การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออะฟลาทอกซินเอ็ม1

นางสาวอภิญญา แสงดอกไม้

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST AFLATOXIN M_1

Miss Apinya Sangdokmai

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 2011
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออะฟลาทอกซินเอ็ม1
โดย	นางสาวอภิญญา แสงดอกไม้
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

อภิญญา แสงดอกไม้ : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออะฟลาทอกซินเอ็ม1. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST AFLATOXIN M_1) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, 91 หน้า.

อะฟลาทอกซินเอ็ม1 (AFM_1) เป็นแมทาบอไลต์ที่ถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิลของอะฟลาทอกซินบี1 (AFB_1) ทนต่อการให้ความร้อน เช่น การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) AFM_1 เป็นที่รู้จักกันว่าเป็นสารพิษต่อเซลล์ตับและเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการตรวจหาปริมาณของ AFM_1 ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์นมจึงมีความจำเป็น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA ต่อไป โดยทำการฉีดแอนติเจน AFM_1 ที่เชื่อมต่อกับ BSA เพื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์สายพันธ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว พบว่าหนูทุกตัวตอบสนองต่อแอนติเจน โดยมีค่าระดับแอนติบอดีในเลือด ระหว่าง 8,192,000 และ 32,768,000 เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูไมซ์กับเซลล์มัยอีโลมา P3X พบว่าได้โมโนโคลน จำนวน 5 โคลน ได้แก่ AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 แอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG_1 ทั้งหมด ความไวซึ่งจะวัดในรูปของค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFB_1 และ AFG_1 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบโดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับตรวจวัด AFM_1 ได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต..
ปีการศึกษา 2554	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก........................
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

5172591923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : AFLATOXIN / AFLATOXIN M_1 / MONOCLONAL ANTIBODY / ELISA

APINYA SANGDOKMAI : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST AFLATOXIN M_1. ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC.PROF.TANAPAT PALAGA, Ph.D., 91 pp.

Aflatoxin M_1 (AFM_1) is the hydroxylated metabolites of aflatoxin B_1 (AFB_1) and stable during heat treatments like pasteurization. AFM_1 is known to be a hepatotoxic and carcinogenic agent. Therefore, detection of AFM_1 presented in dairy products is essential. The aim of this work was to generate monoclonal antibodies against AFM_1 for future development of ELISA detection test kit. AFM_1-BSA conjugate was used as an immunogen to immunize five BALB/c mice. All mice responded vigorously to AFM_1 which yielded the antiserum titer between 8,192,000 and 32,768,000. Splenocytes from these mice were fused with P3X myeloma cells to generate hybridoma, yielding five monoclones including AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 and AFM_1-17. Isotype of all monoclonal antibodies were IgG_1. Their sensitivity, which was calculated in term of limit of detection, was 16, 15, 5, 7 and 8 pg/ml, respectively. The monoclonal antibodies showed strong cross reactivity with AFB_1 and AFG_1 but the cross reactivities to other substances unrelated to aflatoxins were negligible. Thus, these monoclonal antibodies have a potential to be used in the development of an immunoassay-based test kit for detecting AFM_1.

Field of Study : Biotechnology	Student's Signature ....
Academic Year: 2011	Advisor's Signature ....
	Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง กรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้บริหาร อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร และอาจารย์ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง คุณอนุมาศ บัวเขียว และคุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ ตั้งแต่เริ่มต้นการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาตลอด อีกทั้งเป็นกำลังใจที่ดีให้เสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ.. ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง... ฎ

สารบัญภาพ.. ฑ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ... ด

บทที่

1 บทนำ.. 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.. 4

2.1.1 ที่มาของสารอะฟลาทอกซิน.. 4

2.1.2 อาหารที่พบการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน.............................. 4

2.1.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของสารในกลุ่ม AFs 5

2.1.4 ความเป็นพิษของสารในกลุ่ม AFs.. 7

2.1.5 การกำหนดปริมาณสารในกลุ่ม AFs.. 9

2.1.6 วิธีตรวจวิเคราะห์สาร AFs.. 11

2.1.6.1 วิธีทางเคมี.. 11

2.1.6.1.1 High Performance Liquid Chromatography....... 11

2.1.6.1.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry...... 11

2.1.6.1 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา... 12

2.1.7 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.. 12

บทที่ หน้า

2.1.7.1 แอนติเจน.. 12
2.1.7.2 แอนติบอดี.. 16
2.1.7.3 การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี 20
2.1.7.4 ความแตกต่างระหว่างพอลิโคลนอลและโมโนโคลนอล แอนติบอดี.. 20
2.1.7.5 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้หลักการของ somatic hybridization... 20
2.1.7.6 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา............................ 22
2.1.8 หลักการของ ELISA.. 25
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 27

3 วิธีดำเนินการวิจัย... 30
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย... 30
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 30
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย... 31
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.. 34
3.4.1 ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1............ 34
3.4.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี และคัดเลือกโมโนโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1... 34
3.4.2.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา... 34
3.4.2.2 การเตรียมเซลล์ม้าม... 35
3.4.2.3 การหลอมรวมเซลล์.. 35
3.4.2.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้าง แอนติบอดีต่อ AFM_1.. 36
3.4.2.4.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA................... 36
3.4.2.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA 36

บทที่ หน้า

3.4.2.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution...... 37
3.4.2.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว...... 37
3.4.2.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง.... 37
3.4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้...... 38
3.4.3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป...... 38
3.4.3.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี...... 38
3.4.3.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 39
3.4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์...... 39
3.4.4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี...... 39
3.4.4.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี BCA assay...... 40
3.4.4.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA...... 40
3.4.4.3.1 การหาปริมาณแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์...... 40
3.4.4.3.2 การหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์...... 41
3.4.4.4 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี...... 41
3.4.4.4.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น...... 41
3.4.4.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง...... 41
3.4.4.4.3 การทำอิเล็กโทรฟอเรซีส...... 42
3.4.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังให้บริสุทธิ์...... 42

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง...... 43
4.1 ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1...... 43
4.1.1 การหาระดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น...... 43
4.1.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ...... 45
4.2. การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1...... 45

บทที่		หน้า
	4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี......................	48
	4.3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..........................	48
	4.3.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ	49
	4.3.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1........	53
	4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์บางส่วน......................................	58
	4.4.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี..	58
	4.4.2 การหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์............................	59
	4.4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์...	60
	4.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.................	62
	4.5.1 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์......	63
5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..	64
รายการอ้างอิง	....	67
ภาคผนวก	....	73
	ภาคผนวก ก..	74
	ภาคผนวก ข..	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	....	91

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีที่สำคัญของอะฟลาทอกซิน.................................. 6

2.2 ค่ากำหนดปริมาณสารอะฟลาทอกซินต่ำสุดที่ยอมให้มีในอาหารในบางประเทศ 10

2.3 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ................. 18

2.4 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี.. 21

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย... 30

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย... 30

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.. 31

4.1 สรุประดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFM_1-BSAจำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA.. 44

4.2 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจนในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA... 45

4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 5 ครั้ง ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ AFM_1-BSA 47

4.4 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับสาร AFM_1 อิสระ ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5.. 47

4.5 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA 48

4.6 ระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA ที่ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 49

4.7 IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA.. 53

4.8 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1 ต่อสารในกลุ่ม AFs และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA.. 57

4.9 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ให้บริสุทธิ์......... 60

4.10 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.. 62

ตารางที่ หน้า

4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร........ 63

ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี indirect ELISA ของซีรัมหนู 74

ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับ AFM_1 อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA........ 75

ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับ AFG_1 อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA........ 76

ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับ AFB_1 อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA........ 77

ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับสารนอกกลุ่ม AFs ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect competitive ELISA........ 78

ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 นาโนเมตร........ 79

ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA........ 80

ก.8 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี AFM_1-9 ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA.... 81

ก.9 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........ 81

ก.10 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติบอดี........ 81

ตารางที่		หน้า
ก.11	ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยวิธี indirect ELISA เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของแอนติบอดี...	82
ก.12	การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM$_1$-9 ที่เหมาะสมกับแอนติเจน ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม ด้วยวิธี indirect ELISA......................	83
ก.13	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของแอนติบอดีจากโคลน AFM$_1$-9 หลังทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี indirect competitive ELISA…………………………………………………...	84

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม AFs……………………………………..	6
2.2	สารเมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซิน บี1..	7
2.3	ระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี………………………………………………..	16
2.4	โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี………………………………………………..	17
2.5	โครงสร้างและคุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 5 ไอโซไทป์…………………..	19
2.6	แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ de novo pathway และ salvage pathway……………………………………………………………………	22
2.7	ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง.................................	24
2.8	indirect ELISA และ indirect competitive ELISA……………………………	26
4.1	ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูไมซ์ที่ฉีดกระตุ้นด้วย AFM_1-BSA จำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี indirect ELISA………………………………………………….	44
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1………………………………………………	50
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-3………………………………………………	51
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9………………………………………………	51

ภาพที่		หน้า
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-15..	52
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-17..	52
4.7	กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17	53
4.8	ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-1 โดยวิธี indirect competitive ELISA...	54
4.9	ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-3 โดยวิธี indirect competitive ELISA...	55
4.10	ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-9 โดยวิธี indirect competitive ELISA...	55
4.11	ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-15 โดยวิธี indirect competitive ELISA...	56
4.12	ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-17 โดยวิธี indirect competitive ELISA...	56

ภาพที่		หน้า
4.13	โครมาโตแกรมที่ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ให้บริสุทธิ์ โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ ชะแอนติบอดีด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที......................................	58
4.14	แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE……………………………………………………….…......	61
4.15	การเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ต่อ AFM_1 ระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	63
ก.1	กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA…………………………….……..	80
ก.2	กราฟมาตรฐานของแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในช่วงความเข้มข้น 0.122-125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร………………………………………………....................	82
ก.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE……………	83

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	Absorbance
Ab	Antibody
AFB_1	Aflatoxin B_1
AFB_2	Aflatoxin B_2
Ag	Antigen
AFG_1	Aflatoxin G_1
AFG_2	Aflatoxin G_2
AFM_1	Aflatoxin M_1
AP	Alkaline phosphatase
AFs	Aflatoxins
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
C	Constant region
CDRs	Complementarity determining region
Da	Dalton (g/mol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DON	Deoxynivalenol
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
FI-IA	Flow-injection immunoassay
FRs	Framework region
H	Heavy chain
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phoepnoribossyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography

HRP	Horseradish peroxidase
HWE	Hot water extraction
IAC	Immunoaffinity column
IC_{50}	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
L	Light chain
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
M	Molar
MAb	Monoclonal antibody
MHC	Major histocompatibility complex
MSPD	Matrix solid phase dispersion
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline ที่มี 0.05% Tween20
PEG	Polyethylene glycol
ppb	Part per billion
ppt	Part per trillion
R_f	Relative mobility
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
T_C	Cytotoxic T cell
T_H	Helper T cell
TK	Thymidine kinase
V	Variable region
v	Volume
%	Percent

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ที่มีการปนเปื้อนอยู่ในพืช และผลผลิตที่สำคัญทางการเกษตร อะฟลาทอกซินแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซินบี (AFB_1, AFB_2) อะฟลาทอกซินจี (AFG_1, AFG_2) และอะฟลาทอกซินเอ็ม (AFM_1, AFM_2) ซึ่ง *A. flavus* จะผลิตเฉพาะอะฟลาทอกซินชนิดบีเท่านั้น ส่วน *A. parasiticus* จะผลิตทั้งอะฟลาทอกซินชนิดบี และอะฟลาทอกซินชนิดจี (Tekinsen, 2005) AFM_1 พบได้ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนม เกิดจากการเมแทบอลิซึมของ AFB_1 ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณตับของสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนของ AFB_1 และจะถูกหลั่งออกมายังต่อมน้ำนมของสัตว์ ดังนั้นปริมาณ AFM_1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนม หรือ ผลิตภัณฑ์นม จะขึ้นกับปริมาณของ AFB_1 ที่สัตว์กินเข้าไป (Cathey และคณะ, 1994) AFM_1 เป็นสารที่มีพิษต่อตับ และเป็นสารก่อมะเร็ง (Lee และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังทนความร้อนได้สูง จึงมีความเสถียรเมื่อผ่านกระบวนการถนอมอาหารด้วยความร้อน อย่างเช่น การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) การรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนในระดับสูงเป็นระยะเวลานานหลายวัน สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันได้ โดยจะมีอาการไข้สูง มีดีซ่านเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แขนขาบวม ปวดเมื่อย อาเจียน ตับบวม และถึงเสียชีวิตในรายที่รุนแรง ส่วนการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำถึงปานกลางเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง โดยมีอาการเช่นเดียวกับแบบเฉียบพลัน แต่รุนแรงน้อยกว่า ทำให้พัฒนาการในเด็กช้า ซูบผอม การเจริญเติบโตลดลง และ อาจทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก, 2005) ดังนั้น แม้ว่าการบริโภคนมหรือผลิตภัณฑ์นมที่มีการปนเปื้อนของ AFM_1 ในปริมาณน้อยก็สามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก ซึ่งเป็นผู้บริโภคหลัก เนื่องจากนมและผลิตภัณฑ์นมเป็นแหล่งโปรตีนและแคลเซียมที่สำคัญ (Rastogi, 2004) คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) จึงได้กำหนดให้มีปริมาณของ AFM_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 และ 0.025 ppb ตามลำดับ (European Commission Regulation, 2004) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AFM_1 ที่ปนเปื้อนในนมและผลิตภัณฑ์นม การตรวจโดยใช้วิธีทางเคมีด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Manetta และคณะ, 2009) และเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

(Cavaliere และคณะ, 2006) มีความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น ได้มีการพัฒนาเทคนิค Electrochemical immunosensor (Micheli และคณะ, 2005) และเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งเป็นวิธีการที่ประหยัด รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง (Pei และคณะ, 2009) เทคนิค ELISA เป็นวิธีที่ตรวจสอบง่าย สะดวก ได้ผลเร็ว แม่นยำ ค่าใช้จ่ายต่ำ และเหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรอง (Screening Test) ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมี แต่ในประเทศไทยนั้น เนื่องจากชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA มีราคาสูง และต้องทำการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปใช้เองจึงช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้ ซึ่งการเตรียมชุดตรวจสอบนั้น ต้องมีการเตรียมแอนติบอดี ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชุดตรวจสอบ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อ AFM_1 และศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1
2) ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1) ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2) ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1
3) หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1
4) ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้
5) ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
6) วิเคราะห์และสรุปผลการทดลองและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมโนโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 และทราบลักษณะสมบัติของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ที่มาของสารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs)

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ในปี ค.ศ. 1962 (พ.ศ. 2505) กลุ่มทำงานวิจัยการเกิดพิษในถั่วลิสงในประเทศอังกฤษ ร่วมกันพิจารณาตั้งชื่อสารพิษจากเชื้อราเหล่านี้ว่า อะ-ฟลา-ทอกซิน (A-fla-toxin) โดยพิจารณาคำว่า "อะ (A)" มาจาก "แอสเปอร์จิลลัส (Aspergillus)" คำว่า "ฟลา (fla)" มาจาก "ฟลาวัส (flavus)" และสารนี้จัดเป็น "สารพิษหรือทอกซิน (toxin)" จึงนำมาเรียกรวมกันว่า "อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin)" (Lillehoj, 1983) เชื้อราสายพันธุ์เหล่านี้เจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสมบัติเป็นพิษต่อคน พืช และสัตว์ อะฟลาทอกซิน เกิดจากขบวนการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของเชื้อรา ทำให้เชื้อราสร้างสารพิษได้ 4 ชนิด คืออะฟลาทอกซินชนิดบี1 และอะฟลาทอกซินชนิดบี2 ซึ่งเรืองแสงให้สีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 256 ถึง 365นาโนเมตร อะฟลาทอกซินชนิดจี1 และอะฟลาทอกซินชนิดจี2 ซึ่งเรืองแสงให้สีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นช่วงเดียวกัน (อนงค์, 2546) ส่วนอะฟลาทอกซินเอ็ม1 พบได้ในน้ำนม ซึ่งเกิดจากการเมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ที่เกิดขึ้นในบริเวณตับของสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี1 และจะหลั่งออกมายังต่อมน้ำนมของสัตว์

2.1.2 อาหารที่พบการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน มักพบในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง และในอาหารแห้งหลายชนิด เช่น พริกแห้ง พริกป่น กระเทียม หัวหอม กุ้งแห้ง ผลไม้แห้ง สมุนไพร รวมถึงเมล็ดข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และเมล็ดพืชที่ใช้ทำอาหารสัตว์ สภาวะที่เหมาะสมทำให้เชื้อราสามารถผลิตสารพิษได้ดีที่สุดอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 24-32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 75 เปอร์เซนต์ขึ้นไป (สุทธิพร, 2543) ซึ่งวัตถุดิบทางการเกษตรหรือเมล็ดพืชที่เสื่อมสภาพ แตกหัก หรือมีแผลเสียหายจากการทำลายของแมลง นก หรือหนู จัดเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ของเชื้อรา ภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เชื้อราเจริญเติบโต และสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี โดยสารพิษจะอยู่ภายในเมล็ดพืชหรือวัตถุดิบเหล่านั้น และไม่สามารถ

มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งประเทศไทยอยู่ในภูมิอากาศดังกล่าวจึงทำให้มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดสารพิษอะฟลาทอกซินกับผลิตผลทางการเกษตร

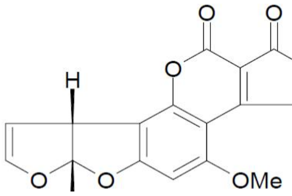
สารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนของการผลิต ตั้งแต่การเพาะปลูก เก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้นำมาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์เหล่านี้ โดยเฉพาะวัตถุดิบประเภทโปรตีนจากพืชและสัตว์บางชนิด เช่น กากมะพร้าว กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ข้าวโพด และปลาป่น ซึ่งมีโอกาสในการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินสูง (คนึงนิจ,2545) ปัจจัยที่เชื้อราใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ สารอาหารที่ต้องการ ความชื้น ความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม (มาลินี, 2527; Heathcote,1984) สารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์มักจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 17 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิตั้งแต่ 24-35 องศาเซลเซียส (คนึงนิจ และอดิลักษ์, 2538; Wilson และคณะ, 1994)

2.1.3 สูตรโครงสร้างทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของสารในกลุ่ม AFs

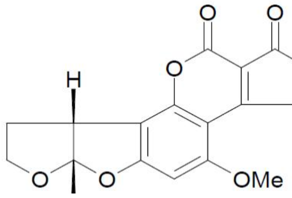
อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษประเภทสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) แบ่งตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มอะฟลาทอกซินชนิดบี ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี1 และบี2 ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นบิสฟิวราโนไอโซคูมาริน (bis-furano-isocoumarin) กลุ่มที่สอง คือกลุ่มอะฟลาทอกซินชนิดจี มีโครงสร้างทางเคมีเป็นไอโซคูมาริน (isocoumarin) ได้แก่ อะฟลาทอกซินจี1 และจี2 ส่วนอะฟลาทอกซินเอ็ม1 เกิดจากกระบวนการไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ของอะฟลาทอกซินบี1 ดังภาพที่ 2.1

อะฟลาทอกซินละลายได้ในน้ำ และแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในสารตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซิน และอะซีโตน อะฟลาทอกซินสามารถเรืองแสงได้ โดยอะฟลาทอกซินบี1 และบี2 จะเรืองแสงสีน้ำเงิน เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร ขณะที่อะฟลาทอกซินจี1 และจี2 จะเรืองแสงสีเขียวปนเหลือง

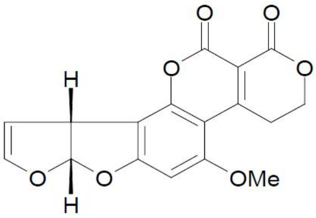
คุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของสารพิษอะฟลาทอกซิน คือ สามารถทนความร้อนได้ถึงระดับอุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.1) ซึ่งทำให้วิธีพาสเจอร์ไรซ์ และสเตอร์ริไรซ์ไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินให้หมดไปได้ แต่สารอะฟลาทอกซินเสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมม่า อะฟลาทอกซินจะคงตัวในสภาพที่เป็นกรด แต่จะสลายตัวในสภาพที่เป็นด่าง และสามารถถูกทำลายได้ด้วยคลอรีน



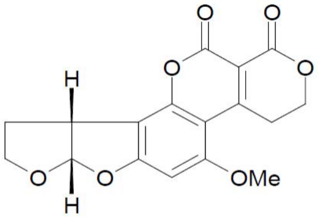
อะฟลาทอกซินบี1



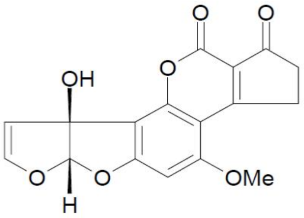
อะฟลาทอกซินบี2



อะฟลาทอกซินจี1



อะฟลาทอกซินจี2



อะฟลาทอกซินเอ็ม1

ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม AFs

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีที่สำคัญของอะฟลาทอกซิน

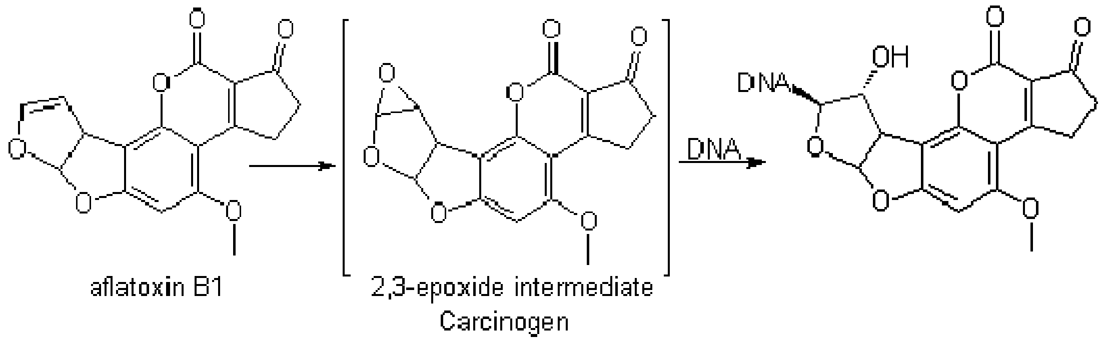
ชนิดอะฟลาทอกซิน	โครงสร้างโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล(Da)	จุดหลอมเหลว(ºC)
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268-296
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286-289
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	244-246
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237-240
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	299

ที่มา: Reddy และWaliyar, 2005

2.1.4 ความเป็นพิษของสารในกลุ่ม AFs

องค์การอนามัยโลกจัดให้สารอะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งที่ร้ายแรงมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากปริมาณของอะฟลาทอกซินเพียง 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย และทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้หากได้รับอย่างต่อเนื่อง

สัตว์แต่ละชนิดจะแสดงอาการ และมีความไวต่อการเป็นพิษของ สารอะฟลาทอกซินต่างกัน เป็ด ไก่ และ ไก่งวง มีความไวต่ออะฟลาทอกซินมากที่สุด รองลงมาได้แก่ สุกร หนู และคน ส่วนสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความต้านทานดีกว่าสัตว์อื่น ยกเว้นในลูกสัตว์จะมีความไวต่ออะฟลาทอกซินมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มที่ (เบญจมาศ, 2543) เมื่ออะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายบางส่วนจะถูกกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเปลี่ยนแปลงเป็นสารเมแทบอไลท์หลายตัว ซึ่งมีทั้งที่มีพิษมากขึ้น และพิษน้อยลง โดยสารเมแทบอไลท์ดังกล่าวจะถูกสะสมในร่างกาย และบางส่วนถูกขับออกทางปัสสาวะ อุจจาระ และทางน้ำนม สารเมแทบอไลท์ที่มีพิษมากที่สุด คือ 2,3-epoxide-aflatoxin B1 เป็นสารก่อมะเร็งจะไปจับกับดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ผิดปกติ และทำให้เกิดมะเร็งที่ตับในที่สุด ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 สารเมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซิน บี1

นอกจากอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารจะเป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงหรือผู้บริโภค เมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซิน เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม1 ที่พบในน้ำนมก็จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค โดยจะพบอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมได้ภายใน 12-24 ชั่วโมง หลังจากโคได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซิน และจะพบมากในช่วงวันแรก โดยปริมาณอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ที่พบจะมีปริมาณ 1% ของอะฟลาทอกซินบี1 ที่ร่างกายได้รับ (วิทยา, 2543)

สารอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน และจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต ผ่านไปสู่อวัยวะต่างๆ เช่น ตับเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนแปลงและกำจัดสารพิษ โดยสารอะฟลาทอกซินจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการสันดาปของเซลล์ตับได้สารอีพอกไซด์ที่ไม่คงตัว ซึ่งสามารถไปเกาะจับอย่างแน่นกับโมเลกุลใหญ่ในเซลล์โดยเฉพาะ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโปรตีนอื่นๆ ซึ่งมีผลทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน เกิดการก่อมะเร็ง (Curtis และ Zhang, 1995) และทำให้จำนวนไรโบโซมภายในเซลล์ผิดปกติและลดจำนวนลง ทำให้เกิดการสลายของไมโตคอนเดรีย เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพและการตายของเซลตับ (มาลินี, 2527) นอกจากนี้การเป็นพิษของอะฟลาทอกซินมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงและกดภูมิต้านทานของร่างกาย (Sahoo และ Mukherjee, 2001) มีผลทำให้โลหิตจาง (Gallagher และ Eaton, 1995) สัตว์ที่ได้รับสารอะฟลาทอกซินจะเกิดอาการพิษที่เรียกว่า Afla-toxicocis โดยจะมีอาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด ผลผลิตลด ภูมิคุ้มกันลด ตับอักเสบดีซ่าน จนถึงตาย ความรุนแรงเมื่อได้รับสารพิษจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดสัตว์ (ศุภกิจ, 2526)

โดยการออกฤทธิ์ในสัตว์ปีกจะทำให้สัตว์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น ผลผลิตเนื้อนมไข่ลดลง คุณภาพไข่ลดลง ขนาดไข่ลดลง การฟักไข่ลดลง เปลือกไข่บางลง ในลูกเป็ดที่ได้รับสารอะฟลาทอกซิน การเกิดพิษแบบเฉียบพลันจะแสดงอาการชักและตายภายใน 2-3 วันหลังจากได้รับสารพิษ พบลักษณะหัว คอ และขาบิดไปข้างหน้าลำ ตัวแอ่นไปข้างหน้า มีจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง และอวัยวะภายใน ตับโตสีเหลืองซีด ไต ตับอ่อนและม้ามขยายใหญ่

สำหรับในโคและกระบือนั้น การเกิดพิษในลูกโคและกระบือนั้นมีความรุนแรงมากกว่าในโค และกระบือตัวโตเต็มวัยลูกโค และกระบือจะแสดงอาการกระสับกระส่าย พยายามถ่ายหรือเบ่งมากจนทวารหนักทะลักออกมา และตายในที่สุด ในแม่โคนมแสดงอาการ ซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลด น้ำนมลด และมีอาการท้องมาน อวัยวะภายในต่างๆบวมน้ำ มีการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับ เซลล์บุท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้นเซลล์บุหลอดเลือดดำ ของตับอักเสบอย่างเรื้อรัง ตับขยายใหญ่ขึ้น

สำหรับมนุษย์นั้นพิษของสารอะฟลาทอกซินแบบเฉียบพลันนั้นมักเกิดในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่อาการที่เกิดจากสารอะฟลาทอกซินในเด็กคล้ายคลึงกับอาการของเด็กที่เป็น Reye's syndrome คือ มีอาการชักและหมดสติได้ เนื่องจากมีความผิดปกติของตับและสมอง น้ำตาลในเลือดลดลง สมองบวม มีการคั่งของไขมันในอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต หัวใจ และปอด บางครั้งมีการตรวจพบสารอะฟลาทอกซินในตับผู้ป่วยด้วย สำหรับในผู้ใหญ่หากได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไป

เป็นจำนวนมาก หรือแม้เป็นจำนวนน้อยแต่ได้รับเป็นประจำ อาจเกิดการสะสมจนทำให้เกิดอาการชัก หายใจลำบาก ตับถูกทำลาย หัวใจและสมองบวม นอกจากนั้นการที่ร่างกายได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นประจำยังเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับ การเกิดไขมันมากในตับและพังพืดในตับ

ความเป็นพิษของสารอะฟลาทอกซินจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ปริมาณที่ได้รับ และความถี่ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย อายุ และเพศ การทำงานของเอนไซม์ในตับของแต่ละบุคคล รวมถึงภาวะทางโภชนาการอื่น ๆ เช่น อาหารที่รับประทาน หรือการได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซิน

2.1.5 การกำหนดปริมาณสารในกลุ่ม AFs

เนื่องจากพิษของอะฟลาทอกซินนั้นรุนแรงมาก แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถก่อให้เกิดอันตรายได้ ซึ่งหน่วยที่ใช้กำหนดปริมาณสารอะฟลาทอกซินมักจะกำหนดเป็นส่วนในพันล้านส่วน (ppb) หรือ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีในผลิตผลเกษตร ในอาหารสัตว์ และอาหารคนนั้น มีกำหนดแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ (ตารางที่ 2.2)

คณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (USFDA) กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินในอาหารและนมได้ไม่เกิน 20 และ 0.5 ppb ตามลำดับ เช่นเดียวกับมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนดให้ไม่เกิน 20 ppb หรือตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2545 แต่ประเทศในยุโรปกำหนดให้อาหารสัตว์ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 10 ppb และกำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมและนมเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 และ 0.025 ppb ตามลำดับ ส่วนคณะกรรมาธิการโคเด็กซ์ (Codex Committee on Food Additived and Contaminants, Joint FAO/WHO Food Standard Programme) ซึ่งทำหน้าที่กำหนดและควบคุมมาตรฐานสากลของการปนเปื้อนในอาหารที่แลกซื้อขายระหว่างประเทศได้ตั้งข้อเสนอการกำหนดค่ามาตรฐานสากล ว่าด้วยการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารต่างๆ ไว้ในเกณฑ์ที่ต่ำ คือในนมและผลิตภัณฑ์นมให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ไม่เกิน 0.5 ppb (ชัยวัธน์ และคณะ ,2551) สำหรับประเทศไทยมีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529)เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารทั่วไปได้ไม่เกิน 20 ppb (คณะกรรมการอาหารและยา, 2529)

ตารางที่ 2.2 ค่ากำหนดปริมาณสารอะฟลาทอกซินต่ำสุดที่ยอมให้มีในอาหาร ในบางประเทศ

ประเทศ	อะฟลาทอกซิน	ประเภทอาหาร	ค่าต่ำสุด(ppb)
สหรัฐอเมริกา	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหารทุกชนิด	20
	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหารสัตว์	20-300
	M_1	นม	0.5
ยุโรป	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหารทุกชนิด	2-15
	M_1	นมและผลิตภัณฑ์นม	0.05
		นมเด็กทารก	0.025
ออสเตรีย	M_1	นมเด็กทารก	0.01
สวิสเซอร์แลนด์	M_1	นมเด็กทารก	0.01
ออสเตรเลีย	B_1	อาหารทุกชนิด	5
นิวซีแลนด์	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหารนำเข้า	15
ญี่ปุ่น	B_1	อาหารทุกชนิด	10
	B_1	อาหารสัตว์	10-20
	M_1	นม	0.5
จีน	M_1	นม	0.5
ไทย	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหารทุกชนิด	20
	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหารสัตว์	50
Codex	B_1, B_2, G_1, G_2	อาหาร	15
	M_1	นม	0.5

ที่มา: อมรา, 2547; Patricia A. และคณะ, 2006

รายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับอะฟลาทอกซินบี1 ในอาหารข้นโคนมในประเทศไทย พบว่ามีการปนเปื้อนในวัตถุดิบที่ใช้ในการผสมอาหารสำหรับเลี้ยงโคนม ซึ่งอะฟลาทอกซินชนิดบี1 จะสร้างสารเมแทบอไลท์ส่งผ่านไปยังนมโคในรูปของอะฟลาทอกซินเอ็ม1 โดยพบว่า อัตราส่วนของอะฟลาทอกซินบี1 ในอาหารที่โคกินเข้าไปต่ออะฟลาทอกซินเอ็ม1 ที่โคขับออกทางน้ำนม มีค่าโดยเฉลี่ยประมาณ 100 ต่อ 1 (เบญจมาศ, 2544) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายของคนและสัตว์ได้ ยิ่งพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมปริมาณสูงเพียงใด ยิ่งส่งผลต่อผู้บริโภคมากขึ้นเท่านั้น เนื่องจากกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินชนิดเอ็ม1 ได้ และยังพบอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการยูเอชที

ด้วย (Diaz และคณะ, 1995) จากรายงานข้างต้นจึงส่งผลกับผู้บริโภคที่บริโภคนมเป็นประจำ อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ โดยเฉพาะในเด็กและเด็กทารกซึ่งมีความต้านทานสารพิษน้อยกว่าผู้ใหญ่ (Galvano และคณะ, 2005) ดังนั้น ปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารโคนม และผลิตภัณฑ์นมจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้ต้องมีวิธีการในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว วิธีการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ คือ HPLC และ ELISA (ประพฤกษ์ และปกรณ์, 2549) ซึ่ง HPLC เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์หาระดับสารพิษแบบยืนยันผล (confirmatory method) ที่มีความละเอียด ถูกต้องและแม่นยำสูง แต่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง บุคลากรต้องมีประสบการณ์และความชำนาญสูง สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และเวลามาก ส่วน ELISA นั้น เป็นวิธีที่ตรวจสอบง่าย รู้ผลเร็ว และราคาถูก จึงมีความจำเป็นในการตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่าง (screening method) ก่อนที่จะใช้วิธีทดสอบแบบยืนยันผล แต่ในประเทศไทยได้มีการนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA จำนวนมาก สำหรับการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซิน ทั้งในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์นม ซึ่งมีราคาสูงประมาณ 10,000 บาทต่อชุด ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบจึงช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้

2.1.6 วิธีการตรวจวิเคราะห์สาร AFs

2.1.6.1 วิธีทางเคมี

2.1.6.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษจากเชื้อราแบบยืนยันผล โดยใช้การตรวจจับกลุ่มสารพิษโดยใช้ตัวทำละลายเป็นตัวนำผ่านคอลัมน์ และตรวจจับการเรืองแสงแสดงผลการตรวจวัดด้วยกราฟ ในปี 2000 Kim และคณะ ใช้เทคนิค HPLC ในการตรวจหา AFM_1 ในนมพาสเจอร์ไรส์ และโยเกิร์ต พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด AFM_1 ในนม และโยเกิร์ต คือ 0.01 ppb ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะมีความละเอียดสูง มีความถูกต้องแม่นยำ แต่มีค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์สูง ดังนั้นจึงไม่เหมาะในการตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมาก

2.1.6.1.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

ในปี 2005 Yang Chen และคณะ ได้ใช้เทคนิค LC-MS ในการตรวจหาอะฟลาทอกซินในนมและนมผง โดยใช้การทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ (clean up) ด้วยวิธี immunoaffinity columns (IAC) พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัด AFM_1 ในนม และนมผง เท่ากับ

0.001 ppb และ 0.0096 ppb ตามลำดับ ดังนั้นเทคนิคการตรวจสารพิษด้วยวิธี LC-MS จึงเป็นวิธีที่มีความสามารถในการตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อยมากๆได้ แต่วิธีนี้ต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และต้องการผู้ชำนาญการในการตรวจวิเคราะห์ เทคนิคนี้จึงไม่เหมาะในการตรวจภาคสนาม หรือการตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมาก

2.1.6.2 **วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา** (Immunological method)

ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซิน ในส่วนผสมของอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์นมอย่างแพร่หลาย Enzyme Immunoassay (EIA) เป็นวิธีตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง สะดวก และรวดเร็ว

การทดสอบทั่วไปมักใช้วัสดุ (solid phase) ประเภทพลาสติก เช่น พอลิโพรไพลีน (polypropylene) ที่ผ่านกระบวนการบางอย่างที่ทำให้พลาสติกเหล่านั้นดูดซับโปรตีนได้ดีขึ้น เป็นตัวดูดซับแอนติเจน หรือแอนติบอดีไว้ก่อน และเมื่อปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนเกิดขึ้นแล้ว ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ส่วนที่ทำปฏิกิริยากันก็จะติดอยู่กับวัสดุ จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรทที่ใส่ลงไปภายหลัง ทำให้เกิดสารมีสีขึ้น จึงเรียกการทดสอบนี้ว่า Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) จากงานวิจัยของ Shi Chun Pei และคณะ (2009) ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออะฟลาทอกซินเอ็ม1 เพื่อใช้ในการทดสอบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมด้วยวิธี ELISA พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ อยู่ที่ 0.04 ppb ซึ่งมีความไวสูง และสามารถตรวจสารปนเปื้อนในปริมาณที่ต่ำกว่าค่าที่ในหลายประเทศได้กำหนดไว้

2.1.7 **ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา**

2.1.7.1 **แอนติเจน** (Antigen, Ag)

แอนติเจน เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่ตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกัน และมีความเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ แม้ว่าสารทุกชนิดที่มีสมบัติเป็นอิมมูโนเจนจะมีสมบัติเป็น

แอนติเจนก็ตาม แต่มีสารโมเลกุลเล็กที่เรียกว่า แฮปเทน (hapten) มีสมบัติเป็นแอนติเจน แต่ขาดสมบัติของการเป็นอิมมูโนเจน ซึ่งไม่สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นต้องใช้กระบวนการทางเคมี เชื่อมแฮปเทนกับโปรตีนพาหะ (carrier protein) สามารถประกอบเป็น hapten-carrier conjugate ซึ่งมีสมบัติเป็นอิมมูโนเจน ซึ่งสมบัติของอิมมูโนเจนที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต ได้แก่

1. มีความเป็นสิ่งแปลกปลอม

สารที่จะกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ สารนั้นจะต้องถูกตรวจว่าไม่มีองค์ประกอบเหมือนกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยโมเลกุลชนิดใดที่ไม่เคยสัมผัสกับลิมโฟไซต์ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature lymphocyte) ในเวลาต่อมาเมื่อแอนติเจนนั้นเข้าสู่ร่างกาย ก็จะถูกตรวจจับโดยระบบภูมิคุ้มกันว่าเป็นสิ่งแปลกปลอม ระดับของการเป็นอิมมูโนเจนขึ้นอยู่กับระดับความแปลกปลอม โดยสารจากสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการห่างกันมากมักจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันมาก

2. ขนาดของโมเลกุล

ขนาดของโมเลกุลมีความเกี่ยวข้องกันโดยตรงกับความเป็นอิมมูโนเจน โดยแอนติเจนขนาด 100,000 ดาลตัน จะกระตุ้นการตอบสนองที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากการที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นจะมีอิพิโทปมากขึ้น และมาโครฟาจจะสามารถจับกินได้ดีมากขึ้น โดยทั่วไปโมเลกุลขนาด 5,000-10,000 ดาลตันจะมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมมูโนเจนต่ำ โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำจะมีสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำ เพราะโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกฟาโกไซโทซิสได้ง่าย

3. องค์ประกอบ และความซับซ้อนทางเคมี

แอนติเจนที่มีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อน (complex) จะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี โปรตีนบางชนิดเป็นโมเลกุลเดี่ยว จะไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่โปรตีนนั้นประกอบด้วยหลายโมเลกุล หรือ มีการเกาะกลุ่ม จะสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ รวมถึงความซับซ้อนของลักษณะโมเลกุลด้านอื่น ๆ เช่น โฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนหรือน้ำตาลเพียงชนิดเดียวจะขาดความเป็นอิมมูโนเจน แม้ว่าจะมีขนาดใหญ่ก็ตามแต่ถ้านำโมเลกุลขนาดเล็กอื่น ๆ หรือเพิ่มความซับซ้อนทางเคมีเป็นโคพอลิเมอร์ (co-polymer) ก็จะทำให้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

4. ความสามารถในการถูกแปรรูปและนำเสนอ

พัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดีและภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต้องการ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างที-เซลล์ กับ แอนติเจนที่ถูกแปรรูป โดยแอนติเจนจะถูกนำเสนอร่วมกับโปรตีนบนผิวเซลล์ที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) แอนติเจนที่ถูกนำเสนอร่วมกับ class II MHC บนผิวของเซลล์จะนำเสนอต่อ Helper T cells (T_H) หรือแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปถูกนำเสนอร่วมกับ class I MHC จะนำเสนอต่อ Cytotoxic T cells (T_C) กรณีของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้เมื่อถูกนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC จะมีการเป็นอิมมูโนเจนต่ำ

นอกจากความแปลกปลอม ขนาดของโมเลกุล องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมีและความง่ายต่อการแปรรูปและนำเสนอเป็นสมบัติที่สำคัญต่อการเป็นอิมมูโนเจนแล้ว สมบัติของสิ่งมีชีวิตเองก็มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วย เช่น จีโนไทป์ของสัตว์ ปริมาณแอนติเจน เส้นทางการให้แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย การผสมและไม่ผสมแอดจูแวนท์ล้วนมีส่วนในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) ดังนั้น สมบัติของสิ่งมีชีวิตเองที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่

1. จีโนไทป์ของสัตว์ที่ได้รับแอนติเจน

องค์ประกอบทางยีน หรือจีโนไทป์ของสัตว์ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันมีอิทธิพลต่อชนิดและระดับของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น หนูขาวสายพันธุ์ต่างๆ จะตอบสนองต่อแอนติเจนต่างกัน บางสายพันธ์จะสร้างแอนติบอดีในซีรัมสูง แต่บางสายพันธุ์จะสร้างแอนติบอดีได้ต่ำ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่ใน MHC และยีนที่ถอดรหัสเป็นตัวรับ (receptor) ของบี-เซลล์ และที-เซลล์ ซึ่งความแปรปรวนของยีนเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการเป็นอิมมูโนเจนของแอนติเจนในสัตว์แต่ละตัว

2. ปริมาณและเส้นทางการให้แอนติเจน

การให้แอนติเจนปริมาณต่ำเกินหรือสูงเกินไปจะไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ เนื่องจากมีปริมาณแอนติเจนน้อยเกินไปที่จะกระตุ้นลิมโฟไซต์ หรืออาจก่อให้เกิดการชักนำให้เกิดสภาวะไม่ตอบสนองขึ้น (tolerance) การให้แอนติเจนเพียงครั้งเดียวโดยทั่วไปจะไม่สามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้นรุนแรง จึงต้องให้ซ้ำ กัน หลาย ๆ ครั้ง เป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองที่รุนแรงได้

เส้นทางการให้แอนติเจนทั่ว ๆ ไป ได้แก่

- การฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (Intravenous injection)
- การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Intradermal injection)
- การฉีดเข้าชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous injection)
- การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection)
- การฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection)

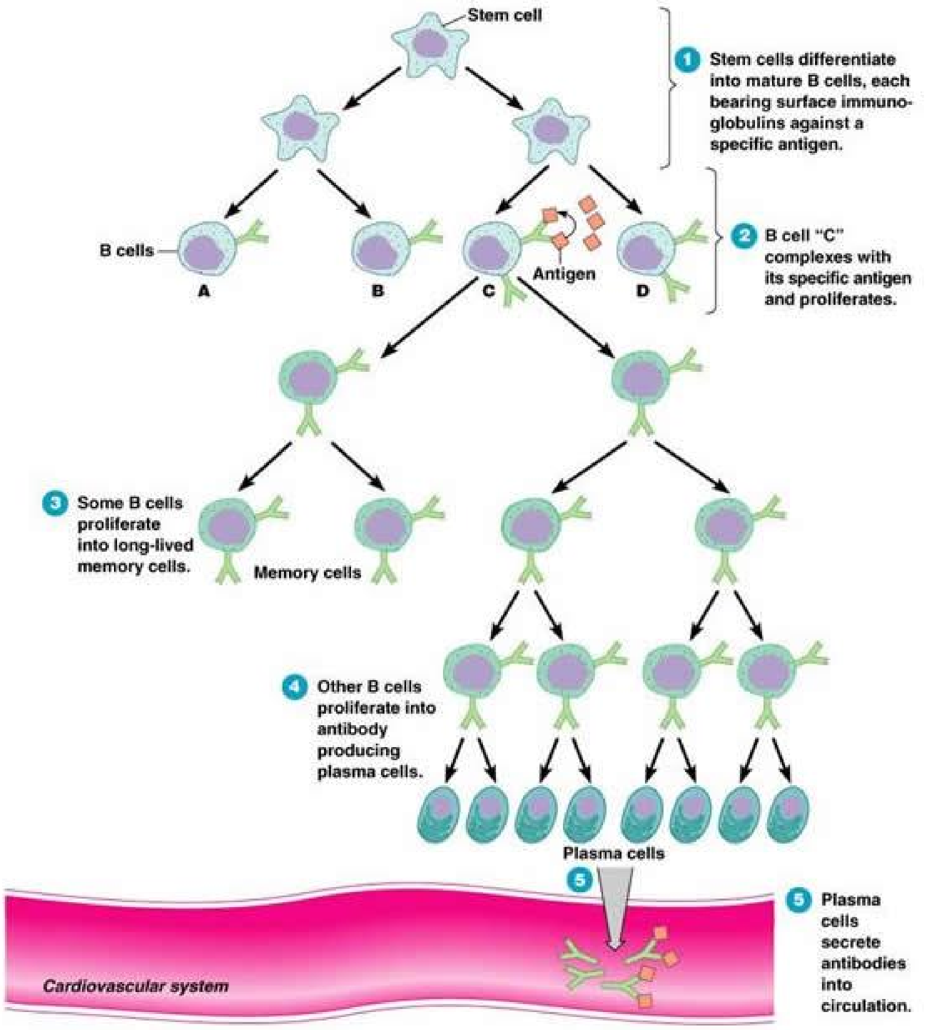
เส้นทางการให้แอนติเจนเกี่ยวข้องกับอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีเซลล์ต่าง ๆ สะสมอยู่จะมีผลต่อการตอบสนองของแอนติเจน การให้เข้าสู่หลอดเลือดดำ แอนติเจนจะถูกนำเข้าสู่ม้ามก่อน ในขณะที่ฉีดเข้าสู่ร่างกายบริเวณต่างๆ แอนติเจนจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอวัยวะต่อมน้ำเหลืองจะเป็นตัวบอกถึงสภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

3. แอดจูแวนท์

แอดจูแวนท์เป็นสารที่ใช้ผสมกับแอนติเจนเพื่อเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน มักใช้ผสมกับแอนติเจนที่มีปริมาณน้อยหรือมีความเป็นอิมมูโนเจนต่ำ แอดจูแวนท์ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น และช่วยเพิ่มการกระตุ้นร่วมของสัญญาณต่างๆ (co-stimulatory signal) แอดจูแวนท์ที่นิยมใช้ ได้แก่ Freund’s complete adjuvant และ Freund’s incomplete adjuvant ที่ประกอบด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil) และ emulsifying agent คือ mannide monooleate เมื่อแอดจูแวนท์ผสมกับแอนติเจนที่ละลายน้ำ จะกระจายเป็นถุงเล็กๆ ล้อมรอบแอนติเจน ทำให้แอนติเจนถูกปล่อยจากบริเวณที่ฉีดช้าลง ใน Freund’s complete adjuvant มีเชื้อ *Mycobacterium* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนผสมอยู่ด้วย เนื่องจาก muramyl dipeptide ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นแมคโครฟาจสูง แมคโครฟาจจะมีการแสดงออกของ class II MHC และ โปรตีน B7 ในเมมเบรน และเพิ่มระดับการหลั่งไซโทไคน์ (cytokine) ที่เป็นตัวกระตุ้นร่วมเพื่อเพิ่มสัญญาณต่างๆ ในการตอบสนองของ T_H

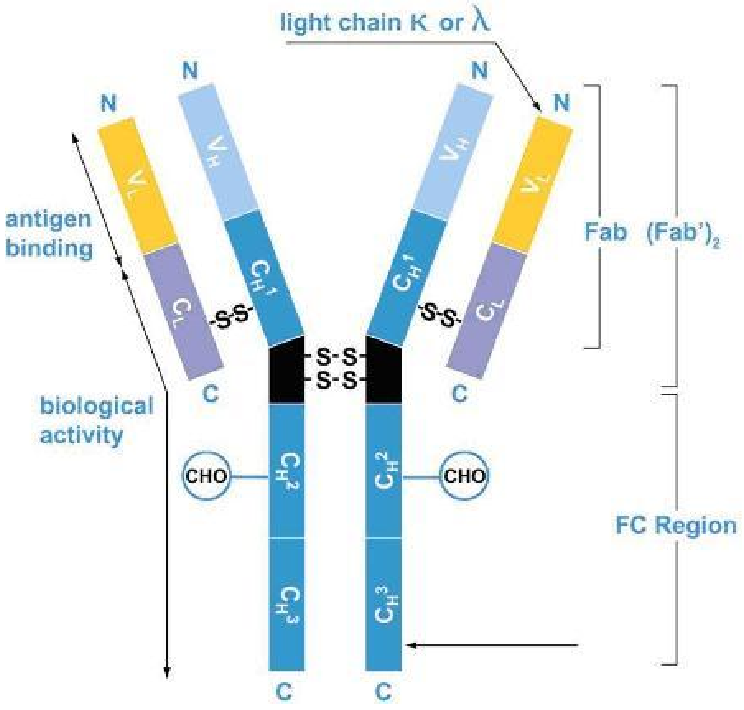
2.1.7.2 **แอนติบอดี** (Antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นโปรตีนทำหน้าที่จับกับแอนติเจน แอนติบอดีสร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ ที่เปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดี เรียกว่า พลาสมาเซลล์ (plasma cell) ระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity) จะหลั่งแอนติบอดีเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ซึ่งทำหน้าที่ในการตรวจจับการสลายพิษ (neutralization) และกำจัดแอนติเจนออกจากร่างกาย ส่วนแอนติบอดีที่อยู่บนผิวเซลล์ของบี-ลิมโฟไซต์เป็นตัวบ่งชี้ความจำเพาะของบี-ลิมโฟไซต์การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดีบนผิวเซลล์เป็นการกระตุ้นให้โคลนของบี-ลิมโฟไซต์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นแบ่งเซลล์ และหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่อยู่บนผิวเซลล์ ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity)
ที่มา: Midlands Technical College

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบุลิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วย สายโพลีเพปไทด์ 4 สาย คือ โปรตีนสายยาว (heavy chain, H) 2 สายที่เหมือนกัน และโปรตีนสายสั้น (light chain, L) 2 สายที่เหมือนกัน เชื่อมต่อกันด้วยไดซัลไฟด์บอนด์ ปลายข้างหนึ่งของสายโพลีเพปไทด์ จะเป็นกรดอะมิโน เรียกปลายข้างนี้ว่า N หรือ amino terminal จะประกอบด้วยส่วนที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนไม่คงที่ เรียกว่า V (Variable region) ซึ่งจะแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่ใช้จับแอนติเจน ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเป็นคาร์บอกซิลิก เรียกปลายข้างนี้ว่า C หรือ carboxy terminal เป็นส่วนที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคงที่เรียกว่า C (Constant region) ดังภาพที่ 2.4 นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง light chain ได้เป็น ชนิด κ และ λ และแบ่ง heavy chain ได้เป็น 5 ชนิด คือ γ μ α δ และ ε ใช้เป็นตัวกำหนดคลาส (class) ของแอนติบอดี ได้แก่ IgG IgM IgA IgD และ IgE ตามลำดับ ความแตกต่างเล็กน้อยของลำดับกรดอะมิโนของ H chain ชนิด α และ γ ทำให้แยกออกเป็นกลุ่มย่อยได้ ในมนุษย์ α chain มี 2 กลุ่มย่อย (α_1 และ (α_2) และกรณีของ γ มี 4 กลุ่มกลุ่ม γ_1 γ_2 γ_3 และ γ_4 ดังตารางที่ 2.3



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี

ที่มา : Abcam's antibody guide

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ

ไอโซไทป์	สายยาว (H-chain)	สายสั้น (L-chain)	กลุ่มย่อย (subclass)
IgG	γ	κ หรือ λ	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$
IgA	α	κ หรือ λ	α_1, α_2
IgM	μ	κ หรือ λ	ไม่มี
IgD	δ	κ หรือ λ	ไม่มี
IgE	ε	κ หรือ λ	ไม่มี

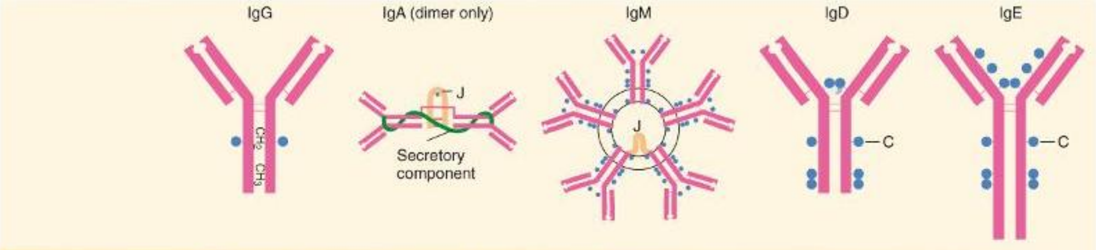
ที่มา: (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

โครงสร้างของ Ig กำหนดโดยโครงสร้างปฐมภูมิ โครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิ และโครงสร้างจตุรภูมิ โครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนส่วน ของ V และ C ของ H chain และ L chain ส่วนโครงสร้างทุติยภูมิเกิดจากการพับทบกันไปมาของสายเพปไทด์แบบ β-pleated sheet เสถียรภาพของโครงสร้างนี้เกิดจากพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายที่เชื่อมระหว่างสายเพปไทป์ที่พับไปมา ซึ่งสายเพปไทป์ม้วนทับเป็นโครงสร้างตติยภูมิอัดแน่นเป็นก้อน (globular domain) และส่วนของโดเมนที่อัดแน่นเป็นก้อนของ H chain และ L chain รวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ ประกอบกันเป็นบริเวณที่ใช้จับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ

ในส่วนบริเวณที่แปรปรวน V (variable region) จะมีบางบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง (hypervariable region) ซึ่งจะพบ 3 แห่งบน H chain และ L chain ซึ่งส่วนที่มีความแปรปรวนสูงนี้จะประกอบกันเป็นบริเวณที่ใช้จับแอนติเจน ซึ่งจะมีลักษณะเข้ากับโครงสร้างอิพิโทปของแอนติเจน จึงเรียกบริเวณนี้ว่า CDRs (complementarity determining region) และมีส่วนที่มีความแปรปรวนน้อยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเรียกว่า FRs (framework region)

คลาส หรือ ไอโซไทป์ (Isotype) ของ Ig ชนิดต่างๆ ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE เกิดจากความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ H chain ในบริเวณ C ทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้าง และบทบาทการทำงานแตกต่างกันในแง่ของการทำหน้าที่กระตุ้นตัวทำงาน (effector) ปริมาณความเข้มข้นในซีรัม และอายุครึ่งชีวิต (ภาพที่ 2.5) โดย IgG เป็นกลุ่มที่พบปริมาณสูงสุดในซีรัม มีความสำคัญในการกำจัดแอนติเจนโดยกลไกต่างๆ และเป็นชนิดเดียวที่สามารถผ่านรกได้ นอกจากนั้น IgG ยังสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (subclass) บนบริเวณคงที่ของโปรตีนสายยาวชนิด γ ได้แก่ $\gamma 1$ $\gamma 2$ $\gamma 3$ และ $\gamma 4$ ทำให้เกิดเป็นกลุ่มย่อย IgG_1 IgG_{2a}

IgG_{2b} และ IgG_3 ตามลำดับ ทั้ง 4 กลุ่มย่อยนี้ถอดรหัสจากยีนต่างกันจึงมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันประมาณ 90-95% โครงสร้างลักษณะที่แตกต่างกันของแต่ละกลุ่มย่อย ได้แก่ ขนาดของข้อพับ จำนวนและตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ ภายในสายระหว่าง H chain IgM ประกอบด้วยแอนติบอดี 5 ชุด (pentamer) ซึ่งมีบริเวณที่จับกับแอนติเจนมาก (multivalence) จึงมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจจับไวรัส การจับรวมตัวกันของแบคทีเรีย และกระตุ้นคอมพลีเมนต์ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนในเลือด ปกติจะอยู่ในสภาวะไม่ทำงาน แต่จะถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบต่างๆ แบบไม่จำเพาะ และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ช่วยในการทำลายและ กำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย IgA จะประกอบด้วยแอนติบอดี 2 ชุด (dimer) หรือ 4 ชุด (tetramer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ กับ J chain ซึ่งเป็นพอลิเพปไทด์ที่เชื่อมบริเวณ Fc ของแอนติบอดี ซึ่งแอนติบอดีกลุ่มหลักที่หลั่งออกนอกร่างกาย รวมถึงน้ำนมและเยื่อเมือกต่างๆ IgD เป็นแอนติบอดีหลักที่ยึดอยู่บนผิวของบี-เซลล์ที่เจริญสมบูรณ์ ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นบี-เซลล์ เมื่อจับอับแอนติเจน ส่วน IgE เป็นตัวก่อให้เกิดอาการแพ้ โดยจะจับกับเม็ดเลือดขาว ได้แก่ มาสต์เซลล์ (mast cell) และเบโซฟิล (basophil) ซึ่งจะชักนำให้หลั่งสารที่อยู่ในแกรนูลของเซลล์ เป็นผลให้เกิดอาการแพ้ ทั้ง IgD และ IgE พบได้น้อยมากในซีรัม (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



	Monomer	Dimer, Monomer	Pentamer	Monomer	Monomer
Number of Antigen Binding Sites	2	4 2	10	2	2
Molecular Weight	150,000	170,000–385,000	900,000	180,000	200,000
Percentage of Total Antibody in Serum	80%	13%	6%	1%	0.002%
Average Half-Life in Serum (Days)	23	6	5	3	2.5
Crosses Placenta?	Yes	No	No	No	No
Fixes Complement?	Yes	No	Yes	No	No
Fc Binds To	Phagocytes				Mast cells and basophils
Biological Function	Long-term immunity; memory antibodies; neutralizes toxins, opsonizes, fixes complement	Secretory antibody; on mucous membranes	Produced at first response to antigen; can serve as B-cell receptor	Receptor on B cells	Antibody of allergy; worm infections

C = carbohydrate. J = J chain.

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างและคุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 5 ไอโซไทป์

ที่มา: Phoenix collage (2010)

2.1.7.3 การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี

เซลล์ บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) หรือ บีเซลล์ (B-cell) จะถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specific antibody) ซึ่งแอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลชนิดต่างๆ ได้ โดยโมเลกุลของแอนติบอดีจะมีบริเวณจำเพาะที่จะจับกับแอนติเจน ความจำเพาะของบี- เซลล์ เกิดจากการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ เมื่อบี-เซลล์มีการจับกับแอนติเจนที่เหมาะสมตรงบริเวณที่จับ (binding site) ของแอนติบอดีบนผิวเซลล์ บี-เซลล์จะถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและพัฒนาเป็นเซลล์ความจำ (Memory B-cell) และ บางส่วนพัฒนาเป็นพลาสมาเซลล์ (plasma cell) ทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเหมือนกับแอนติบอดีบนผิวเซลล์และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, 2541) ดังภาพที่ 2.3

2.1.7.4 ความแตกต่างระหว่างพอลิโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

แอนติเจนแต่ละชนิดจะมีอิพิโทปที่ต่างกันจำนวนมาก แอนติเจนสามารถชักนำการกระตุ้นการตอบสนองของบี-เซลล์ โดยบี-เซลล์จะตรวจจับอิพิโทปต่างกันบนโมเลกุลของแอนติเจนตัวเดียวกัน ทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดที่จำเพาะต่ออิพิโทปที่แตกต่างกัน ที่รวมอยู่ด้วยกันในซีรัม เรียกว่า โพลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAb) เป็นแอนติบอดีที่สร้างจากบี-เซลล์ที่โคลนมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน เป็นบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปบนแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกัน จึงทำให้แอนติบอดีที่ผลิตออกมามีคุณสมบัติเหมือนกัน

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว โพลิโคลนอลแอนติบอดี คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกันซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายมนุษย์ หรือสัตว์ เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยแอนติเจน โดยความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด จะแสดงดังตารางที่ 2.4

2.1.7.5 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้หลักการของsomatic hybridization

บี-เซลล์ และพลาสมาเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนมักมีการแบ่งตัวแบบมีขีดจำกัด และตายในระยะเวลาอันสั้น ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองได้ แต่มีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งที่กำเนิดมาจากเซลล์พลาสมา เรียกว่า เซลล์มัยอีโลมา (myeloma cell) ที่มีคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง คือ สามารถแบ่ง

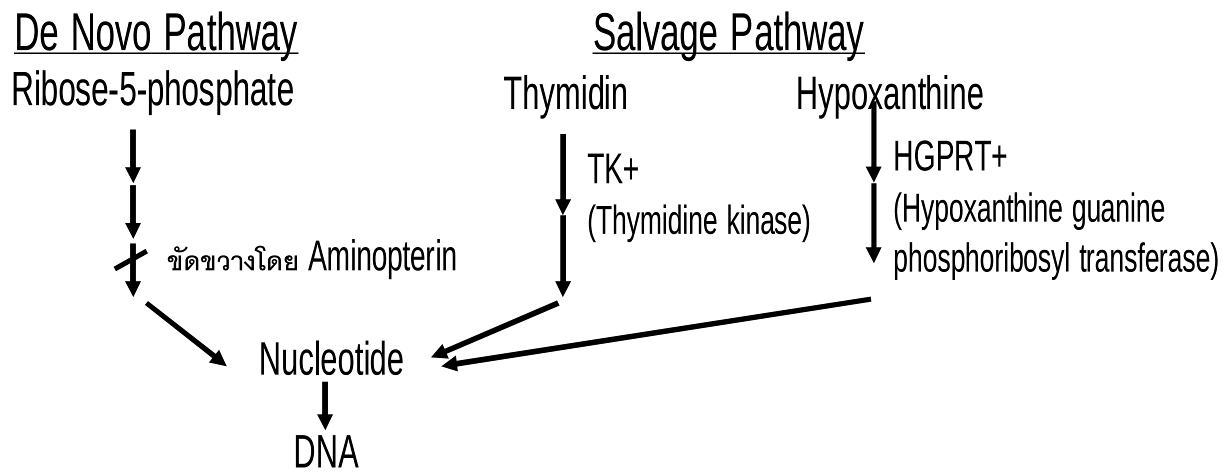
เซลล์ได้อย่างไม่จำกัด โดยในปี ค.ศ. 1975 Kohler และ Milstein ได้พัฒนาการการหลอมรวมบี-เซลล์ที่ได้จากม้ามของหนูทดลองที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจน กับเซลล์มัยอีโลมา ได้เป็นเซลล์ลูกผสม หรือ ไฮบริโดมา (hybridoma) ที่มีคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ได้จากบี-เซลล์ และความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่จำกัดของเซลล์มะเร็ง ทำให้สามารถผลิตโคลนของไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และไม่จำกัดปริมาณ

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สมบัติ	โพลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำ ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น ๆ ได้	ความจำเพาะสูง เนื่องจากจำเพาะกับอิพิโทปเดียวของแอนติเจน
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้อิพิโทปเดียวของแอนติเจน
ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิต	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100-200 μg/ml
ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 100 ml จากซีรัมของกระต่าย	เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบปั่นกวนปริมาณไม่จำกัด
ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ได้	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะกับอิพิโทปเดียว จึงไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาที่ใช้ผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะเวลาเริ่มต้น
ข้อดี	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต ใช้เวลาในการผลิตน้อย	มีความจำเพาะสูง ผลิตได้ไม่จำกัด แอนติบอดีที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ
ข้อเสีย	คุณภาพแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ	เสียเวลาและแรงงานในการผลิตมาก

2.1.7.6 การสร้าง และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

นำบี-เซลล์จากสัตว์ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาชักนำให้เกิดการหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา โดยใช้วิธีการหลอมรวมเซลล์ (fusion) ทางเคมี โดยการใช้ polyethylene glycol (PEG) ซึ่งทำให้เกิดการหลอมรวมของเซลล์เมมเบรนเข้าด้วยกันก่อนที่จีโนมของเซลล์จะผ่านเข้าสู่ไซโทพลาสของอีกเซลล์หนึ่ง เซลล์ที่รวมตัวกันจะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสสองอัน หรือมากกว่า เมื่อเซลล์แบ่งตัวนิวเคลียสจึงรวมตัวกันและเกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) หรือไฮบริโดมา แต่การทำให้เซลล์หลอมรวมตัวกันจะมีเซลล์ที่หลอมรวมกันเอง ไม่หลอมรวมกัน และไฮบริโดมา ถ้านำเซลล์มะเร็งมาหลอมรวมกับเซลล์ปกติแล้วเพาะเลี้ยงต่อไป จะพบว่าเซลล์มะเร็งที่ยังไม่เกิดการหลอมรวมจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุมเซลล์ไฮบริโดมา ดังนั้นจึงต้องหาวิธีที่จะคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นให้สามารถอยู่รอดได้ ในปี ค.ศ. 1964 Littlefield เป็นผู้พบวิธีการคัดเลือกดังกล่าวโดยการใช้ selective medium ซึ่งมีสาร aminopterin, hypoxanthine และ thymidine เรียกว่า HAT medium โดย aminopterin เป็นสารที่เป็น folic acid analogue มีคุณสมบัติที่จะเกาะกับ folic acid reductase ทำให้ยังยั้ง coenzymes ที่จะใช้ในการสังเคราะห์ DNA ทาง "de novo" synthesis pathway เซลล์ที่จะรอดชีวิตใน HAT medium ได้จึงต้องมีการสร้าง DNA ผ่านทาง "salvage pathway" ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญสองตัวคือ Thymidine Kinase (TK) และ Hypoxanthine Guanine Phoepnoribosyl Transferase (HPRT หรือ HGPRT) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งไปจะไม่สามารถสร้าง DNA ได้ (ภาพที่ 2.6)

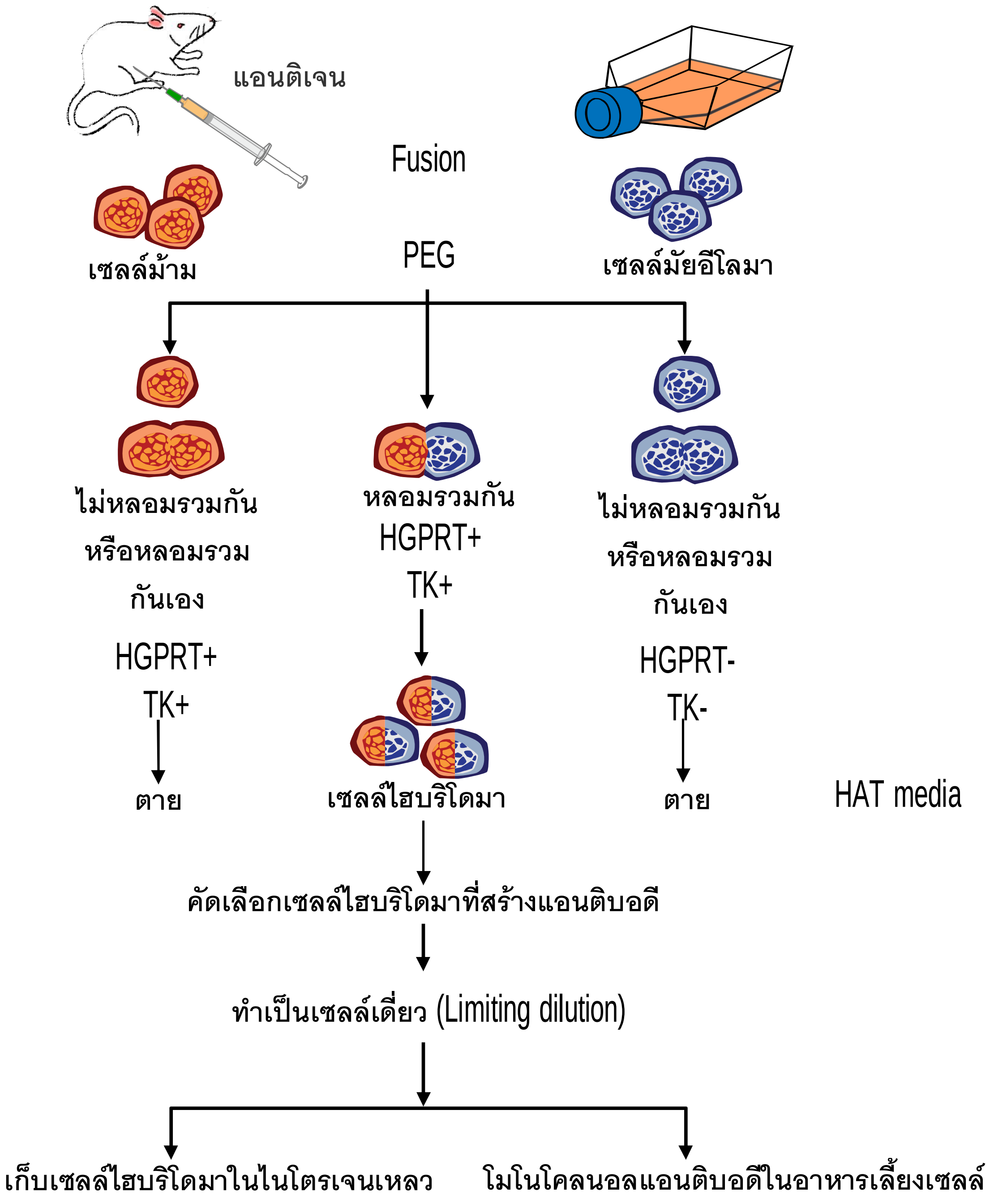


ภาพที่ 2.6 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ de novo pathway และ salvage pathway

ที่มา : ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548

ในการหลอมรวมจะใช้เซลล์มัยอิโลมาที่มีคุณสมบัติขาด HGPRT ทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมา ในอาหารที่ใส่สาร 6-thioguanine หรือ 8-azaguuanine ซึ่งเป็น toxic base analogue ลงไป สารนี้จะถูกใช้ในการสร้าง DNA โดยอาศัย HGPRT ซึ่งจะทำให้เซลล์ มัยอีโลมาตายในที่สุด ดังนั้นเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่จึงเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติขาด HGPRT ดังนั้นถ้านำเซลล์มัยอีโลมาที่ขาด HGPRT มาหลอมรวมกับบี-เซลล์ที่ได้จากม้ามของหนูทดลองซึ่งเป็นเซลล์ปกติ เซลล์มัยอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวม หรือหลอมรวมกันเองจะขาด HGPRT และ TK ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ส่วนบี-เซลล์ที่มีคุณสมบัติในการสร้าง HGPRT ที่หลอมรวมกันเอง หรือ ไม่หลอมรวม ก็จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ได้ระยะเวลาหนึ่งและจะตายไปภายในเวลา 3-7 วัน ดังนั้นจึงมีเพียงเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ภาพที่ 2.7) ภายหลังจากการหลอมรวมแล้ว เซลล์ไฮบริโดมาจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และสูญเสียโครโมโซมไปบ้าง แต่ถ้าทำการคัดเลือกและแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยวตั้งแต่แรก ก็จะสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ยังมีคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีไว้ได้ ถ้าไม่รีบทำการคัดเลือกและแยกเซลล์ไฮบริโดมาก็จะเสี่ยงต่อการที่พบไฮบริโดมาซึ่งสูญเสียโครโมโซมในการสร้างแอนติบอดีไป ซึ่งเซลล์พวกนี้มักจะเจริญเติบโตรวดเร็วกว่าและจะเพิ่มจำนวนปกคลุมเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการไป ดังนั้นการคัดเลือกและแยกเซลล์ไฮบริโดมา จะทำให้ได้ไฮบริโดมาที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียว ที่มีสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่จะใช้งานได้ต่อไป

เนื่องจากในแต่ละโคลนอาจมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีได้ต่างกัน จึงต้องคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ตามที่ต้องการ โดยการใช้วิธีทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา ได้แก่ วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)



ภาพที่ 2.7 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง
ที่มา ดัดแปลงจาก Keith, W. 2005

2.1.8 หลักการ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA หรือ enzyme immunoassay (EIA) อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี ซึ่งแอนติบอดีจะเชื่อมต่อกับเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (chromogenic substrate) เอนไซม์ที่ใช้ติดแอนติบอดีที่ใช้ใน ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase (AP) และ horseradish peroxidase (HRP) เป็นต้น

การพัฒนา ELISA รูปแบบต่าง ๆ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่าง (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

เทคนิค ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งตามลักษณะได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. Indirect ELISA

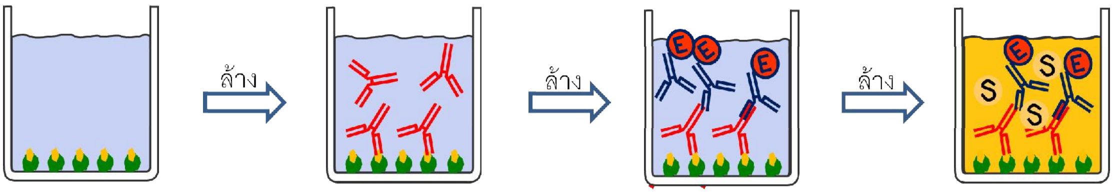
วิธี indirect ELISA ใช้ในการหาระดับของแอนติบอดีหลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจน และใช้ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ ทำได้โดยเติมซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ก้นหลุมแล้วล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนที่ก้นหลุมออก หลังจากนั้นตรวจสอบแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สอง ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยแอนติบอดีตัวที่สองจะมีความจำเพาะกับส่วน Fc ของแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีตัวที่สองออก เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ ปริมาณสีที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถวัดได้โดย microplate reader ที่สามารถอ่านหลุมทดสอบในจาก 96 หลุม ได้ทั้งหมดในเวลาเดียวกัน และทราบผลค่าการดูดกลืนแสงจากทั้ง 96 ได้ภายในเวลาไม่ถึงนาที ดังภาพที่ 2.8

2. Competitive ELISA

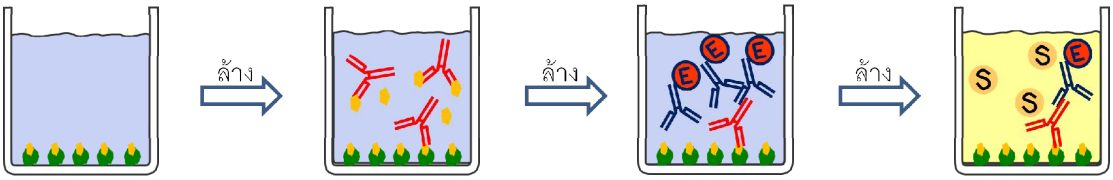
วิธี competitive ELISA ใช้ในกรณีทดสอบซีรัมที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน ว่ามีแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนในรูปอิสระหรือไม่ และใช้ในการคัดเลือกโคลนที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนในรูปอิสระได้ โดยวิธีนี้จะใช้แอนติบอดีผสมกับแอนติเจนในรูปอิสระ หรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจ จากนั้นเติมลงในถาดหลุม 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจน (เหมือนกับกรณีของ indirect ELISA) ซึ่งถ้าแอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนใน

รูปอิสระได้ หรือมีแอนติเจนในตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาก แอนติบอดีที่จะจับกับแอนติเจนก้นหลุมจะมีน้อยลง ดังนั้นหลังจากเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมด้วยเอนไซม์ และมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก เพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับก้นหลุมคล้ายกับ indirect ELISA แต่ในกรณีนี้ ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ต่ำกว่าหลุมที่ไม่มีแอนติเจน ดังภาพที่ 2.8

1. Indirect ELISA



2. Indirect Competitive ELISA



ภาพที่ 2.8 indirect ELISA และ indirect Competitive ELISA

: แอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ

: แอนติเจนในรูปอิสระ

: แอนติบอดี

: แอนติบอดีทุตยภูมิ ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase

: สารตั้งต้นของเอนไซม์

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Shundo และคณะ (2006) ได้ทำการตรวจหา AFM_1 ในตัวอย่างน้ำนมดิบ นมพาสเจอร์-ไรส์ และนมยูเอชที ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC โดยใช้ Immunoaffinity Column เพื่อทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์ จากการทดลองใส่ AFM_1 ในปริมาณ 0.01-0.5 ppb ลงในตัวอย่าง จากเทคนิค TLC พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 73.86 - 85.83% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.01 ppb และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบเชิงปริมาณ (LOQ) อยู่ที่ 0.02 ppb ในเทคนิค HPLC พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 84.5 – 86.1% และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) อยู่ที่ 0.01 ppb

ในปี 2006 Cavaliere และคณะ ได้ทดลองหาปริมาณ AFM_1 ในชีส Grana Padano และ Mozzarella โดยใช้เทคนิค LC-MS และเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างคือ Matrix solid phase dispersion (MSPD) จะสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และ Hot water extraction (HWE) จะสกัดด้วยน้ำ และ เมทานอล ในอัตราส่วน 90:10(v/v) ที่อุณหภูมิ 150 ^oC หลังจากสกัดแล้วจะทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Solid-phase extraction(SPE) โดยใช้ Carbograph-4 จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS พบว่า จากวิธีการสกัดแบบ MSPD สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ใน Grana Padano และ Mozzarella อยู่ที่ 0.025 และ 0.019 ppb ตามลำดับ และวิธีการสกัดแบบ HWE สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.143 และ 0.048 ppb

ในปี 2009 Manetta และคณะ ได้มีการตรวจหา AFM_1 ในชีส Grana Padano ที่ผลิตจากนมที่มีการปนเปื้อนของ AFM_1 เตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วย SPE-C_{18} จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC คอลัมน์ Supercosil LC-18 ที่อุณหภูมิ 40^oC โดยใช้ acetic acid, acetonitrile, 2-propanol และ น้ำ ในอัตราส่วน 2:10:10:78(v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และมีเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนส์ วัดความยาวคลื่นที่ 353 และ 423 นาโนเมตร พบว่าจากการตรวจตัวอย่าง 25 ตัวอย่าง ในตัวอย่างน้ำนมตรวจพบ AFM_1 ปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.03-0.098 ppb ในตัวอย่างหางนม (whey) อยู่ในช่วง 0.017-0.061 ppb ในตัวอย่างตะกอนลิ่มของนม (curd) อยู่ในช่วง 0.093-0.309 ppb และในตัวอย่างชีส Grana Padano อยู่ในช่วง 0.111-0.413 ppb ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.008 ppb

Kim และคณะ (2000) ได้เปรียบเทียบการตรวจ AFM_1 ในนมด้วยวิธี HPLC และELISA จากการทดลองใส่ AFM_1 ในปริมาณ 0.005-0.5 ppb ลงในตัวอย่าง จากเทคนิค HPLC พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 103 - 120% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.01 ppb และเทคนิค ELISA พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 88-106% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.002 ppb

Woychik และคณะ (1984) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1 โดยฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธ์ BALB/C ด้วย AFM_1-BSA และนำม้ามไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา P3-NS1-Ag4-1 จนได้โมโนโคลนออกมา 2 โคลน ได้แก่ AMW-1 และ AMW-4 มีค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (IC_{50}) อยู่ที่ 25 และ 50 ppb ตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFB_1 และ AFG_1 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFB_2 และ AFG_2

ในปี 2009 Pei และคณะ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1 และใช้ในการตรวจหา AFM_1 ในนม แอนติบอดีที่ผลิตได้มีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a} เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFM_1, AFB_1 และ AFG_1 คิดเป็น 100, 13.9 และ 6.7% ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.04 ppb จากการทดลองใส่ AFM_1 ในปริมาณ 0.1 - 3.2 ppb พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 98%

ในปี 2004 Badea และคณะ ใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยามาใช้ในการตรวจ AFM_1 ในนมโดยใช้เทคนิค flow-injection immunoassay (FI-IA) และมี amperometric เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ นำตัวอย่างนมมาบ่มรวมกับแอนติบอดีและแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP ทิ้งไว้ให้เกิดการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่อยู่ในนมกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วย HRP จากนั้นนำมาฉีดเข้าสู่ระบบที่มีคอลัมน์ Protein G แอนติบอดีจะจับกับ Protein G อยู่ในคอลัมน์ ส่วนแอนติเจนทั้งตัวที่ไม่ได้ติดฉลากและตัวที่ติดฉลากที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดีจะออกจากคอลัมน์ เข้ามาในส่วนของการทำปฏิกิริยากับ TMB ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ และวัดกระแสไฟที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ถ้าวัดกระแสไฟที่เกิดจากปฏิกิริยาได้สูงแสดงว่าในตัวอย่างมีความเข้มข้นของ AFM_1 สูง ซึ่งจากวิธีนี้สามารถวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.011 ppb

ในปี 2008 Radoi และคณะ ได้ทำการพัฒนาวิธีตรวจหาการปนเปื้อนของ AFM_1 ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ superparamagnetic nanoparticles เพื่อลดเวลาและขั้นตอนในการทำ ELISA ทำให้ทราบผลได้เร็วขึ้น นำ superparamagnetic nanoparticles มาเชื่อมต่อกับโปรตีนจีและนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1 ยึดเกาะกับโปรตีนจี เพื่อลดขั้นตอนในการ blocking จากนั้นนำไป

เคลือบในจาน 96 หลุม ใส่ตัวอย่างและ AFM_1-HRP เพื่อใช้แข่งขันในการจับกับแอนติบอดีก้นหลุม ใส่สับสเตรตและหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 450 นาโนเมตรซึ่งจากวิธีนี้สามารถวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.004 ppb

ในปี 2009 Goryacheva และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของ AFM_1 แบบคัดกรอง โดยทำการเชื่อมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFB_1 ที่มีปฏิกิริยาข้ามกับ AFM_1 79% เข้ากับเจล Sepharose 4B โหลดเจลลงคอลัมน์ ใส่ตัวอย่างและใส่ AFB_1-HRP เพื่อไปจับกับแอนติบอดีที่ยังว่างอยู่ในคอลัมน์ ใส่สารตั้งต้นของเอนไซม์ ในกรณีที่ในตัวอย่างไม่มี AFM_1 จะเกิดสีฟ้าในคอลัมน์ แต่ถ้ามี AFM_1ปนเปื้อนในตัวอย่างจะไม่เกิดสีในคอลัมน์ ซึ่งจากวิธีนี้สามารถวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.04 ppb

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์ มัยอีโลมา SP2/0-Ag14	ATCC: CRL 8287
เซลล์ มัยอีโลมา P3X 63AG8	ATCC: TIB-9

3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตาราง 3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Germany
เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง	Metter Toledo, USA
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Finland
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc, Denmark
จานเลี้ยงเซลล์	Spl, Korea
จานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม	Costar, USA
ชุดอิเล็กโทรฟอเรซีส	Bio-rad, USA
ตู้ดูดควัน	Theera Trading co., Thailand
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation,USA

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co., Ltd.,Thailand
ทิป	Axygen, USA
ปั๊มลม	Iwaki, Japan
ปิเปตแก้ว	HBG, Germany
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII Memmert, Japan
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA
หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Nunc, Denmark
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
Aflatoxin B_1 (AFB_1)	Fermentek, Israel
Aflatoxin G_1 (AFG_1)	Fermentek, Israel
Aflatoxin M_1 (AFM_1)	Fermentek, Israel
Aflatoxin M_1-BSA (AFM_1-BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumpersulfate $(NH_4)_2S_20_8$; APS	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Jackson Immuno research laboratories, USA
BCA^{TM} protein assay kit	Pierce, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
Beta mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Cinoxacin	Sigma-Aldrich, USA
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid	Merck, Germany
Coomassie brilliant blue R-250	Pierce, USA
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Deoxynivalenol (DON)	Fermentek, Israel
Diethyl ether	Merck, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany
di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	Fluka, China
Fetal calf serum (FCS)	Invitromax, USA
Enoxacin	Sigma-Aldrich, USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	T.P.drug laboratories (1969) Co.,Ltd., Thailand
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycine	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
Isotyping kit	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
Nitrofurantoin	Sigma-Aldrich, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
Norfloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Oxytetracycline	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol HYBRI-MAX® (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Germany
Skim milk	Anline, Thailand
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Merck, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Germany
3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylenediamine (TEMED)	Pierce, USA
Tetracycline	Sigma-Aldrich, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tris (hydroxymethyl) Aminomethane (Trizma base)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Riedel-de Haën, UK

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ด้วย AFM_1 ที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ (AFM_1-BSA; Sigma -Aldrich) โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสม Freund's complete adjuvant (FCA) กับแอนติเจนในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาณแอนติเจนที่ฉีด 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ทำการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 เช่นกัน หลังจากฉีดกระตุ้น 3-4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังฉีด 7 วัน เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีข้อ 3.4.2.4.1 และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ AFM_1 อิสระได้หรือไม่ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ในข้อ 3.4.2.4.2 โดยใช้ AFM_1-BSA มาเคลือบบนจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA เมื่อตรวจพบระดับแอนติบอดีที่สูงและสามารถจับกับ AFM_1 อิสระได้จึงทำการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์เป็นครั้งสุดท้ายด้วย AFM_1-BSA ปริมาณ 2.5 ไมโครกรัม โดยที่ไม่ผสม Freund's adjuvant หลังจากนั้น 4 วันนำม้ามของหนูทดลองมาทำการหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา ในขั้นตอนที่ 3.4.2.2

อนึ่งการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการ การควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์แล้ว (Protocol No. 1061001)

3.4.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีและคัดเลือกโมโนโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1

3.4.2.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโลมา P3X เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 20% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในวันหลอมรวมเซลล์ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตในจำนวนที่มากกว่า 10^7 เซลล์ และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.2.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

ทำการสลบหนูด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัม จากนั้นทำการเปิดช่องท้องโดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อนำม้ามออกมา ใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด แล้วนำเซลล์ม้ามที่ได้ไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.2.3 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์ของม้ามหนูที่ได้จากข้อ 3.4.2.2 มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา P3X ที่ได้จากข้อ 3.4.2.1 ในอัตราส่วนเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยอีโลมาเป็น 1:3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเขย่าเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยๆ หยด 50% PEG ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ที่เป็นสารช่วยหลอมเซลล์ลงไป โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร โดยควบคุมการหยดของ PEG ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้หมดภายใน 1 นาที พร้อมกับการหมุนหลอดช้าๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตรดูดขึ้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้าง PEG ออกจากเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งเป็นอาหารที่เติมสาร hypoxanthine, aminopterin และ thymidine ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นปิเปตลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ไว้ 10-14 วัน ดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1 หรือไม่ ตามวิธีในข้อ 3.4.2.4

3.4.2.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

3.4.2.4.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานชนิด 96 หลุมด้วย AFM_1-BSA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่มี tween20 (PBS-T) เข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) เข้มข้น 5% (w/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มี horse redish peroxidase (GAM-HRP) เชื่อมอยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 3,3'5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม 1M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.2.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับ AFM_1 ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยปิเปตสารละลาย AFM_1 เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย AFM_1-BSA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนยและล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์หรือซีรัมหนูจากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกในขั้นตอนแรก (ข้อ 3.4.2.4.1) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารละลาย AFM_1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติม AFM_1 ในรูปอิสระให้การดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า หลุมที่ไม่มีการเติม AFM_1 นั่นจะแสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับสาร AFM_1 ในรูปอิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาแยกให้ได้โคลนเดี่ยว โดยวิธี limiting dilution

3.4.2.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเซลล์เพียงเซลล์เดียว นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระจากการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม ถ้ายังไม่ได้โคโลนีเดี่ยว จะทำซ้ำ 2-3 รอบเพื่อให้แน่ใจว่าได้เป็นโมโนโคลน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเป็นโคโลนีเดี่ยวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ มาตรวจหาว่าเซลล์ยังคงมีแอนติบอดีต่อ AFM_1 และสามารถจับ AFM_1 ในรูปอิสระได้หรือไม่ ถ้าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1 และสามารถจับกับ AFM_1 ในรูปอิสระได้ จึงทำการขยายเซลล์เพิ่มจำนวน แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

3.4.2.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% (v/v) ให้อยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด (log phase) มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้น 10% (v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็ง ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตรและนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นจึงย้ายลงไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.2.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวมาแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันทีเมื่อน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในหลอดละลายหมดแล้ว ให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v)

3.4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

3.4.3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการเตรียมแอนติบอดี ที่จำเพาะกับไอโซไทป์ชนิดต่าง ๆ คือ IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM จาก isotyping kit มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:6,000 เท่าใน PBS เติม ลงในจาน ELISA ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบไอโซไทป์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มีเอนไซม์ HRP เชื่อมอยู่ (โดยที่แอนติบอดีทุติยภูมิมีความจำเพาะกับส่วน Fab (HRP-Rabbit anti mouse IgG Fab specific) ของ IgG ของหนู ที่เจือจาง 1:2,000 ใน PBS บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.3.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (50% of inhibition concentration; IC_{50}) เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เทียบกับที่ไม่ใส่สารแข่งขัน และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการเติมลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.0048-4 นาโนกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และ สารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และ แกน X เป็นค่า ล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและคำนวณค่า LOD โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นที่ B_0-3SD เมื่อ B และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่มีการเติมแอนติเจนและไม่เติม แอนติเจน ตามลำดับ และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.3.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1

ความจำเพาะของแอนติบอดีจะรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับสารอื่นในกลุ่ม AFs และสารนอกกลุ่มหรือไม่ โดยจะทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้กับสารอื่นๆ ทั้งในกลุ่ม และนอกกลุ่ม AFs โดยการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งได้จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และเติมลงไปผสมกับสาร AFM_1 และ ตัวแข่งขันที่ต้องการทดสอบซึ่งเป็นสารในกลุ่ม AFs จำนวน 2 ชนิด คือ AFB_1 และ AFG_1 ที่ความเข้มข้น 0.0048-4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงสารนอกกลุ่ม AFs คือ deoxynivalenol ซึ่งเป็นสารพิษที่สร้างจาก *Fusarium sp* และสารกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ chloramphenicol, cinoxacin, ciprofloxacin, enoxacin, enrofloxacin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline และ tetracycline ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย กับสารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และ แกน X เป็นค่าล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยั้บยั้งที่ 50 % (50% of inhibition concentration; IC_{50}) หาได้จากการนำค่าที่ $50\% \ B/B_0$ มาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้น และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวที่ใช้เป็นตัวแข่งขัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของ } AFM_1}{IC_{50} \text{ ของ ตัวแข่งขันอื่น}} \times 100$$

3.4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทรกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) โดยใช้โปรตีนจี

3.4.4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sapharose) 5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในเอทานอลเข้มข้น 20%(w/v) มาล้างเอทานอลออก แล้วเติม 2.0mM sodium phosphate buffer pH 7.0

จากนั้นเตรียมคอลัมน์โปรตีนจีให้เข้าสู่ภาวะสมดุลโดยปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ลงในคอลัมน์โปรตีนจี ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับกับโปรตีนจีในคอลัมน์ออกด้วย 2.0mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ทำการชะแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนจีด้วย 0.1M glycine-HCl pH 2.7 โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ในหลอดที่มี 1M tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 65 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่าค่าความเป็นกรดเป็นเบสของสารละลายให้เป็นกลาง หลังจากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อนำมาวาดโครมาโตแกรม แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีแอนติบอดีมารวมกัน เพื่อนำไปไดอะไลซีสใน PBS ที่มี 0.01% thimerosal เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดีต่อไป

3.4.4.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

เตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0-1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน และเจือจางแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 2 เท่า ด้วย PBS โดยเติมสารละลาย BSA และแอนติบอดีที่เตรียมไว้ลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยผสมสารละลาย A โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต กรดไบคาร์บอนิค และโซเดียมทาเทรตอยู่ และสารละลาย B คูปลิกซัลเฟต เข้มข้น 4% ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 562 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำข้อมูลระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างมาสร้างกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณกลับไปเป็นปริมาณโปรตีน

3.4.4.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

3.4.4.3.1 การหาปริมาณแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

หาปริมาณแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ได้จากการทำไดอะไลซีสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี IgG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{extinction coefficient ของ IgG}}$$

<u>หมายเหตุ</u> : ค่า extinction coefficient ของสารละลายแอนติบอดี IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1.35

3.4.4.3.2 การหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์

หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 1:1,600 และ 1:3,200 และแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วให้มีความเข้มข้น 0.122-125 นาโนกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาทำ indirect ELISA แล้วสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของแอนติบอดีเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

3.4.4.4 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.4.4.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

ทดสอบความบริสุทธิ์ และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซีสแบบเอสดีเอส(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) โดยเตรียม 15% separating gel ที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.2 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมหน้ากลั่น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียม 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel และใส่หวีเพื่อเป็นแม่พิมพ์ของหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว 30 นาที

3.4.4.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายสีย้อมทีมี SDS, mercaptoethanol และ bromophenol blue (SDS staining dye) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปิเปตในหลุมเจล

3.4.4.4.3 การทำอิเล็กโทรฟอเรซีส

ทำการแยกแอนติบอดีโดยนำเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบเข้ากับเครื่องทำอิเล็กโตฟอเรซีส (electrophoresis chamber) ที่มี SDS ในสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (running buffer) ทั้งส่วนบนและส่วนล่างของเครื่อง นำสารละลายตัวอย่างมาปิเปตในหลุมเจลไม่เกินหลุมละ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลุมของ marker ให้ปิเปตปริมาตร 2 ไมโครลิตร ต่อขั้วไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue (staining solution) ข้ามคืนและล้างในสารละลายของเอทานอลและกรดอะซิติก (destaining solution) จนกว่าเจลจะใสและเห็นสีของแถบโปรตีนชัดเจน

3.4.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความไวด้วยวิธี indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.3.2

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

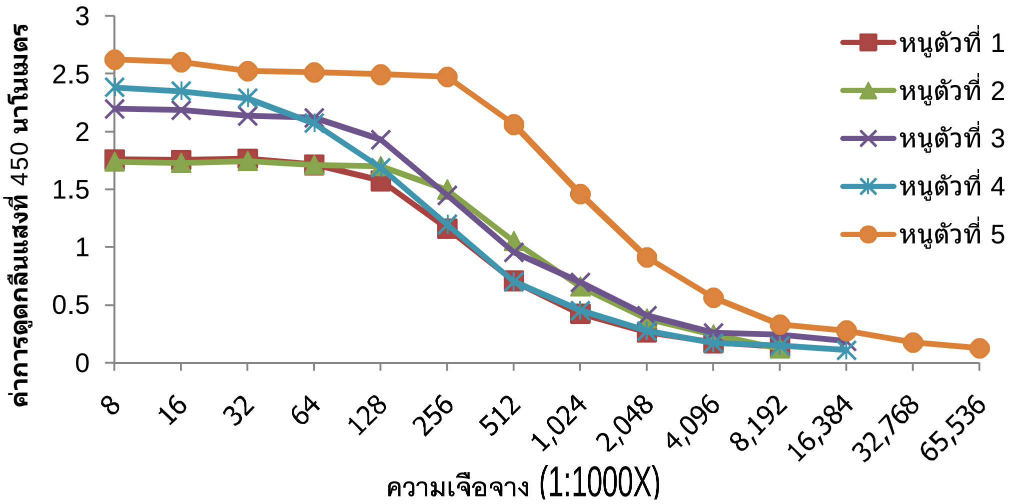
4.1 ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

ทำการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM_1-BSA (Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของหนูไมซ์ในวันที่ 7 หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 และแยกซีรัมมาหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect Competitive ELISA คัดเลือกหนูไมซ์ที่มีระดับแอนติบอดีสูงอย่างน้อย 1,000 (Liddle และ Cryer, 1991) และสามารถจับกับ AFM_1 ในรูปอิสระได้ เพื่อใช้สำหรับหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป สำหรับหนูไมซ์ที่มีการสร้างแอนติบอดีในระดับต่ำ เนื่องจากการกระตุ้นบี-ลิมโฟไซท์ในหนูยังเกิดขึ้นไม่ดี จะไม่นำหนูไปใช้เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพราะอาจจะทำให้เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีโอกาสที่จะไม่ผลิตแอนติบอดี หรือผลิตได้น้อย ควรฉีดแอนติเจนเพิ่ม จนหนูสร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูงต่อไป

4.1.1 การหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของหนูไมซ์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้น

จากการทดสอบหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังภาพที่ 4.1 (ตารางที่ ก.1, ภาคผนวก ก) โดยเลือกระดับแอนติบอดีที่ความเจือจางของซีรัม ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.1 (Liddle และ Cryer, 1991) พบว่าหนูทั้ง 5 ตัว มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป โดยสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ AFM_1-BSA ได้ในระดับสูง

หนูทั้ง 5 ตัวให้ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1-BSA อยู่ในช่วง 8,192,000 – 32,768,000 โดยหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีต่ำที่สุด คือ หนูตัวที่ 1และ2 ให้ระดับแอนติบอดี 8,192,000 ส่วนหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด คือ หนูตัวที่ 5 โดยให้ระดับแอนติบอดี 32,768,000 ดังตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูไมซ์ที่ฉีดกระตุ้นด้วย AFM_1-BSA จำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี indirect ELISA

ตารางที่ 4.1 สรุประดับแอนติบอดีของหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFM_1-BSAจำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA

หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดี
1	8,192,000
2	8,192,000
3	16,384,000
4	16,384,000
5	32,768,000

4.1.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ

จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยเลือกระดับความเจือจางในซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ประมาณ 1.0-1.3 มาทดสอบว่าแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมนั้น สามารถจับกับ AFM_1 ในรูปอิสระได้หรือไม่ พบว่าแอนติบอดีในซีรัมจากหนูไมซ์ทั้ง 5 ตัวสามารถจับกับ AFM_1ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ โดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรลดลงเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่ไม่มีการแย่งจับของ AFM_1 อิสระ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันในการแย่งจับของ AFM_1 ในรูปอิสระอยู่ในช่วง 52.97-85.87 % ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจนในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

หนูตัวที่	ระดับความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		% การแข่งขัน
		ไม่มี AFM_1	AFM_1 (2µg/ml)	
1	1: 256,000	1.258	0.541	56.99
2	1: 512,000	0.927	0.410	55.77
3	1:512,000	0.956	0.185	80.65
4	1:256,000	1.196	0.169	85.87
5	1:1,024,000	0.808	0.380	52.97

4.2. การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1

เมื่อฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ทั้ง 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM_1-BSA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง พบว่าหนูมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดี และแอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับ AFM_1 ในรูปอิสระ จึงทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูไมซ์กับเซลล์มัยอีโลมา การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1-3 ใช้เซลล์มัยอีโลมา SP2/0 และการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4-5 จะใช้เซลล์มัยอีโลมา P3X นำเซลล์ม้ามของหนูไมซ์มาผสมกับเซลล์มัยอีโลมา แล้วนำไปปั่นเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกมารวมกัน จากนั้นหลอมรวมเซลล์ด้วย 50% PEG แล้วล้างออก เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เพื่อกำจัดเซลล์มัยอีโลมา หลังจากการหลอมรวมประมาณ 10 วัน ตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพบว่าเซลล์ไฮบริโดมา

เริ่มมีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT โดยจะเห็นเซลล์ขนาดเล็ก ลักษณะกลมใสเริ่มมีการเกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีภายในหลุม หลังจากที่มีการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาเซลล์ประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาเจริญขึ้นมาคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ โดยวิธี indirect ELISA หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวก (ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 450 นาโนเมตร มากกว่า หรือเท่ากับ 0.7) มาทำการทดสอบต่อไป เพื่อดูว่าแอนติบอดีที่เซลล์ไฮบริโดมาผลิตได้ สามารถจับกับ AFM_1 ในรูปอิสระได้หรือไม่ โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA ให้ผลดังตารางที่ 4.3

จากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปประมาณ 1 สัปดาห์พบว่าในหลุมมีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเพียงเล็กน้อยเป็นโคโลนีอยู่ในหลุม แต่พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเซลล์ไฮบริโดมา และมีเจริญอย่างรวดเร็วจึงส่งผลให้ไปบดบังการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 และ 3 พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1-BSA ที่ใช้เคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA จากการทำ indirect ELISA แต่ไม่สามารถจับกับ AFM_1 อิสระจากการทำ indirect competitive ELISA จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับสาร AFM_1 อิสระ จำนวน 2 หลุม นำแต่ละหลุมมาแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution หลังจากขั้นตอนนี้รอให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบว่าเซลล์ยังสามารถผลิตแอนติบอดีและจับกับสารอิสระได้หรือไม่ ด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA ตามลำดับ แต่พบว่าเซลล์ได้สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไป เนื่องจากโคลนที่ได้มีความไม่คงตัว (stability) จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับสาร AFM_1 อิสระ จำนวน 11 หลุม นำแต่ละหลุมมาแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution ทำการคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับ AFM_1 อิสระได้ดี โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect competitive ELISA โดยหลุมที่ใส่ AFM_1 อิสระแล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากกว่า 90% เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่ใส่ AFM_1 แสดงว่าโคลนนั้นสามารถผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับAFM_1 อิสระได้ดี พบว่ามีทั้งหมด 5 โคลนที่มีสมบัติดังกล่าว จึงทำการกำหนดรหัสของเซลล์ไฮบริโดมา ได้แก่ AFM_1-1,

AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และAFM_1-17 ดังตารางที่ 4.4 ต่อมาจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดย แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการตรวจสอบลักษณะสมบัติต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 5 ครั้ง ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ AFM_1-BSA

ครั้งที่	จำนวนตั้งต้น	จำนวนที่เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ		จำนวนที่ผลิตแอนติบอดี		จำนวนที่แอนติบอดีจับกับ AFM_1		จำนวนโคลนที่ได้	
	(หลุม)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(โคลน)	(%)
1	1,152	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1,776	386	21.73	175	9.85	-	-	-	-
3	1,152	110	9.55	98	8.50	-	-	-	-
4	2,200	990	45.00	87	3.95	2	0.09	-	-
5	1,584	639	40.34	157	9.91	11	0.69	5	0.31

ตารางที่ 4.4 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับสาร AFM_1 อิสระ ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		% การแข่งขัน
		ไม่มี AFM_1	AFM_1 (2µg/ml)	
AFM_1-1	130/1F/5G/11E/10F	2.737	0.088	96.78
AFM_1-3	130/1F/6F/10B/6H	2.838	0.075	97.36
AFM_1-9	131/11D/9D/10H/7G	2.992	0.277	90.74
AFM_1-15	70/3F/8H/11C	2.900	0.091	96.86
AFM_1-17	151/7B/12F/9H	2.756	0.118	95.72

4.3 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากไฮบริโดมาแต่ละโคลนมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบไอโซไทป์ เพื่อที่จะได้ทราบธรรมชาติของแอนติบอดีที่ได้ ว่ามีแรงจับของแอนติบอดีต่ออิพิโทป 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน (antibody affinity) หรือ แรงจับรวมของแอนติบอดีที่มีตำแหน่งจับหลายตำแหน่งและแอนติเจนที่มีอิพิโทปซ้ำๆ กัน (antibody avidity) อย่างไร เช่น กรณีของ IgM จะมี affinity ต่ำกว่า IgG แต่มี avidity สูงกว่า เนื่องจากมีตำแหน่งที่จับแอนติเจนจำนวนมากกว่า ทำให้ IgM สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ IgG นอกจากนี้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทรกราฟีแบบสัมพรรคภาพ จำเป็นต้องทราบกลุ่มย่อย ของ IgG เพื่อที่จะได้เลือกชนิดของคอลัมน์ให้เหมาะสม เนื่องจากกลุ่มย่อยของ IgG แต่ละชนิด มีความสามารถในการจับกับ โปรตีนเอ หรือ โปรตีนจี ด้วย affinity ต่างกัน จากการทดสอบไอโซ-ไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

รหัสเซลล์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร					
ไฮบริโดมา	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
AFM_1-1	1.087	0.071	0.086	0.085	0.073	0.216
AFM_1-3	1.098	0.073	0.071	0.088	0.072	0.221
AFM_1-9	1.124	0.074	0.086	0.09	0.07	0.219
AFM_1-15	1.034	0.071	0.084	0.087	0.074	0.225
AFM_1-17	1.051	0.072	0.083	0.09	0.071	0.226

หมายเหตุ : ส่วนที่เน้น หมายถึง ไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน

4.3.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ

หาระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมเพื่อที่จะนำไปทดสอบความจำเพาะต่อ AFM_1 ของแอนติบอดีที่ได้ ด้วยวิธี indirect ELISA เนื่องจากในแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างกัน จึงทำให้ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุม โดยใช้แอนติเจน AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเคลือบหลุม เลือกค่าความเจือจางที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 ทำให้ได้ระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมของโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-15 และ AFM_1-17 ที่ 1:3,200 และโคลน AFM_1-9 ที่ 1:1,600 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA ที่ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

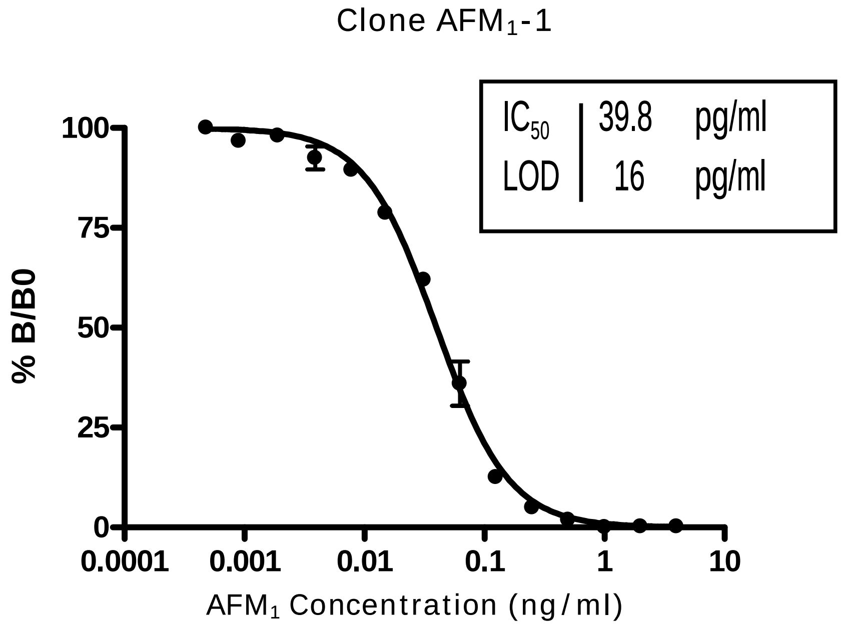
ระดับการเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา				
	AFM_1-1	AFM_1-3	AFM_1-9	AFM_1-15	AFM_1-17
1:200	1.932	1.927	1.968	1.938	2.076
1:400	1.782	1.507	1.717	1.978	1.993
1:800	1.946	1.132	1.854	2.020	2.066
1:1,600	1.778	1.966	1.479	1.836	1.593
1:3,200	1.293	1.462	0.865	1.170	1.058
1:6,400	0.686	0.837	0.486	0.589	0.767
1:12,800	0.494	0.476	0.319	0.349	0.346
1:25,600	0.273	0.271	0.213	0.209	0.190

หมายเหตุ : ส่วนที่เน้น หมายถึง ระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมในแต่ละโคลน

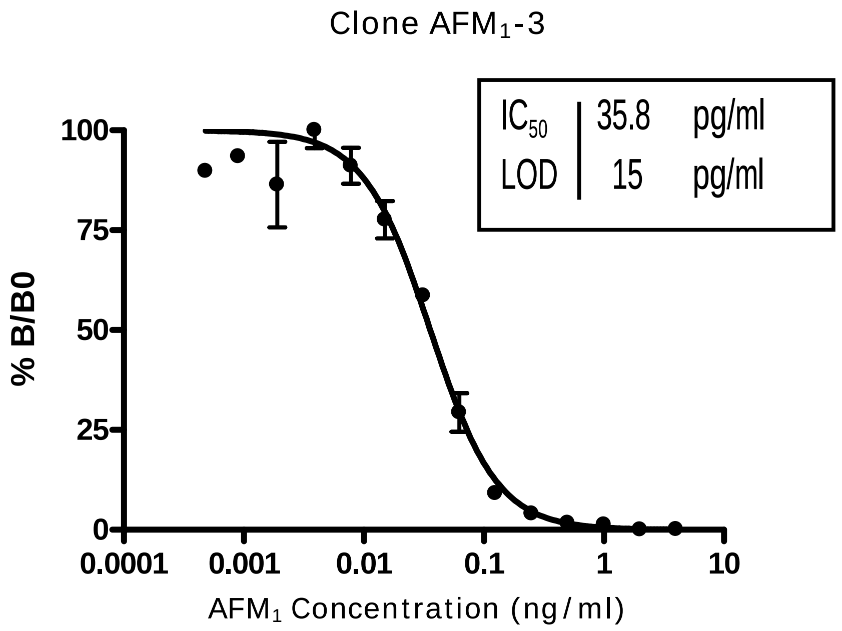
เมื่อทราบค่าความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนแล้ว จากนั้นหาค่า IC_{50} และ LOD ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1 ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 4.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (0.0048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จนถึง 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังภาพที่ 4.2 - 4.6

พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 39.8, 35.8, 16.7, 28.3 และ 22.3 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังสรุปในตารางที่ 4.7

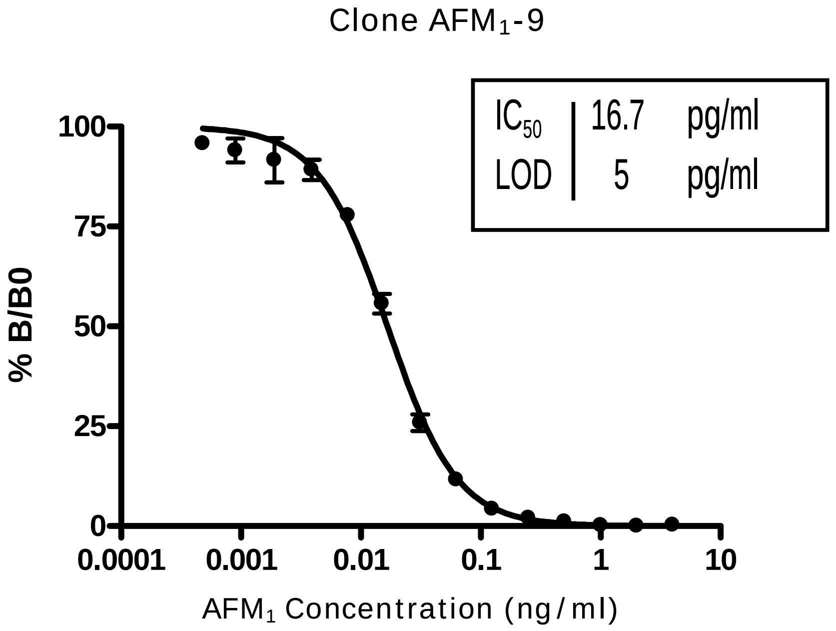
เมื่อเปรียบเทียบค่า LOD ที่ได้จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน กับการศึกษาของ Pei และคณะ (2009) ที่ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1 แล้วมีค่า LOD อยู่ที่ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (40 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 มีความไวต่ำกว่าที่ Pei และคณะได้ศึกษาไว้ แต่อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความไวต่อ AFM_1 ในระดับที่ต่ำกว่าค่าที่คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ ว่าให้มีปริมาณของ AFM_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.025 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ



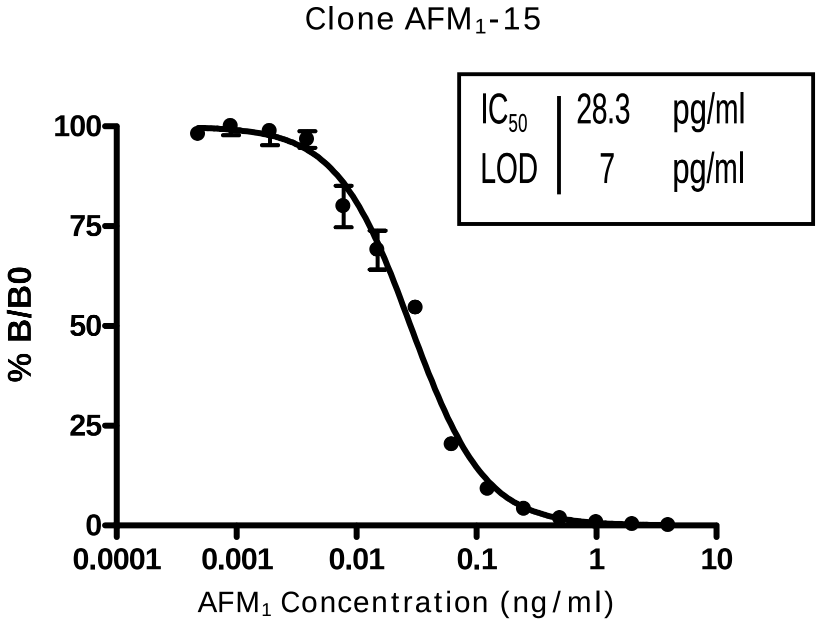
ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1



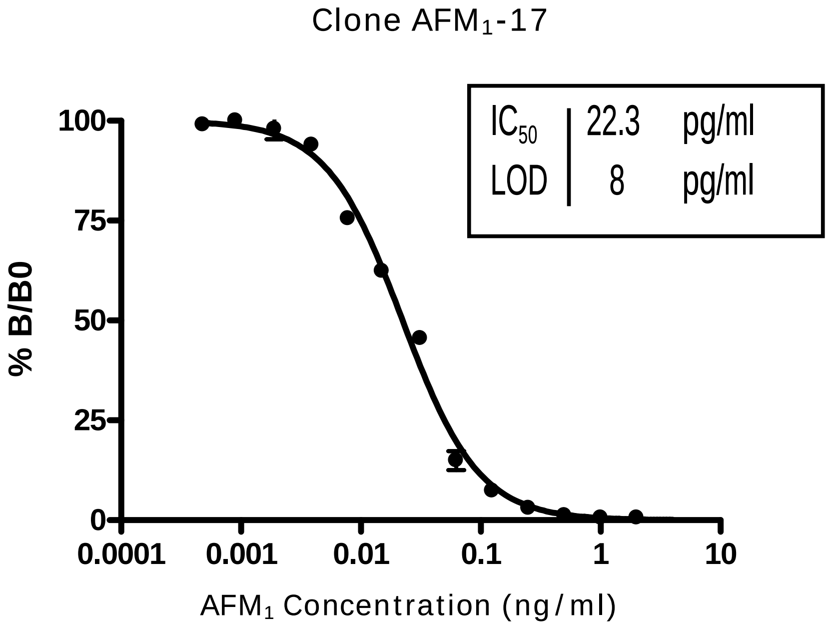
ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-3



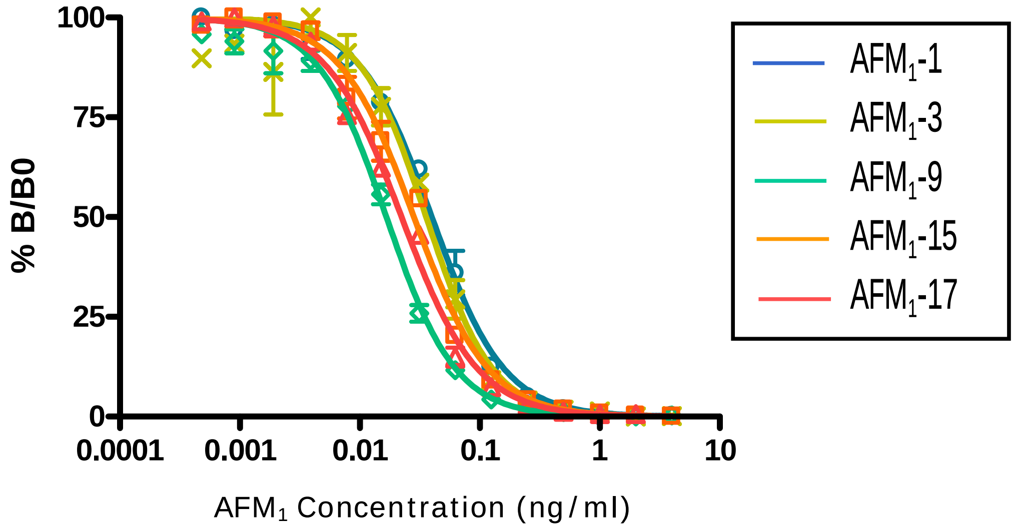
ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-15



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-17



ภาพที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17

ตารางที่ 4.7 IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

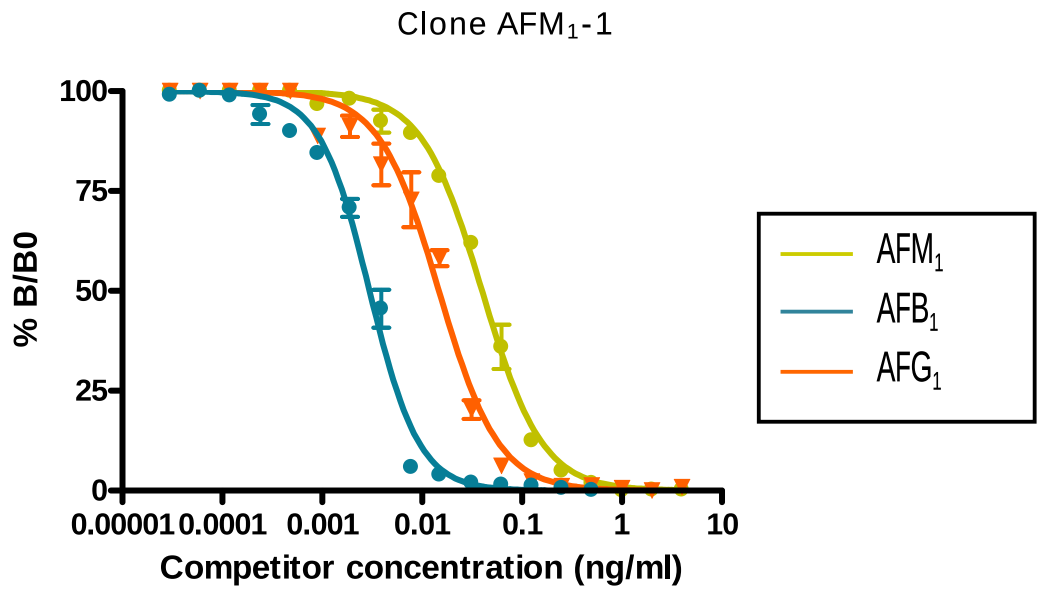
รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC_{50} (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)
AFM_1-1	39.8	16
AFM_1-3	35.8	15
AFM_1-9	16.7	5
AFM_1-15	28.3	7
AFM_1-17	22.3	8

4.3.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1

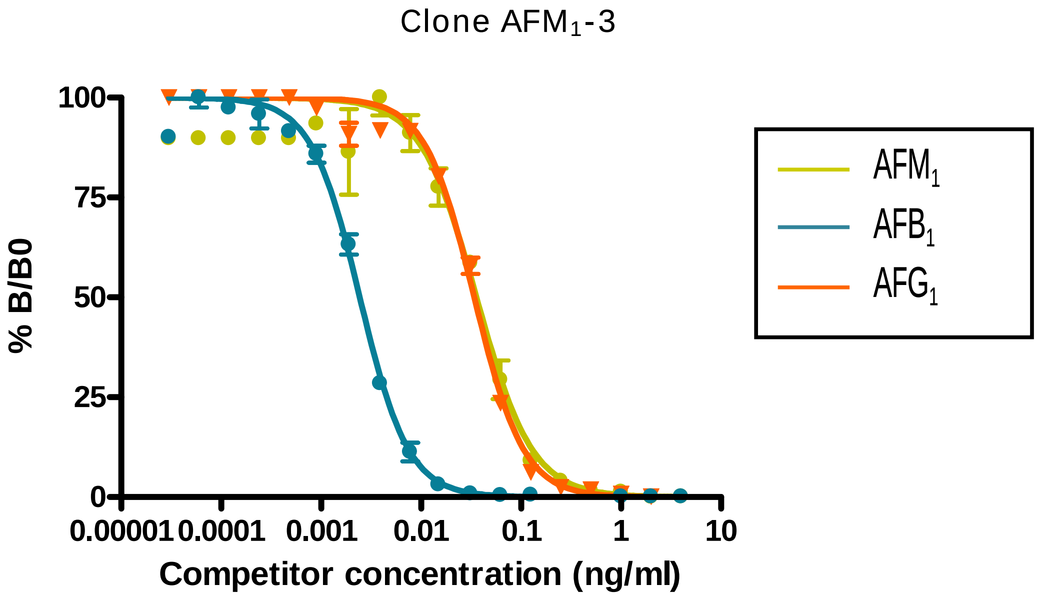
ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนโดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ตัวแข่งขันเป็นสารในกลุ่ม AFs คือ AFB_1 และ AFG_1 ส่วนสารนอกกลุ่ม AFs ได้แก่ deoxynivalenol (DON) ซึ่งเป็น

สารพิษจาก *Fusarium sp.* และสารในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ tetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, enoxacin, cinoxacin และ nitrofurantoin นำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 เพื่อหา IC_{50} ของแต่ละสาร ดังภาพที่ 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 และ 4.12 (ตารางที่ ก.2 ถึง ก.5, ภาคผนวก ก)

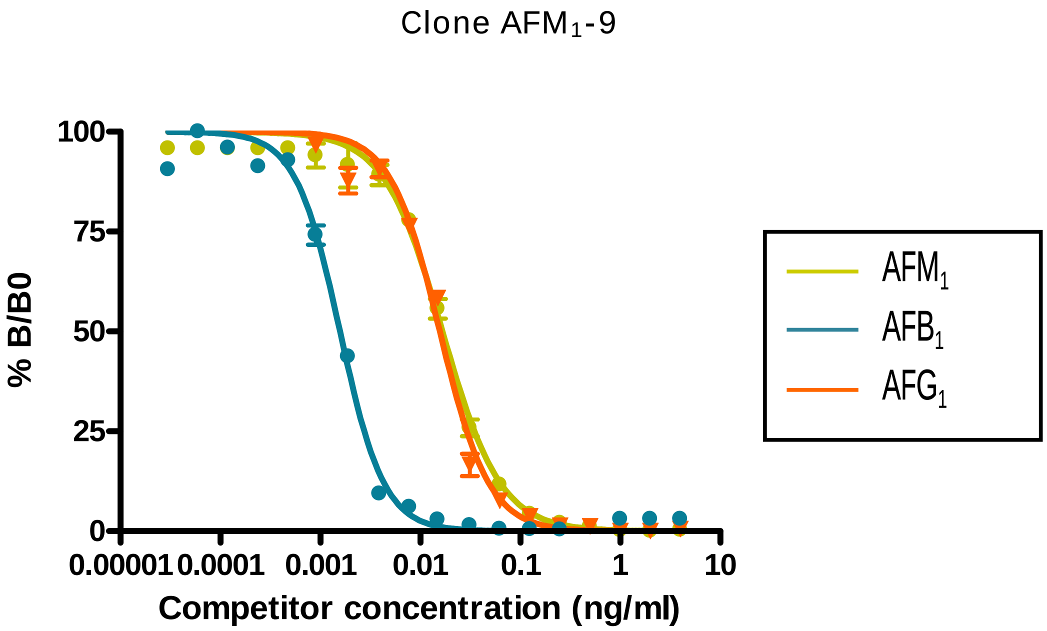
จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน พบว่าเกิดปฏิกริยาข้ามกับสารในกลุ่ม คือ AFB_1 และ AFG_1 ทั้งสองชนิด แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ DON และสารในกลุ่มยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารนอกกลุ่ม AFs ดังตารางที่ 4.8 ถึงแม้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะมีความจำเพาะสูง แต่แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดหนึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งปฏิกิริยาข้ามอาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณี คือ กรณีที่แอนติเจนอาจมีอิพิโทปบางส่วนเหมือนกัน และกรณีที่แอนติบอดีอาจจะจับกับอิพิโทปอื่นที่มีโครงสร้างหรือมีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน ดังนั้นจากการทดสอบความจำเพาะแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีความจำเพาะกับสารในกลุ่ม AFs สูง คาดว่าเนื่องจากสารภายในกลุ่ม AFs ด้วยกันจะมีโครงสร้างของโมเลกุลใกล้เคียงกัน หากนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Pei และคณะ(2009) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเช่นเดียวกัน โดยเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFM_1, AFB_1 และAFG_1 คิดเป็น 100, 13.9 และ 6.7% ตามลำดับ (Pei และคณะ, 2009)



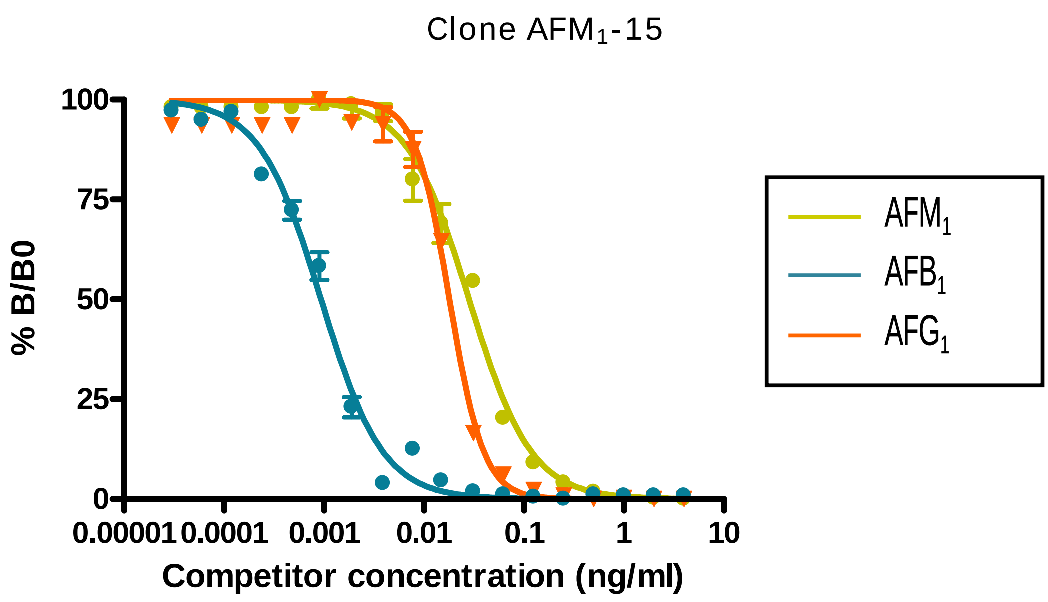
ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-1 โดยวิธี indirect competitive ELISA



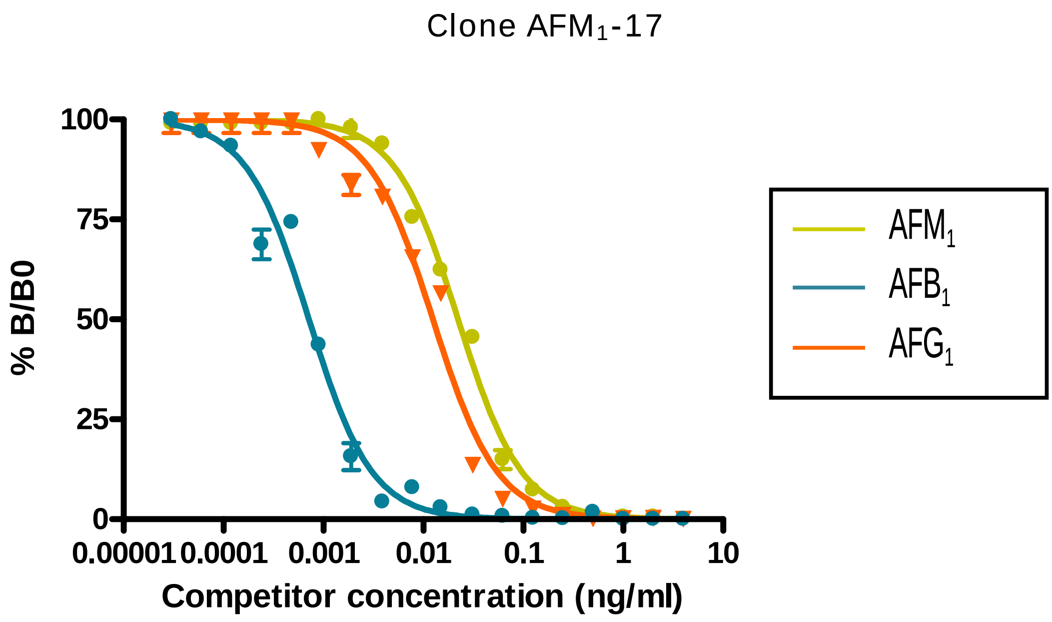
ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-3 โดยวิธี indirect competitive ELISA



ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B_0) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-9 โดยวิธี indirect competitive ELISA



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B$_0$) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM$_1$-15 โดยวิธี indirect competitive ELISA



ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (B/B$_0$) กับความเข้มข้นของสารในกลุ่ม AFs ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM$_1$-17 โดยวิธี indirect competitive ELISA

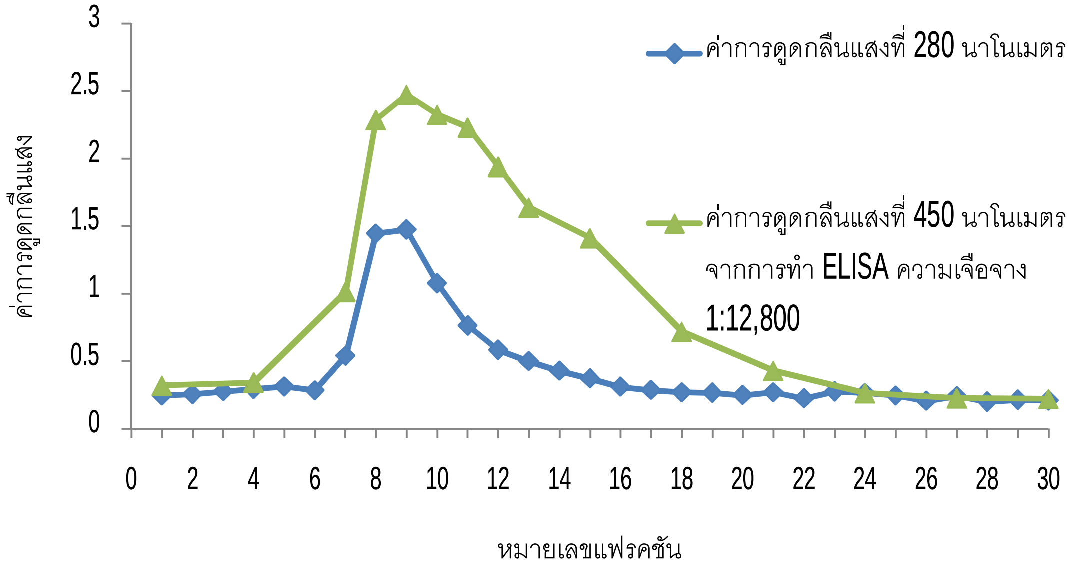
ตารางที่ 4.8 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่ม AFs และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA

สารแข่งขัน	AFM_1-1		AFM_1-3		AFM_1-9		AFM_1-15		AFM_1-17	
	IC_{50} (pg/ml)	% CR	IC_{50} (pg/ml)	% CR	IC_{50} (pg/ml)	% CR	IC_{50} (pg/ml)	% CR	IC_{50} (pg/ml)	% CR
Aflatoxins										
AFM_1	39.8	100	35.8	100	16.7	100	28.3	100	22.3	100
AFB_1	3.0	1,328	2.4	1,491	1.6	1,043	0.9	3,144	1.6	1,393
AFG_1	14.8	269	34.1	105	15.7	106	16.2	175	12.5	178
Mycotoxin										
DON	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Antibiotics										
Tetracycline	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Oxytetracycline	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Chloramphenicol	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Ciprofloxacin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Enrofloxacin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Norfloxacin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Nitrofurantoin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02

4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.4.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 มีความไวมากที่สุด จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ของโคลน AFM_1-9 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพโดยใช้โปรตีนจี ที่พบได้บนผนังเซลล์ของ β-hemolytic Streptococci strain C และ G โดยโปรตีนชนิดนี้สามารถจับกับส่วน Fc ของแอนติบอดีชนิด IgG การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้อาศัยหลักการของโครมาโทกราฟี เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน AFM_1-9 มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงกับโปรตีนจี แอนติบอดีจึงถูกจับอยู่ในคอลัมน์ และจะถูกชะออกมาโดยใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 โดยนำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้มาตรวจหาโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจว่าโปรตีนที่ได้เป็นแอนติบอดีที่ยังสามารถทำงานได้อยู่หรือไม่ ด้วยวิธี Indirect ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (ตารางที่ ก.6, ภาคผนวก ก) โดยใช้ความเจือจางของแต่ละส่วนที่ 1:12,800 ได้ผลดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 โครมาโตแกรมที่ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ ชะแอนติบอดีด้วย 0.1M glycine-HCl pH 2.7 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากโครมาโตแกรม พบว่าในส่วนที่ 7-15 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ 450 นาโนเมตรมีค่าสอดคล้องกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนที่ถูกชะออกมานั้นเป็นแอนติบอดีที่ยังมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ AFM_1-BSA ที่เคลือบไว้ที่หลุมได้ จึงนำส่วนนั้นๆ มารวมกัน และทำการไดอะไลซีสเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ออกจากสารละลายที่ได้ ซึ่งแอนติบอดีที่ได้จะอยู่ใน pH 7.4 เพื่อเป็นรักษาสภาพของแอนติบอดีในการเก็บแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วให้ได้เป็นเวลานาน

4.4.2 การหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA (ภาพที่ ก.1, ภาคผนวก ก) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความเข้มข้นของโปรตีน 4.238 และ 0.897 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ ก.8 และ ก.9, ภาคผนวก ก) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์นั้น มีความเข้มข้นของโปรตีนมากกว่าหลังทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมีการเติมซีรัมเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงทำให้มีโปรตีนมากมายปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แต่เมื่ออาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะเหลือแต่โปรตีนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนจีในคอลัมน์เท่านั้น ส่วนโปรตีนชนิดอื่นๆที่ไม่จำเพาะกับโปรตีนจีในคอลัมน์ก็จะถูกกำจัดไป

การหาปริมาณแอนติบอดีในรูปของ IgG หลังทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) จากการวัดความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร โดยอาศัยหลักการที่ว่า ในโมเลกุลของแอนติบอดีมีกรดอะมิโน tyrosine และ tryptophan ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้ จึงสามารถนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของแอนติบอดีได้ พบว่ามีความเข้มข้นของแอนติบอดี 0.61 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาณแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติบอดีที่สร้างจากแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์และทราบความเข้มข้นแล้ว (ภาพที่ ก.2, ภาคผนวก ก) พบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นของแอนติบอดี 0.135 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.10, ภาคผนวก ก) นำค่าปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีที่ได้มาคำนวณหา % recovery และคำนวณเป็นค่าความบริสุทธิ์ (% purity) ของแอนติบอดีในโปรตีนทั้งหมด พบว่ามีค่าเท่ากับ 10.16% และ 68% ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.13 เนื่องจากในขั้นตอนการโหลดอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านคอลัมน์ได้ทำการปรับอัตราการไหลไว้เร็ว

เกินไป คาดว่าแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จึงไม่สามารถจับกับโปรตีนจีที่อยู่ในคอลัมน์ได้ทัน จึงทำให้สูญเสียแอนติบอดีบางส่วนไป มีผลทำให้ได้ %recovery ค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 4.9 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ให้บริสุทธิ์

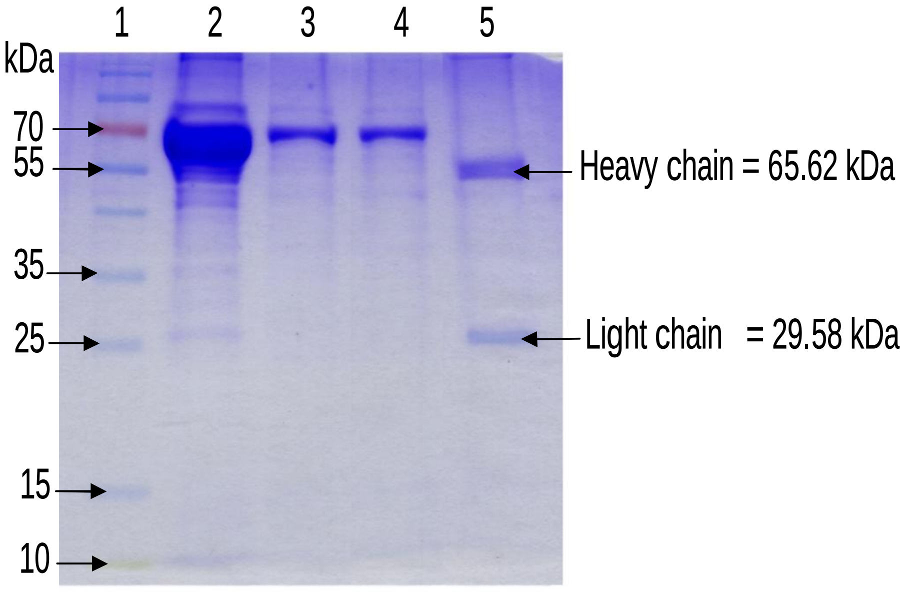
การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA		ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA		%recovery	%purity
		ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)	ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)		
ก่อน	400	4.238	1,695.2	0.135	54	-	3
หลัง	9	0.897	8.073	0.61	5.49	10.16	68

4.4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์

การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 ภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อวิเคราะห์ว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด มีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่หรือไม่ ด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีแยกโปรตีนตามขนาด เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีระหว่างก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ จะเห็นว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์นั้นจะมีโปรตีนจากซีรัมปนอยู่มากมาย ทำให้เห็นเป็นแถบเข้มที่ระยะทางเดียวกับช่องที่ 2 แต่เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้มาทำให้บริสุทธิ์แล้ว โปรตีนชนิดอื่นๆ เหล่านั้นจึงถูกกำจัดไป โดยช่องโมโนโคลนอลแอนติบอดีผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะพบแถบโปรตีน 2 แถบ เนื่องจากในการทำ SDS-PAGE มีการเติมสาร 2-mercaptoethanol เข้าไปด้วย ซึ่งสารนี้จะเข้าไปตัดพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้โปรตีนสายยาว (heavy chain) และโปรตีนสายสั้น (light chain) แยกออกจากกัน

มวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นหาได้จาก การหาความสัมพันธ์ของค่าลอกการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ (Relative mobility; R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ ก.3, ภาคผนวก ก) แล้วนำระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนสายสั้น และโปรตีน

สายยาวไปเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่กับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน จากการหามวลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 พบว่า มวลโมเลกุลของโปรตีนสายยาว (H) และสายสั้น (L) เท่ากับ 65.62 และ 29.58 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 และตารางที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE

โดยช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

2 ซีรัม (FCS)

3 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่เติม 10% FCS

4 อาหารเลี้ยงเซลล์ AFM_1-9 ก่อนทำให้บริสุทธิ์

5 อาหารเลี้ยงเซลล์ AFM_1-9 หลังทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.10 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

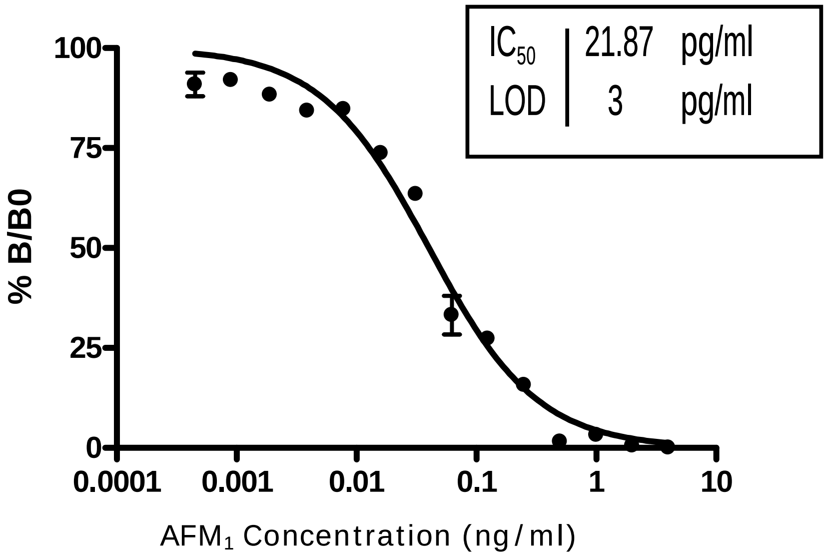
ตัวอย่าง	มวลโมเลกุล (kDa)	Relative mobility (R_f)
โปรตีนมาตรฐาน		
1	170	0.02
2	130	0.04
3	100	0.08
4	70	0.15
5	55	0.22
6	44	0.31
7	35	0.44
8	25	0.58
9	15	0.88
10	10	1
โมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9		
Heavy chain	65.62	0.24
Light chain	29.58	0.55

4.5 **การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์**

4.5.1 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการหาความเข้มข้นที่ของแอนติบอดีทำให้บริสุทธิ์แล้วจากโคลน AFM_1-9 ที่เหมาะสมกับแอนติเจน AFM_1-BSA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมที่มีความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect ELISA โดยจะเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 ซึ่งความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่เหมาะสมอยู่ที่ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.12, ภาคผนวก ก)

นำแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการทดสอบความไวต่อ AFM_1 ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังรูปที่ 4.15 (ตารางที่ ก.13, ภาคผนวก ก) พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.87 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า LOD เท่ากับ 3 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบความไวของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ต่อ AFM_1 ระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ พบว่า แอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 หลังทำให้บริสุทธิ์มีความไวต่อ AFM_1 ใกล้เคียงกับค่าเดิม ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ต่อ AFM_1 ระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

แอนติบอดี	IC_{50} (pg/ml)	LOD (pg/ml)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	16.70	5
หลังทำให้บริสุทธิ์	21.87	3

จากผลการทดลองหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ที่มีความจำเพาะต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ต่ำกว่าค่าที่คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ ว่าให้มีปริมาณของ AFM_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.025 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 จึงเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ AFM_1 โดยวิธี ELISA ต่อไปได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM_1-BSA พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวมีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปดีมาก โดยให้ระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง 8,192,000 ถึง 32,768,000 หลังจากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อ AFM_1 ในรูปอิสระเพื่อยืนยันว่าแอนติบอดีที่ได้นั้นสามารถจับกับ AFM_1 ได้ จากการทดสอบพบว่าแอนติบอดีในซีรัมจากหนูทั้ง 5 ตัวสามารถจับกับ AFM_1ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันในการทำปฏิกิริยากับ AFM_1 ในรูปอิสระอยู่ในช่วง 52.97-85.87 % เมื่อตรวจพบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ AFM_1 แล้วจึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์มัยอีโลมา โดยการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1-3 ใช้เซลล์มัยอีโลมา SP2/0 พบว่าเซลล์ไฮบริโด-มาที่ได้มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1-BSA ที่ใช้เคลือบพื้นหลุม แต่ไม่สามารถจับกับ AFM_1 อิสระจากการทำ indirect competitive ELISA จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป และการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4-5 ใช้เซลล์มัยอีโลมา P3X พบว่าจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อ AFM_1 จำนวน 5 โคลน ได้แก่ AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ จากการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 เมื่อทดสอบความไวของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ AFM_1 ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 39.8, 35.8, 16.7, 28.3 และ 22.3 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มอะฟลาทอกซิน และสารนอกกลุ่ม พบว่าโมโนโคลนอลทั้ง 5 โคลน เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มอะฟลาทอกซินทั้งสองชนิด คือ AFB_1 และ AFG_1 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม ผลจากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 มีความไวมากที่สุด จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพโดยใช้โปรตีนจีเซฟาโรสคอลัมน์ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 0.61 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการทดสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์ และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 ของโปรตีนสายยาว และสายสั้น เท่ากับ 65.62 และ 29.58 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาทดสอบความไวอีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบกับความไวของแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 มีความไวต่อ AFM_1 ใกล้เคียงกับค่าเดิม โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 21.87 และ 3 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากงานวิจัยนี้พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 มีความจำเพาะต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ โดยความไวของแอนติบอดีที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ ว่าให้มีปริมาณของ AFM_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.025 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ AFM_1ที่พบในน้ำนม โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 นี้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มอะฟลาทอกซิน ได้แก่ AFB_1 และ AFG_1 ค่อนข้างสูง ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 นี้ จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารพิษในกลุ่มอะฟลาทอกซิน (generic test) ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์

ขั้นตอนต่อไปควรนำแอนติบอดีที่ได้มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มอะฟลาทอกซิน เช่น วิธีสกัดสารออกจากตัวอย่าง ปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม เป็นต้น เพื่อเพิ่มความไว และความสะดวกในการใช้งานของชุดตรวจสอบในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์. 2545. ความปลอดภัยของอาหารสัตว์. วารสารข่าวปศุสัตว์ 25(212) : 16-9.

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์ และอดิลักข์ เล็บนาค. 2538. ผลการตรวจสารพิษอะฟลาทอกซินในสัตว์. สาส์นไก่และการเกษตร 43(10) : 47-53.

ชัยวัธน์ วิทูระกูล, นัฐวุฒิ อินคำเชื้อ และวิชาญ สุขประเสริฐ. 2551. การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมและนมโคในฟาร์มโคนมจังหวัดลำพูน.ข่าวสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ 16(4) : 44-50.

เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2543. การปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราอะฟลาทอกซินในน้ำนม. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : 161-166.

เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2544. การหาชนิดวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ผสมในอาหารข้น และชนิดของอาหารหยาบสำหรับเลี้ยงโคนมที่มีผลกระทบต่ออัตราการขับออกของสารพิษอะฟลาทอกซินทางน้ำนมของแม่โครีดนม. การสัมมนาเรื่องการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจร. ชลบุรี.

ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง และ ปกรณ์ จาละ. 2549. การตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) งานตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา. นครปฐม: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

วิทยา สังข์ทอง. 2543. การปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราอะฟลาทอกซินในน้ำนม. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหาร และอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : 123-129.

ศุภกิจ อังศุภากร. 2526. ผลของอะฟลาทอกซินต่อสุขภาพของคนและสัตว์ในประเทศไทย. สัตวแพทยสาร 34(3) : 285-303.

สุทธิพร พิริยายน. 2543. การปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารสัตว์. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตาม โครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วน รับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์ : 158-160.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. 2541. อิมมูโนวิทยา: พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: พริ้นต์โพร.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2529. ประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ฉบับที่ 98 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abcam. An explanation and description of the different structural elements of an antibody [Online] Available from: http: //www.abca m.com/in dex.html?pageconfig =resource&rid=11258&pid=11287 [2001, August 15]

Badea, M., Micheli, L., Messia, M. C., Candigliota, T., Marconi, E., Mottram, T., Velasco-Garcia, M., Moscone, D and Palleschi, G. 2004. Aflatoxin M_1 determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. Analytica Chemica Acta 520 : 141-148.

Cavaliere, C., Foglia, P, .Guarini, C., Marzioni, F., Nazzari, M., Samperi, R., and Lagana, A. 2006. Aflatoxin M_1 determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography 1135 : 135–141.

Cathey, C. G., Huang, A. G., Sarr, A. B., Clement, B. A and Phillips, T. D. 1994. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M_1 in milk. Journal of Dairy Science 77 : 1223–1231.

Creepy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127 : 19–28.

Curits, L.R. and Zhang, Q. 1995. Temperature modulated incidence of aflatoxin B_1-initiated liver cancer in rainbow trout. Fundamental and Applied Toxicology 25 : 146-159.

Diaz, S., Dominguez, L., Prieta, J., Blanco, J. L., and Moreno, M. A. 1995. Application of a diphasic dialysis membrane produce for surveying occurrence of aflatoxin M_1 in commercial milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43 : 2678-2680.

European Commission Regulation, No. 683/2004/EC of 13 April 2004, Amending Regulation (EC) No. 466/2001 as Regards Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods for Infants and Young Children, Official Journal of European Communities L106 : 3-5.

Gallagher, E. P., and Eaton, D. L. 1995. In vitro biotransformation of aflatoxin B_1 in channel catfish liver. Toxicology and Applied Pharmacology 132 : 82-90.

Goryacheva, I. Y., Karagusheva, M. A., Peteghem, C. V., and Sibanda, L. 2009. Immunoaffinity pre-concentration combined with on-column visual detection as a tool for rapid aflatoxin M_1 screening in milk. Food Control 20 : 802–806.

Gulvano, F., Ritieni, A., Piva, G., and Pietie, A. 2005. A mycotoxin in the human food chain. In D. E. Diaz (Ed.), Mycotoxins blue book : 187-224.

Heathcote, J. G. 1984. Aflatoxin and related toxins. In V. Betina (Ed.), Mycotoxins-production, Isolation, Separation and Purification. Amsterdam: Elsevier.

Keith, W., and Walker, J. 2005. Principle and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University: 295.

Kim, E. K.,Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J., and Kim, Y. B. 2000. Occurance of aflatoxin M_1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminants 17 : 59-64.

Lee, J. E., Kwak, B. M., Ahn, J. H., and Jeon, T. H. 2009. Occurrence of aflatoxin M_1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Food Control 20 : 136–138.

Lillehoj, E. B. 1983. Effect of environment and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn Kernel. In U.L. Diener, R.L. Asquith and J.W. Dickens (eds), Aflatoxin and *Aspergillus Flavus* in corn. Alabama: 279.

Manetta, A.C., Giammarco, M., Giuseppe, L.D., Gramenzi, A., Formigoni, A., and Lambertini, L. 2009. Distribution of aflatoxin M_1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. Food Chemistry 113 : 595–599.

Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D., and Palleschi, G. 2005. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M_1 determination in milk using screen-printed electrodes. Biosensors and Bioelectronics 21 : 588–596.

Midlands Technical College. B-Cells and Humoral Immunity [Online]. Available from: http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap17/Lecture3.htm [2001, August 15]

Patricia, A. M., Hendrich, S., Langren, C. and Bryant, C. M. 2006. Food mycotoxins: An update. Journal of Food Science 71 : 51-65.

Pei, S. C., Zhang, Y. Y., Eremin, S. A., and Lee, W. J. 2009. Detection of aflatoxin M_1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. Food Control 20 : 1080–1085.

Phoenix collage. Chapter15: The Specific Immune System [Online]. Available from: http://www.pc.maricopa.edu/Biology/rcotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%2015%20LB/Ch15LessonBuilder_print.html [2011, July 24]

Radoi, A., Targa, M., Prieto-Simon, B., and Marty, J. L. 2008. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M_1 detection. Talanta 77 : 138-143.

Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K., and Das, M. 2004. Detection of aflatoxin M_1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control 15 : 287–290.

Reddy, S. V., and Waliyar, F. Properties of aflatoxin and its producing fungi [Online]. 2005. Available from:http://www.aflatoxin.info/Aflatoxin.asp [2011, July 24]

Sahoo, P. K., and Mukherjee, S. C. 2001. Immunosuppressive effect of Aflatoxin B_1 in Indian major carp. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 24 : 143-149.

Shundo, L., and Sabino, M. 2006. Aflatoxin M_1 in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. Brazillian Journal of Microbiology 37 : 164-167.

Tekinsen, K. K., and Tekinsen, O. C. 2005. Aflatoxin M1 in white pickle and van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern in Turkey. Food Control 16 : 565–568.

Wilson, D. A.,and Payne, G. A. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In D. L. Eaton and J. D.Groopman (Eds.), The toxicology of aflatoxins. New York Academic Press: 309-326.

Woychik, N. A., Hinadill, R. D., and Chu, S. F. 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M_1. Applied and Environmental Microbiology 48 : 1096-1099.

Yang C, C., Jiun L, W., and Yao P, K. 2005. Determination of aflatoxin M_1 in Milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53 : 8474-8480.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรที่ได้จากวิธี indirect ELISA ของซีรัมหนู

ความเจือจางของซีรัม (เท่า)	หนูตัวที่				
	1	2	3	4	5
8,000	1.756	1.739	2.14	2.38	2.514
16,000	1.753	1.728	2.19	2.29	2.625
32,000	1.764	1.744	2.12	2.35	2.601
64,000	1.712	1.71	2.20	2.07	2.524
128,000	1.573	1.699	1.93	1.69	2.495
256,000	1.161	1.497	1.45	1.20	2.474
512,000	0.709	1.05	0.96	0.70	2.063
1,024,000	0.424	0.658	0.69	0.45	1.463
2,048,000	0.265	0.383	0.41	0.28	0.914
4,096,000	0.172	0.244	0.26	0.17	0.562
8,192,000	0.136	0.122	0.24	0.15	0.328
16,384,000	-	-	0.19	0.11	0.277
32,768,000	-	-	-	-	0.175

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับ AFM_1 อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

AFM_1 concentration (ng/ml)	A_{450}				
	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา				
	AFM_1-1	AFM_1-3	AFM_1-9	AFM_1-15	AFM_1-17
0	1.696	1.717	1.199	1.748	1.546
0.00048	1.871	1.672	1.150	1.739	1.624
0.0009	1.812	1.739	1.131	1.772	1.638
0.0019	1.836	1.612	1.103	1.752	1.606
0.0039	1.735	1.856	1.075	1.716	1.543
0.0078	1.680	1.697	0.945	1.428	1.253
0.015	1.486	1.455	0.692	1.240	1.045
0.03125	1.184	1.113	0.352	0.992	0.778
0.0625	0.714	0.588	0.189	0.402	0.296
0.125	0.289	0.224	0.105	0.211	0.176
0.25	0.153	0.133	0.079	0.124	0.108
0.5	0.097	0.091	0.069	0.085	0.079
1	0.063	0.083	0.059	0.067	0.070
2	0.067	0.060	0.056	0.059	0.070
4	0.067	0.062	0.059	0.054	0.060
IC_{50} (ng/ml)	0.03984	0.03581	0.01667	0.02831	0.0223
LOD (ng/ml)	0.016	0.015	0.005	0.007	0.008

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับ AFG_1 อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

AFG_1 concentration (ng/ml)	A_{450}				
	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา				
	AFM_1-1	AFM_1-3	AFM_1-9	AFM_1-15	AFM_1-17
0	1.696	1.717	1.199	1.748	1.546
0.00048	1.829	1.858	1.235	1.622	1.542
0.0009	1.631	1.813	1.195	1.730	1.432
0.0019	1.673	1.693	1.091	1.335	1.302
0.0039	1.504	1.710	1.126	1.627	1.258
0.0078	1.348	1.708	0.958	1.521	1.032
0.015	1.089	1.503	0.746	1.136	0.899
0.03125	0.417	1.100	0.255	0.333	0.260
0.0625	0.168	0.480	0.150	0.159	0.133
0.125	0.099	0.168	0.104	0.095	0.098
0.25	0.079	0.100	0.076	0.071	0.073
0.5	0.081	0.090	0.074	0.058	0.060
1	0.070	0.070	0.061	0.062	0.061
2	0.058	0.058	0.060	0.057	0.063
4	0.074	0.056	0.067	0.057	0.058
IC_{50} (ng/ml)	0.01476	0.03408	0.01568	0.01621	0.01247
LOD (ng/ml)	0.005	0.016	0.007	0.005	0.003

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับ AFB_1 อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

AFB_1 concentration (ng/ml)	A_{450}				
	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา				
	AFM_1-1	AFM_1-3	AFM_1-9	AFM_1-15	AFM_1-17
0	1.696	1.717	1.199	1.707	1.546
0.00003	1.6845	1.649	1.1125	1.661	1.548
0.00006	1.6995	1.8235	1.2225	1.6215	1.503
0.00012	1.681	1.779	1.1755	1.6545	1.4495
0.00024	1.6045	1.7515	1.1215	1.3955	1.0855
0.00048	1.536	1.675	1.139	1.249	1.168
0.0009	1.446	1.575	0.922	1.018	0.713
0.0019	1.224	1.177	0.568	0.435	0.300
0.0039	0.813	0.565	0.170	0.121	0.132
0.0078	0.168	0.262	0.131	0.262	0.186
0.015	0.136	0.119	0.094	0.131	0.112
0.03125	0.104	0.079	0.078	0.086	0.085
0.0625	0.095	0.072	0.067	0.074	0.080
0.125	0.091	0.074	0.066	0.063	0.072
0.25	0.082	0.064	0.065	0.055	0.070
0.5	0.073	0.064	0.061	0.074	0.094
1	0.072	0.066	0.096	0.069	0.068
IC_{50} (ng/ml)	0.002982	0.002438	0.01571	0.00089	0.001571
LOD (ng/ml)	0.001	0.001	0.001	0.00024	0.00019

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โดยแข่งขันกับสารนอกกลุ่ม AFs ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

สารแข่งขัน (100 ng/ml)	A_{450}				
	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา				
	AFM_1-1	AFM_1-3	AFM_1-9	AFM_1-15	AFM_1-17
Mycotoxin					
DON	1.581	1.904	1.274	1.367	1.306
Antibiotics					
Tetracycline	1.926	1.916	1.931	1.905	1.906
Oxytetracycline	1.896	1.910	1.909	1.884	1.902
Chloramphenicol	1.925	1.937	1.954	1.922	1.923
Ciprofloxacin	1.920	1.928	1.929	1.903	1.902
Enrofloxacin	1.945	1.955	1.962	1.936	1.915
Norfloxacin	1.949	1.957	1.957	1.942	1.938
Enoxacin	1.937	1.954	1.952	1.931	1.941
Cinoxacin	1.935	1.970	1.964	1.935	1.914
Nitrofurantoin	1.883	1.905	1.914	1.867	1.862

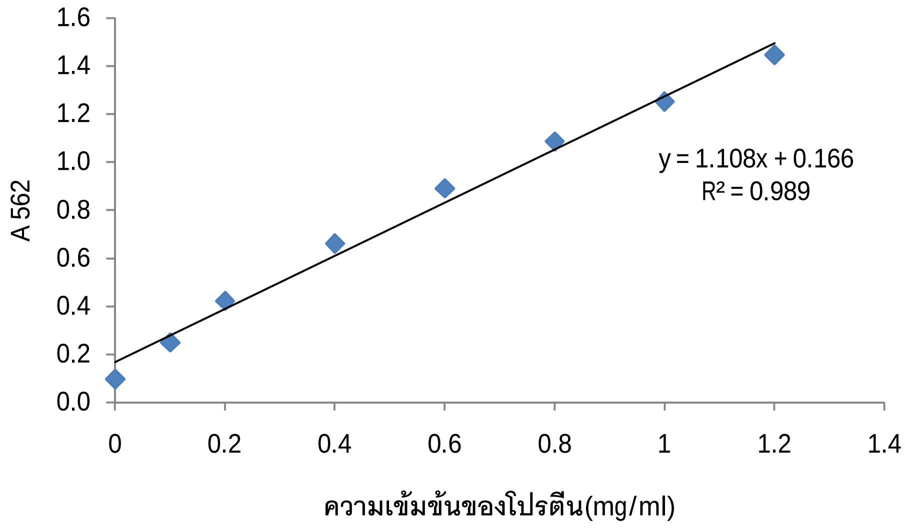
ตารางที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 นาโนเมตร

Fraction	A_{280}	A_{492}	Fraction	A_{280}	A_{492}
1	0.247	0.323	16	0.312	-
2	0.257	-	17	0.288	-
3	0.279	-	18	0.271	0.719
4	0.295	0.344	19	0.268	-
5	0.314	-	20	0.251	-
6	0.286	-	21	0.271	0.43
7	0.541	1.015	22	0.227	-
8	1.446	2.286	23	0.278	-
9	1.475	2.472	24	0.267	0.265
10	1.078	2.326	25	0.248	-
11	0.765	2.232	26	0.208	-
12	0.585	1.94	27	0.243	0.227
13	0.501	1.638	28	0.202	-
14	0.43	-	29	0.216	-
15	0.374	1.411	30	0.211	0.224

หมายเหตุ เครื่องหมาย – ไม่ได้นำไปทำ indirect ELISA

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.152
0.2	0.325
0.4	0.564
0.6	0.793
0.8	0.989
1.0	1.155
1.2	1.349



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.8 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี AFM_1-9 ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}			เฉลี่ย	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
	1	2	3		
1:10	0.617	0.655	0.62	0.631	4.197
1:20	0.395	0.393	0.42	0.403	4.278
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย					4.238

ตารางที่ ก.9 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

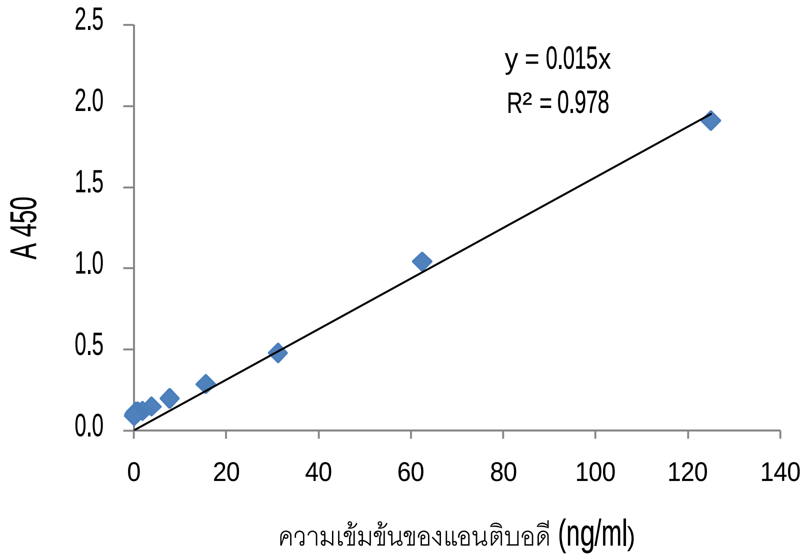
Dilution	A_{562}			เฉลี่ย	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
	1	2	3		
0	1.135	1.119	1.225	1.160	0.897
1:2	0.655	0.664	0.669	0.663	0.897
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย					0.897

ตารางที่ ก.10 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติบอดี

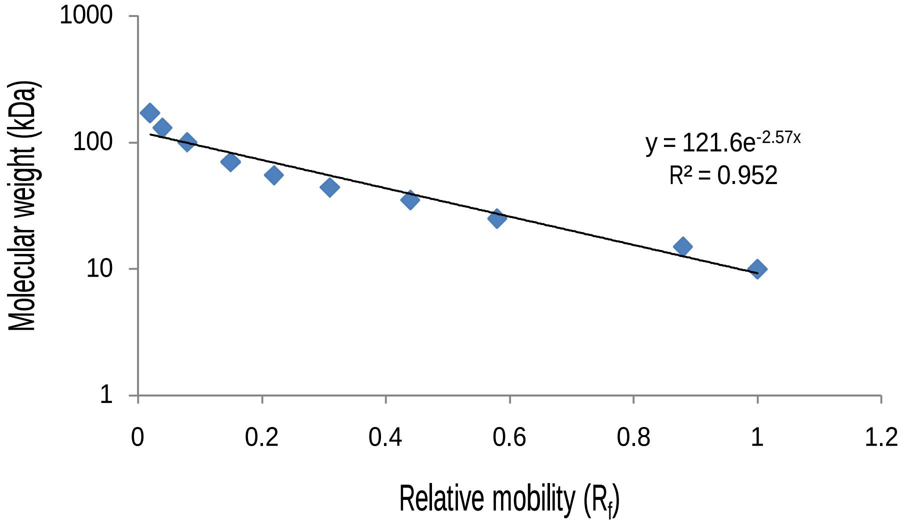
Dilution	A_{562}		เฉลี่ย	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
	1	2		
1:1600	1.304	1.355	1.330	0.141
1:3200	0.616	0.586	0.601	0.128
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย				0.135

ตารางที่ ก.11 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยวิธี indirect ELISA เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของแอนติบอดี

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ng/ml)	A_{450} 1	A_{450} 2	เฉลี่ย
125	1.936	1.879	1.908
62.5	1.045	1.033	1.039
31.25	0.531	0.424	0.478
15.625	0.294	0.275	0.285
7.81	0.2	0.194	0.197
3.9	0.155	0.138	0.147
1.95	0.12	0.12	0.120
0.976	0.117	0.111	0.114
0.488	0.12	0.112	0.116
0.244	0.108	0.098	0.103
0.122	0.091	0.091	0.091



ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในช่วงความเข้มข้น 0.122-125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ก.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ตารางที่ ก.12 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-9 ที่เหมาะสมกับแอนติเจนความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม ด้วยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี (ng/ml)	แอนติเจน AFM_1-BSA (0.2 ug/ml)			เฉลี่ย
	1	2	3	
100	2.164	2.198	2.066	2.143
80	1.978	1.972	1.96	1.970
60	1.464	1.448	1.522	1.478
40	0.96	0.958	0.969	0.962

ตารางที่ ก.13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของแอนติบอดีจากโคลน AFM_1-9 หลังทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี indirect competitive ELISA

AFB_1 concentration (ng/ml)	A_{450}		
	1	2	ค่าเฉลี่ย
0	1.001	0.964	0.982
0.00048	0.931	0.881	0.906
0.0009	0.915	0.914	0.915
0.0019	0.87	0.898	0.884
0.0039	0.856	0.845	0.851
0.0078	0.849	0.859	0.854
0.015	0.771	0.751	0.761
0.03125	0.669	0.681	0.675
0.0625	0.461	0.38	0.421
0.125	0.37	0.372	0.371
0.25	0.283	0.264	0.274
0.5	0.152	0.156	0.154
1	0.17	0.166	0.168
2	0.148	0.143	0.146
4	0.149	0.133	0.141
	IC_{50} (ng/ml)		0.02187
	LOD (ng/ml)		0.003

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดสอบโดยเทคนิค ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

Na_2HPO_4	27.60	กรัม
NaH_2PO_4	71.63	กรัม

แต่ละสารละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วปรับ pH ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4

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

PB Stock	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1	ลิตร

4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS เตรียมใหม่ก่อนใช้

5) 0.2 M Citrate buffer, pH 4.0

Patassium citrate	33.2	กรัม
Citric acid	21.54	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้ได้ pH 4.0

6) Substrate solution TMB

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3.0	ไมโครกรัม
DMSO	300	ไมโครลิตร
0.2 M Citrate buffer	9.9	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	1.2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

7) 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน (หลังจากเทกรดลงไปในน้ำกลั่นอาจเกิดความร้อน ควรนำขวดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง)

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) Stock 100X HAT

Hypoxanthine	0.1361 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Aminopterin	0.0018 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	0.0388 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> Aminopterin อาจละลายได้ยากที่อุณหภูมิห้อง ควรนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียสจนกว่าจะละลาย

2) 100X HT

Hypoxanthine	0.1361 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	0.0388 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
L-glutamine	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) 50% PEG (Polyethylene glycol)

นำ PEG 5 กรัมมาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด หลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนหลอมรวมเซลล์ นำหลอดมาอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็ง (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	90	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

4. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1) 20 mM Sodium phosphate pH 7.0

Na_2PO_4 •12 H_20	2.77	กรัม
NaH_2PO_4•H_20	1.69	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2) 0.1 M glycine-HCl pH 2.7

Glycine	7.5	กรัม
Conc. HCl	2.42	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 2.7 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3) 1 M Tris HCl buffer, pH 9.0

Trizma base	121.14	กรัม
Conc. HCl	6.41	กรัม

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

1) 10% Separating gel (1 แผ่น ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	3.836	กรัม
40% Acylamide/Bis	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	2	มิลลิลิตร
10% SDS	80	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2)_8$	80	ไมโครลิตร
TEMED	40	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการ polymerization

2) 5% Stacking gel (1 แผ่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	1.204	มิลลิลิตร
40% Acylamide/Bis	250	ไมโครลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	504	ไมโครลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2)_8$	20	ไมโครลิตร
TEMED	2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการ polymerization

3) SDS Staining dye

SDS dye	900	ไมโครลิตร
β-mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร

4) Running buffer

Trizma base	15.1	กรัม
Glycine-HCl	94	กรัม
SDS	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

5) Staining solution

Comasssie brilliant blue R 250	5	กรัม
95% Ethanol	450	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

6) Destaining solution

Methanol	250	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	680	มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอภิญญา แสงดอกไม้ เกิดเมื่อวันที่ 23 เมษายน พ.ศ.2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 เสนอผลงานเรื่อง Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M_1 ในการประชุม International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology 2011