การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน

นายมนัสพงศ์ ชูศรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2902-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ENROFLOXACIN

Mr. Manaspong Chusri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Program in Biotechnology Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2902-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน
โดย	นายมนัสพงศ์ ชูศรี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
	นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทน

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตศานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นางทรงจันทร์ ภู่ทอง)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มนัสพงศ์ ชูศรี :การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ENROFLOXACIN) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, อ.ที่ปรึกษาร่วม ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, นางทรงจันทร์ ภู่ทอง, จำนวนหน้า 73 หน้า. ISBN 974-53-2902-9.

เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะสังเคราะห์ในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ใช้มากทั้งในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบในสัตว์ เอนโรฟลอกซาซินจึงตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ และยังเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธ์และดื้อยา จึงได้มีการจำกัดปริมาณเอนโรฟลอกซาซินที่ตกค้างในอาหารบริโภค

ในการวิจัยนี้จึงได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินเพื่อนำแอนติบอดีไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจปริมาณเอนโรฟลอกซาซิน ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินนั้นได้ทำการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมด 5 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน และคัดเลือกมา 4 โคลนคือโคลนรหัส #44, #45, #47 และ #48 ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 จากการศึกษาสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดนี้มี subclass เป็น IgG1 และมีความจำเพาะอย่างสูงต่อเอนโรฟลอกซาซินโดยมีค่า IC50 อยู่ในช่วง 0.15 - 0.19 ng/ml มีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.0014 - 0.0029 ng/ml มีปฏิกิริยาข้ามต่อสารปฏิชีวนะอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนน้อยกว่า 0.01%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..

4672375923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: MONOCLONAL ANTIBODY / ENROFLOXACIN / ELISA / HYBRIDOMA

MANASPONG CHUSRI : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ENROFLOXACIN. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., THESIS COADVISORS : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., SONGCHAN PUTHONG, M.Sc., 73 pp. ISBN 974-53-2902-9.

Enrofloxacin is a synthetic antibiotic in the group of fluoroquinolone which has been widely used for treatment and prevention of infection by both gram positive and gram negative bacteria in animals. Therefore, enrofloxacin residues in animal products could enter into the food chain, increasing in drug resistance of bacteria. Then maximum residue limit of enrofloxacin in food is regulated in many countries.

In this research, the production of monoclonal antibodies against enrofloxacin for the development of ELISA test kit was carried out. To produce hybridoma cells that can secrete monoclonal antibodies against enrofloxacin, cell fusions were performed for five times, yielding four monoclones specified as #44, #45, #47 and #48. The properties of all monoclonal antibodies were characterized. The subclass of all monoclonal antibodies were identified as IgG1. The antibodies are highly specific for enrofloxacin with the IC50 value in the range of 0.15 - 0.19 ng/ml and the LOD value in the range of 0.0014 - 0.0029 ng/ml. The cross-reactivity of all four antibodies with other quinolones and fluoroquinolones is less than 0.01%.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Biotechnology Student's signature..

Academic year 2005 Advisor's signature..

Co-advisor's signature..

Co-advisor's signature..

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส และคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์และผู้บริหารตลอดจนนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย และคำแนะนำรวมทั้งความช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน โดยเฉพาะคุณอณุมาศ บัวเขียว ดร. นันทิกา ปานจันทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำทุกๆ ด้านตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ยุทธนา ชูศรี น้องเอกพล ชูศรี ญาติพี่น้อง และคุณใบบัว บัวดี รวมทั้งเพื่อนๆ ทุกท่านที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือและการสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ที่เลี้ยงดู ให้ความรัก ความเอาใจใส่ ให้กำลังใจและสนับสนุนตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ...จ

กิตติกรรมประกาศ..ฉ

สารบัญ...ช

สารบัญตาราง..ฌ

สารบัญภาพ...ฏ

บทที่

1 บทนำ..1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ...2

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย..2

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง...4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี..4

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน.....................................11

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย...13

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ...13

3.2 สารเคมี..14

3.3 ขั้นตอนการวิจัย..16

4 ผลการทดลอง...24

4.1 ผลการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง..24

4.2 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา..26

4.3 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..................34

5 สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง...48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

รายการอ้างอิง..51
ภาคผนวก ก...55
ภาคผนวก ข...69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ค่า MRLs ที่สหภาพยุโรปกำหนดสำหรับเอนโรฟลอกซาซินในเนื้อเยื่อต่างๆ................7

4.1 ค่าไตเตอร์แอนติบอดีของหนูหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย
เอนโรฟลอกซาซิน-KLH 3 ครั้ง..25

4.2 ค่าไตเตอร์แอนติบอดีของหนูกลุ่มที่ 2 หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย
เอนโรฟลอกซาซิน-BSA 26

4.3 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 27

4.4 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2..28

4.5 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3..30

4.6 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 32

4.7 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 35

4.8 รหัสโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่เลือกมาทดสอบการจับของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ............................36

4.9 รหัสโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ที่เลือกมาทดสอบการจับของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ............................36

4.10 ค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอม
รวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน..........41

4.11 ค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการ
หลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารในกลุ่มควิโนโลน
และกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน...41

4.12 ค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอม
รวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน.......42

ตาราง หน้า

4.13 ค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน……43
4.14 ค่าดูดกลืนแสงจากการตรวจไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4……43
4.15 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 เพื่อใช้หาค่า LOD…46
4.16 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ……46
ก.1 รหัสโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4……55
ก.2 รหัสโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5……57
ก.3 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน……59
ก.4 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อโอฟลอกซาซิน……59
ก.5 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่ออีนอกซาซิน……60
ก.6 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อซินอกซาซิน……60
ก.7 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อนอร์ฟลอกซาซิน……61
ก.8 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อกรดไบเพมิดิก……61
ก.9 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อกรดออกโซลินิก……62
ก.10 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อกรดนาลิดิซิก……62

ตาราง หน้า

ก.11 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อซิโพรฟลอกซาซิน................................63
ก.12 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อฟลูเมควิน………………………………..…..63
ก.13 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเตตราไซคลิน…………………………….…64
ก.14 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสเตรฟโตมัยซิน…………………………64
ก.15 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อซัลฟาเมทาซีน………..…………………...65
ก.16 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อฟูราโซลิโดน…………………………..…65
ก.17 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเพนิซิลลิน………………………………...66
ก.18 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อคลอแรมเฟนิคอล…………..……………66
ก.19 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน …………..………....67
ก.20 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน …………..…………67
ก.21 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน …………..…………68

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน..4
2.2 โครงสร้างเอนโรฟลอกซาซินและสารอื่นๆในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน........5
4.1 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในซีรัมของหนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 1 โดยวิธี indirect competitive ELISA........................31
4.2 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนโรฟลอกซาซินในซีรัมของหนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA.......................33
4.3 การจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 กับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระโดยวิธี indirect competitive ELISA.............37
4.4 การจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 กับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระโดยวิธี indirect competitive ELISA..............38
4.5 กราฟใช้หาค่า IC 50 ต่อเอนโรฟลอกซาซินของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลน #44, #45, #47และ #48 จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4.......40
4.6 กราฟใช้หาค่า LOD ต่อเอนโรฟลอกซาซินของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4..........45
4.17 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์..........47
4.18 กราฟใช้หาค่าความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA assay............47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) ใช้มากทั้งในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบในสัตว์ สามารถใช้รักษาโรคที่เกี่ยวกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระคายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่นปวดหัว อ่อนเพลีย และบางโอกาสอาจเกิดอาการเศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก เป็นต้น (Bertino และ Fish, 2000)

จากการที่มีการใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซินทั้งในการทำปศุสัตว์ และการเลี้ยงปลาเป็นจำนวนมากทำให้สารเหล่านี้ตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ รวมทั้งเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยาจึงได้มีการจำกัดปริมาณสารตกค้างในอาหารบริโภค (Kummerer, 2004; Phillips และคณะ, 2004; Snaryและคณะ, 2004)

การตรวจหาปริมาณสารปฏิชีวนะที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างนั้นส่วนใหญ่ใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) แม้เทคนิคนี้จะมีประสิทธิภาพสูงให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำมากแต่มีข้อจำกัดหลายประการเช่น มีขั้นตอนสกัดและเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน ใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์สูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างนานจึงตรวจตัวอย่างได้น้อย จึงได้มีผู้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างโดยใช้หลักการของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ

ปัจจุบันความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันถูกนำมาใช้อธิบายการเกิดโรคต่างๆ มีการประยุกต์นำความรู้ในสาขานี้ไปใช้ในการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการโดยมีความไวสูงและแม่นยำเช่นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจและรักษาโรคมะเร็ง (Trikha และคณะ, 2002; Stern และ Herrmann, 2005) รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจติดตามปริมาณสารในตัวอย่าง (Loomans และคณะ, 2003; Van Coillie และคณะ, 2004) ซึ่งล้วนแต่นำสมบัติความจำเพาะอย่างสูงของแอนติบอดีต่อแอนติเจนมาใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเอนโรฟลอกซาซิน

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

1.4.1.1 แอนติเจนที่ใช้สำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง

1.4.1.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน

1.4.1.3 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1.4.2 ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน

1.4.3 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีและคัดกรองโคลนที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเอนโรฟลอกซาซิน

1.4.4 แยกเซลล์ที่เป็นโมโนโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน

1.4.5 ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

BSA	bovine serum albumin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
g	gram
kg	kilogram
HAT	Aminopterin, Hypoxanthine และ Thymidine
HRP	horseradish peroxydase
KLH	Keyhold limpet hemocyanin
LOD	limiting of detection
M	molar
MRLs	maximum residue limits

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mg	milligram
ml	milliliter
N	normal
ng	nanogram
OPD	O-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
PEG	polyethylene glycol
rpm	round per minute

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

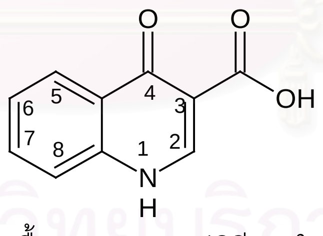
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 **สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน** (fluoroquinolone)

2.1.1.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน

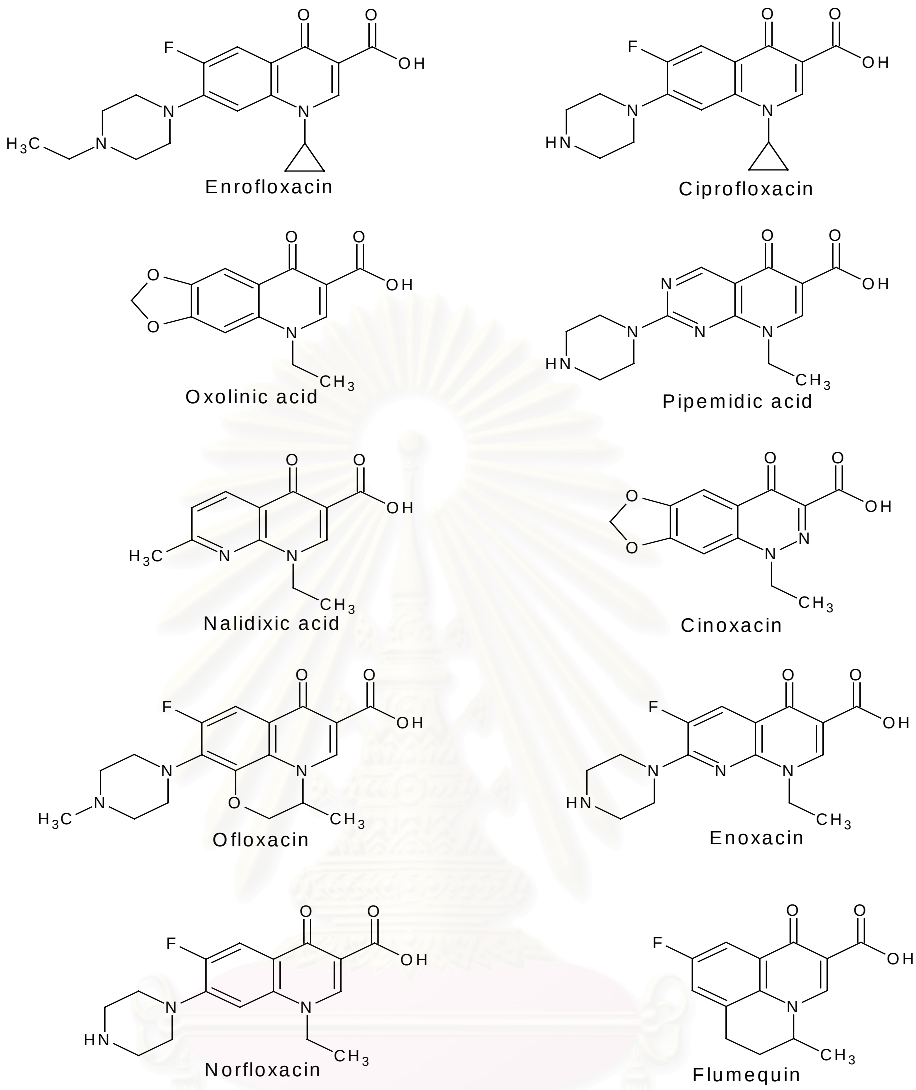
สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่และมีการขยายตัวมาก โดยโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนนั้นเป็นสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมีหมู่คีโตนตรงตำแหน่งที่ 4 และหมู่คาบอกซิลิคตรงตำแหน่งที่ 3 ซึ่งโครงสร้างของสารนี้ทำให้มีผลยับยั้งการทำงานของดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) (Holtzapple และคณะ, 2001) ของแบคทีเรียแกรมลบ และยับยั้งดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรส (DNA topoisomerase) IV ในแบคทีเรียแกรมบวก (Bertino และ Fish, 2000) หากในตำแหน่งที่ 6 นั้นมีธาตุฟลูออรีนจะทำให้สารในกลุ่มนี้ถูกแยกออกเป็นกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Hernandez-Arteseros และคณะ, 2002)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน

2.1.1.2 เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin)

เอนโรฟลอกซาซิน หรือ 1-cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid (hydrochloride) เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ มีฤทธิ์ฆ่าจุลชีพโดยการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและสังเคราะโปรตีนของแบคทีเรีย ออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ ใช้มากในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารในโค สุกร และสัตว์ปีกนอกจากนั้นแล้วยังมีการใช้ในแกะ แพะ และกระต่ายอีกด้วย



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างเอนโรฟลอกซาซินและสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.1.3 ผลข้างเคียงจากกการใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซิน

จากการที่มีการใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซินทั้งในการทำปศุสัตว์ และการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อบริโภคเป็นจำนวนมาก ทำให้สารเหล่านี้ตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภคและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ รวมทั้งเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยาซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ในสัตว์นั้นสามารถจะถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ ซึ่งเป็นอันตรายอย่างมากต่อสุขภาพของมนุษย์ (Kummerer, 2004; Phillips และคณะ, 2004; Snary และคณะ, 2004) โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระคายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว อ่อนเพลีย และบางโอกาสอาจเกิดอาการเศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก เป็นต้น

จากการใช้เอนโรฟลอกซาซินอย่างแพร่หลายทำให้มีการพบเชื้อ *Pseudomonas Sp.*, *Escherichia coli และ Streptococcus spp.* (Guardabassi และคณะ, 2004) รวมทั้ง *Salmonella spp.* และ *Campylobactor* spp. ที่มีการดื้อต่อยาในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนเพิ่มขึ้นในสัตว์หลายชนิดที่นำมาบริโภค รวมถึงพบในมนุษย์ด้วยภายหลังจากที่เริ่มมีการนำยากลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาสัตว์ โดยการศึกษาทางระบาดวิทยาระบุว่าการดื้อต่อยาของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ที่เพาะเชื้อได้จากมนุษย์มีสาเหตุมาจากสัตว์ สหรัฐอเมริกาได้ยกเลิกการใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินในสัตว์ปีก โดยระบุว่าการใช้ยานี้ทำให้เกิดการดื้อต่อยาของเชื้อ *Campylobactor spp.* (FDA, 2000) ซึ่งการที่แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ในส่วนของ ดีเอ็นเอไจเรส และดีเอ็นเอโทโพไอโซเมอเรส IV (Ruiz, 2003)

อย่างไรก็ตามเอนโรฟลอกซาซินยังคงสามารถใช้ได้ในสหภาพยุโรปและหลายประเทศในเอเชียรวมถึงประเทศไทย จึงได้มีการจำกัดปริมาณสารตกค้างในอาหารบริโภค สหภาพยุโรปได้กำหนดค่า MRL (maximum residue limit) ในโค สุกรและสัตว์ปีก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (โดยมี Marker residue เป็นผลรวมระหว่างเอนโรฟลอกซาซินและซิโพรฟลอกซาซิน) ซึ่งในกล้ามเนื้อหรือไขมันของโค สุกร และสัตว์ปีก และนมโคนั้นมีค่า MRL เท่ากับ 100 µg/kg เป็นต้น (The Europeon Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2002)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ค่า MRL ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรปสำหรับเอนโรฟลอกซาซินตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ

ชนิดสัตว์	MRLs (µg/kg)	เนื้อเยื่อเป้าหมาย	หมายเหตุ
โค, แกะ, แพะ	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	300	ตับ	
	200	ไต	
	100	น้ำนม	
หมู, กระต่าย	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	200	ตับ	
	300	ไต	
สัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ	ห้ามใช้ในสัตว์ที่ผลิตไข่สำหรับบริโภค
	100	หนังและไขมัน	
	200	ตับ	
	300	ไต	
สัตว์ทุกชนิดยกเว้น โค, แกะ, แพะ, หมู, กระต่าย และสัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	200	ตับ	
	200	ไต	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 **โมโนโคลนอลแอนติบอดี** (monoclonal antibody)

การคิดค้นและวิจัยเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีมายาวนาน โดยในปี ค.ศ. 1975 George Kohler และ Cesar Milstein ได้พัฒนาเทคนิคการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ หลังจากนั้นมาได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างๆ มากมาย และปัจจุบันมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปประยุกต์ใช้กับงานต่างๆ เช่น การรักษาโรคมะเร็ง (Trikha และคณะ, 2002; Stern และ Herrmann, 2005) การวินิจฉัยโรค รวมทั้งการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา จากการคิดวิธีการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์อย่างใหญ่หลวงต่อวงการวิทยาศาสตร์ ทำให้ผู้ค้นพบคือ

George Kohler และ Caesar Milstein ได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1984 ในสาขาการแพทย์ด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันถูกนำมาใช้อธิบายการเกิดโรคต่างๆ มีการประยุกต์นำความรู้ในสาขานี้ไปใช้ในการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ โดยมีความไวสูงและแม่นยำ เช่น การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาสารตกค้างต่างๆ (Watanabe และคณะ, 1998; Duan และ Yuan, 2001; Watanabe และคณะ, 2002; Loomans และคณะ, 2003; Van และคณะ , 2004) ซึ่งแอนติบอดีเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์และหลั่งโดยบีลิมโฟไซต์ โดยสามารถแบ่งออกตามลักษณะเด่นเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีลักษณะที่สำคัญคือ แอนติบอดีจะถูกประมวลรหัสโดยยีนที่ผ่านการเรียงลำดับใหม่ของยีนอิมมูโนโกลบูลินเดียวกัน ส่งผลให้อิมมูโนโกลบูลินมีความเหมือนกันในลำดับของกรดอะมิโนเพราะถูกสร้างมาจากเซลล์หรือโคลนเดียวกัน และมีความจำเพาะสูงต่อ Antigenic determinant ชนิดหนึ่งชนิดใดของแอนติเจนเท่านั้น (Nelson และคณะ, 2000) เซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการให้เจริญเติบโต แบ่งตัวและหลั่งแอนติบอดีออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถเก็บเซลล์นี้แบบถาวรได้ และนำกลับมาเพาะเลี้ยงได้อีก เพื่อให้เซลล์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกในปริมาณและเวลาที่ต้องการ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตเป็นชนิดเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีจุดเด่นและจุดด้อยต่างๆเมื่อเทียบกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีดังนี้ (Nelson และคณะ, 2000)

จุดเด่นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1) ใช้แอนติเจนน้อยและไม่ต้องบริสุทธิ์มากในการฉีดกระตุ้น

โดยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูอาจใช้แอนติเจน 100 μg หรือน้อยกว่าก็ได้ต่อการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง โดยที่แอนติเจนนั้นมีความบริสุทธิ์พอประมาณ เนื่องจากสามารถเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ในระหว่างการคัดกรองเซลล์

2) มีความเป็นมาตรฐาน

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีลักษณะเหมือนกันเป็นมาตรฐาน สามารถแจกจ่ายไปในห้องปฏิบัติการต่างๆซึ่งเดิมการใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมักมีปัญหาเนื่องจากสมบัติไม่ค่อยคงที่ในแต่ละครั้งที่ผลิต และเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตได้ในปริมาณที่ต้องการไม่จำกัด ดังนั้นความเป็นมาตรฐานของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงมีสูงมาก

3) มีความจำเพาะสูง

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะเข้าทำอันตรกิริยากับ antgenic determinat เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมาก สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์หรือศึกษาลักษณะของโมเลกุลของแอนติเจนได้

4) มีสัมพรรคภาพสูง

ในวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพสูงต่อแอนติเจนได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพนี้จะสามารถนำไปใช้ได้ในความเจือจางสูง ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวนในการทดลองลงได้ และสามารถนำไปใช้ในการทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์ได้อีกด้วย

5) สามารถเก็บรักษาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีได้อย่างถาวร

สามารถเก็บเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้เป็นเวลานานในไนโตรเจนเหลว และนำกลับมาเลี้ยงใหม่เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกเมื่อต้องการ

จุดด้อยของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1) การผลิต

ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องใช้กำลังแรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายแพงกว่าการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีมาก

2) ความจำเพาะ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้ในบางกรณีมีความจำเพาะสูงเกินไปที่จะไปใช้ในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงมากจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจน ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างที่แอนติเจนเกาะกับพื้นผิวหรือภาวะที่ใช้ในการทดลอง

3) ไม่สามารถทำปฏิกิริยาบางอย่างได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมากไม่สามรถทำปฏิกิริยาตกตะกอน (Precipitation) ได้ ซึ่งต่างจากพอลิโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นใช้บีลิมโฟไซต์ซึ่งสามารถผลิตแอนติบอดีที่ต้องการแต่บีลิมโฟไซต์นั้นมีอายุขัยจำกัดเมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จึงต้องหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาซึ่งมีอายุขัยไม่จำกัด วิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นเริ่มจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองแล้วนำบีลิมโฟไซต์ในม้ามและเซลล์ไมอีโลมามาหลอมรวมกันโดยใช้ sendai virus, lysolecithin หรือ polyethylene glycol (PEG) ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้ PEG กันมากที่สุดเซลล์ที่ได้จะเกิดการรวมตัวของเซลล์เมมเบรนเข้าด้วยกันก่อนที่จีโนมของเซลล์จะผ่านเข้าสู่ซัยโตพลาสซึมของอีกเซลล์หนึ่ง เซลล์ที่รวมตัวกันจะเป็นเซลล์ที่มีสองนิวเคลียสหรือมากกว่า เมื่อเซลล์แบ่งตัวนิวเคลียสจึงรวมตัวกันและเกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) หรือไฮบริโดมา อย่างไรก็ดีการทำให้เซลล์หลอมรวมตัวกัน (fusion) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างยาก ดังนั้นถ้านำเซลล์มะเร็งมาหลอมรวมกับเซลล์ปกติแล้วเพาะเลี้ยงต่อไป จะพบว่าเซลล์มะเร็งที่ไม่เกิดการหลอมรวมจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุมเซลล์ไฮบริโดมา ดังนั้นจึงต้องหาวิธีที่จะคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ ในปี ค.ศ. 1964 Littlefield เป็นผู้พบวิธีการคัดเลือกดังกล่าวโดยการใช้ selective medium ที่มีการเติมสารชื่อ Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine เรียกว่า HAT medium ซึ่งมีสมบัติที่จะยอมให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเติบโต Aminopterin คือสารที่เป็นอะนาลอกของกรดโฟลิก มีสมบัติที่จะจับกับเอนไซม์ folic acid reductase ทำให้ยับยั้งโคเอนไซม์ที่จะใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทางวิถีสังเคราะห์ de novo ดังนั้นเซลล์ที่จะรอดชีวิตใน HAT medium ได้จึงต้องมีการสร้างดีเอ็นเอผ่านทางวิถีสังเคราะห์salvage pathway ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญสองตัวคือ Thymidine Kinase (TK) และ Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งไปจะไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอได้ แต่ถ้านำเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ TK หรือ HGPRT ไปทำการหลอมรวมกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ก็จะทำให้เซลล์ลูกผสมหรือเซลล์ไฮบริโดมารอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ใน HAT medium เซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเซลล์สำหรับหลอมรวมเพื่อผลิตไฮบริโดมาคือเซลล์ไมอีโลมา โดยมีสมบัติเบื้องต้นคือขาดเอนไซม์ HGPRT ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไมอีโลมาในสูตรอาหารที่ใส่สาร 6-thioguanine หรือ 8-azaguanine ซึ่งเป็น toxic base analogue ลงไป เมื่อเซลล์ใช้สารนี้ในการสร้าง ดีเอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ HGPRT จะทำให้เซลล์ตายในที่สุด ดังนั้นเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่จึงเป็นเซลล์ที่มีสมบัติขาดเอนไซม์ HGPRT ดังนั้นหากนำเซลล์ไมอีโลมาที่ขาดเอ็นไซม์ HGPRT ไปทำการหลอมรวมกับบีลิมโฟไซต์ซึ่งเป็นเซลล์ปกติแล้วนำไปเลี้ยงใน HAT medium เซลล์ที่จะรอดชีวิตอยู่ได้ก็คือเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์ไมอีโลมาและเซลล์ปกติเท่านั้น ทั้งนี้เพราะจีโนมของเซลล์

ไมอีโลมาจะให้สมบัติของเซลล์มะเร็งที่จะทำให้เซลล์ลูกผสมเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และจีโนมของบีลิมโฟไซต์จะให้สมบัติในการสร้างเอนไซม์ HGPRT และสมบัติการสร้างแอนติบอดี ส่วนเซลล์บีลิมโฟไซต์ที่ไม่ได้หลอมรวมตัวกับเซลล์ไมอีโลมาก็จะตายไปเองโดยธรรมชาติในเวลา 3-7 วันเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีอายุจำกัด จากหลักการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium นี้เองจึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Abbas, 1994; Nelson และคณะ, 2000)

การหลอมรวมเซลล์ไมอีโลมาเข้ากับบีลิมโฟไซต์จากม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของสัตว์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนนั้นทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งมีสมบัติสร้างแอนติบอดีได้และสามารถเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนเซลล์ไมอีโลมา หลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วเซลล์ไฮบริโดมาจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสูญเสียโครโมโซมแบบสุ่ม เซลล์ไฮบริโดมาที่สูญเสียโครโมโซมในการสร้างแอนติบอดีไปมักจะเจริญเติบโตรวดเร็วกว่า และจะเพิ่มจำนวนปกคลุมเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการ จึงต้องมีการติดตามโคลนอย่างใกล้ชิดและต้องมีวิธีที่เหมาะสมในการคัดกรองโคลนที่มีสมบัติที่ต้องการ

จากปัญหาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินในเนื้อสัตว์สำหรับบริโภค ซึ่งจะมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค และการใช้เอนโรฟลอกซาซินในปริมาณมากยังเป็นการกระตุ้นให้เกิดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยามากขึ้นจึงได้มีการตรวจสอบปริมาณสารตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินในเนื้อสัตว์สำหรับบริโภค ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างโดยใช้หลักการของระบบภูมิคุ้มกันที่ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แต่ใช้เวลาน้อยและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจสารตกค้างนี้ ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้จึงได้เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินเพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจปริมาณเอนโรฟลอกซาซินตกค้างในเนื้อสัตว์สำหรับบริโภคต่อไป

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน

ในปัจจุบันมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะจำนวนมาก แต่ที่จำเพาะต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนั้นมีดังนี้

Duan และ Juan (2001) ผลิตแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน โดยเชื่อมซิโพรฟลอกซาซินเข้ากับ BSA (bovine serum albumin) แล้วฉีดเข้ากระต่ายหลังจากนั้นนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี ELISA ให้ค่า Detection limit ที่ระดับ 0.32 ng/ml และให้ค่าปฏิกิริยาข้ามกับเอนโรฟลอกซาซิน 69.8% และ นอร์ฟลอกซาซิน 44.6%

Watanabe และคณะ (2002) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซิน โดยเชื่อมเอนโรฟลอกซาซินกับ HSA (human serum albumin) แล้วฉีดเข้าหนู BALB/c หลังจากนั้นนำเซลล์ม้ามมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งไมอีโลมา P3X63Ag8U แล้วนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี ELISA ให้ค่า Detection limit ที่ระดับ 10 ng/g ในตัวอย่างตับและกล้ามเนื้อไก่ และ 1 ng/g ในน้ำนมวัว

Bucknall และคณะ (2003) ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน และฟลูออโรควิโนโลน คือ นอร์ฟลอกซาซิน เอนโรฟลอกซาซิน ซิโพรฟลอกซาซิน ฟลูเมควิน และกรดนาลิดิซิก โดยเชื่อมสารต่างๆ กับ ovalbumin แล้วฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแกะจากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี ELISA โดยแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินให้ค่า detection limit ที่ระดับต่ำ 6 ng/ml เอนโรฟลอกซาซินให้ค่า detection limit ที่ระดับ 3.1 ng/ml ฟลูเมควินให้ค่า detection limit ที่ระดับ 4 ng/ml และกรดนาลิดิซิกให้ค่า detection limit ที่ระดับ 2 ng/ml และให้ค่าปฏิกิริยาข้ามกับเอนโรฟลอกซาซิน 69.8% และ นอร์ฟลอกซาซิน 44.6% โดยการเลือกใช้แอนติเจนนี้ทำให้ได้แอนติเจนตัวหนึ่งที่เป็น generic antigen ซึ่งก็คือการใช้นอร์ฟลอกซาซินเชื่อมเข้ากับ ovalbumin ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีโดยใช้สาร carbodiimide เมื่อนำไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองทำให้ได้แอนติบอดีที่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นในกลุ่มควิโนโลน ทำให้สามารถนำแอนติบอดีนี้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี ELISA ที่ใช้ในการคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้นได้ และใช้แอนติเจนอีกกลุ่มที่เชื่อมเข้ากับ ovalbumin ด้วยปฏิกิริยา mixed anhydride ทำให้ได้แอนติบอดีที่ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ที่ทดสอบเลย

Coillie และคณะ (2004) ผลิตแอนติบอดีโดยการใช้ฟลูเมควินเชื่อมเข้ากับ cationized BSA เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นไก่ พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากไข่แดง (IgY) นั้นเมื่อนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี indirect competitive ELISA ที่มี cationized ovine serum albumin เป็นตัวแข่งขัน เมื่อทดสอบในน้ำนมวัวพบว่าให้ค่า IC50 ต่อสารฟลูเมควินเท่ากับ 50 ng/ml ซึ่งรายงานนี้ไม่ได้ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาและไม่ได้ใช้แอนติบอดีจากซีรัมแต่ใช้แอนติบอดีจากไข่แดงของไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนจึงเป็นแอนติบอดีชนิด IgY ที่ไม่พบในสัตว์อื่น

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

หนูทดลอง

หนู mouse สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

เซลล์ไมอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1(NS- I) จาก ATCC No: TIB 18

ชื่อเครื่องมือ	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
หม้อนึ่งอัดไอ	Udono-RII	ญี่ปุ่น
ปิเปตต์อัตโนมัติ	Socorex	สวิสเซอร์แลนด์
ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato	**ญี่ปุ่น**
ขวดแก้ว	Boro	เยอรมัน
มิเตอร์นับเซลล์	Boeco	เยอรมัน
กล้องจุลทรรศ์แบบหัวกลับ	Nikon	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige	ไทย
ตัวกรองปลอดเชื้อ	Spectrapor	สหรัฐอเมริกา
ไมโครปิเปตต์	Gilson	ฝรั่งเศส
จานชนิด 96 หลุม	nunc	เดนมาร์ก
Microtiterplate reader	Titertek multiskan	ฟินแลนด์
เข็มฉีดยา (เบอร์ 18G, 21G)	Nipro	ไทย
ปิเปตต์ (10 ml)	HBG	เยอรมัน
กระบอกฉีดยา (1 และ 5 ml)	Nipro	ไทย
ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (10 ml และ 250 ml)	Nunc	เดนมาร์ก
เครื่องวัด pH	Mettler Toledo	สหรัฐอเมริกา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
Aminopterine	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
BCA protein assay kit	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Bipemidic acid	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Cinoxacin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Ciprofloxacin	Siam pharmaceutical	ไทย
Citric acid	Merck	เยอรมัน
Clenbuterol	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
D-glucose	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Diethylether	Merck	เยอรมัน
Dimethyl fomamide	Fisher scientific	สหรัฐอเมริกา
Dimethyl Sulfoxide	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
Disodium hydrogen phosphate	Carlo erba	สหรัฐอเมริกา
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Enrofloxacin-BSA	Abkem ibera S.L.	สเปน
Enrofloxacin-KLH	Abkem ibera S.L.	สเปน
Fetal calf serum	Invitromex	เยอรมัน
Furazolidone	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Keyhole limpets hemocyanin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Hydrogen peroxide	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Isotyping kit	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
L-glutamine	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Methanol	กรมสรรพสามิต	ไทย
Nalidixic acid	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Non-fat dry milk	Mission	ไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อสารเคมี	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
Norfloxacin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Ofloxacin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
O-phenylenediamine	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Oxolinic acid	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Penicllin G	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	Zymed	สหรัฐอเมริกา
Polyethylene glycol	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
RPMI – 1640 medium	Invitromex	เยอรมัน
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Sodium cabonate	Merck	เยอรมัน
Sodium chloride	Merck	เยอรมัน
Sodium dihydrogen phosphate	Carlo erba	สหรัฐอเมริกา
Sodium hydroxide	Merck	เยอรมัน
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Streptomycin	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Sulfamethazine sodium salt	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Sulfuric acid	Merck	เยอรมัน
Tetracyclin HCl	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
Tween 20	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

3.3.1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองด้วยแอนติเจน

3.3.1.1 กระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซินที่ถูกเชื่อมเข้ากับ KLH เป็นแอนติเจน โดยฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ตัวละ 30 μg ปริมาตร 100 μl โดยผสมแอนติเจนกับ complete Freund 's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันจนเป็น water in oil emulsion จากนั้นฉีดแอนติเจนเข้าช่องท้องหนู หลังจากนั้นฉีดซ้ำทุกๆ 3 สัปดาห์ โดยการฉีดซ้ำนั้นใช้แอนติเจนปริมาณเท่าเดิมแต่เปลี่ยนมาผสมด้วย incomplete Freund 's adjuvant แล้วเจาะเลือดจากหางหนูในวันที่ 7-10 หลังฉีดแอนติเจนเพื่อนำไปตรวจวัดหาไตเตอร์แอนติบอดี เมื่อได้ไตเตอร์ที่สูงพอแล้วจึงกระตุ้นครั้งสุดท้ายก่อนการทำการหลอมรวมเซลล์ โดยละลายแอนติเจนในน้ำเกลือแล้วฉีดเข้าช่องท้องหนูก่อนนำไปหลอมรวมเซลล์ในวันที่ 5 หลังการกระตุ้นนี้

3.3.1.2 การเตรียมซีรัม

หลังจากเจาะเลือดจากหางหนูแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 –60 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกส่วนน้ำใสซึ่งก็คือซีรัมออกมาเก็บใน 4 องศาเซลเซียส

3.3.1.3 การทำ indirect ELISA เพื่อตรวจวัดไตเตอร์แอนติบอดีในซีรัม

นำแฮพเทนที่เชื่อมอยู่กับโปรตีนเอนโรฟลอกซาซิน-KLH มาตรึงบนจานชนิด 96 หลุมที่ความเข้มข้น 3 μg/ml ปริมาตร 100 μl ต่อหลุมแล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน หรือที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติเจนที่ไม่ถูกตรึงออกด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติม Blocking agent (5% skim milk ที่ละลายใน PBS) ปริมาตร 300 μl ต่อหลุมแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติมซีรัมที่เจือจางแล้ว 100 μl ต่อหลุม (โดยเจือจางเริ่มต้นจาก 1:1,000 เท่า แล้วเจือจางทีละ 2 เท่าจนถึง 1:64,000 เท่า โดยจะใช้ซีรัมหนูที่ได้ก่อนได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนเป็นตัวควบคุมลบจากนั้นนำจานบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ได้จากกระต่ายที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูซึ่งติดฉลากด้วย HRP โดยเจือจาง 1:2,000 เท่าด้วย PBS ที่มี BSA 0.5% ละลายอยู่ เติมลงหลุมละ 100 μl แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วจึงเติมซับสเตรต โดยใช้ โอ-ฟีนิลีนไดเอมีน

(OPD) 6 mg ละลายใน citrate phosphate buffer pH 5.0 ปริมาณ 15 ml แล้วเติม H_2O_2 30% ปริมาตร 6 µl เติมซับสเตรตที่เตรียมไว้หลุมละ 150 µl บ่มในที่มืดนาน 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2.5 M H_2SO_4 ปริมาตร 100 µl จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วย ELISA plate reader

3.3.1.4 การทดสอบหาความจำเพาะแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในซีรัมด้วยวิธี indirect competitive ELISA

เจือจางซีรัมใน PBS ที่มี BSA อยู่ 0.5% เพื่อดูดซับแอนติบอดีต่อ BSA ในซีรัมออกเสียก่อน จากนั้นตรียมเอนโรฟลอกซาซินโดยละลายใน DMF ปริมาตรเล็กน้อยเมื่อละลายแล้วจึงเจือจางเอนโรฟลอกซาซินใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 µg/ml ส่วนซีรัมเตรียมโดยเจือจางซีรัมใน PBS ที่มี BSA อยู่ 0.5% ให้ได้อัตราเจือจาง 1:10,000 เท่า แล้วนำเอนโรฟลอกซาซินที่เตรียมไว้รวมกับซีรัมในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ได้เอนโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/ml ในซีรัมที่อัตราเจือจางสุดท้าย 1:20,000 เท่า แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเติมในไมโครไตเตอร์เพลตปริมาตร 100 µl ต่อหลุม แล้วนำจานไปบ่มแล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิและซับสเตรตเช่นเดียวกับการทำ indirect ELISA ตามวิธีการข้างต้นดังข้อ 3.3.1.3

3.3.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา

3.3.2.1 การเตรียม HAT medium

เตรียมเป็นความเข้มข้น HAT 100X ก่อน เวลาใช้นำ HAT 100X มา 10 ml ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 1 ลิตร และเติม Fetal calf serum 20% (v/v)

3.3.2.2 การเตรียม HT medium

เตรียมเป็นความเข้มข้น HT 100X เก็บไว้ เมื่อใช้นำ HT 100X มา 10 ml ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 1 ลิตร และเติม FCS 20% (v/v)

3.3.2.3 การเตรียมน้ำยาหลอมรวมเซลล์ (PEG)

นำพอลิเอทิลีนไกลคอลซึ่งมีปริมาณ 2 mg มาอุ่นให้ละลาย จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 2 ml จะได้ 50%พอลิเอทิลีนไกลคอล (50% PEG)

3.3.2.4 การทำการหลอมรวมเซลล์

หนูตัวที่มีไตเตอร์ต่อเอนโรฟลอกซาซินสูงจะถูกคัดเลือกมาเพื่อนำม้ามไปหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาเพื่อเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

3.3.2.4.1 การเตรียมเซลล์ไมอีโลมา NSI โดยนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีการเติม FCS ที่ความเข้มข้นประมาณ 10% (v/v) ให้เซลล์อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล ประมาณ 2-3 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที แล้วแขวนลอยตะกอนเซลล์ด้วย RPMI-1640 ปริมาณ 10 ml แล้วนำเซลล์ไมอีโลมาที่ได้มาย้อมด้วยสีทริปแพนบลูและนับเซลล์โดยใช้ haemacytometer หาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตให้มีมากกว่า 95 % โดยให้มีปริมาณเซลล์มากกว่า 10^5 cell/ml จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ที่ตู้บ่ม CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้าม

3.3.2.4.2 การเตรียมเซลล์ม้าม ทำการเจาะเลือดจากหัวใจด้วยวิธี cardiac puncture จากหนูที่ได้รับไดเอทิลอีเทอร์เก็บซีรัมเตรียมไว้ใช้เป็นตัวควบคุมบวกใน indirect ELISA แล้วเปิดหน้าท้องด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำม้ามออกมาบดบนตะแกรงลวดตาถี่ นำเซลล์มาปั่นล้างด้วย RPMI-1640 ด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำเซลล์มาแขวนลอยด้วย RPMI-1640 แล้วนำเซลล์ม้ามที่ได้มาย้อมด้วยสีทริปแพนบลูและนับเซลล์ที่มีชีวิต

3.3.2.4.3 การเชื่อมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมา นำเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมาที่เตรียมไว้มาผสมกัน อัตราส่วนจำนวนเซลล์ม้ามต่อเซลล์ไมอีโลมาประมาณ 1:3 โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml แล้วปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเทน้ำใสทิ้งจากนั้นเติมสารละลาย 50% PEG ที่ถูกอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติม PEG ลงไป 1 ml ลงในตะกอนเซลล์แล้วเขย่าหลอดเบาๆ โดยต้องควบคุมการไหลของ PEG ให้หมดภายใน 1 นาที แล้วเขย่าหลอดเบาๆ นาน 1 นาที หลังจากนั้นล้าง PEG ออกด้วย RPMI-1640 แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม HAT medium ที่มี FCS อยู่ 20% (v/v) ลงไป นำไปหยอดลงจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 อยู่ 5%

3.3.2.5 การเลี้ยงเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

3.3.2.5.1 การติดตามเซลล์ไมอีโลมา หลังจากหลอมรวมเซลล์แล้วสังเกตเซลล์ในแต่ละหลุม เมื่อผ่านไป 5-7 วันเซลล์ไมอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะตาย ต้องสังเกตตรวจติดตามเซลล์ไฮบริโดมาพร้อมกับเปลี่ยนอาหารโดยดูดอาหารเก่าออกแล้วเติม HAT medium ใหม่ลงไป เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุม จึงดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 µl มาตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินโดยวิธี indirect ELISA หลังจากการหลอมรวมเซลล์ผ่านไปประมาณ 3 สัปดาห์จึงเปลี่ยนไปใช้ HT medium นาน 1 สัปดาห์จึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเหมือนที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไมอีโลมาทั่วไป

3.3.2.5.2 การคัดกรองเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุมจึงตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยมีขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับการทำ indirect ELISA ในข้อ 3.3.1.3 เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ในพอลิโคลนอลแอนติบอดี แต่ต่างที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ต้องเจือจางแทนซีรัม และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงเป็นตัวควบคุมลบ

3.3.2.5.3 การคัดแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว (single cell cloning) เพื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี limiting dilution โดยนำกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินมานับเซลล์ แล้วเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์ที่ต้องการในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม โดยให้จำนวนเซลล์แต่ละหลุมมีประมาณ 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 20 เซลล์ต่อหลุม (จำนวนเซลล์ 0.5 และ 0.25 เซลล์ต่อหลุมเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณ) แล้วเพาะเลี้ยงไว้โดยต้องตรวจติดตามเซลล์เพื่อคัดเลือกกลุ่มเซลล์ที่มาจากหลุมที่มีเซลล์เพียงเซลล์เดียว และต้องเป็นเซลล์ที่ให้ผลบวกกับโดยวิธี indirect ELISA และทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าได้เซลล์ในหลุมที่มาจากเซลล์ตั้งต้นเซลล์เดียวกันจริง แล้วเก็บเซลล์นั้นมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป

3.3.3 การเก็บรักษาเซลล์และนำเซลล์ไฮบริโดมามาเลี้ยงใหม่

3.3.3.1 นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้ปริมาณที่มากพอและให้เซลล์ไฮบริโดมาอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลแล้วเก็บเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง เติม freezing medium ที่มีองค์ประกอบเป็นอาหาร

เลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 65% , FCS 25% และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 5×10^6 cell/ml แล้วดูดลงหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 ml นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วย้ายลงในไนโตรเจนเหลว

3.3.3.2 นำหลอดแช่แข็งออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว แล้วแช่ลงทันทีในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำยาเลี้ยงเซลล์ละลายแล้วจึงถ่ายลงหลอดปั่นเหวี่ยงที่มี RPMI-1640 อยู่ 10 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อล้างเอา DMSO ออก โดยล้างซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์ไปเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์

3.3.4 ทดสอบการจับกันของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นได้จากการฉีดการกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่ถูกเชื่อมต่อด้วยโปรตีน และในการทำ indirect ELISA นั้นก็ไม่สามารถตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้โดยตรง ต้องตรึงด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่ถูกเชื่อมต่อด้วยโปรตีนเพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับแบบจำเพาะกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ จึงใช้หลักการการแย่งจับในการทำ indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทำเช่นเดียวกับการทำ indirect competitive ELISA ดังข้อ 3.3.1.4 แต่ต่างกันที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแทนซีรัมโดยเจือจางเอนโรฟลอกซาซินให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 µg/ml และเตรียมแอนติบอดีโดยเจือจางใน PBS ให้ได้อัตราเจือจาง 1:160 เท่าแล้วนำเอนโรฟลอกซาซินรวมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ได้เอนโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16 และ 0 µg/ml ในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อัตราเจือจางสุดท้าย 1:320 เท่า หากโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ จะพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลุมที่มีเอนโรฟลอกซาซินในระดับความเข้มข้นสูงกว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะน้อยกว่าโมโนโคลนอแอนติบอดีในหลุมที่มีเอนโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า

3.3.5 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.3.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ในการตรวจสอบไอโซไทป์ของแอนติบอดีนี้จะใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของบริษัท sigma-aldrich และทำการตรวจสอบตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำดังนี้ ตรึงก้นหลุมด้วย isotyping specific antibody ที่เจือจาง 1:1,000 เท่าใน PBS ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (PBS+0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วเติม

โมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาตร 100 µl ลงในหลุมแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (Fab specific) ที่เจือจาง 1:600 เท่าใน washing buffer ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วจึงเติมซับสเตรต (OPD เตรียมเหมือนในวิธีการทำ indirect ELISA ในข้อ 3.3.1.3) ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม 2.5 N H_2SO_4 ปริมาตร 100 µl แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm

3.3.5.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ใช้การทดสอบค่า IC (inhibition concentration) 50 ซึ่งก็คือ ปริมาณสารที่สนใจที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงใน indirect competitive ELISA ลดลงเหลือ 50% เมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีสารซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความจำเพาะของแอนติบอดี ซึ่งหาค่า IC50 ได้จากการนำค่า %B/B_0 (หรือ %Binding) มาเขียนกราฟเป็นแกน Y และค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินเป็นแกน X เพื่อหาตำแหน่งของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่ให้ค่า %B/B_0 เท่ากับ 50% เมื่อ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ที่มีสารที่สนใจในระดับต่างๆ และ B_0 คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซินอยู่

3.3.5.2.1 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน

มีวิธีการทำเช่นเดียวกับการทดสอบการจับกันของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ แต่ต่างที่เตรียมเอนโรฟลอกซาซินให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.08, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ng/ml เพื่อให้ได้เอนโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้น 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5 และ 10 ng/ml ในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อัตราเจือจางสุดท้าย 1:320 เท่า แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาทำ indirect ELISA ดังวิธีการดังข้อ 3.3.1.3 หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่า %B/B_0

3.3.5.2.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มควิโนโลน ฟลูออโรควิโนโลนและสารนอกกลุ่มนี้

สารในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนยกเว้นเอนโรฟลอกซาซินที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ อีนอกซาซิน (enoxacin), ซินอกซาซิน (cinoxacin), นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin), กรดไบเพมิดิก (bipemidic acid), กรดออกโซลินิก (oxolinic acid), ฟลูเมควิน (flumequin), โอฟลอกซาซิน (ofloxacin), ซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ส่วนสารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ทดสอบมีดังนี้ สารเททราไซคลิน (tetracycline), สเตรปโตมัยซิน (streptomycin), ซัลฟาเมทาซีน (sulfamethazine), ฟูราโซลิโดน (furazolidone), เพนิซิลลิน (penicillin), เคลนบูเทอรอล (clenbuterol) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) เตรียมสารที่ต้องการทดสอบโดยละลายใน DMF เมื่อละลายแล้วจึงเจือจางใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 µg/ml และเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเจือจางใน PBS ให้ได้อัตราเจือจาง 1:160 เท่า นำสารที่ต้องการทดสอบมารวมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ได้สารที่ความเข้มข้น 0, 0.08, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5 และ 10 µg/ml ในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อัตราเจือจางสุดท้าย 1:320 แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายมาทำ indirect ELISA ตามวิธีการในข้อ 3.3.1.3 หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่า %B/B_0

3.3.5.3 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้รายงานเป็นค่า LOD (limit of detection) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA มาเขียนกราฟ ให้แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงส่วนแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน

ค่า LOD = B_0- 3 SD

เมื่อ B_0 = ค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน

ส่วน SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

วิธีการทำนั้นทำเช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้หาค่า IC50 แต่ต่างที่หลุมที่มีความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน 0 ng/ml (หลุม B_0) นั้นให้มีทั้งหมด 8 หลุม (Linnet และ Kondratovich, 2004)

3.3.6 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.3.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี

เลี้ยงเซลล์รหัสโคลน #44 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี FCS อยู่10% จนอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมีสีเหลืองซึ่งจะมีแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่จำนวนมาก

3.3.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีนเอ

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้ได้ pH 8.1 โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris 1 M. pH 8.0 แล้วเติมบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 M. pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีนเอปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีลงไปในคอลัมน์โปรตีนเอ โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 mg/ml เติมบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 M. pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีนเอปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ซิเตรท 0.1 M. pH 3 ลงในคอลัมน์เพื่อชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ในปริมาตรเท่ากับ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ พร้อมกับการใช้หลอดทดลองเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 1 ml โดยเติมบัฟเฟอร์ Tris 1 M. pH 8.0 ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายที่ได้จากคอลัมน์โปรตีนเอเพื่อให้มี pH 8 แล้วเติมบัฟเฟอร์ Tris 1 M. pH 8.0 ลงในคอลัมน์โปรตีนเอปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm.

3.3.6.3 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีโดยวิธี BCA assay

เตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 µg/ml เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรมาตรฐาน และเจือจางแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในอัตราการเจือจาง 1 ต่อ 4 โดยเติมสารละลาย BSA และแอนติบอดีที่เตรียมลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ25 µl แล้วเติมสารละลาย A และ B โดยเจือจางสารละลาย A ต่อสารละลาย B เท่ากับ 50:1 แล้วเติมลงในหลุมข้างต้นที่มีสารละลาย BSA และแอนติบอดีอยู่ปริมาตร 200 µl หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายในจาน มีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm.

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง

ใช้หนูทดลองทั้งหมด 9 ตัว โดยแบ่งเป็นหนู 2 กลุ่ม กลุ่มแรกหนู 4 ตัว ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ทั้งหมด โดยใช้ทำการหลอมรวมเซลล์ไปทั้งหมด 2 ตัว ส่วนหนูกลุ่มที่ 2 มี 5 ตัว โดยแบ่งเป็นหนู 2 ตัวที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA เพียงอย่างเดียว ส่วนหนูที่เหลืออีก 3 ตัวฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH แต่มี 2 ตัวที่เปลี่ยนมากระตุ้นซ้ำด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ซึ่งหนูในกลุ่มที่ 2 นี้ใช้ในการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมด 3 ตัว

4.1.1 หนูกลุ่มที่ 1

หนูกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 4 ตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH หนูแต่ละตัวได้รับการฉีดกระตุ้นครั้งละ 30 μg ปริมาตร 100 μl ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์นั้นได้นำซีรัมหนูมาทำ indirect ELISA ทุกตัวโดยตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ปริมาณ 3 μg/ml บนไมโครไตเตอร์เพลตแบบ 96 หลุมเพื่อหาปริมาณแอนติบอดี (IgG) ต่อเอนโรฟลอกซาซินในซีรัมหนูหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว 3 ครั้ง พบว่าหนูตัวที่ 2 ให้ค่าไตเตอร์สูงที่สุด จึงเลือกหนูตัวที่ 2 มาทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 และใช้หนูตัวที่ 3 ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2

ตารางที่ 4.1 ค่าไตเตอร์แอนติบอดีของหนูหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH 3 ครั้ง

หนูตัวที่	ระดับไตเตอร์
1	1:4,000
2	1:16,000
3	1:8,000
4	1:2,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 หนูกลุ่มที่ 2

เนื่องจากหนูกลุ่มที่ 1 ที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH นั้นให้ไตเตอร์แอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในเลือดต่ำจึงเปลี่ยนแอนติเจนและวิธีการฉีดกระตุ้น หนูในกลุ่มที่ 2 นี้มีทั้งหมด 5 ตัว แบ่งออกเป็นหนู 2 ตัว ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA โดยหนูแต่ละตัวได้รับการฉีดกระตุ้นครั้งละ 30 µg ปริมาตร 100 µl ส่วนหนูอีก 3 ตัวฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ซึ่งหนูแต่ละตัวได้รับการฉีดกระตุ้นครั้งละ 30 µg ปริมาตร 100 µl หลังจากนำซีรัมมาทำ indirect ELISA พบว่าหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA นั้นให้ค่าไตเตอร์สูงกว่าหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 นั้นจึงใช้หนูตัวที่ 2 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA แล้ว 4 ครั้ง

ในหนูตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH นั้นพบว่าแอนติบอดีในซีรัมของหนูนั้นมีน้อยซึ่งอาจเกิดจากเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ที่ใช้นั้นละลายน้ำได้น้อยทำให้ได้ปริมาณแอนติเจนที่ไม่ถูกต้องซึ่งอาจน้อยเกิน ไปเมื่อนำไปฉีดกระตุ้นหนูทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของหนูตอบสนองต่อแอนติเจนได้น้อยจึงได้ไตเตอร์ต่ำ ซึ่งในหนูตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA นั้นให้ไตเตอร์สูงจึงทำให้ได้โอกาสที่จะได้ไฮบริโดมาที่ต้องการมากกว่า เพื่อการใช้สัตว์ทดลองให้มีประโยชน์สูงสุดจึงได้ใช้หนูในกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 4 และ 5 ที่เคยได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH มาเปลี่ยนเป็นกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ส่วนหนูตัวที่ 3 นั้นยังคงฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ต่อไป ซึ่งพบว่าหนูตัวที่ 1 และ 2 ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ตั้งแต่ต้นนั้นให้ค่าไตเตอร์ในระดับสูง แต่ในหนูตัวที่ 3 ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ตั้งแต่ต้นนั้นยังคงให้ไตเตอร์ในระดับต่ำ ส่วนหนูตัวที่ 4 และ 5 ซึ่งเคยได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ซึ่งให้ไตเตอร์ระดับต่ำแต่เมื่อเปลี่ยนมาฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ก็ให้ไตเตอร์ในระดับสูง ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 นั้นจึงใช้หนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 5 ครั้ง ส่วนการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 นั้นใช้หนูตัวที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH 5 ครั้งแล้วจึงเปลี่ยนมากระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA อีก 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.2 ค่าไตเตอร์แอนติบอดีของหนูกลุ่มที่ 2 หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย
เอนโรฟลอกซาซิน-BSA

หนูตัวที่	ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัม	นำไปหลอมรวมเซลล์ครั้งที่
1*	1:64,000	4
2*	1:64,000	3
3**	1:2,000	-
4***	1:32,000	-
5***	1:64,000	5

หมายเหตุ * หนูตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA

** หนูตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH

*** หนูตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH 5 ครั้งและกระตุ้นซ้ำด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3 ครั้ง

4.2 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอีโลมา

4.2.1 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1

ใช้หนูกลุ่มที่ 1 ตัวที่ 2 ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH มาแล้ว 3 ครั้ง หลังหลอมรวมเซลล์ได้ทำการแบ่งเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 480 หลุม ภายหลังการเชื่อมเซลล์แล้วประมาณ 10 วัน นำเซลล์มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมาที่ไม่หลอมรวมนั้นตายแล้วทั้งหมด จำนวนหลุมที่มีโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีประมาณ 60% ของหลุมทั้งหมด โดยเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคลนขนาดเล็กในหลุม เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนโคลนมีขนาดใหญ่ขึ้นและโตครอบคลุมพื้นที่ก้นหลุมประมาณ 60-70% จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบโดยวิธี indirect ELISA เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินจะถูกย้ายจากหลุมในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ไปเลี้ยงต่อในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ซึ่งหลุมจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และให้เซลล์แข็งแรงก่อนที่จะนำเซลล์ไฮบริโดมาไปแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ แต่พบว่าเซลล์นั้นเสียสมบัติการสร้างแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน อาจเนื่องจากเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม นั้นมีทั้งเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตและไม่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน เมื่อย้ายเซลล์ไปเลี้ยงใน

ถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม นั้นทำให้เซลล์กระจาย เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินนั้นโตช้ากว่าเซลล์อื่นจึงมีปริมาณน้อยกว่าเซลล์อื่นมาก และอาจไม่มีความเสถียรทางพันธุกรรมทำให้เซลล์ตายไป หรือเสียสมบัติการผลิตแอนติบอดีไปในที่สุด

หลังทำการหลอมรวมเซลล์แล้วพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมรหัส 2/11F เพียงหลุมเดียวที่ให้ผลบวกในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH จึงทำการแยกเซลล์เดี่ยว พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถจับกับแอนติเจนทั้งที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH และ KLH ดังตารางที่ 4.3 แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไม่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินและยังสามารถทำอันตรกิริยากับ KLH ได้

ตารางที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1

รหัสโคลน	แอนติเจนที่ตรึง	
	เอนโรฟลอกซาซิน-KLH 3 μg/ml	KLH 3 μg/ml
2/11F/4A/5C	1.292	1.238
2/11F/7D/8G	1.441	1.266
2/11F/3H/4D	1.374	1.186
2/11F/11B/9C	1.160	1.155
C-*	0.077	0.080
C+**	1.587	1.935

หมายเหตุ * อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์

** ซีรัมที่ได้จากการเจาะจากหัวใจหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ที่ความเจือจาง 1:4,000 เท่าใน PBS

4.2.2 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2

ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ใช้หนูกลุ่มที่ 1 หนูตัวที่ 3 มาทำการหลอมรวมเซลล์และเปลี่ยนมาใช้เอนโรฟลอกซาซินที่ถูกเชื่อมเข้ากับ BSA (เอนโรฟลอกซาซิน-BSA) เพื่อใช้คัดกรองหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินแทนเอนโรฟลอกซาซิน-KLH เนื่องจากเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ที่เคยใช้ตรึงก้นหลุมโดยวิธี indirect ELISA นั้นละลายน้ำได้น้อยและมี

ลักษณะเป็นตะกอนแขวนลอยซึ่งทำให้ได้เกาะกับก้นหลุมได้น้อย หลังทำการหลอมรวมเซลล์แล้ว พบว่ามีหลุมที่ให้ผลบวกโดยวิธี indirect ELISA ที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3 μg/ml ทั้งหมด 10 โคลน แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาไปพบว่าเหลือเพียง 4 โคลนที่ยังผลิตแอนติบอดีที่ให้ผลบวกโดยวิธี indirect ELISA คือโคลนที่มาจากหลุม 3/6H, 3/12H, 4/10E และ 4/11E ดังตารางที่ 4.4 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 นี้ให้ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3 μg/ml และ KLH 3 μg/ml ไม่ต่างกันแสดงว่าแอนติบอดีนี้ไม่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน และแอนติบอดียังสามารถจับกับแอนติเจนในหลุมที่ตรึงด้วย BSA 3 μg/ml ทั้งที่ไม่ได้เป็นสารที่ฉีดกระตุ้นซึ่งปกติมีความเป็นไปได้น้อย เนื่องจากหนูนั้นได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ทำให้มีแอนติบอดีส่วนหนึ่งที่จะทำอันตรกิริยากับ KLH ได้ แต่ในการทำอันตรกิริยากับ BSA นั้นมีความเป็นไปได้น้อย

ตารางที่ 4.4 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2

รหัสโคลน	แอนติเจนที่ตรึง		
	เอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3μg/ml	KLH 3μg/ml	BSA 3μg/ml
3/6H/9G/8G/1A/4F	1.075	0.937	2.865
3/6H/9D/7A/9G/11E	1.047	1.017	2.704
3/12H/1A/3E/2D/8E	2.348	1.847	2.763
3 /12H/1A/3E/12A/2E	1.725	1.558	2.710
4/10E/3H/9D/1A/3H	2.807	2.019	2.840
4/10E/3H/9D/1A/2F	2.298	1.675	2.527
4/11E/12G/3E/4E/5A	1.236	0.816	1.532
4/11E/12G/3F/7B/9C	1.062	0.756	1.519
C*	0.077	0.080	0.083
C+**	1.387	1.435	1.348

หมายเหตุ * อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์

** ซีรัมที่ได้จากการเจาะจากหัวใจหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ที่ความเจือจาง 1:4,000 เท่าใน PBS

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ไปแล้ว 2 ครั้งนั้นไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินและพบว่าซีรัมจากหนูที่เหลือทั้ง 2 ตัวนั้นมีค่าไตเตอร์แอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินต่ำจึงไม่ได้นำหนูทดลองที่เหลือมาทำการหลอมรวมเซลล์

4.2.3 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3

ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 นั้นใช้หนูจากกลุ่มที่ 2 หนูตัวที่ 2 ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA แล้ว 4 ครั้ง

หลังทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 ได้ทำการคัดกรองหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินโดยวิธี indirect ELISA ที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3 µg/ml จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 นั้นพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นมาจากเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมตั้งต้นรหัส 2/7F และ 5/11Fและได้ทำ indirect ELISA ที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3 µg/ml เพื่อเปรียบเทียบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ถูกดูดซับ ที่ดูดซับด้วยเอนโรฟลอกซาซิน 25 µg/ml และที่ดูดซับด้วย BSA 1% โดยพบว่าแม้ดูดซับด้วยเอนโรฟลอกซาซิน 25 µg/ml ค่าดูดกลืนแสงนั้นไม่ต่างกับการไม่ดูดซับ แต่การดูดซับด้วย BSA 1% นั้นพบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างมากดังตารางที่ 4.5 แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดไม่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินแต่จำเพาะต่อ BSA

ตารางที่ 4.5 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3

รหัสโคลน	ไม่ดูดซับ	ดูดซับ	
		เอนโรฟลอกซาซิน 25 μg/ml	BSA 1%
2/7F/2A/5C/9E	1.450	1.293	0.100
2/7F/10C/4C/8D	1.075	0.961	0.113
5/11F/2E/6G/8C	1.101	1.043	0.144
5/11F/3C/2F/5F	1.899	1.812	0.395
5/11F/4D/4D/2G	1.911	1.890	0.364
C-*	0.091		
C+**	1.286		

หมายเหตุ * อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์

** ซีรัมที่ได้จากการเจาะจากหัวใจหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 ที่ความเจือจาง 1:4,000 เท่าใน PBS

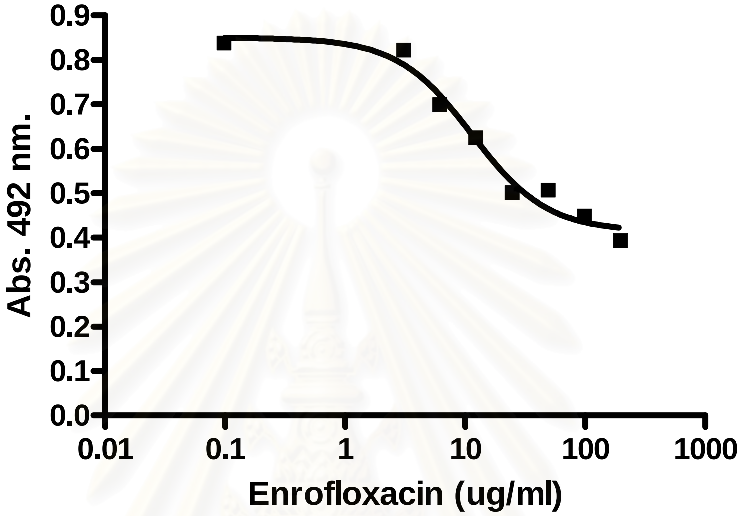
4.2.4 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 นั้นใช้หนูในกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 1 ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA 5 ครั้ง

4.2.4.1 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในซีรัมโดยวิธี indirect competitive ELISA

การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูที่ใช้ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 กับเอนโรฟลอกซาซินโดยวิธี indirect ELISA เพื่อตรวจสอบว่าซีรัมมีแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินหรือไม่ โดยเจือจางซีรัมใน PBS ที่มี BSA ละลายอยู่ 0.5% (w/v) เนื่องจากในซีรัมที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA จะมีแอนติบอดีต่อ BSA อยู่ด้วยจึงต้องดูดซับ BSA ออกเสียก่อน ถ้าซีรัมหนูมีแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระทำให้ไม่จับกับเอนโรฟลอกซาซินที่ถูกตรึงอยู่ก้นหลุม ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระอยู่ในหลุม ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.1 จะ

เห็นว่าค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนโรฟลกซาซินเพิ่มขึ้น แสดงว่าในซีรัมของหนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 1 นั้นมีแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินทำให้มีความน่าจะเป็นสูงที่จะได้เซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินเมื่อทำการหลอมรวมเซลล์แล้ว จึงใช้ม้ามจากหนูตัวนี้ไปทำการหลอมรวมเซลล์



ภาพที่ 4.1 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในซีรัมของหนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 1 โดยวิธี indirect competitive ELISA

4.2.4.2 การหลอมรวมเซลล์

หลังจากหลอมรวมเซลล์พบว่าเซลล์ในหลุมนั้นเพิ่มจำนวนแต่ไม่มีลักษณะเป็นโคลนโดยเซลล์นั้นกระจายทั่วหลุม เซลล์มีจำนวนมากและมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ไฮบริโดมาปกติ จึงได้ทำการคัดกรองเซลล์ไฮบริโดมาหลังจากวันที่ทำการหลอมรวมเซลล์เพียง 3 สัปดาห์ ซึ่งปกติจะทำการคัดกรองเซลล์หลังจากหลอมรวมเซลล์แล้วอย่างน้อย 4 สัปดาห์ หลังการคัดกรองแล้วพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมให้ผลบวกโดยวิธี indirect ELISA จำนวน 512 หลุมจากทั้งหมด 576 หลุม แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อไป 2 สัปดาห์พบว่าแอนติบอดีจากเซลล์นั้นให้ผลเป็นลบในวิธี indirect ELISA โดยบางหลุมเซลล์ตาย หลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีให้ผลบวกโดยวิธี indirect ELISA ที่ตรึงก้นหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA เหลือเพียงเซลล์จากหลุมรหัส 1/4D, 5/3F และ 5/4D แต่ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำมากในหลุม BSA ดังตารางที่ 4.6 จึงได้ทำการคัดแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจากนั้นจึงเพิ่มจำนวนและเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว และจะทำการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ต่อไป

ตารางที่ 4.6 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

รหัสโคลน	แอนติเจนที่ตรึง	
	เอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3µg/ml	BSA 3µg/ml
1/4D/2F/8F	1.057	0.094
1/4D/2F/10H	1.224	0.111
1/4D/8G/8B	1.458	0.159
5/3F/1D/6C	0.663	0.099
5/3F/1G/10B	0.717	0.114
5/4D/4B/7F	0.993	0.138
5/4D/4B/1F	1.330	0.093
5/4D/4D/8F	1.274	0.089
C-	0.091	0.081
C+	1.338	1.429

หมายเหตุ * อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์

** ซีรัมที่ได้จากการเจาะจากหัวใจหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่ความเจือจาง 1:4,000 เท่าใน PBS

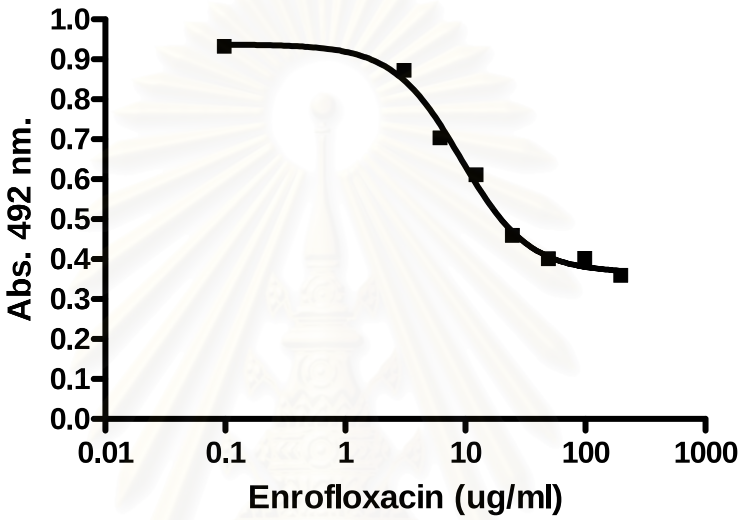
4.2.5 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 นั้นใช้หนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 5 ซึ่งเคยได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH มาแล้ว 5 ครั้งแล้วจึงเปลี่ยนมากระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA อีก 3 ครั้ง

4.2.5.1 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในซีรัมโดยวิธี indirect competitive ELISA

การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อเอนโรฟลอกซาซินโดยวิธี indirect ELISA เพื่อตรวจสอบว่าในซีรัมมีแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินหรือไม่ โดยเจือจางซีรัมใน PBS ที่มี BSA ละลายอยู่ 0.5% (w/v) เนื่องจากในซีรัมของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA จะมีแอนติบอดีต่อ BSA อยู่ด้วยจึงต้องดูดซับ BSA ออกเสียก่อน ถ้าซีรัมหนูมีแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระทำให้ไม่จับกับ

เอนโรฟลอกซาซินที่ถูกตรึงอยู่ก้นหลุม ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระอยู่ในหลุม ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.2 จะเห็นว่าค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนโรฟลกซาซินเพิ่มขึ้น แสดงว่าในซีรัมของหนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 5 นั้นมีแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินจึงใช้ม้ามจากหนูตัวนี้ไปทำการหลอมรวมเซลล์



ภาพที่ 4.2 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนโรฟลอกซาซินในซีรัมของหนูกลุ่มที่ 2 ตัวที่ 5 ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

4.2.5.2 การหลอมรวมเซลล์

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 นี้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่ให้ผลบวกในวิธี indirect ELISA ทั้งหมด 7 หลุมคือหลุมที่มีรหัส 2/12A, 3/6E, 4/2E, 5/6G, 5/12D, 5/6F และ 1/3C ดังตารางที่ 4.7 เมื่อรวมกับ 3 โคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 เป็นทั้งหมด 10 โคลนที่ไม่จับกับ BSA แต่จับกับเอนโรฟลอกซาซิน–BSA ที่ตรึงก้นหลุมโดยวิธี indirect ELISA ซึ่งคาดว่าจะให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน จึงเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บเป็นเซลล์แช่แข็งซึ่งมีดังตารางที่ ก.1 และ ก.2 ในภาคผนวก ก และจะทำการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ต่อไป

4.3 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.3.1 ทดสอบการจับกันของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และครั้งที่ 5 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นสามารถจับกับเอนโรฟลอกซาซิน-BSA แต่ไม่จับกับ BSA โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดที่ได้มีจำนวนมาก จึงเลือกเซลล์ที่เป็นตัวแทนของเซลล์ไฮบริโดมาจากทั้งหมดมาทดสอบการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ โดยตั้งรหัสโคลนใหม่เพื่อความสะดวกในการจัดการดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ในการทดสอบหาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระโดยวิธี indirect competitive ELISA นั้นถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะจับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้นำเอนโรฟลอกซาซินมาทำอันตรกิริยา ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.3 จะเห็นว่าในโคลนที่มีรหัส #44, #45, #47 และ #48 ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินเพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่มาจากโคลนตั้งต้นรหัส 1/4D เท่านั้นที่สามารถจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ โดยโคลนรหัสอื่นๆ ทั้งในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และครั้งที่ 5 นั้นไม่สามารถจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ไม่ลดลงเมื่อปริมาณเอนโรฟลอกซาซินเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และ 4.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

รหัสโคลน	แอนติเจนที่ตรึง		
	เอนโรฟลอกซาซิน-BSA 3µg/ml	BSA 3µg/ml	KLH 3µg/ml
1/3C/1D/1E	0.859	0.083	0.084
1/3C/3E/3E	0.887	0.078	0.092
2/12A/4C/2G	0.572	0.081	0.092
2/12A/9B/5D	0.663	0.084	0.088
3/6E/2D/10F	0.701	0.081	0.099
3/6E/7E/12E	0.679	0.091	0.100
3/6E/3F/11H	0.642	0.093	0.077
4/2E/9D/9H	0.920	0.087	0.067
4/2E/9B/7E	0.937	0.086	0.091
5/6F/2C/4G	1.229	0.078	0.082
5/6F/4E/5D	1.318	0.076	0.083
5/6G/8A/8C	0.939	0.085	0.096
5/6G/11F/9G	1.002	0.084	0.092
5/6G/10H/12B	1.104	0.099	0.081
5/12D/8H/2C	0.770	0.083	0.087
5/12D/10C/7E	0.698	0.091	0.088
C-	0.092	0.089	0.075
C+	1.867	1.349	1.255

หมายเหตุ * อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์

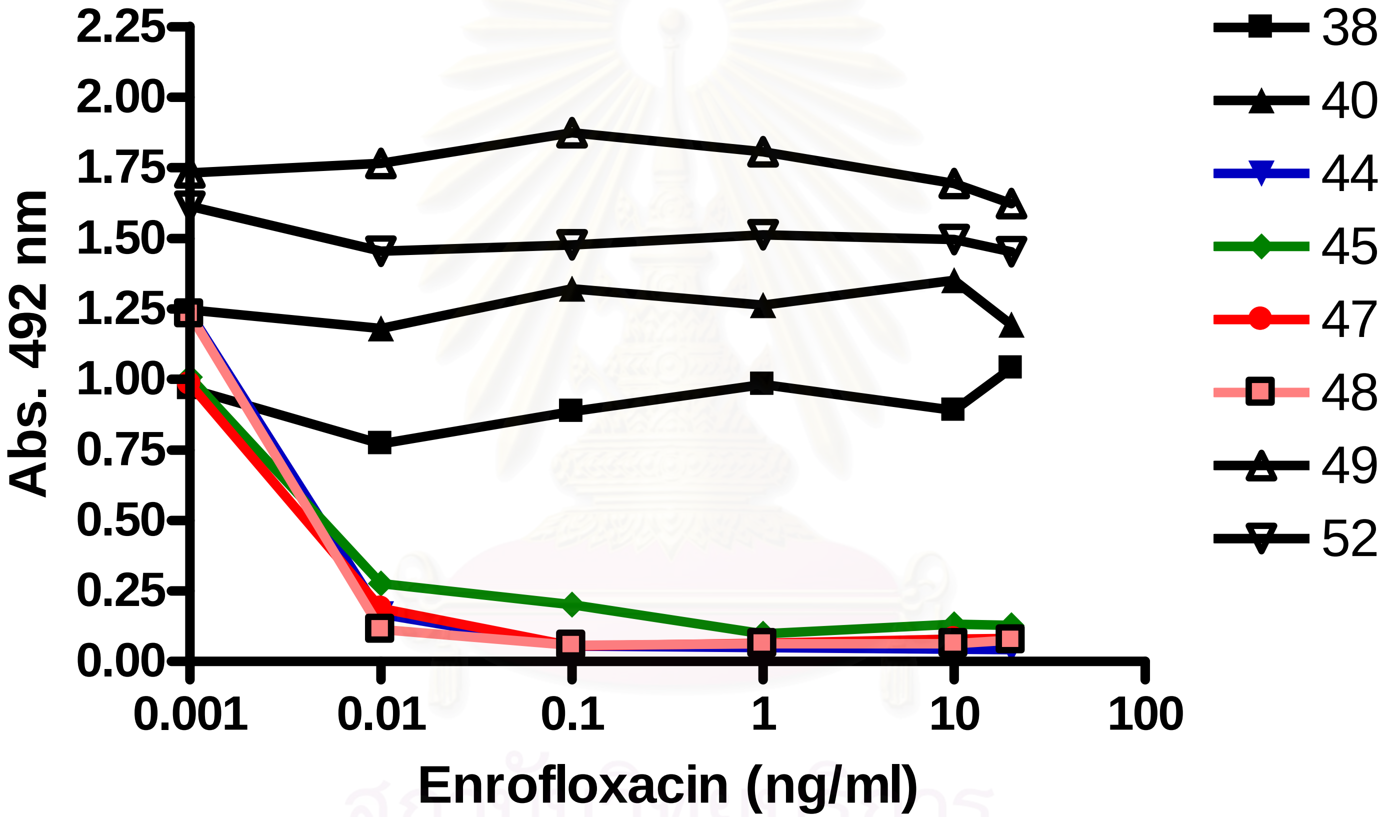
** ซีรัมที่ได้จากการเจาะจากหัวใจหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ที่ความเจือจาง 1:4,000 เท่าใน PBS

ตารางที่ 4.8 รหัสโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่เลือกมาทดสอบการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

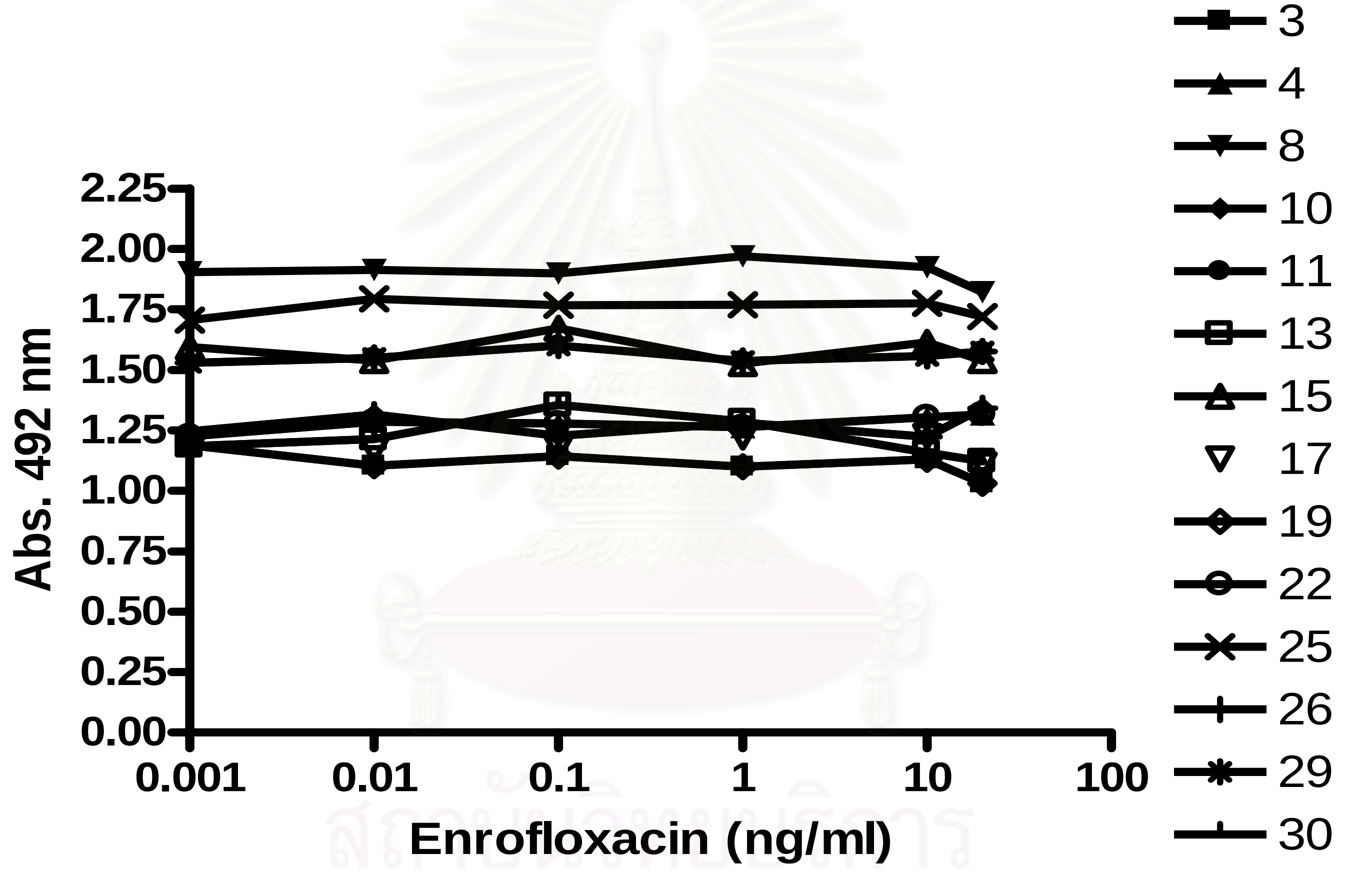
รหัสโคลน	รหัสของหลุมที่ใช้เลี้ยงเซลล์
38	5/4D/4B/1F/4D/3B/1G/1C /5B/1/10C
40	5/4D/4D/8F/10E/11B/10E/1G /8C/1B
44	1/4D/2F/8F/7E/3A /4G/3F
45	1/4D/2F/10H/9G/7F /8G/6F
47	1/4D/2F/10H/9G/7F /11G/5A
48	1/4D/1D/6C/7E/6D /2D/8D
49	5/3F/1D/6C/7E/6D /2D/10E
52	5/3F/1G/10B/10E/7G /11D/10G

ตารางที่ 4.9 รหัสโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ที่เลือกมาทดสอบการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

หมายเลขโคลน	รหัสโคลน
3	2/12A/9B/5D/12B
4	3/6E/2D/10F/3G
8	3/6E/7E/12E/7C/10E
10	3/6E/3F/11H/3H/5G
11	4/2E/9D/9H/7C
13	4/2E/9B/7E/11E
15	5/6G/11F/9G/12F
17	5/6G/10H/12B/1D
19	5/12D/8H/2C/5C/2B
22	5/12D/10C/8B/8C
25	5/6F/2C/4G/9E/1G
26	5/6F/4E/5D/11D/11F
29	1/3C/1D/1E/6D/5H
30	1/3C/3E/3E/2G/8E



ภาพที่ 4.3 การจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 กับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระโดยวิธี indirect competitive ELISA



ภาพที่ 4.4 การจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 กับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA

4.3.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 รหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 มาหาค่า IC50 โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่มีแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินและแกน Y เป็น %B/B_0 (%Binding) โดยให้ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ที่มีสารที่ทดสอบในระดับความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี competitive ELISA ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน เพื่อหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่ให้ค่า %B/B_0เท่ากับ 50% และได้ค่า IC50 เท่ากับ 0.15, 0.19, 0.18 และ 0.18 ng/ml ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5

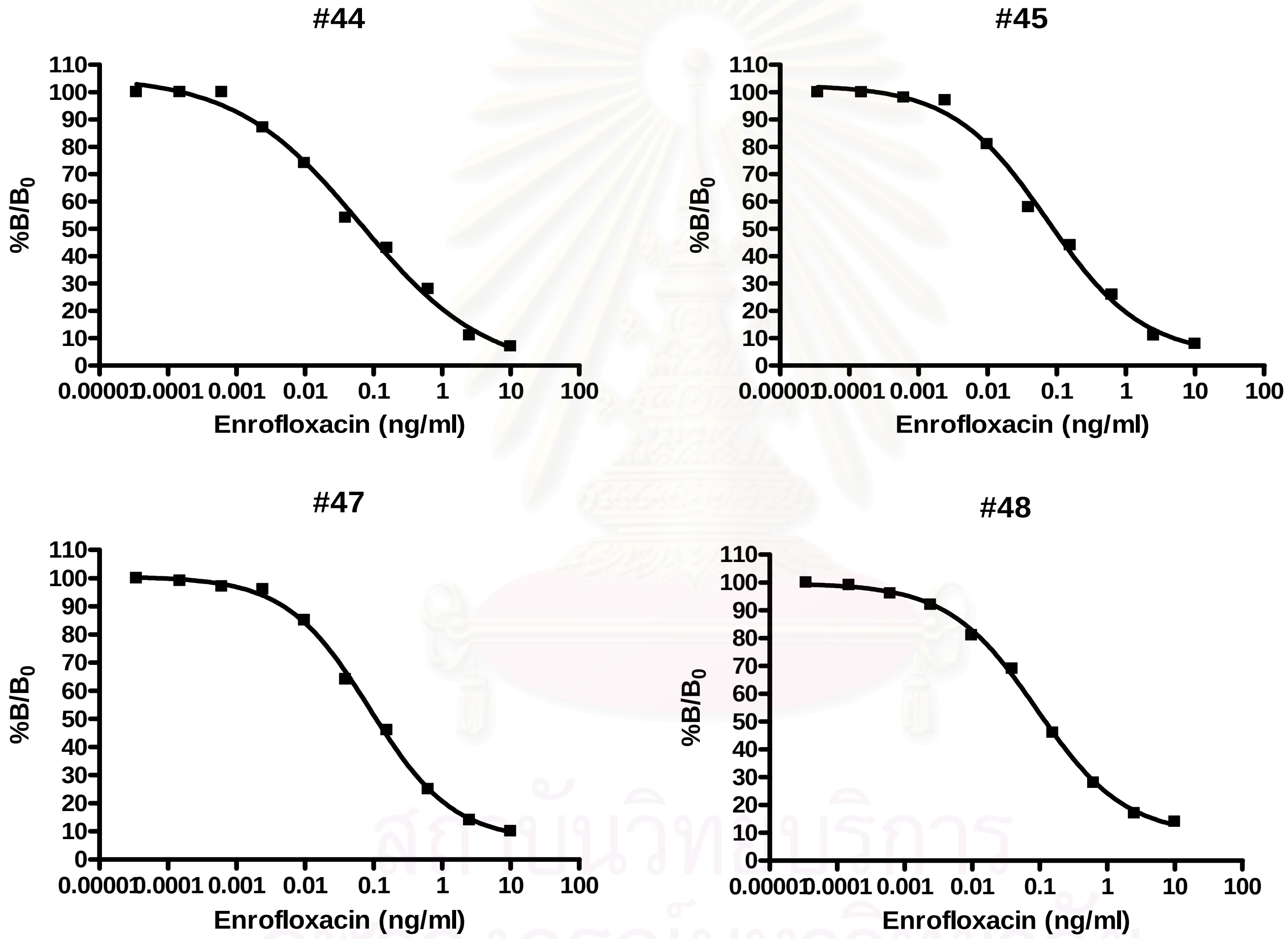
4.3.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 รหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 โดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะอื่นๆ ในกลุ่มควิโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนโดยวิธี indirect competitive ELISA

โดยปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะต่างๆ หาได้จากเปอร์เซ็นของค่า IC50 ของเอนโรฟลอกซาซินต่อค่า IC50 ของสารปฏิชีวนะต่างๆ

$$\text{ปฏิกิริยาข้าม (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{IC50 ของเอนโรฟลอกซาซิน}}{\text{IC50 ของของสารปภิชีวนะต่างๆ}} \times 100$$

ซึ่งพบว่าในจำนวนสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบนี้ทั้งหมด 9 ชนิด มีโอฟลอกซาซิน(ofloxacin) ที่มีค่า IC50 น้อยที่สุด แต่ก็มากกว่า IC50 ของเอนโรฟลอกซาซินเกิน 1,000 เท่า จึงมีปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.1% ส่วนสารอีนอกซาซิน (enoxacin), ซินอกซาซิน (cinoxacin), นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin), กรดไบเพมิดิก (bipemidic acid), กรดออกโซลินิก (oxolinic acid), ฟลูเมควิน (flumequin), ซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) นั้นมีค่า IC50 มากกว่า 10 µg/ml จึงมีปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.001% ดังตารางที่ 4.10 และตารางที่ 4.11



ภาพที่ 4.5 กราฟใช้หาค่า IC50 ต่อเอนโรฟลอกซาซินของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

สารปฏิชีวนะ	IC 50 (ng/ml)			
	#44	#45	#47	#48
เอนโรฟลอกซาซิน	0.15	0.19	0.18	0.18
โอฟลอกซาซิน	2.98×10^{3}	4.79×10^{3}	2.12×10^{3}	1.71×10^{3}
อีนอกซาซิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
ซินอกซาซิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
นอร์ฟลอกซาซิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
กรดไบเพมิดิก	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
กรดออกโซลินิก	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
กรดนาลิดิซิก	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
ฟลูเมควิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
ซิโพรฟลอกซาซิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000

ตารางที่ 4.11 ค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

สารปฏิชีวนะ	ปฏิกิริยาข้าม (เปอร์เซ็น)			
	#44	#45	#47	#48
เอนโรฟลอกซาซิน	100	100	100	100
โอฟลอกซาซิน	0.0050	0.0040	0.0085	0.011
อีนอกซาซิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
ซินอกซาซิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
นอร์ฟลอกซาซิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
กรดไบเพมิดิก	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
กรดออกโซลินิก	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
กรดนาลิดิซิก	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
ฟลูเมควิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
ซิโพรฟลอกซาซิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.4 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

สารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ทดสอบมีดังนี้ เททราไซคลิน (tetracycline), สเตรปโตมัยซิน (streptomycin), ซัลฟาเมทาซีน (sulfamethazine), ฟูราโซลิโดน(furazolidone), เคลนบูเทอรอล (clenbuterol), เพนิซิลลิน (penicillin) และคลอแรมเฟนิคอล(chloramphenical) โดยฟูราโซลิโดนเป็นสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน (nitrofuran) และเคลนบูเทอรอลเป็นสารในกลุ่มสารเร่งเนื้อแดง ส่วนสารอื่นนั้นเป็นสารปฏิชีวนะทั้งสิ้น ซึ่งสารที่ทดสอบทั้งหมดนี้ให้ค่า IC50 มากกว่า 10 µg/ml ดังนั้นทุกสารจึงให้ค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44, #45, #47 และ#48 จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 น้อยกว่า 0.01%

ตารางที่ 4.12 ค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

สารที่ทดสอบ	IC50 (ng/ml)			
	#44	#45	#47	#48
เอนโรฟลอกซาซิน	0.15	0.19	0.18	0.18
เททราไซคลิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
สเตรปโตมัยซิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
ซัลฟาเมทาซีน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
ฟูราโซลิโดน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
เคลนบูเทอรอล	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
เพนิซิลลิน	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
คลอแรมเฟนิคอล	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 ค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลนที่คัดเลือกจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสารนอกกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

สารที่ทดสอบ	ปฏิกิริยาข้าม (เปอร์เซ็น)			
	#44	#45	#47	#48
เอนโรฟลอกซาซิน	100	100	100	100
เททราไซคลิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
สเตรปโตมัยซิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
ซัลฟาเมทาซีน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
ฟูราโซลิโดน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
เคลนบูเทอรอล	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
เพนิซิลลิน	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018
คลอแรมเฟนิคอล	<0.0015	<0.0019	<0.0018	<0.0018

4.3.5 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ (Isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผลการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน #44, #45, #47 และ#48 ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดเป็นชนิด IgG1 ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่าดูดกลืนแสงจากการตรวจไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

รหัสโคลน	ไอโซไทป์						ผลไอโซไทป์
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	
# 44	***0.551***	0.068	0.095	0.101	0.502	0.161	IgG1
# 45	***0.662***	0.086	0.094	0.096	0.073	0.156	IgG1
# 47	***0.591***	0.080	0.091	0.094	0.059	0.162	IgG1
# 48	***0.551***	0.088	0.093	0.093	0.061	0.155	IgG1
Control (IgG3)	0.163	0.311	0.364	**1.534**	0.155	0.254	IgG3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.6 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้รายงานเป็นค่า LOD (limit of detection) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA มาเขียนกราฟให้แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ส่วนแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของปริมาณเอนโรฟลอกซาซิน ดังแสดงในภาพที่ 4.6

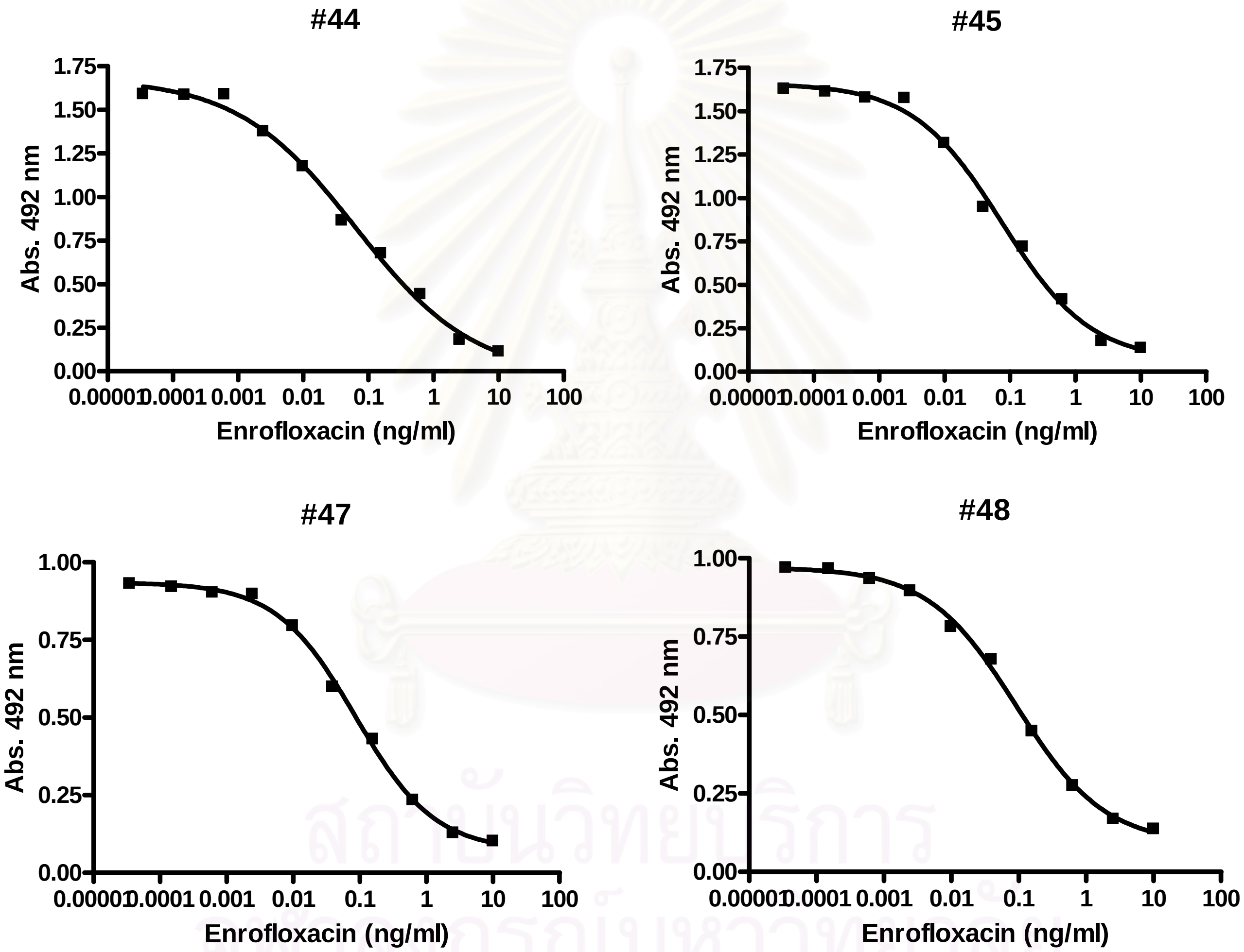
ค่า LOD = B_0- 3 SD

เมื่อ B_0 = ค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซินอยู่

ส่วน SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 (Linnet และ Kondratovich, 2004)

นำค่า B_0 จำนวน 8 ค่า มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานดังตารางที่ 4.15 จะได้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานหลังจากนั้นหาค่า 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ นำค่าที่ได้ไปลบค่าของ B_0 ค่าที่ได้จะเป็นค่าการดูดกลืนแสง จึงนำไปหาค่าปริมาณเอนโรฟลอกซาซินโดยหาได้จากสมการเส้นตรงของกราฟ (สมการจากส่วนที่เป็นเส้นตรงของกราฟ) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน #44, #45, #47 และ #48 มีค่า LOD เท่ากับ 0.0014, 0.0029, 0.0026 และ 0.0015 ng/ml ตามลำดับ แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนนี้มีความไวต่อเอนโรฟลอกซาซินสูง เนื่องจากสามารถตรวจสอบปริมาณเอนโรฟลอกซาซินได้ในระดับต่ำสุดถึง 0.0014 ng/ml ดังตารางที่ 4.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.6 กราฟใช้หาค่า LOD ต่อเอนโรฟลอกซาซินของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 ค่าดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 เพื่อใช้หาค่า LOD

รหัสโคลน	ค่าดูดกลืนแสงที่มีเอนโรฟลอกซาซิน 0 ng/ml (ค่า B_0)								ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
#44	1.562	1.540	1.499	1.574	1.599	1.602	1.620	1.498	0.032
#45	1.630	1.557	1.559	1.681	1.604	1.595	1.622	1.626	0.031
#47	0.931	0.913	0.955	0.947	0.938	0.929	0.915	0.950	0.016
#48	0.970	0.967	0.978	0.981	0.961	0.972	0.960	0.971	0.007

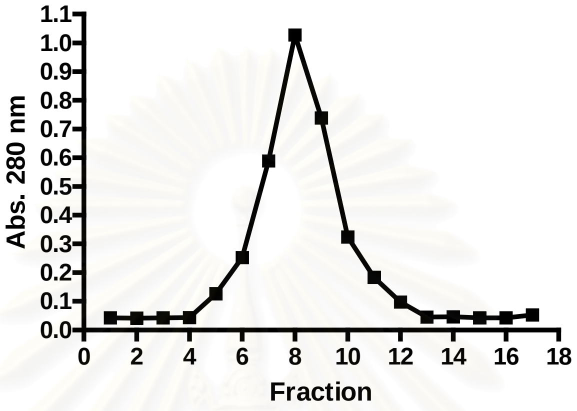
ตารางที่ 4.16 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

รหัสโคลน	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	สมการเส้นตรงของกราฟ	ค่า LOD (ng/ml)
#44	0.032	0.096	y = -0.1698Ln(x) + 0.3505	0.0014
#45	0.031	0.093	y = -0.2045Ln(x) + 0.3373	0.0029
#47	0.016	0.048	y = -0.1173Ln(x) + 0.2152	0.0026
#48	0.007	0.021	y = -0.1074Ln(x) + 0.2491	0.0015

4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

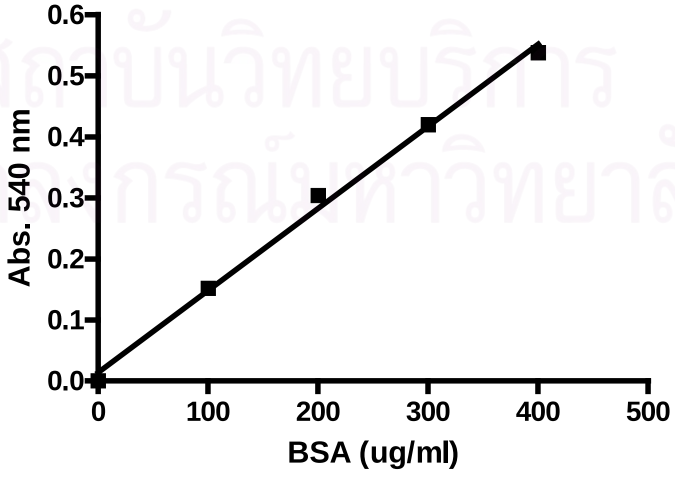
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 นั้นให้ค่า IC50 และค่า LOD ต่ำที่สุด จึงใช้เซลล์จากรหัสโคลน #44 นี้เพิ่มจำนวนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้แอนติบอดีในปริมาณมากสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงนำแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีนเอ ซึ่งแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพต่อโปรตีนเอที่ค่า pH 8 โดยที่โปรตีนและสารอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีนเอเหลือเพียงแอนติบอดีเท่านั้น แต่ที่ค่า pH ต่ำลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อโปรตีนเอจะลดลง ซึ่งที่ค่า pH 3 นั้นแอนติบอดีทั้งหมดจะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีนเอ จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ หลังจากนั้นจึงนำบัฟเฟอร์และแอนติบอดีที่ถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีนเอซึ่งอยู่ในหลอดทดลองมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm. ดังภาพที่ 4.7 ซึ่งพบว่าในหลอดทดลองที่ 6 ถึงหลอดที่ 10

นั้นมีแอนติบอดีที่บริสุทธิ์อยู่ในความเข้มข้นสูงจึงได้นำแอนติบอดีมารวมกันและนำไปทำ dialysis ด้วย PBS ทั้งหมด 5 ครั้ง แล้วนำแอนติบอดีที่ได้มาทำ BCA assay เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน ซึ่งก็คือความเข้มข้นของแอนติบอดีนั่นเอง



ภาพที่ 4.17 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

จากการหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA assay พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อัตราเจือจางของแอนติบอดีเป็น 1 ต่อ 4 เท่ากับ 241.43 µg/ml ซึ่งแอนติบอดีทั้งหมดปริมาตร 5 ml นั่นคือจากอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 300 ml พบว่าหลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีนเอแล้วได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์เท่ากับ 4,828.6 µg/ml ซึ่งจะได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป



ภาพที่ 4.18 กราฟใช้หาค่าความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA assay

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในงานวิจัยนี้ใช้หนูเพื่อทำการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมด 5 ตัว ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งแรกและครั้งที่ 2 นั้นใช้หนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-KLH ซึ่งไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน ส่วนการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 นั้นเปลี่ยนมาฉีดกระตุ้นหนูด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ซึ่งให้ไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมสูงกว่าหนูที่หลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 1 และ 2 แต่ก็ยังไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในหลอมรวมเซลล์ทั้ง 3 ครั้งที่ผ่านมานั้นมี 7 โคลนแต่ก็เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ในการคัดเลือกหนูที่จะทำการหลอมรวมเซลล์นั้นต้องตรวจสอบระดับพอลิโคลนอลแอนติบอดีในซีรัมที่สามารถจับกับสารในรูปอิสระซึ่งเป็นไปตามจุดประสงค์ของงานที่จะนำแอนติบอดีไปใช้ โดยในซีรัมของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ที่ใช้ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 นั้นเมื่อวัดไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติเจนในการคัดกรองเป็นเอนโรฟลอกซาซิน-BSA พบว่าให้ค่าไตเตอร์สูงและเมื่อนำซีรัมมาดูดซับด้วย BSA ก่อนทำ indirect ELISA ก็พบว่ายังให้ไตเตอร์ต่อเอนโรฟลอกซาซิน-BSA ในระดับสูงเช่นกัน ซึ่งจากตรงนี้ยังสรุปไม่ได้ว่าแอนติบอดีในซีรัมนั้นจับกับเอนโรฟลอกซาซินได้มากหรือน้อย ต้องนำซีรัมมาดูดซับด้วยเอนโรฟลอกซาซินโดยตรงจึงจะสรุปได้ว่าแอนติบอดีในซีรัมนั้นจับกับเอนโรฟลอกซาซินได้ และสำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีก็เช่นกัน เพราะในการนำแอนติบอดีไปใช้เป็นชุดตรวจหาสารเอนโรฟลอกซาซินนั้นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ ไม่ใช่เอนโรฟลอกซาซินในรูปที่เชื่อมติดอยู่กับสารโปรตีนใดๆ เนื่องจากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองนั้นต้องใช้เอนโรฟลอกซาซินในรูปที่เชื่อมติดกับสารโปรตีนเพื่อให้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองได้ ทำให้หลังการหลอมรวมเซลล์ได้แอนติบอดีทั้งที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน จำเพาะต่อสารโปรตีนและที่จำเพาะต่อ epitope ใหม่ที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อระหว่างเอนโรฟลอกซาซินและสารโปรตีน และในการวัดปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA นั้นก็ต้องใช้เอนโรฟลอกซาซินในรูปที่เชื่อมติดกับสารโปรตีน เพื่อให้สารโปรตีนนั้นเกาะติดกับพื้นหลุมได้ทำให้แม้ว่าแอนติบอดีนั้นจับกับเอนโรฟลอกซาซิน-BSA หรือเอนโรฟลอกซาซิน-KLH และไม่จับกับสารโปรตีนซึ่งก็คือ BSA

หรือ KLH แต่อาจจับกับจุดเชื่อมต่อระหว่างเอนโรฟลอกซาซินและสารโปรตีนหรือ epitope ใหม่อื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างเอนโรฟลอกซาซินและสารโปรตีน ทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นไม่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน ดังในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 นั้นทั้งหมด 10 โคลนที่จับกับเอนโรฟลอกซาซิน-BSA และไม่จับกับ BSA แต่สามารถจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้เพียงโคลนเดียว

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินมีเพียง 1 โคลนเท่านั้นคือเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมตั้งต้นรหัส 1/4D ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ซึ่งได้เพิ่มจำนวนและเก็บแช่แข็งโดยใช้รหัสโคลน 19-26 และ 43-47 โดยเซลล์ไฮบริโดมารหัส 1/4D นั้นในระหว่างทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวได้ถูกคัดแยกออกเป็น 4 กลุ่มจึงคัดเลือกรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 โดยพบว่าทั้ง #44, #45, #47 และ #48 มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG1 และเมื่อนำมาทดสอบหาค่า IC50 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.15, 0.19, 0.18 และ 0.18 ng/ml ตามลำดับ และปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่เลือกมาทดสอบต่อสารปฏิชีวนะต่างๆในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนนั้นมีค่าน้อยมาก โดยโอฟลอกซาซินนั้นมีปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01% ส่วนอีนอกซาซิน, ซินอกซาซิน, นอร์ฟลอกซาซิน, กรดไบเพมิดิก, ซิโพรฟลอกซาซิน, ฟลูเมควิน, กรดออกโซลินิก และกรดนาลิดิซิกนั้นมีค่า IC50 มากกว่า 10 µg/ml จึงมีปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.002% ส่วนปฏิกิริยาข้ามต่อสารปฏิชีวนะนอกกลุ่มควิโนโลนนั้นมีปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.002% เนื่องจากมีค่า IC50 มากกว่า 10 µg/ml

จากความจำเพาะอย่างสูงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 นั้น เมื่อพิจารณาในโครงสร้างของเอนโรฟลอกซาซินเทียบกับสารในกลุ่มควิโนโลนและกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ดังภาพที่ 2.2 พบว่าเอนโรฟลอกซาซินมีโครงสร้างใกล้เคียงกับซิโพรฟลอกซาซินมากที่สุดต่างกันเพียงเอนโรฟลอกซาซินมีหมู่เอทิลที่ติดอยู่กับวงไพเพอราซีน ส่วนซิโพรฟลอกซาซินนั้นไม่มี แต่พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับซิโพรฟลอกซาซินเลยและสารอื่นๆที่ทดสอบก็เช่นกัน ยกเว้นแต่โอฟลอกซาซินซึ่งมีปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยอาจเนื่องจากโอฟลอกซาซินนั้นมีหมู่เมทิลที่ติดอยู่กับวงไพเพอราซีนทำให้แอนติบอดีมาจับกับโอฟลอกซาซินได้เล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 นี้จำเพาะต่อหมู่เอทิลที่ติดอยู่กับวงไพเพอราซีนของเอนโรฟลอกซาซิน

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นรายงานเป็นค่า LOD ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44, #45, #47 และ #48 มีค่า LOD เท่ากับ 0.0014, 0.0029, 0.0026 และ 0.0015 ng/ml ตามลำดับ แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนนี้มีความไวต่อเอนโรฟลอกซาซินสูง สามารถตรวจสอบปริมาณเอนโรฟลอกซาซินได้ในระดับต่ำสุดถึง 0.0014 ng/ml มีรายงานการวิจัยของ watanabe และคณะ (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาเป็นชุดตรวจเอนโรฟลอกซาซินโดยวิธี ELISA ซึ่งให้ค่า detection limit ที่ระดับ 10 ng/g ในตัวอย่างตับและกล้ามเนื้อไก่และ 1 ng/g ในน้ำนมวัว ส่วน Bucknall และคณะ (2003) ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาเป็นชุดตรวจเอนโรฟลอกซาซินโดยวิธี ELISA ซึ่งให้ค่า detection limit ที่ระดับ 3.1 ng/ml เมื่อเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในงานวิจัยครั้งนี้นั้นพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความไว และความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินสูง แม้ว่าหลังจากนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี ELISA ที่ใช้ตรวจเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อเยื่อของสัตว์แล้วอาจจะทำให้ค่า LOD เพิ่มขึ้นบ้างแต่ก็ยังอยู่ในระดับใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีความไวและความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินสูงจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ ELISA ประเภท direct ELISA และ indirect competitive ELISA ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

Abul K. Abbas, J. S. P., and Andrew H. Lichtman. (1994). Cellular and Molecular Immunology. Pennsylvania, W.B. Saunders company.

Bertino, J., Jr. and D. Fish. (2000). "The safety profile of the fluoroquinolones." Clin Ther **22**(7): 798-817; discussion 797.

Bucknall, S., Silverlight, J., Coldham, N., Thorne, L., Jackman, R. (2003). "Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products." Food Addit Contam **20**(3): 221-8.

Duan, J. and Z. Yuan. (2001). "Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues." J Agric Food Chem **49**(3): 1087-9.

FDA (2000). "Enrofloxacin for poultry: opportunity for hearing. Federal Register." **65**: 64954-65.

Guardabassi, L., Schwarz, S., Lloyd, D. H. (2004). "Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria." J Antimicrob Chemother **54**(2): 321-32.

Hernandez-Arteseros, J. A.,Barbosa, J., Compano, R., Prat, M. D. (2002). "Analysis of quinolone residues in edible animal products." J Chromatogr A **945**(1-2): 1-24.

Holtzapple, C. K., Buckley, S. A., Stanker, L. H. (2001). "Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **754**(1): 1-9.

Kummerer, K. (2004). "Resistance in the environment." J Antimicrob Chemother **54**(2): 311-20.

Linnet, K. and M. Kondratovich. (2004). "Partly nonparametric approach for determining the limit of detection." Clin Chem **50**(4): 732-40.

Loomans, E. E., Van Wiltenburg, J., Koets, M., Van Amerongen, A. (2003). "Neamin as an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk." J Agric Food Chem **51**(3): 587-93.

Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P. G. (2000). "Monoclonal antibodies." Mol Pathol **53**(3): 111-7.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. (2004). "Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data." J Antimicrob Chemother **53**(1): 28-52.

Ruiz, J. (2003). "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." J Antimicrob Chemother **51**(5): 1109-17.

Snary, E. L., Kelly, L. A., Davison, H. C., Teale, C. J., Wooldridge, M. (2004). "Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective." J Antimicrob Chemother **53**(6): 906-17.

Stern, M. and R. Herrmann. (2005). "Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise." Crit Rev Oncol Hematol **54**(1): 11-29.

The europeon agency for the evaluation of medicinal products. (2002). Committee for veterinary madicinal products, Enrofloxacin, Summary report(5).

Trikha, M., Yan, L., Nakada, M. T. (2002). "Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology." Curr Opin Biotechnol **13**(6): 609-14.

Van Coillie, E., De Block, J., Reybroeck, W. (2004). "Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies." J Agric Food Chem **52**(16): 4975-8.

Watanabe, H., Satake, A., Matsumoto, M., Kido, Y., Tsuji, A., Ito, K., Maeda, M. (1998). "Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for monensin." Analyst **123**(12): 2573-8.

Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., Tsuji, A. (1999). "Production of monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay for kanamycin in biological matrices." Analyst **124**(11): 1611-5.

Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., Tsuji, A. (2002). "Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices." Analyst **127**(1): 98-103.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ ก.1 รหัสโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4	
รหัสโคลน	รหัสของหลุมที่ใช้การเลี้ยงเซลล์
1	5/4D/2C/4E/4A/3F/1H/4D
2	5/4D/2C/4E/4A/3F/1H/4H
3	5/4D/2C/4E/4A/4F/4E/6B
4	5/4D/2C/4E/4A/4F/4E/6B
5	5/4D/2H/10H/11F/10F/7F/8D
6	5/4D/2H/10H/11F/10F/7F/8B
7	5/4D/2H/10H/12G/11G/9G/9C
8	5/4D/2H/8G/1G/2B/1G/1E
9	5/4D/2H/8G/1G/2B/1G/1F
10	5/4D/4B/1F/4D/3B/1G/1C
11	5/4D/4B/1F/4D/3F/1H/2F
12	5/4D/4B/1F/4D/3F/1H/2G
13	5/4D/4B/1F/4D/3B/2H/3G
14	5/4D/4D/8F/10E/11B/10E/1G
15	5/4D/4D/4E/11E/7C/11E/2G
16	5/4D/4D/4E/11E/7C/11F/3C
17	5/4D/4D/4E/11E/7C/11F/3D
18	5/4D/4D/4E/11E/7C/11F/3E
19	1/4D/2F/8F/7E/3A
20	1/4D/2F/8F/8G/4H
21	1/4D/2F/10H/9G/7B
22	1/4D/2F/10H/9G/7F
23	1/4D/8G/8B/4C/11E
24	1/4D/8G/8B/4C/11H

ตารางที่ ก.1 รหัสโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 (ต่อ)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4	
รหัสโคลน	รหัสของหลุมที่ใช้การเลี้ยงเซลล์
25	1/4D/8G/8B/4E/12C
26	1/4D/8G/8B/4E/12F
27	5/3F/1D/6C/7E/6A
28	5/3F/1D/6C/7E/6D
29	5/3F/1D/6C/7E/6F
30	5/3F/1G/10B/10E/7B
31	5/3F/1G/10B/10E/7F
32	5/3F/1G/10B/10E/7G
33	5/3F/1G/10B/10H/8B
34	5/4D/4D/4E/11F/7C/11F/3F
35	5/4D/4B/7F/7E/7A/6B/7A
36	5/4D/4B/7F/7E/7A/6B/7B
37	5/4D/4B/1F/4D/3B/1G/1C /5B/1/8E
38	5/4D/4B/1F/4D/3B/1G/1C /5B/1/10C
39	5/4D/4B/1F/4D/3B/1G/1C /5B/1/11E
40	5/4D/4D/8F/10E/11B/10E/1G /8C/1B
41	5/4D/4D/8F/10E/11B/10E/1G /8H/8B
42	5/4D/4D/8F/10E/11B/10E/1G /8H/12A
43	1/4D/2F/8F/7E/3A /4G/3E
44	1/4D/2F/8F/7E/3A /4G/3F
45	1/4D/2F/10H/9G/7F /8G/6F
46	1/4D/2F/10H/9G/7F /11G/2G
47	1/4D/2F/10H/9G/7F /11G/5A
48	1/4D/2F/10H/9G/7F/2D/8D

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.1 รหัสโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 (ต่อ)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4	
รหัสโคลน	รหัสของหลุมที่ใช้การเลี้ยงเซลล์
49	5/3F/1D/6C/7E/6D /2D/10E
50	5/3F/1G/10B/10E/7G /11C/5D
51	5/3F/1G/10B/10E/7G /11C/5E
52	5/3F/1G/10B/10E/7G /11D/10G

ตารางที่ ก.2 รหัสโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5	
รหัสโคลน	รหัสของหลุมที่ใช้การเลี้ยงเซลล์
1	2/12A/4C/2G/10E
2	2/12A/4C/2G/10F
3	2/12A/9B/5D/12B
4	3/6E/2D/10F/3G
5	3/6E/2D/10F/4H
6	3/6E/7E/12E/5E/8B
7	3/6E/7E/12E/7C/11D
8	3/6E/7E/12E/7C/10E
9	3/6E/3F/11H/4D/3A
10	3/6E/3F/11H/3H/5G

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.2 หมายเลขเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 (ต่อ)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5	
รหัสโคลน	รหัสของหลุมที่ใช้การเลี้ยงเซลล์
11	4/2E/9D/9H/7C
12	4/2E/9D/9H/8H
13	4/2E/9B/7E/11E
14	5/6G/8A/8C/7B
15	5/6G/11F/9G/12F
16	5/6G/11F/9G/12B
17	5/6G/10H/12B/1D
18	5/6G/10H/12D/4C
19	5/12D/8H/2C/5C/2B
20	5/12D/8H/2C/8B/8B
21	5/12D/10C/7E/4C
22	5/12D/10C/8B/8C
23	5/12D/10C/9F/9B
24	5/6F/2C/4G/9E/1E
25	5/6F/2C/4G/9E/1G
26	5/6F/4E/5D/11D/11F
27	5/6F/4E/5D/11D/12F
28	1/3C/1D/1E/6D/3C
29	1/3C/1D/1E/6D/5H
30	1/3C/3E/3E/2G/8E
31	1/3C/3E/3E/2G/11F

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ปริมาณเอนโรฟลอกซาซิน(ng/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	0.115	0.137	0.102	0.137
2.5	0.181	0.177	0.129	0.169
0.625	0.443	0.416	0.235	0.275
0.156	0.677	0.719	0.430	0.449
0.039	0.865	0.949	0.599	0.678
0.0098	1.176	1.316	0.795	0.752
0.00243	1.377	1.576	0.898	0.896
0.00061	1.589	1.539	0.903	0.915
0.00015	1.586	1.614	0.921	0.967
0	1.591	1.630	0.931	0.970

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.4 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่ออีนอกซาซิน

ปริมาณอีนอกซาซิน (μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.208	1.404	0.676	0.935
1	1.141	1.564	0.963	0.989
0.1	0.986	1.521	0.881	0.967
0.01	1.256	1.434	0.821	0.962
0.001	1.183	0.995	0.881	0.683
0	1.321	1.458	0.790	0.802

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโน โคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อโอฟลอกซาซิน

ปริมาณโอฟลอกซาซิน(µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
20	0.252	0.295	0.109	0.157
10	0.332	0.406	0.249	0.219
5	0.507	0.804	0.332	0.259
2.5	0.755	0.976	0.486	0.378
1.25	1.079	1.246	0.625	0.571
0.625	1.321	1.378	0.865	0.764
0.313	1.430	1.489	1.114	0.988
0	1.469	1.499	1.157	1.018

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.6 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อซินอกซาซิน

ปริมาณซินอกซาซิน (µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.244	1.417	0.816	0.880
1	1.170	1.390	1.905	0.801
0.1	1.152	1.238	0.797	0.831
0.01	1.239	1.516	0.806	0.789
0.001	1.245	1.500	0.805	0.802
0	1.321	1.458	0.790	0.804

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.7 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อนอร์ฟลอกซาซิน

ปริมาณนอร์ฟลอกซาซิน(µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.282	1.551	0.705	1.226
1	1.157	1.648	0.752	0.854
0.1	1.233	1.617	0.781	0.841
0.01	1.159	1.583	0.217	0.826
0.001	1.374	1.380	0.681	0.747
0	1.225	1.502	0.757	0.814

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.8 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อกรดไบเพมิดิก

ปริมาณกรดไบเพมิดิก (µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	0.924	1.244	0.851	0.924
1	0.894	1.351	0.899	0.847
0.1	1.078	1.472	1.163	0.984
0.01	0.895	1.428	1.184	0.893
0.001	1.051	1.461	1.129	0.951
0	1.225	1.502	0.767	0.815

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.9 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อกรดออกโซลินิก

ปริมาณกรดออกโซลินิก (μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.244	1.417	0.816	0.880
1	1.170	1.390	1.905	0.801
0.1	1.152	1.238	0.797	0.831
0.01	1.239	1.516	0.806	0.789
0.001	1.245	1.500	0.805	0.802
0	1.321	1.458	0.790	0.804

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.10 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อกรดนาลิดิซิก

ปริมาณกรดนาลิดิซิก (μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	0.988	1.300	0.813	0.894
1	0.997	1.235	0.921	0.829
0.1	1.034	1.111	0.782	0.900
0.01	0.911	1.076	0.877	0.897
0.001	1.157	1.291	0.774	0.883
0	1.325	1.389	0.895	0.911

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.11 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อซิโพรฟลอกซาซิน

ปริมาณซิโพรฟลอกซาซิน (μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.349	1.318	0.998	0.915
1	1.294	1.1941	0.890	0.903
0.1	1.233	1.275	0.815	0.895
0.01	1.311	1.230	0.853	0.898
0.001	1.056	1.136	0.871	0.894
0	1.325	1.389	0.895	0.911

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.12 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อฟลูเมควิน

ปริมาณฟลูเมควิน (μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.005	1.207	0.909	0.903
1	1.012	1.333	0.901	0.900
0.1	1.025	1.323	0.891	0.925
0.01	1.144	1.082	0.883	0.941
0.001	1.279	1.066	0.870	0.876
0	1.325	1.389	0.895	0.911

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.13 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเททราไซคลิน

ปริมาณเททราไซคลิน(μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.324	1.243	1.024	1.073
5	1.352	1.222	0.929	0.988
2.5	1.443	1.228	1.045	0.899
1.25	1.344	1.182	1.183	0.918
0	1.429	1.224	0.979	0.933

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.14 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อสเตรพโตมัยซิน

ปริมาณเททราไซคลิน(μg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.227	1.124	0.981	1.022
5	1.291	1.229	0.945	0.929
2.5	1.328	1.003	0.997	0.987
1.25	1.241	1.162	0.983	0.921
0	1.429	1.224	0.979	0.933

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.15 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อซัลฟาเมทาซีน

ปริมาณซัลฟาเมทาซีน (µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.326	1.232	0.899	0.972
5	1.462	1.306	0.902	1.033
2.5	1.230	1.208	0.915	1.018
1.25	1.301	1.201	0.935	0.935
0	1.429	1.224	0.979	0.933

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.16 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อฟูราโซลิโดน

ปริมาณฟูราโซลิโดน (µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.100	0.927	0.980	0.911
5	1.345	0.790	0.850	0.814
2.5	1.033	0.888	0.859	0.827
1.25	1.100	0.893	0.812	0.831
0	1.167	0.900	0.826	0.841

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.17 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเพนิซิลลิน

ปริมาณเพนิซิลลิน (µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.009	1.111	0.891	0.815
5	1.023	1.051	0.787	0.934
2.5	1.081	0.999	0.782	0.927
1.25	1.119	0.913	0.725	0.818
0	1.167	0.900	0.826	0.841

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

ตารางที่ ก.18 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อคลอแรมเฟนิคอล

ปริมาณคลอแรมเฟนิคอล (µg/ml)	รหัสโคลน			
	#44	#45	#47	#48
10	1.336	1.119	0.855	0.811
5	1.084	1.091	0.900	0.874
2.5	1.229	0.875	0.912	0.815
1.25	1.209	0.879	0.836	0.839
0	1.167	0.900	0.826	0.841

หมายเหตุ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #44 และ #45 ใช้อัตราเจือจาง 1:320 เท่า
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน #47 และ #48 ใช้อัตราเจือจาง 1:640 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.19 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ปริมาณเอนโรฟลอกซาซิน(μg/ml)	รหัสโคลน							
	#38	#40	#44	#45	#47	#48	#49	#52
20	1.14	1.193	0.043	0.129	0.081	0.076	1.623	1.452
10	0.89	1.351	0.044	0.133	0.079	0.063	1.694	1.496
1	0.982	1.262	0.049	0.099	0.064	0.062	1.806	1.513
0.1	0.886	1.321	0.055	0.202	0.056	0.057	1.874	1.477
0.01	0.771	1.181	0.168	0.277	0.189	0.113	1.765	1.454
0	0.966	1.245	1.235	1.007	0.984	1.23	1.731	1.614

ตารางที่ ก.20 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ปริมาณเอนโรฟลอกซาซิ(μg/ml)	รหัสโคลน						
	#3	#4	#8	#10	#11	#13	#15
20	1.15	1.624	1.658	1.559	1.102	1.001	1.538
10	1.224	1.748	1.747	1.677	1.269	0.956	1.614
1	1.102	1.687	1.734	1.588	1.175	0.991	1.526
0.1	1.157	1.703	1.687	1.555	1.188	0.943	1.672
0.01	1.145	1.745	1.561	1.593	1.199	0.974	1.539
0	1.213	1.663	1.604	1.668	1.035	1.06	1.594

ตารางที่ ก.21 ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ปริมาณ เอนโรฟลอกซาซิ(µg/ml)	รหัสโคลน						
	#17	#19	#22	#25	#26	#29	#30
20	1.108	1.03	1.315	1.821	1.341	1.576	1.123
10	1.225	1.13	1.305	1.925	1.224	1.557	1.158
1	1.221	1.1	1.262	1.97	1.282	1.537	1.287
0.1	1.176	1.143	1.277	1.898	1.228	1.6	1.355
0.01	1.167	1.104	1.285	1.914	1.316	1.549	1.214
0	1.171	1.188	1.225	1.905	1.246	1.529	1.185

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ

1. HT (Hypoxanthine และ thymidine) stock 100 เท่า

hypoxanthine (MW 131.1)	136.1	mg
น้ำปลอดไอออน (deionized water)	50	ml

(ละลายที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส)

thymidine (MW. 242.2)	37.8	mg
ละลายในน้ำปลอดไอออน	50	mg

นำสารละลายทั้งสองชนิดมารวมกันแล้วกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่หลอด หลอดละ 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลล์เซียส

2. A (aminopterin) stock 100 เท่า

Aminopterin (MW. 440.4)	1.76	mg
น้ำปลอดไอออน	90	ml

กรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่หลอดที่หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลล์เซียส

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

RPMI	10.4	g/l
$NaHCO_3$	2	g/l

เติม Phenol red ปรับ pH 7.1-7.2 ด้วย 3 M HCl

สำหรับเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา และเซลล์ไมอีโลมา เติมอีก 3 ตัวคือ

L-glutamine	0.1	g/l
Sodium pyruvate	0.11	g/l
glucose	2.0	g/l

นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm

4. อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	100	ml
HT stock (100X)	1	ml
A stock (100X)	1	ml

ผสมให้เข้ากัน

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	100	ml
HT stock (100X)	1	ml

ผสมให้เข้ากัน

6. เตรียมสารละลาย PEG เข้มข้น 50%

นำสารละลาย PEG (MW 4000) มาผสมกับ RPMI-1640 ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:1

7. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแช่แข็ง

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	65	ml
fetal bovine serum	25	ml
dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	ml

ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 μm แบ่งใส่ขวด เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลล์เซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ indirect ELISA

1. PBS buffer pH 7.4 (phosphate buffer saline) .

1.1 Phosphate buffer 0.2 M (stock solution)

NaH_2SO_4	27.6 g (กรด)	ละลายน้ำกลั่น	1,000	ml
Na_2HPO_4	71.63 g(ด่าง)	ละลายนำกลั่น	1,000	ml

ไตเตรตด่างด้วยกรด (ใส่กรดลงในด่าง) จนได้ pH 7.4

1.2 PBS buffer pH 7.4 0.01 M

NaCl	175.2 g	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1,000	ml

1.3 นำสารละลาย stock solution ในข้อ 1.1 มา 1,000 mlผสมกับ NaCl ในข้อ 1.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 20 ลิตร (อาจเติม preservative คือ 0.01% thimorosal ปริมาตร 20 ml)

2. Blocking solution

ผสม skim milk power 5 mg เข้ากับ PBS 100 ml

3. Citrate phosphate buffer pH 5.0 (0.15 M)

Na_2HPO_4	21.29 g	ละลายน้ำกลั่น	1,000	ml
Citric acid	7 g	ละลายนำกลั่น	1,000	ml

นำสารละลายข้างต้นมาไตเตรตให้ได้ pH 5 นำเก็บในขวดสีน้ำตาล ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. H_2SO_4 2.5 M (stopping reagent)

ใช้ conc. H_2SO_4 (18 M) 69.5 ml ละลายน้ำกลั่น 430.5 ml

5. สารละลายซับสเตรต O-ฟีนิลีนไดเอมีน (OPD)

ละลาย OPD 6 mg ใน citrate phosphate buffer pH 5.0 ปริมาณ 15 ml แล้วเติม 30% H_2O_2 6 μl

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายมนัสพงศ์ ชูศรี เกิดเมื่อวันที่ 7 สิงหาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย