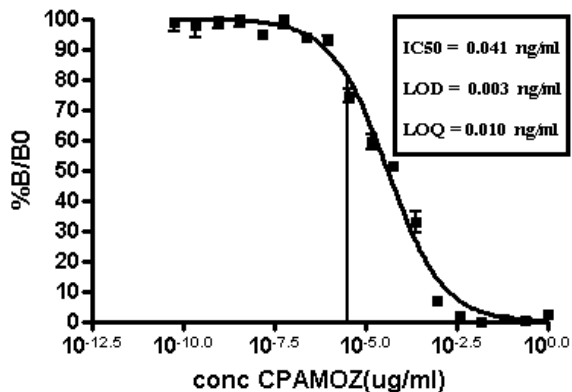


รูปที่ 4.18 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร AMOZ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2

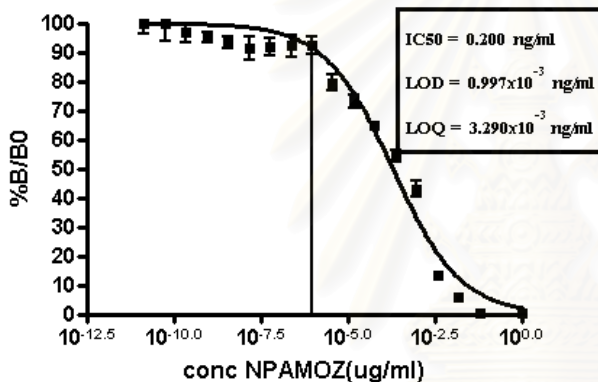


โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18

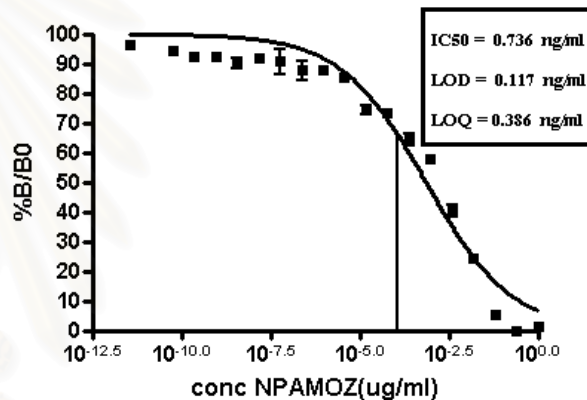


รูปที่ 4.19 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร CPAMZO

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2

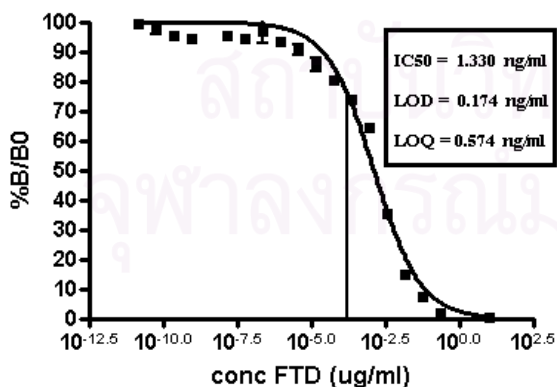


โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18

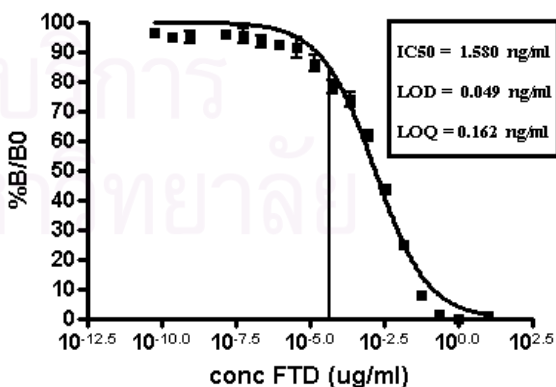


รูปที่ 4.20 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร NPAMZO

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2



โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18



รูปที่ 4.21 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน AMOZ#2 และ AMOZ#18 ที่บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร FTD

จากรูปที่ 4.18- 4.21 แสดงค่า 50 เปอร์เซ็นต์ Inhibition concentration (IC50) , Limit of Detection (LOD) และ ค่า Limit of quantification (LOQ) ของการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#2 ที่ความเข้มข้น 1:8000 และ AMOZ#18 กับสารอิสระ AMOZ CPAMOZ NPAMOZ และ FTD ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ถึง 1×10^{-6} พิกโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้แอนติเจน CPAMOZ-OVA 0.250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ได้ค่า IC50 LOD และ LOQ เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อสารอิสระ AMOZ ของแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์แสดงดังตารางที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีความไว (sensitivity) ต่อสารอิสระ AMOZ CPAMOZ NPAMOZ และ FTD มากกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ยังไม่บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.19 ค่า IC50 LOD และ LOQ ในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ Furaltadone (FTD) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และหลังให้บริสุทธิ์แล้ว

โมโนโคลนแอนติบอดี		AMOZ (ng/ml)		CPAMOZ (ng/ml)		NPAMOZ (ng/ml)		FTD (ng/ml)	
		IC50	LOD	IC50	LOD	IC50	LOD	IC50	LOD
AMOZ#2	ก่อนทำให้บริสุทธิ์	14.980	1.420	1.185	0.170	1.594	0.135	0.355	0.118
	หลังทำให้บริสุทธิ์	5.333	0.150	0.023	1.295×10^{-3}	0.200	0.997×10^{-3}	1.330	0.174
AMOZ#18	ก่อนทำให้บริสุทธิ์	-	-	1.196	0.200	12.770	0.135	0.591	0.122
	หลังทำให้บริสุทธิ์	-	-	0.041	0.003	0.736	0.117	1.580	0.049

จากตารางที่ 4.19 สรุปได้ว่าความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ จะมีความไว (ค่า IC50) ต่อสารแข่งขันในรูปอิสระ เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย เป็น CPAMOZ NPAMOZ FTD และ AMOZ ซึ่งจะให้ค่า IC50 เป็น 0.023 0.200 1.330 และ 5.333 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยจะให้ค่าปริมาณของสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เป็น 1.295×10^{-3} 0.997×10^{-3} 0.174 และ 0.150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 จะมีความไวโดยดูจากผล ค่า IC50 ต่อสารแข่งขันในรูปอิสระ เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย เป็น CPAMOZ NPAMOZ และ FTD จะให้ค่า IC50 เป็น 0.041 0.736 และ 1.580 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยจะให้ค่า LOD เป็น 0.003 0.117 และ 0.049 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลที่ได้จะเห็นว่าแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนที่ทำให้บริสุทธิ์จะให้

ค่า IC50 ต่อสารอิสระ FTD สูงขึ้นเมื่อเทียบกับแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์ แสดงให้เห็นว่าความไวต่อสารอิสระ FTD ลดลงอาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของสาร FTD นั้นมีความไวต่อแสงและสลายได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานานจึงมีอายุการใช้งานสั้น ซึ่งส่งผลให้สารดังกล่าวเกิดการสลายตัวไป จากผลที่ได้จึงสามารถบอกได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 จะมีความไวเพียงพอสำหรับการพัฒนาเป็นชุดตรวจหาสารตกค้าง AMOZ ซึ่งจะให้ค่าปริมาณของสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ของตัวแข่งขันอิสระ AMOZ เป็น 0.150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ามาตรฐานของสาร AMOZ ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ (MRL) ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ซึ่งกำหนดโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ให้ค่า MRL มีค่าเท่ากับ 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากประสิทธิภาพของโมโนโคลนที่ได้แสดงให้เห็นว่าโคลน AMOZ#2 สามารถตรวจสารในรูปอิสระได้ทั้ง 4 รูป สำหรับจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารอิสระ AMOZ ซึ่งจะให้ค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นงานวิจัยฉบับแรกที่สามารถตรวจสาร AMOZ ในรูปอิสระได้ด้วยวิธี ELISA โดยไม่ต้องเปลี่ยนอนุพันธ์ให้เป็น NPAMOZ ดังในการผลิตชุดตรวจสอบสาร AMOZ เชิงการค้า ของบริษัท Prime biotech ประเทศแคนาดา ซึ่งตรวจได้ในรูป NPAMOZ โดยตรวจในตัวอย่างเนื้อและกึ่งได้ปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 0.2 นาโนกรัมต่อกรัม ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาต่อในการผลิตชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพตรวจสอบสารตกค้าง AMOZ ที่อยู่ในรูปติดกับโปรตีนเนื้อสัตว์และรูปอิสระได้ต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดคือ 0.3 นาโนกรัมต่อกรัม และไม่ต้องเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารก่อนตรวจหรือตรวจเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีได้เนื่องจากโคลนที่ได้มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับสาร AMOZ ในรูปอนุพันธ์ (NPAMOZ) ด้วย และยังสามารถตรวจสอบสารตั้งต้น FTD ในอาหารสัตว์ก่อนเข้าสู่ระบบการเลี้ยงสัตว์ได้ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

หลังจากฉีดกระตุ้นหนูทดลอง 5 ตัวด้วยแอนติเจน CPAMoz-cBSA ซึ่งเตรียมได้จากนำสาร AMOZ มาเปลี่ยนอนุพันธ์ให้อยู่ในรูป CPAMoz ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 333.33 กรัมต่อโมล เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ได้เท่ากับ 335.25 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันและเมื่อทดสอบดูแถบของสารด้วยวิธี TLC มีค่า Rf อยู่ที่ 0.23 ซึ่งคาดว่าสารที่ได้เป็นสาร CPAMoz ส่วนโปรตีน cBSA เตรียมได้จากโปรตีน BSA ที่มีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น 31.60 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 0.761 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบน้ำหนักโมเลกุลของ BSA กับ cBSA ด้วย MALDI-TOF MS พบว่าเพิ่มขึ้นจาก 67,020 เป็น 67,268 ดาลตัน ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนของ BSA 1 โมเลกุล จะมีหมู่เอมีนเพิ่ม 15 โมเลกุล โดยจะช่วยเพิ่มโอกาสให้สาร CPAMoz เข้าจับหมู่เอมีนบนโปรตีน cBSA ซึ่งการเชื่อมติดได้ใช้สาร NHS และ EDC เป็นตัวช่วยในการเชื่อมติดได้เป็นแอนติเจน CPAMoz-cBSA ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 1.78 มิลลิกรัม คิดค่าการเชื่อมติดเป็น 83.63 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 76,407 ดาลตัน โดยมีอัตราการเชื่อมติดของ cBSA 1 โมเลกุลจะมีสาร CPAMoz ติด 27 โมเลกุล สำหรับแอนติเจนที่ใช้สำหรับทำ ELISA ใช้แอนติเจน CPAMoz-OVA ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 7.838 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าการเชื่อมติดเป็น 16.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเชื่อมติดกับสารแล้วมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็น 45,221 ดาลตัน ซึ่งคิดอัตราส่วนการเชื่อมติดของ OVA 1 โมเลกุล จะมีสาร CPAMoz ติด 1.4 โมเลกุล นำแอนติเจนที่ได้ไปใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 1-5 พบว่าจะให้ระดับแอนติบอดีเป็น 1:64000 1:16000 1:128000 1:64000 และ 1:128000 ตามลำดับ

หลังจากทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมกับสารแข่งขันอิสระ CPAMoz NPAMoz และ AMOZ ที่ความเข้มข้น 0 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 1-5 มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับสาร CPAMoz NPAMoz และ AMOZ ในรูปอิสระ เมื่อหลอมรวมเซลล์ม้าของหนู 5 ตัว สามารถสรุปได้ว่าการหลอมรวมเซลล์ ครั้งที่ 1 และ 2 ได้จำนวนเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 39 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ได้เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ CPAMoz เป็น 24 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อโคลนเซลล์ซ้ำให้ได้เซลล์เดี่ยวพบว่าเซลล์สูญเสียคุณสมบัติการผลิตแอนติบอดีต่อสาร CPAMoz หลังจากหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 พบว่ามีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ขึ้นจำนวนมากจนบดบังเซลล์ไฮบริโดมาส่งผลให้เซลล์ตายไปในที่สุด จึงหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 ได้เซลล์ไฮบริโดมาขึ้น 13 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับได้เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อสาร CPAMoz 23 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์โมโนโคลน จะได้เซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 1 และ 20 โคลน จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 ตามลำดับ หลังจากทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 21 โคลนพบว่ามิไอโซไทป์ เป็น

IgG1 จำนวน 16 โคลน ที่เหลือ 1 โคลน เป็น IgG2a และอีก 4 โคลนเป็น IgG2b จึงทำการทดสอบความเจือจางที่เหมาะสมและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ ซึ่งใช้แอนติเจน CPAMoz-OVA AMoz-OVA BSA และ OVA พบว่าทุกโคลนที่ได้จะให้ผลบวกกับแอนติเจน CPAMoz-OVA และแอนติบอดีจาก 10 โคลนที่ให้ผลบวกกับแอนติเจน AMoz-OVA สำหรับโปรตีน BSA และ OVA นั้นไม่มีแอนติบอดีที่ให้ผลบวกเลย แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนที่ได้ทั้งหมดมีโอกาสที่จะจำเพาะต่อสารอิสระ CPAMoz และมีบางแอนติบอดีที่มีโอกาสจำเพาะกับสารอิสระ AMoz ซึ่งโคลนที่ได้จะไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน BSA และ OVA ที่เชื่อมกับสาร CPAMoz ที่ฉีดกระตุ้นและคัดเลือกโคลน

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาหาความเจือจางที่เหมาะสมโดยมีระดับความเจือจางของแต่ละโคลนแตกต่างกัน เป็น ไม่เจือจาง 1:25 1:50 และ 1:100 นำไปทดสอบความจำเพาะกับตัวแข่งขันอิสระทั้ง 4 รูป คือ CPAMoz NPAMoz AMoz และ FTD ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้พบว่าทั้ง 21 โคลน จะจำเพาะต่อสาร CPAMoz NPAMoz และ FTD โดยมี 2 โคลนที่จำเพาะต่อสาร AMoz ในรูปอิสระ จึงทำการคัดเลือกโคลนทั้งหมด 5 โคลน จาก 21 โคลน เพื่อนำไปทดสอบความไวต่อสารอิสระทั้ง 4 รูป (AMoz CPAMoz NPAMoz และ FTD) ได้จำนวน 2 โคลน ได้แก่โคลน 2E5.1 (AMoz#2) และ 2H6 (AMoz#4) เลือกโคลนที่จำเพาะต่อสารอิสระ 3 รูป (CPAMoz NPAMoz และ FTD) ได้แก่โคลน 4F1 (AMoz#5) 7H8 (AMoz#17) และ 8B1.1 (AMoz#18) หลังจากนั้นหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบความจำเพาะและการทำปฏิกิริยาข้าม ได้ค่าปริมาณแอนติเจน CPAMoz-OVA ที่เหมาะสมอยู่ที่ 0.250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับแอนติบอดีของโคลน AMoz#2 AMoz#4 AMoz#5 AMoz#17 และ AMoz#18 เป็น 1:640 1:40 1:160 1:640 และ 1:320 ตามลำดับ เมื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มพบว่าทั้ง 21 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มในโตรฟูเรน และสารนอกกลุ่มในโตรฟูเรน ได้ค่าการเกิดปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์จึงแสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารอิสระทั้ง 4 รูป

เมื่อทดสอบความไวต่อสารอิสระของโมโนโคลนทั้ง 5 โคลนที่มีความไวต่อสารอิสระทั้ง 4 รูป ได้สูงสุดคือ AMoz#2 ให้ค่า IC₅₀ ต่อ AMoz CPAMoz NPAMoz และ FTD ในรูปอิสระได้เท่ากับ 14.980 1.185 1.594 และ 0.355 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า LOD เท่ากับ 1.420 0.170 0.135 และ 0.118 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โมโนโคลนที่มีความไวรองมากคือ AMoz#18 ให้ค่า IC₅₀ ต่อ CPAMoz NPAMoz และ FTD ในรูปอิสระได้เท่ากับ 1.196 12.770 และ 0.591 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 0.200 0.135 0.122 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จึงคัดเลือกโมโนโคลนทั้ง 2 มาเลี้ยงเพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ผลที่ได้คือ โมโนโคลน AMoz#2 และ AMoz#18 ที่บริสุทธิ์จะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.5 และ 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.48 และ 2.04 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตรตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์ 95.5 และ 107 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักของแอนติบอดีที่ได้จากการทำ SDS-PAGE และ western blot โดยพบว่า แอนติบอดีโคลน AMOZ#2 (IgG2b) จะให้แถบของ Heavy chain 2 สาย ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ 69.12 และ 63.32 กิโลดาลตัน และพบว่าทั้ง 2 แถบ ยังแสดงผลในฟิล์ม x-ray ที่ได้จากการทำ western blot แสดงว่าสาย Heavy chain ทั้ง 2 สายนี้ เป็นแถบของแอนติบอดี และได้สาย Light chain มีขนาด 28.33 กิโลดาลตัน สำหรับโคลน AMOZ#18 (IgG1) แถบของ Heavy chain และ Light chain อยู่ที่ 58.69 และ 25.21 กิโลดาลตัน ตามลำดับ หลังจากนั้นทดสอบความไวต่อสารอิสระของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ผลที่ได้คือแอนติบอดีที่ได้จากโคลน AMOZ#2 จะมีความไวต่อสารอิสระ AMOZ CPAMOZ NPAMOZ และ FTD มากขึ้น ซึ่งโคลน AMOZ#2 จะมีความไวสูงสุดโดยให้ค่า IC₅₀ ต่อสารอิสระดังกล่าวเป็น 5.333 0.023 0.200 และ 1.330 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับมีค่าปริมาณของสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เป็น 0.150 1.298x10⁻³ 0.997x10⁻³ และ 0.174 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งมีความไวเพียงพอสำหรับใช้พัฒนาต่อในการทำชุดตรวจสอบสารตกค้าง AMOZ ซึ่งค่ามาตรฐาน (MRLs) ที่กำหนดโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้กำหนดให้ค่า MRLs ของสารตกค้าง AMOZ อยู่ที่ 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ ELISA ประเภท indirect competitive ELISA และ direct ELISA ได้ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวและความจำเพาะต่อสารเมแทบอลิไตน์ ไตรฟูแรนฟูรัลทาโคนเพียงพอเนื่องจากสามารถตรวจวัดสารดังกล่าวในรูปอิสระได้ปริมาณต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดและไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ และสารนอกกลุ่ม จึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจสาร AMOZ ที่ตกค้างในอาหารสำหรับบริโภคได้ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คานิศ ทวีதியานนท์. 2545. ผลจากประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่อง การนำยาเกสซ์เคมีภัณฑ์ เกลือของเกสซ์เคมีภัณฑ์ และเกสซ์เคมีภัณฑ์ กิ่งสำเร็จรูป เข้ามาในราชอาณาจักร. เวชสารสัตวแพทย์. 32(4) : 11-13

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2546. เรื่องหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร.

แพรวพรรณ หองทองแดง, ครุณ กอเซาะ และ มนวิภา จารุตามระ. 2548. วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดยาในอาหารสัตว์และยาสัตว์:Nitro Test Kit. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2540. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์บกและสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 4: 256-266

สุริยะ กวางษ์กลาง และ อชวัน โกมลเสวิน. 2546. การศึกษาปัญหาสารตกค้างกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ในเนื้อไก่พื้นถิ่นที่สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 1. สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 1 อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี.

ศักดิ์สิทธิ์ สุสเกต. 2545. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาสารไนโตรฟูแรนในอาหารสัตว์. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศศิ เจริญพจน์ และ วิมล จิระชนะวัฒน์. 2546. การวิเคราะห์ความเสี่ยงจากยาสัตว์ ความปลอดภัยทางอาหาร และการคุ้มครองผู้บริโภค. สำนักงานตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์.

ภาษาอังกฤษ

- Angelini, N. M., Rampini, O. D., and Mugica, H. 1997. Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurans Residues in Bovine Muscle Tissues. J. AOAC Int. **80**(3): 481-485.
- Bryan, G. T. 1978. Nitrofurans: chemistry, metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Raven Press, New York : 3-9.
- Conneely, A., Nugent, A., Keeffe, M. O., Mulder, P.P.J., Rhijn, J.A. v., Kovacsics, L., Fodor, A., McCracken, R.J., and Kennedy, D.G. 2003. Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem massspectro-metric detection. Anal. Chim. Acta. **483**: 91-98.
- Cooper, K. M., Caddell, A., Elliott, C.T., and Kennedy, D. G. 2004. Production and characterization of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurans furazolidone. Anal. Chim. Acta. **520**: 79-86.
- Cooper, K. M., and Kennedy, D. G. 2005. Nitrofurans antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs—a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurans abuse. Analyst. **130**: 466–468.
- Delatour, T., Gremaud, E., Mottier, P., Richoz, J., Vera, F. A., and Stadler, R. H. 2003. Preparation of Stable Isotope-Labeled 2-Nitrobenzaldehyde Derivatives of Four Metabolites of Nitrofurans Antibiotics and Their Comprehensive Characterization by UV, MS, and NMR Techniques. J. Agric. Food Chem. **51**: 6371-6379.
- Diaz, T. G., Cabanillas, A. G., Valenzuela, M.I. A., Correa, C.A., and Salinas, F. 1997. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. A. **764**: 243-248.

- Diblikova, I., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Franek, M. 2005. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofuran metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation. Anal. Chim. Acta. **540**: 285-292.
- Franek, M., and Hruska, K. 2005. Antibody based methods for environmental and food analysis: a review. Vet. Med. **50**(1): 1-10.
- Keefe, M. O., Conneely, A., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Kovacsics, L., Andrea, F., Mulder, P.P.J., van Rhijn, J.A., Trigueros, G. 2004. Nitrofuran antibiotic residues in pork The FoodBRAND retail survey. Anal. Chim. Acta. **520**: 125-131.
- Kumar, L., Toothill, J. R., and Ho, K. B. 1994. Determination of nitrofuran residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. J. AOAC Int. **77**(3): 591-595.
- Leitner, A., Zollner, P., and Lindner, W. 2001. Determination of the metabolites of nitrofuran antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatography. A. **939**: 49-58.
- Lipmto, J. M., Arriba, A. F., Tiptonf, K. F., and Unqeta, M. 1996. Inhibition of Bovine Lung SCAicarbazideSensitive Amine Oxidase (SSAO) by Some Hydrazine Derivatives. Biochemical Pharmacology. **52**:187-195.
- Rupp, H. S., Munns, R. K., and Long, A. R. 1994. Simultaneous determination of nitrofurazone, nitrofurantoin, and Furazolidone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue by liquid chromatography. JAOAC Int. **77**(2): 344-350.
- Situ, C., and Elliott, C. T. 2005. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. Analytica Chimica Acta **529**: 89-96.

Vass, M., Kotkova, L., Dibkikova, I., Nevorankova, Z., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Franek, M., 2005. Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone. Vet. Med. **50**(7): 300-310.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

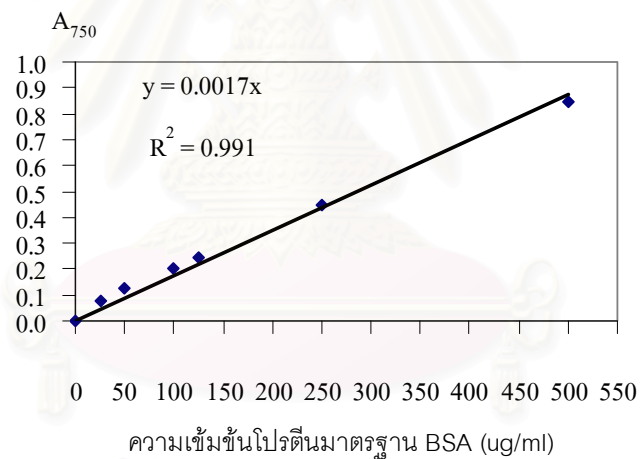


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานBSA

ปริมาณโปรตีน BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร
0	0
25	0.077
50	0.123
100	0.204
125	0.243
250	0.451
500	0.850

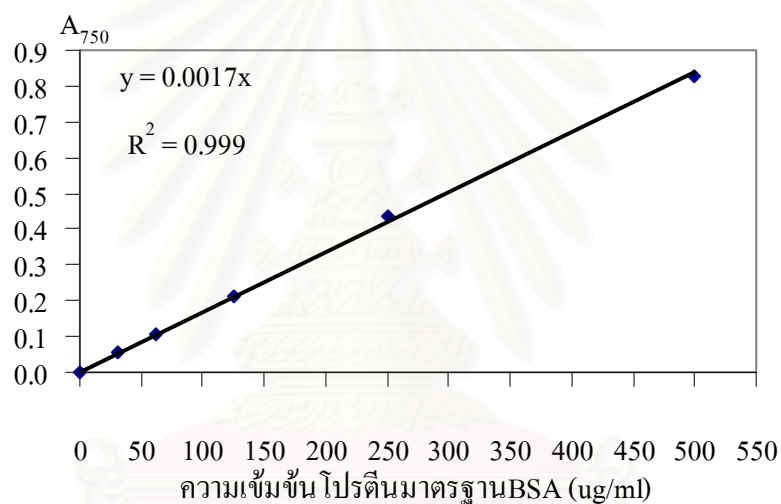


รูปที่ ก.1 กราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน

สถาบันวิจัยปฏิบัติการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA

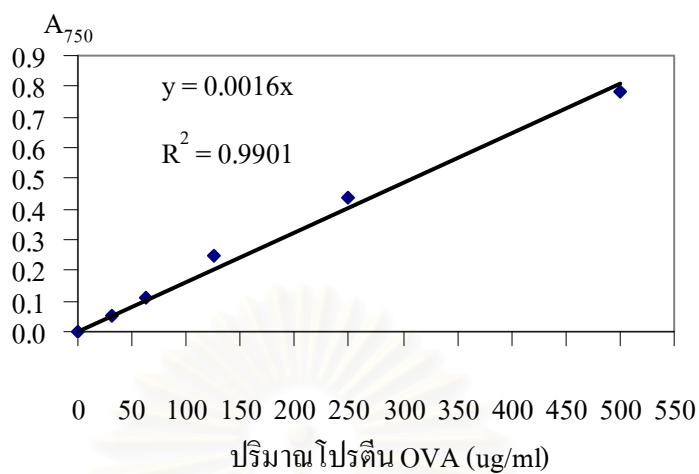
ปริมาณโปรตีน BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร
0	0
31.25	0.055
62.5	0.106
125	0.215
250	0.436
500	0.826



รูปที่ ก.2 กราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ก.3 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน OVA

ปริมาณโปรตีน OVA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร
0	0
31.25	0.050
62.5	0.111
125	0.250
250	0.432
500	0.780



รูปผนวกที่ ก.3 กราฟโปรตีน OVA มาตรฐาน

ตารางที่ ก.4 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ได้แสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.8.1

ความเจือจางของซีรัม	แอนติเจนที่ใช้เคลือบจาน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	CPAMOZ-OVA	BSA
1:500	2.654	0.565
1:1000	2.653	0.497
1:2000	1.929	0.374
1:4000	1.313	0.297
1:8000	0.840	0.195
1:16000	0.509	0.169

ตารางที่ ก.5 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ได้แสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.8.2

ความเจือจางของซีรัม	แอนติเจนที่ใช้เคลือบจาน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	CPAMAZ-OVA	BSA
1:500	2.060	2.532
1:1000	1.239	1.587
1:2000	0.776	1.122
1:4000	0.450	0.818
1:8000	0.314	0.821
1:16000	0.255	0.383

ตารางที่ ก.6 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 ได้แสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.8.3

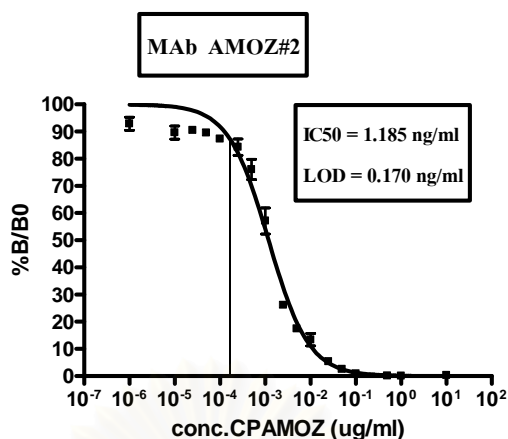
ความเจือจางของซีรัม	แอนติเจนที่ใช้เคลือบจาน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	CPAMAZ-OVA	BSA
1:500	2.273	2.019
1:1000	2.112	1.662
1:2000	1.752	1.229
1:4000	1.654	0.770
1:8000	1.276	0.711
1:16000	0.956	0.604
1:32000	0.750	0.408

ตารางที่ ก.7 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ได้แสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.8.4

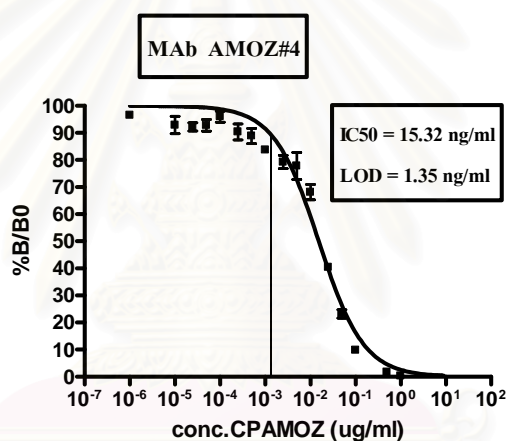
ความเจือจางของซีรัม	แอนติเจนที่ใช้เคลือบจาน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	CPAMAZ-OVA	BSA
1:500	2.090	1.846
1:1000	1.592	1.305
1:2000	1.391	0.875
1:4000	1.106	0.593
1:8000	0.753	0.437
1:16000	0.645	0.228
1:32000	0.437	0.193
1:64000	0.339	0.174

ตารางที่ ก.8 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี Indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองก่อนหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ได้แสดงในผลการทดลองรูปที่ 4.8.5

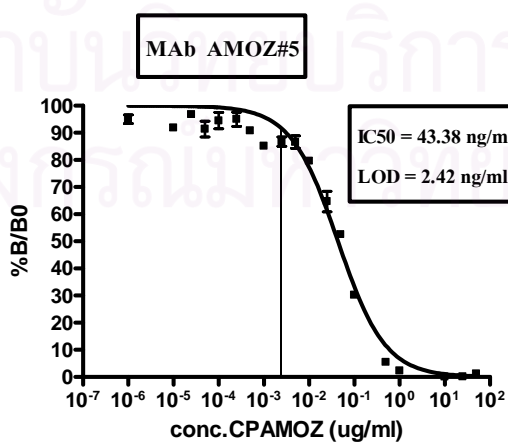
ความเจือจางของซีรัม	แอนติเจนที่ใช้เคลือบจาน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	CPAMAZ-OVA	BSA	OVA
1:500	2.694	1.765	0.460
1:1000	2.701	1.063	0.509
1:2000	2.434	0.483	0.352
1:4000	2.145	0.495	0.280
1:8000	1.362	0.256	0.171
1:16000	0.847	0.176	0.192
1:32000	0.491	0.193	0.193
1:64000	0.347	0.136	0.140
1:128000	0.281	0.108	0.162



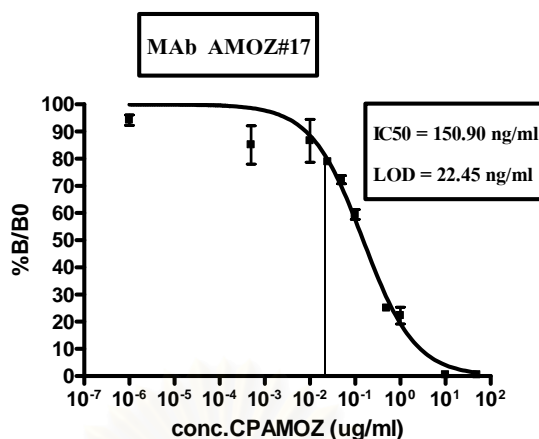
รูปที่ ก.4 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อสาร CPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



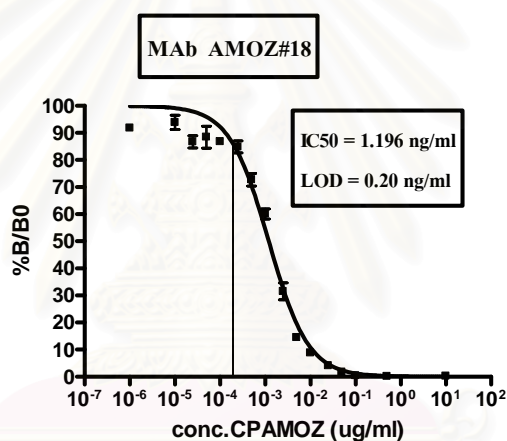
รูปที่ ก.5 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อสาร CPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



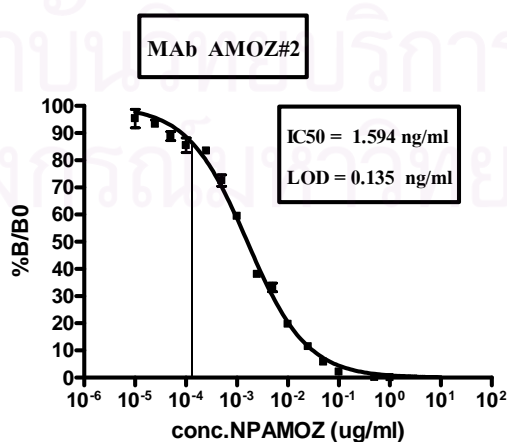
รูปที่ ก.6 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#5 ต่อสาร CPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



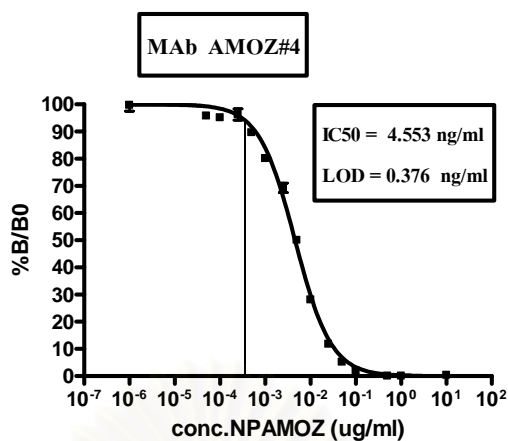
รูปที่ ก.7 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#17 ต่อสาร CPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



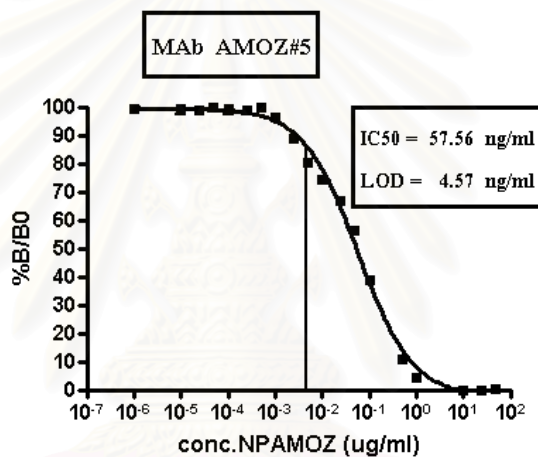
รูปที่ ก.8 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ต่อสาร CPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



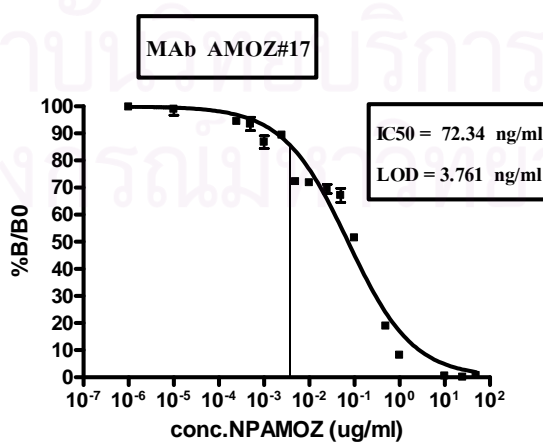
รูปที่ ก.9 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อสาร NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



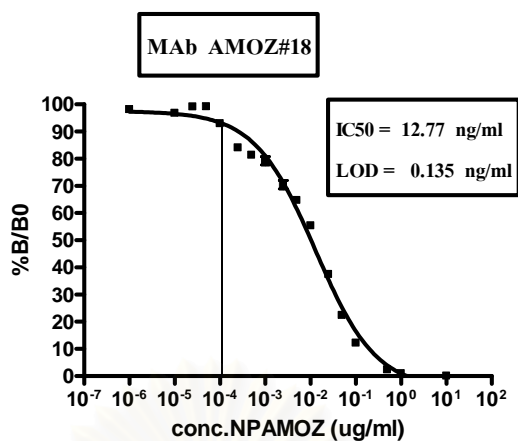
รูปที่ ก.10 กราฟหาค่า IC₅₀ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อสาร NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



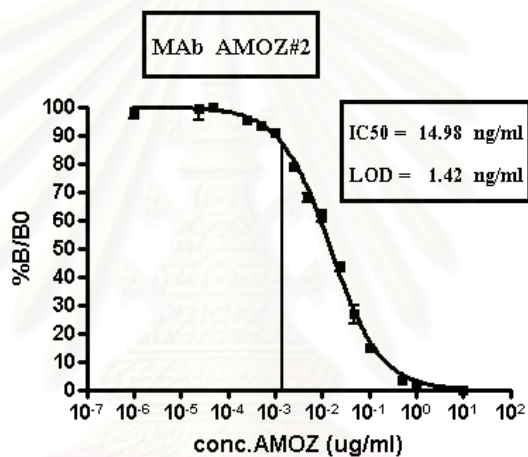
รูปที่ ก.11 กราฟหาค่า IC₅₀ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#5 ต่อสาร NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



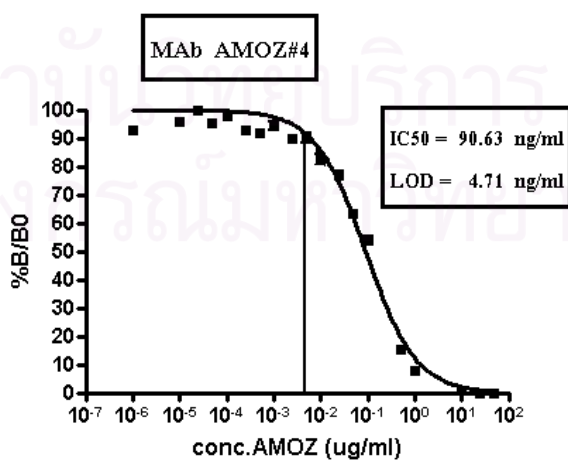
รูปที่ ก.12 กราฟหาค่า IC₅₀ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#17 ต่อสาร NPAMOZ ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



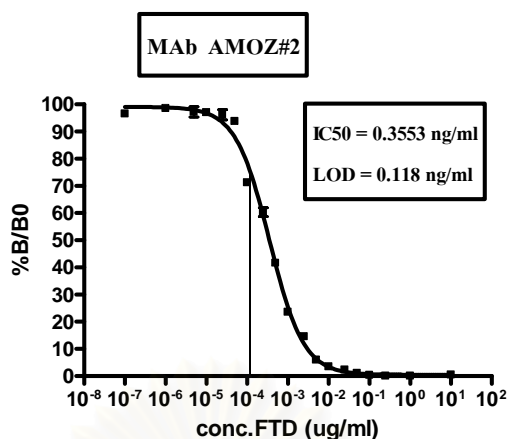
รูปที่ ก.13 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ต่อสาร NPAMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03



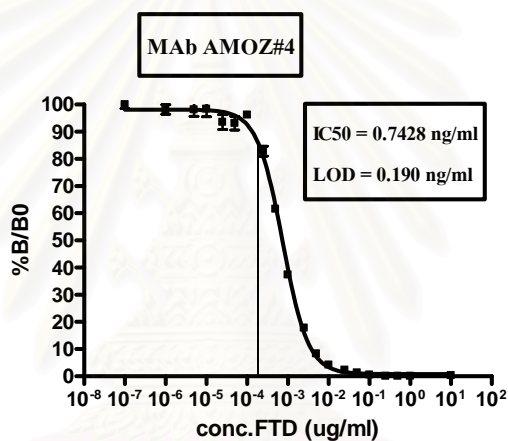
รูปที่ ก.14 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อสาร AMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03



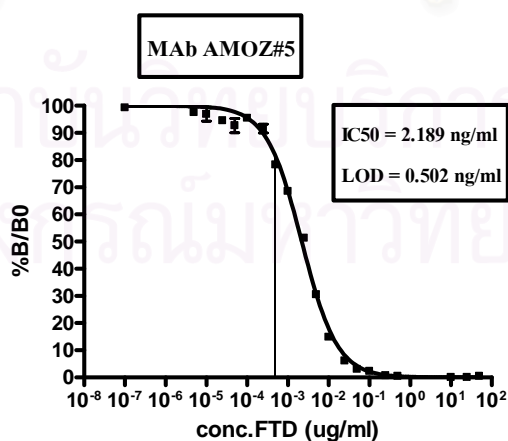
รูปที่ ก.15 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อสาร AMOZ ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03



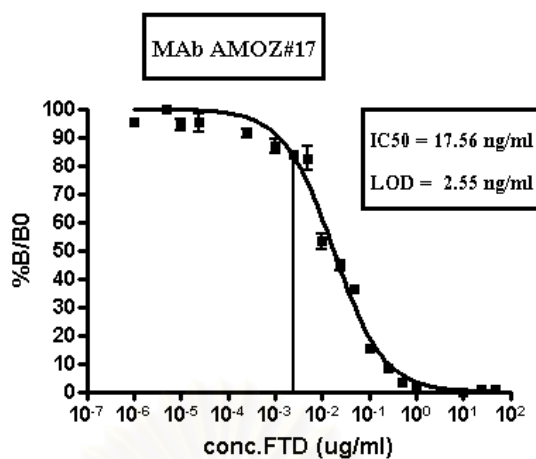
รูปที่ ก.16 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ต่อสาร FTD ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03



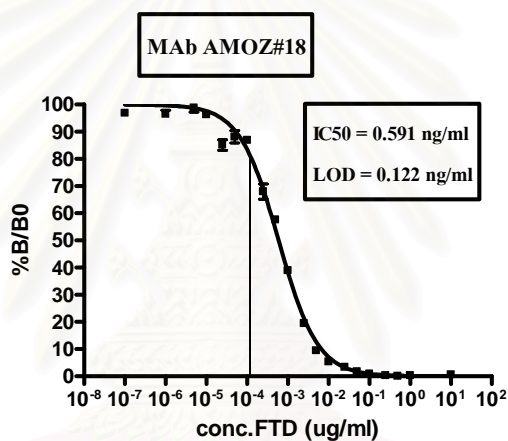
รูปที่ ก.17 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#4 ต่อสาร FTD ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปที่ ก.18 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#5 ต่อสาร FTD ด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปที่ ก.19 กราฟหาค่า IC₅₀ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#17 ต่อสาร FTD ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปที่ ก.20 กราฟหาค่า IC₅₀ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 ต่อสาร FTD ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.9 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#1 (1F2) AMOZ#2 (2E5.1) AMOZ#3 (2E9) และ AMOZ#4 (2H6)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#1		Clone AMOZ#2		Clone AMOZ#3		Clone AMOZ#4	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
CPAMOZ (derivative form)	0.943	0.131	1.044	0.124	0.950	0.150	1.085	0.127
NPAMOZ (derivative form)	0.810	0.135	1.068	0.103	0.999	0.139	0.915	0.105
AMOZ (metabolite form)	0.835	0.829	0.923	0.127	0.984	1.111	1.073	0.124
Furaltadone (FTD; parent drug form)	1.145	0.156	1.399	0.140	1.234	0.180	1.422	0.089
Furazolidone (FZD; parent drug form)	1.304	1.240	1.463	1.282	1.304	1.179	1.576	1.323
AOZ (metabolite form)	0.997	0.923	1.117	0.978	1.057	1.060	0.907	0.943
NPAOZ (derivative form)	1.167	1.113	1.315	1.282	1.145	1.243	1.233	1.250
Nitrofurantoin (NFT; parent drug form)	1.220	1.087	1.467	1.310	1.052	1.179	1.281	1.443
AHD (metabolite form)	1.121	1.025	1.176	1.098	1.204	1.159	1.139	1.036
NPAHD (derivative form)	1.108	1.280	1.300	1.290	1.268	1.289	1.279	1.234
Nitrofurazone (NFZ; parent drug form)	1.199	1.230	1.330	1.259	1.305	1.155	1.263	1.277
SCA (metabolite form)	1.039	0.996	1.263	1.061	1.038	0.920	1.074	1.101
NPSCA (derivative form)	1.127	1.111	1.274	1.177	1.291	1.335	1.263	1.155

ตารางที่ ก.10 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#5 (4F1) AMOZ#6 (4H3) AMOZ#7 (5A7) และ AMOZ#8 (5F1)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#5		Clone AMOZ#6		Clone AMOZ#7		Clone AMOZ#8	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
CPAMOZ (derivative form)	1.106	0.142	1.094	0.109	0.782	0.193	0.810	0.165
NPAMOZ (derivative form)	1.044	0.141	1.065	0.106	0.645	0.422	0.864	0.152
AMOZ (metabolite form)	1.040	0.965	1.007	1.043	0.734	0.727	1.019	0.663
Furaltadone (FTD; parent drug form)	1.552	0.203	1.541	0.187	1.178	0.194	1.171	0.172
Furazolidone (FZD; parent drug form)	1.432	1.328	1.805	1.577	1.153	0.979	1.224	1.241
AOZ (metabolite form)	1.263	1.195	1.208	1.283	0.663	0.861	0.903	0.949
NPAOZ (derivative form)	1.504	1.395	1.516	1.415	0.869	0.889	1.250	1.266
Nitrofurantoin (NFT; parent drug form)	1.628	1.427	1.374	0.900	1.097	0.843	1.218	0.951
AHD (metabolite form)	1.326	1.231	1.278	1.306	0.679	0.683	0.911	0.998
NPAHD (derivative form)	1.416	1.534	1.761	1.595	1.067	0.999	1.400	1.302
Nitrofurazone (NFZ; parent drug form)	1.314	1.341	1.088	1.124	0.975	0.851	1.149	0.926
SCA (metabolite form)	1.129	1.154	1.222	1.198	0.711	0.690	1.011	0.973
NPSCA (derivative form)	1.445	1.258	1.590	1.550	1.043	1.031	1.132	1.204

ตารางที่ ก.11 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#9 (5G10.2) AMOZ#10 (5G10.3) AMOZ#11 (5H7) และ AMOZ#12 (6B3.1)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#9		Clone AMOZ#10		Clone AMOZ#11		Clone AMOZ#12	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
CPAMOZ (derivative form)	0.821	0.126	1.077	0.182	0.776	0.122	0.874	0.118
NPAMOZ (derivative form)	0.792	0.113	0.915	0.115	0.835	0.106	0.888	0.145
AMOZ (metabolite form)	0.819	0.755	1.048	0.836	0.799	0.664	0.890	0.592
Furaltadone (FTD; parent drug form)	1.075	0.194	1.392	0.129	1.119	0.143	0.896	0.064
Furazolidone (FZD; parent drug form)	1.179	1.072	1.165	1.123	1.167	1.166	1.055	1.268
AOZ (metabolite form)	0.844	0.898	0.796	1.013	0.969	0.918	0.925	0.991
NPAOZ (derivative form)	1.111	1.116	1.071	1.122	1.205	1.134	1.204	1.193
Nitrofurantoin (NFT; parent drug form)	1.047	0.970	1.366	1.231	1.077	0.982	1.272	1.149
AHD (metabolite form)	0.902	0.854	1.023	1.054	0.995	0.898	0.990	0.961
NPAHD (derivative form)	1.168	1.152	1.291	1.203	1.238	1.193	1.263	1.077
Nitrofurazone (NFZ; parent drug form)	1.070	1.015	1.430	1.322	1.077	1.014	1.226	1.108
SCA (metabolite form)	0.916	0.865	1.055	1.141	0.932	0.867	0.802	0.933
NPSCA (derivative form)	1.150	1.190	1.082	1.152	1.204	1.044	1.030	1.214

ตารางที่ ก.12 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#13 (6B3.2) AMOZ#14 (6B3.3) AMOZ#15 (6G2) และ AMOZ#16 (7G4)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#13		Clone AMOZ#14		Clone AMOZ#15		Clone AMOZ#16	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
CPAMOZ (derivative form)	0.981	0.112	1.062	0.109	1.116	0.185	1.069	0.467
NPAMOZ (derivative form)	1.188	0.125	1.153	0.164	1.162	0.173	0.981	0.121
AMOZ (metabolite form)	1.146	0.862	1.149	0.794	1.302	1.127	1.111	1.131
Furaltadone (FTD; parent drug form)	1.576	0.117	1.655	0.109	1.629	0.141	1.177	0.403
Furazolidone (FZD; parent drug form)	1.542	1.513	1.635	1.515	1.552	1.775	1.463	1.687
AOZ (metabolite form)	1.216	1.291	1.268	1.296	1.341	1.462	1.271	1.240
NPAOZ (derivative form)	1.605	1.550	1.829	1.481	1.351	1.631	1.255	1.370
Nitrofurantoin (NFT; parent drug form)	1.428	1.456	0.609	0.674	1.407	1.527	1.062	1.235
AHD (metabolite form)	1.240	1.304	1.278	1.244	1.359	1.424	1.151	1.240
NPAHD (derivative form)	1.559	1.660	1.492	1.451	1.668	1.794	1.635	1.460
Nitrofurazone (NFZ; parent drug form)	1.562	1.507	1.248	1.175	1.713	1.472	1.217	1.260
SCA (metabolite form)	1.200	1.252	1.187	1.177	1.273	1.316	1.088	1.150
NPSCA (derivative form)	1.675	1.474	1.292	1.488	1.899	1.744	1.648	1.530

ตารางที่ ก.13 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#17 (7H8) AMOZ#18 (8B1.1) AMOZ#19 (8B4) และ AMOZ#20 (8E2)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#17		Clone AMOZ#18		Clone AMOZ#19		Clone AMOZ#20	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
CPAMOZ (derivative form)	0.906	0.513	0.726	0.136	0.716	0.139	0.922	0.130
NPAMOZ (derivative form)	0.821	0.330	0.730	0.106	0.745	0.084	0.769	0.124
AMOZ (metabolite form)	0.901	0.971	0.745	0.690	0.808	0.740	0.821	0.753
Furaltadone (FTD; parent drug form)	1.136	0.267	0.998	0.121	0.933	0.119	0.717	0.096
Furazolidone (FZD; parent drug form)	1.156	1.252	1.127	1.243	1.191	1.383	1.096	1.356
AOZ (metabolite form)	0.969	0.977	0.773	0.817	0.922	0.855	0.962	0.926
NPAOZ (derivative form)	1.173	1.156	0.940	1.073	1.025	1.088	1.085	1.116
Nitrofurantoin (NFT; parent drug form)	1.182	1.168	0.960	1.017	0.989	1.269	0.845	1.052
AHD (metabolite form)	1.013	1.013	0.973	0.760	0.922	0.898	0.860	0.910
NPAHD (derivative form)	1.228	1.291	1.025	1.164	1.042	1.207	1.050	1.180
Nitrofurazone (NFZ; parent drug form)	1.144	1.243	1.147	1.145	0.937	1.064	1.286	1.137
SCA (metabolite form)	0.981	0.938	0.813	0.817	0.801	0.851	0.897	0.871
NPSCA (derivative form)	1.170	1.383	1.182	1.130	1.111	1.250	1.181	1.235

ตารางที่ ก.14 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#1 (1F2) AMOZ#2 (2E5.1) AMOZ#3 (2E9) และ AMOZ#4 (2H6)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#1		Clone AMOZ#2		Clone AMOZ#3		Clone AMOZ#4	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
3-carboxybenzaldehyde (CBA)	1.310	1.171	1.353	1.319	1.180	1.234	1.394	1.190
คลอเนบูเทอรอล (Clenbuteral)	1.608	1.460	1.591	1.616	1.506	1.600	1.443	1.667
ซัลบูตามอล (Salbutamal)	1.006	0.982	1.123	1.120	1.163	1.067	0.977	1.018
คลอแรมเฟนิคอลล (CAP)	1.346	1.252	1.487	1.496	1.607	1.362	1.633	1.673
นอร์ฟลอร์กซาซิน (Norfloxacin)	1.092	1.060	1.081	1.108	0.572	0.464	1.168	1.094
เพนิซิลลิน จี (Penicilin G)	1.416	1.337	1.857	1.730	1.734	1.668	1.685	1.485
ฟลูมิควิน (Flumequine)	1.393	1.318	1.651	1.432	1.675	1.507	1.658	1.587
ออกซิเตรทตาไซคริน (Oxytetracycline)	1.097	0.966	1.089	1.114	1.047	0.960	1.038	1.047
ตัวควบคุมบวก (CPAMOZ)	0.943	0.131	1.044	0.124	0.950	0.150	1.085	0.127
ตัวควบคุมลบ(อาหาร RPMI 1640)	0.151	0.084	0.121	0.084	0.105	0.094	0.077	0.185

ตารางที่ ก.15 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#5 (4F1) AMOZ#6 (4H3) AMOZ#7 (5A7) และ AMOZ#8 (5F1)

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#5		Clone AMOZ#6		Clone AMOZ#7		Clone AMOZ#8	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
3-carboxybenzaldehyde (CBA)	1.164	1.450	1.705	1.375	0.894	0.949	1.010	1.073
คลอเนบูเทอรอล (Clenbuteral)	1.805	1.738	1.227	1.263	1.177	1.212	1.486	1.430
ซัลบูตามอล (Salbutamal)	1.186	1.206	1.223	1.165	0.886	0.713	0.972	0.975
คลอแรมเฟนิคอลล (CAP)	1.697	1.566	0.969	0.964	1.176	1.169	1.377	1.315
นอร์ฟลอร์กซาซิน (Norfloxacin)	1.284	1.306	1.222	1.292	0.684	0.704	1.032	1.019
เพนิซิลลิน จี (Penicilin G)	1.949	1.831	1.845	1.739	1.131	1.243	1.501	1.583
ฟลูมิควิน (Flumequine)	1.813	1.725	1.996	1.763	1.185	1.040	1.627	1.457
ออกซิเตรทตาไซคริน (Oxytetracycline)	1.202	1.218	1.287	1.220	0.856	0.855	1.009	0.977
ตัวควบคุมบวก (CPAMOZ)	1.106	0.142	1.094	0.109	0.782	0.193	0.810	0.165
ตัวควบคุมลบ(อาหาร RPMI 1640)	0.111	0.180	0.212	0.226	0.208	0.111	0.129	0.225

ตารางที่ ก.16 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#9 (5G10.2) AMOZ#10 (5G10.3) AMOZ#11 (5H7) และ AMOZ#12 (6B3.1)

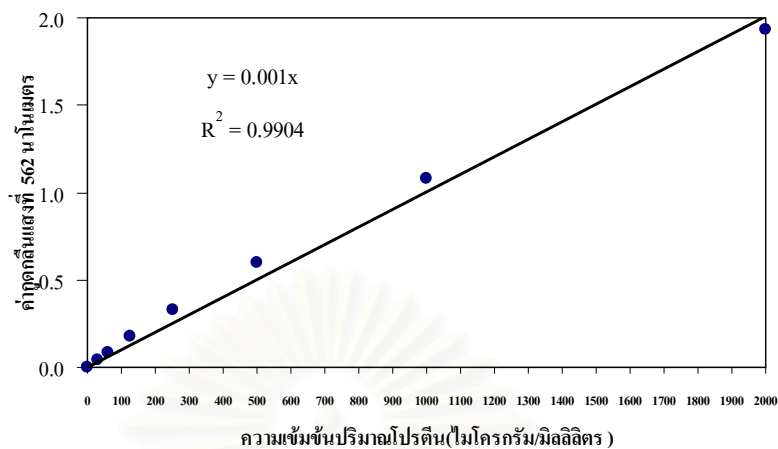
สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#9		Clone AMOZ#10		Clone AMOZ#11		Clone AMOZ#12	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
3-carboxybenzaldehyde (CBA)	1.089	0.973	1.121	1.220	1.144	1.157	1.277	1.069
คลอเนบูเทอรอล (Clenbuteral)	1.201	1.312	1.628	1.501	1.294	1.430	1.677	1.618
ซัลบูตามอล (Salbutamal)	0.788	0.876	1.097	1.049	0.986	0.929	0.941	0.969
คลอแรมเฟนิคอลล (CAP)	1.208	1.260	1.456	1.673	1.456	1.395	1.397	1.509
นอร์ฟลอร์กซาซิน (Norfloxacin)	0.964	0.962	0.874	0.981	1.052	1.077	0.971	1.011
เพนิซิลลิน จี (Penicilin G)	1.472	1.367	1.524	1.644	1.475	1.452	1.562	1.575
ฟลูมิควิน (Flumequine)	1.426	1.355	1.932	1.743	1.449	1.439	1.575	1.471
ออกซิเตรทตาไซคริน (Oxytetracycline)	0.908	0.852	1.081	1.019	0.973	0.963	0.917	0.945
ตัวควบคุมบวก (CPAMOZ)	0.821	0.126	1.077	0.182	0.776	0.122	0.874	0.118
ตัวควบคุมลบ(อาหาร RPMI 1640)	0.111	0.180	0.212	0.226	0.208	0.111	0.129	0.225

ตารางที่ ก.17 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#13 (6B3.2) AMOZ#14 (6B3.3) AMOZ#15 (6G2) และ AMOZ#16 (7G4)

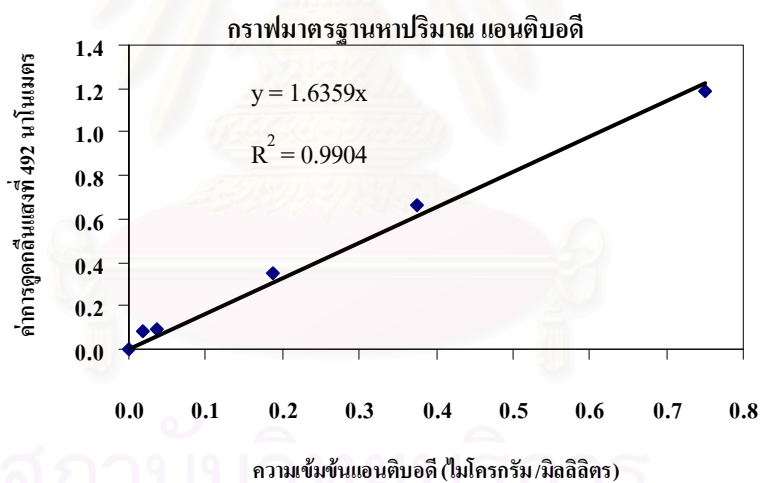
สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#13		Clone AMOZ#14		Clone AMOZ#15		Clone AMOZ#16	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
3-carboxybenzaldehyde (CBA)	1.544	1.562	1.530	1.479	1.860	1.859	1.630	1.708
คลอเนบูเทอรอล (Clenbuteral)	1.427	1.506	1.876	1.790	2.012	2.132	1.946	1.889
ซัลบูตามอล (Salbutamal)	1.131	1.142	1.005	1.044	1.341	1.369	1.111	1.235
คลอแรมเฟนิคอลล (CAP)	0.734	0.668	1.838	1.891	1.779	2.064	1.791	1.887
นอร์ฟลอร์กซาซิน (Norfloxacin)	1.237	1.198	1.097	1.151	1.338	1.423	1.315	1.223
เพนิซิลลิน จี (Penicilin G)	1.839	1.754	2.027	2.072	1.932	2.241	1.836	2.101
ฟลูมิควิน (Flumequine)	1.527	1.912	1.924	1.936	2.135	2.241	1.948	2.043
ออกซิเตรทตาไซคริน (Oxytetracycline)	1.185	1.200	1.123	1.108	1.402	1.404	1.177	1.260
ตัวควบคุมบวก (CPAMOZ)	0.981	0.112	1.062	0.109	1.116	0.185	1.069	0.467
ตัวควบคุมลบ(อาหาร RPMI 1640)	0.111	0.180	0.212	0.226	0.208	0.111	0.129	0.225

ตารางที่ ก.18 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#17 (7H8) AMOZ#18 (8B1.1) AMOZ#19 (8B4) และ AMOZ#20 (8E2)

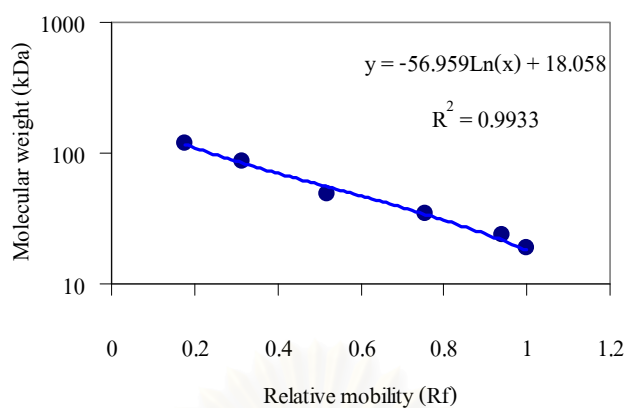
สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน	Clone AMOZ#17		Clone AMOZ#18		Clone AMOZ#19		Clone AMOZ#20	
	ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นตัวแข่งขันอิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0	10	0	10	0	10	0	10
3-carboxybenzaldehyde (CBA)	1.291	1.351	1.324	1.205	1.251	1.439	1.483	1.512
คลอเนบูเทอรอล (Clenbuteral)	1.421	1.591	1.468	1.462	1.353	1.538	1.426	1.654
ซัลบูตามอล (Salbutamal)	0.675	0.774	0.809	0.938	0.908	1.023	0.824	0.962
คลอแรมเฟนิคอลล (CAP)	1.689	1.510	1.265	1.463	1.379	1.629	1.443	1.722
นอร์ฟลอร์กซาซิน (Norfloxacin)	0.858	0.972	0.937	0.946	1.035	0.971	0.898	1.104
เพนิซิลลิน จี (Penicilin G)	1.808	1.580	1.349	1.541	1.754	1.478	1.586	1.827
ฟลูมิควิน (Flumequine)	1.570	1.652	1.450	1.618	1.473	1.663	1.533	1.703
ออกซิเตรทตาไซคริน (Oxytetracycline)	0.929	1.064	0.922	1.014	0.941	0.988	0.929	0.946
ตัวควบคุมบวก (CPAMOZ)	0.906	0.513	0.726	0.136	0.716	0.139	0.922	0.130
ตัวควบคุมลบ(อาหาร RPMI 1640)	0.111	0.180	0.212	0.226	0.208	0.111	0.129	0.225



รูปที่ ก.21 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณ โปรตีนของโมโน โคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี BCA



รูปที่ ก.22 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแอนติบอดีของโมโน โคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA



รูปที่ ก.23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (หลังจากทำให้บริสุทธิ์) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ตารางที่ ก.19 แสดงค่า Rf กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa) ที่ได้จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดี ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีน	Molecular weight (kDa)	Relative mobility (Rf)
b-galactosidase	118	0.176
Bovine serum albumin	86	0.314
Ovalbumin	49	0.520
Carbonic anhydrase	34	0.755
b-lactoglobulin	24	0.941
Lysozyme	19	1.000
FBS	75.31	0.366
โมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์	74.84	0.369
แอนติบอดีจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#2 (IgG2b) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีน เอ โดยใช้หลักการของ affinity chromatography	69.12	0.408
	63.92	0.447
	28.33	0.835
อาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AMOZ#18	74.84	0.369
แอนติบอดีจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี AMOZ#18 (IgG1) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วย Protein A โดยใช้หลักการของ affinity chromatography	58.69	0.490
	25.21	0.882



ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลาย Ninhydrin สำหรับใช้ในเทคนิค TLC ในขั้นตอนการเตรียม CPAMAZ

Ninhydrin staining (Ninhydrin Solution)

นินไฮดริน	20	มิลลิกรัม
Butanol	9.5	มิลลิลิตร
10% Acetic acid	5	มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้การหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมได้

วิธี Lowry's method

Solution A : 2% Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 N NaOH

Solution B₁ : 1% Coupper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ละลายในน้ำกลั่น

Solution B₂ : 2% Potassium tartate ละลายในน้ำกลั่น

Solution C : Solution A : B₁ : B₂ อัตราส่วน 100 : 1 : 1 โดยเติม B₁, A และ B₂ ตามลำดับ

Solution D : Folin-Ciocalteu phenol reagent เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน

Folin : น้ำ DI (1 : 1) เตรียมก่อนใช้งาน

วิธีการ

- นำสารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- เติมสารละลาย C ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จับเวลา 10 นาที
- เติมสารละลาย D ที่เจือจางปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrometer UV/vis ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

หมายเหตุ ควรวัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 30 นาที

3. การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อสาร CPAMAZ กับโปรตีนพาหะ

1. 0.1 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

Na_2CO_3	0.027	โมลลาร์ (M)
NaHCO_3	0.063	โมลลาร์ (M)
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. 0.05% TNBS (Picrylsulfonic acid)

Stock 5% TNBS (w/v) ละลายใน methanol

- Picrylsulfonic acid	5	กรัม
-----------------------	---	------

- methanol 100 มิลลิลิตร

เจือจาง Stock 5% TNBS เป็น 0.05% TNBS ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 0.1 M Sodium bicarbonate, pH 8.5

3. 10% SDS (Sodium dodecyl sulphate)

SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4. 1 N HCl

Conc. HCl	7.7	มิลลิลิตร
-----------	-----	-----------

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. นำสารละลาย 0.05% TNBS ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
2. เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ หรือ สารละลายมาตรฐาน ที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
4. เติมสารละลาย 1 N HCl ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร
6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติด

$$\% \text{ การเชื่อมติด} = \frac{[(\text{ค่าดูดกลืนแสงโปรตีนพาหะ} - \text{ค่าดูดกลืนแสงสารที่เชื่อมติดกับโปรตีน}) \times 100]}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนพาหะ}}$$

4. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4 (Stock reagent)

ชั่ง NaH ₂ PO ₄	27.6	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
---------------------------------------	------	------	-------------------	------	-----------

ชั่ง Na ₂ HPO ₄	71.63	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
---------------------------------------	-------	------	-------------------	------	-----------

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

2. 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.4

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1	ลิตร
--------------------------------	---	------

NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

3. PBS-Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4. 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย ยี่ห้อ mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร
ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)		

5. 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

Na ₂ HPO ₄	11.9	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Citric acid	7	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรดต่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Substrate OPD

O-phenylenediamine	40	มิลลิกรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	0.04	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)		

7. 2.5 M H₂SO₄ (Stopping reagent)

H ₂ SO ₄ (96%)	256	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	744	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1. Stock HAT 100X

Hypoxanthine	0.1361 กรัม.	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Aminopterin	0.0018 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidin	0.0388 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 um แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่

อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ Aminopterin จะละลายยาก ให้นำไปอุ่นใน water bath จนกว่าจะละลาย

2. Stock HT 100X

Hypoxanthine	0.1361 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidin	0.0388 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้ง 2 สารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บ

ไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
NaHCO ₃	2	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไม

โครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 90 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT (Selective medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 90 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ก่อนจะนำอาหาร (ข้อ 3-5) ไปเลี้ยงเซลล์ให้ผสม FBS (Fetal bovine serum) 10-20 % ตามความเหมาะสมกับเซลล์ที่ใช้เลี้ยง

6. การเตรียมสารสำหรับการหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

50% PEG (Polyethylene glycol)

นำ PEG(sigma) มาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดๆ ละ ประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการหลอมรวมเซลล์ให้นำออกมาอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	70	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	20	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

8. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Bovine serum albumin (BSA)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

BCA™ Reagent A และ BCA™ Reagent B (BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE)

ก่อนใช้ผสม Reagent A : B ในอัตราส่วน 50:1

9. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 4 M NaCl

NaCl	233.76	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. 0.1 M citrate buffer, pH 6 4.5 3.5 และ 3

citric acid	0.1	โมลลาร์ (M)
Na ₂ HPO ₄	0.1	โมลลาร์ (M)

ไตเตรตกรดด้วยต่างจนได้ pH 6 4.5 3.5 และ 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 0.1 M Phosphate buffer, pH 8

ชั่ง NaH ₂ PO ₄	13.8	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ชั่ง Na ₂ HPO ₄	35.8	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

4. 1 M Tris HCl buffer, pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (HCl)	1	M			

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stacking gel and Separating gel

Reagent	Stacking gel (5%)	Separation gel (10%)
Sterile distilled water (ml)	1.46	3.84
40% Acrylamide gel (ml)	0.25	2.0
1.5 M Tris , pH 8.8 (ml)	-	2.0
1.0 M Tris , pH 6.8 (ml)	0.25	-
10% SDS (ml)	0.02	0.08
10% APS (ml)	0.02	0.08
TEMED (ml)	0.002	0.0032
final volume (ml)	2	8

2. Sample buffer

SDS	2 %
60 mM Tris (pH 6.8)	
Bromophenol blue	0.01 %
Glycerol	10 %
beta-mercaptoethanol	10 %

3. Running buffer(1X) 1 L

Tris	3.02 กรัม
Glycine	18.8 กรัม
SDS	1.0 กรัม

4. Coomassie brilliant blue (250 ml)

Coomassie Brilliant blue R-250	0.25%
Methanol	50%
Acetic acid	10%

5. Destaining solution (1 L)

Methanol	5%
Acetic acid	10%

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อูมาพร พิมพิทักษ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2521 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ในปีการศึกษา 2543 และ เข้าศึกษาต่อ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2547 ขณะศึกษาอยู่ได้รับทุนค่าเล่าเรียนจากหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นเวลา 3 ปี คือ ทุนงบประมาณแผ่นดิน 2 ปี และทุนผู้ช่วยอาจารย์ 1 ปี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย