

การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโปไวน์เคซีน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES  
AGAINST BOVINE CASEIN

Miss Kanokporn Patipatsinlapakij



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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี ต่อโบไวรัสเคซีน
โดย	นางสาวกนกภรณ์ ปฏิพัทธ์ศิลปกิจ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

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

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

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

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

กนกภรณ์ ปฏิพัทธ์ศิลปกิจ : การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ  
โบรินเคซีน (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL  
ANTIBODIES AGAINST BOVINE CASEIN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.กิตตินันท์  
โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, 117 หน้า.

นมวัวเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญสำหรับมนุษย์อย่างมาก แต่พบว่านมก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยว  
การแพ้ได้ในเด็ก โดยเฉพาะในบางรายอาจเกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงที่ส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตได้ใน  
เวลาไม่นาน โปรตีนหลักที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ คือ เคซีน (ประมาณ 80% ของโปรตีนทั้งหมด) ซึ่ง  
ประกอบไปด้วยชนิดแอลฟา<sub>1</sub> เคซีน บีตา เคซีน และ แคปปา เคซีน ในอัตราส่วน 50%, 40% และ  
10% ตามลำดับ แม้จะมีการพัฒนาการตรวจสอบเคซีนด้วยวิธีทางเคมีหลายวิธี แต่พบว่าวิธีเหล่านี้  
ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพงและไม่เหมาะสำหรับการตรวจนอกห้องปฏิบัติการ ในทางตรงกันข้ามมี  
วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปแบบของแถบทดสอบที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก  
เนื่องจากความเรียบง่าย ราคาถูก และพร้อมใช้งานนอกห้องปฏิบัติการ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมี  
วัตถุประสงค์เพื่อผลิตและคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่เหมาะสำหรับใช้ตรวจสอบโบริน  
เคซีน โดยได้หลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c จำนวน 6 ตัว ที่ถูก  
กระตุ้นด้วยเคซีนชนิดผสมกับเซลล์ไลน์มัยอีโลมา P3X ได้จำนวนมอนอโคลนทั้งหมดหลังจากการ  
หลอมรวมเซลล์จำนวน 60 มอนอโคลน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามความจำเพาะต่อชนิดของเคซีนได้  
เป็น 7 กลุ่ม ในกลุ่มมอโนโคลนเหล่านี้ ได้ทำการคัดเลือกออกมา 8 โคลน ได้แก่ CN1F4 CN3F4  
CN5F4 CN10F4 CN11F4 CN12F4 CN16F4 และ CN20F4 เพื่อทำการศึกษาต่อ เนื่องจาก  
แอนติบอดีของโคลนเหล่านี้จะจับกับเคซีนชนิดผสมและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ที่นำมา  
ทดสอบ MAb จากโคลนที่คัดเลือกมานี้ได้มีการผลิตและทำให้บริสุทธิ์บางส่วน หลังจากนั้นความไว  
ของ MAb ได้มีการทดสอบด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์และรายงานเป็นค่าความ  
เข้มข้นที่ให้ประสิทธิภาพ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC50) และค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) โดยพบว่า  
EC50 และ LOD มีค่าอยู่ในช่วง 0.09-0.86 µg/ml และ 6.13-21.52 ng/ml ตามลำดับ โดย MAb ที่  
ได้ทั้งหมดมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นแถบทดสอบเนื่องจากให้ค่าความไวที่สูง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5571903223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: MONOCLONAL ANTIBODY / BOVINE CASEIN

KANOKPORN PATIPATSINLAPAKIJ: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BOVINE CASEIN. ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 117 pp.

Bovine milk is an important source of proteins for human. But it can cause allergic reaction in some children. In the severe cases, it can lead to death rapidly. The milk major protein that causes allergy is casein (80% of the total milk protein) which composes of  $\alpha_s$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -forms at 50%, 40% and 10%, respectively. Many chemical based methods have been developed to detect casein. However, these methods require expensive instruments and are not suitable for an on-site detection. On the contrary, immunological-based method, specifically a strip test, is more of interest due to its simplicity, inexpensive and ready to use for on-site application. Therefore, the objective of this research is to produce and screen for monoclonal antibodies suitable for casein detection. Conventional somatic cell fusions of splenocytes of six BALB/c mice immunized with mixed form of casein and P3X myeloma cell line were performed. In total, 60 monoclones which were divided into 7 groups based on their cross-reactivities to different forms of casein were obtained. Among these monoclones, 8 clones (CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 and CN20F4) were selected for further studies because their monoclonal antibodies (MAb) reacted with the mixed form of casein and did not cross-react with other tested substances. MAb were produced and partially purified. Then, sensitivity of each MAb was analyzed by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay and reported as 50% effective concentration (EC50) and limit of detection (LOD). The values of EC50 and LOD were found to be in the ranges of 0.09-0.86  $\mu\text{g/ml}$  and 6.1-21.5  $\text{ng/ml}$ , respectively. All MAbs obtained could also be used for further development of test kit because of their high sensitivity.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ช่วยร่วมแก้ไข ปัญหา ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง ให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์ ประธานกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง กรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) ที่ให้ความเห็นแนะนำและ แนวทางในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ ภูทอง ที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ในการทำวิจัย ให้สำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบคุณ อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร คุณอนุมาศ บัวเขียว และคุณอุมาพร พิมพ์ทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุ- ศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับเครื่องมือในงานวิจัย รวมทั้งดำเนินการด้านเอกสาร ต่างๆ ให้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ และ สนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดีมาตลอด

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ .....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์ย่อ .....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย .....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	5
2.1.1 ส่วนประกอบของน้ำนมวัว.....	5
2.1.2 การผลิตและการบริโภคน้ำนมในประเทศไทย .....	6
2.1.3 เคซีนในน้ำนมวัว (Bovine casein) .....	6
2.1.4 โครงสร้างเคซีน (Casein) .....	7
2.1.5 ผลจากการแพ้เคซีนในน้ำนม.....	9
2.1.6 วิธีตรวจวิเคราะห์เคซีน .....	10
2.1.6.1 อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis).....	10
2.1.6.2 Reverse phase high performance liquid chromatography (RP- HPLC) .....	10

2.1.6.3 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method) .....	11
2.1.7 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	12
2.1.7.1 แอนติเจน (Antigen, Ag).....	12
2.1.7.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab) .....	14
2.1.7.3 ไอโซไทป์ของแอนติบอดี.....	15
2.1.8 มอนอโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody, MAb) .....	20
2.1.9 โพลีโคลนอลแอนติบอดี .....	21
2.1.10 การผลิต MAb ด้วย hybridoma technology .....	22
2.1.11 หลักการ Enzyme linked-immunosorbent assay .....	30
2.1.11.1 รูปแบบของ ELISA.....	31
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	35
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย .....	38
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	38
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในงานวิจัย.....	38
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	40
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	42
3.4.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของโปวไน์เคซิน ....	42
3.4.2 เตรียมซีรัม (serum).....	42
3.4.3 ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี indirect ELISA.....	42
3.4.4 เตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโปวไน์เคซิน .	43
3.4.4.1 เตรียมเซลล์มัยอีโลมา (myeloma).....	43
3.4.4.2 การเตรียมสารตัวกลางสำหรับหลอมรวมเซลล์ .....	43
3.4.4.3 เตรียมเซลล์ม้าม .....	43



3.4.4.4	เตรียมเซลล์ไฮบริโดมา.....	44
3.4.5	การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อโวกไวน์เคซิน .	45
3.4.6	การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution .....	45
3.4.6.1	การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว .....	45
3.4.6.2	การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงใหม่.....	46
3.4.7	ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	46
3.4.7.1	ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	46
3.4.7.2	การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี.....	46
3.4.7.2.1	ตรวจสอบตัวบล็อกที่เหมาะสมสำหรับหาความไวและความจำเพาะของแอนติบอดี .....	46
3.4.7.2.2	การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี .....	47
3.4.7.3	การวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพีโทปของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA.....	47
3.4.7.4	ทดสอบสัมพรรคภาพ (affinity) ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	49
3.4.7.5	ทดสอบความไว (sensitivity) และปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	49
3.4.8	การทำบริสุทธิ์มอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	50
3.4.8.1	การเพิ่มจำนวนมอนอโคลนอลแอนติบอดีปริมาณมาก .....	50
3.4.8.2	การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจี (Protein G).....	50
3.4.8.3	การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA).....	51
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	52
4.1	การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อโวกไวน์เคซิน .....	52
4.2	การหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์มัยอีโลมา.....	55
4.3	การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโวกไวน์เคซิน.....	56

4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	60
4.4.1 ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	60
4.4.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี .....	61
4.4.3 การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีต่ออีพีโทปด้วยเทคนิค indirect ELISA .....	69
4.4.4 การทำบริสุทธ์์มอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	75
4.4.4.1 การทำบริสุทธ์์แอนติบอดีด้วยโปรตีนจี .....	75
4.4.4.2 การหาปริมาณโปรตีนหลังจากการทำให้บริสุทธ์์ .....	76
4.4.4.3 ทดสอบสัมพรรคภาพของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (affinity) หลังการทำให้บริสุทธ์์ .....	77
4.4.5 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	80
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	87
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	87
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	88
รายการอ้างอิง .....	90
ภาคผนวก .....	98
ภาคผนวก ก .....	99
ภาคผนวก ข .....	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	117

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย .....	38
ตารางที่ 3.2 สารเคมีสำหรับวิจัย .....	40
ตารางที่ 3.3 การผสม MAb ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์อิมูโนโอบด้วยเทคนิค indirect ELISA .....	48
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนูตัวที่ 2 และสาร ป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะที่เหมาะสม .....	53
ตารางที่ 4.2 ระดับการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนก่อนการหลอมรวมเซลล์ .....	55
ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพการหลอมรวมเซลล์หนูที่กระตุ้นด้วยโบไวน์เคซีน .....	56
ตารางที่ 4.4 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 .....	57
ตารางที่ 4.5 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 .....	57
ตารางที่ 4.6 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 .....	58
ตารางที่ 4.7 สรุปลักษณะของ MAb ของแต่ละมอนอโคลน .....	61
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมสำหรับ indirect ELISA .....	63
ตารางที่ 4.9 สรุปผลกลุ่มของมอนอโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะต่อสารอื่นๆ .....	69
ตารางที่ 4.10 ระดับการเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความจำเพาะของ แอนติบอดีต่ออิมูโนโอบด้วยเทคนิค indirect ELISA .....	70
ตารางที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ความจำเพาะของอิมูโนโอบที่จับด้วย MAb ต่อ โบไวน์เคซีน .....	71
ตารางที่ 4.12 ค่า Additive index (AI) จากการวิเคราะห์ความจำเพาะของอิมูโนโอบที่จับด้วย MAb ต่อโบไวน์เคซีน .....	74
ตารางที่ 4.13 ปริมาณโปรตีนจากวิธี BCA หลังทำบริสุทธิ์มอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	76
ตารางที่ 4.14 ช่วงความเข้มข้นของแต่ละมอนอโคลนอลแอนติบอดีจากการทดสอบค่าการ เจือจาง .....	79

ตารางที่ 4.15 ผลความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	81
ตารางที่ 4.16 ค่า EC50 และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแต่ละ ไอโซไทป์ของโปรไวรัลเคซีนด้วยเทคนิค indirect ELISA .....	86



## สารบัญญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 โมเดลโครงสร้างเคซีน .....	8
รูปที่ 2.2 รูปแบบการจับกันเป็นคู่ (Dual bonding model) ของเคซีนไมเซลล์ .....	9
รูปที่ 2.3 โครงสร้างต้นแบบของอิมมูโนโกลบูลิน G; IgG .....	15
รูปที่ 2.4 อิมมูโนโกลบูลิน จี .....	16
รูปที่ 2.5 โครงสร้างอิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม a) แบบเพนตาเมอร์ b) แบบโมนอเมอร์ .....	17
รูปที่ 2.6 อิมมูโนโกลบูลิน เอ .....	18
รูปที่ 2.7 อิมมูโนโกลบูลิน ดี .....	19
รูปที่ 2.8 อิมมูโนโกลบูลิน อี .....	20
รูปที่ 2.9 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดี .....	22
รูปที่ 2.10 การหลอมรวมของเซลล์ ด้วย Polyethylene glycol .....	24
รูปที่ 2.11 ขั้นตอนการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี .....	25
รูปที่ 2.12 กลไกอาหาร HAT medium a) กลไกการสร้างนิวคลีโอไทด์ และการบล็อกกลไก De novo ด้วย aminopterin b) HAT medium ที่มีการเติม aminopterin และ hypoxanthine .....	27
รูปที่ 2.13 เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	30
รูปที่ 2.14 Indirect ELISA.....	32
รูปที่ 2.15 Sandwich ELISA.....	33
รูปที่ 2.16 Competitive ELISA a) ตัวอย่างมีแอนติเจน b) ตัวควบคุมลบ .....	34
รูปที่ 4.1 ระดับการสร้างแอนติบอดีจากซีรัมของหนูตัวที่ 4-6 กระตุ้นด้วยโปไวน์เคซีน (C8654) บล็อกด้วย 5% (w/v) หางนม ด้วยเทคนิค indirect ELISA เป็นเวลา 15 นาที.....	54
รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ความจำเพาะของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (ไม่เจือจาง) ต่อสารต่างๆ.....	67

รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมจากการทำมอนอโคลนอลแอนติบอดี CN12F4 ให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจีคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที .....	76
รูปที่ 4.4 ทดสอบค่าการเจือจางมอนอโคลนอลแอนติบอดีสำหรับ indirect ELISA ที่เคลือบหลุม...	78
รูปที่ 4.5 ผลสัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อแอนติเจน .....	80
รูปที่ 4.6 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN1F4 โดยเทคนิค indirect ELISA..	82
รูปที่ 4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN3F4 โดยเทคนิค indirect ELISA..	82
รูปที่ 4.8 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN5F4 โดยเทคนิค indirect ELISA..	83
รูปที่ 4.9 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN10F4 โดยเทคนิค indirect ELISA.....	83
รูปที่ 4.10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN11F4 โดยเทคนิค indirect ELISA.....	84
รูปที่ 4.11 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN12F4 โดยเทคนิค indirect ELISA.....	84
รูปที่ 4.12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN16F4 โดยเทคนิค indirect ELISA.....	85
รูปที่ 4.13 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN20F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4 .....	85

## คำอธิบายสัญลักษณ์ย่อ

Ab	Antibody
$\alpha$ -CN	Alpha casein
$\alpha$ -La	Alpha lactalbumin
$\beta$ -Lg	Beta lactoglobulin
$\beta$ -CN	Beta casein
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
CN	Casein
CR	Cross reactivity
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Da	Dalton
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EC50	50% of effective concentration
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin

$\kappa$ -CN	Kappa casein
LOD	Limit of detection
M	Molar
MAb	Monoclonal antibody
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline ที่มี 0.05% tween
PEG	Polyethylene glycol
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume





# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นมเป็นของเหลวที่มีส่วนประกอบภายในอยู่มากมาย โดยจะประกอบด้วย น้ำ โปรตีน แลคโตส ไขมัน และสารอนินทรีย์ ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้จะมีส่วนสำคัญมากทางอาหารและมีมูลค่าในด้านวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำน้ำนมมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารหลายๆ ประเภท ทั้งของคาวและของหวาน ดังนั้นนมจึงเป็นอาหารที่มีความจำเป็นแก่มนุษย์ แต่ในบางรายนั้นกลับพบว่านมทำให้เกิดอาการแพ้ได้ เนื่องมาจากเกิดการแพ้โปรตีนบางชนิดที่อยู่ในนม โปรตีนในน้ำนมที่ทำให้เกิดการแพ้นั้น ได้แก่ อัลฟา แลคตัลบูมิน (alpha-lactalbumin;  $\alpha$ -La) บีตา แล็กโทโกลบูลิน (beta-lactoglobulin;  $\beta$ -Lg) และเคซีน (casein; CN) [1, 2] ซึ่งโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ในนมจะสามารถคงอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารได้นาน จึงทำให้เกิดภูมิแพ้ได้ หลังจากที่ได้รับประทานนมไป [3] เคซีน เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีปริมาณมากร้อยละ 80 ของโปรตีนในน้ำนม จึงโปรตีนหลักที่ก่อให้เกิดการแพ้ที่พบอยู่ในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมีลักษณะเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่นรส และมีความคงตัวระหว่างให้ความร้อน โดยปกติเคซีนจะอยู่ในรูปของไมเซลล์ซึ่งกระจายเป็นแบบคอลลอยด์ในน้ำนม เคซีนไมเซลล์มีลักษณะเป็นประจุลบ ภายในประกอบด้วย แคลเซียมฟอสเฟต และโปรตีนอื่นๆ อีกเล็กน้อย เคซีนไมเซลล์ประกอบด้วยเคซีน 4 ไอโซไทป์ คือ แอลฟา<sub>s1</sub> เคซีน, แอลฟา<sub>s2</sub> เคซีน, บีตา เคซีน และแคปปา เคซีน [4] ซึ่งพบผู้ที่มีอาการแพ้เคซีนอยู่เป็นจำนวนมากไม่น้อย โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กทารก อาการแพ้ที่พบจะมีอาการที่แตกต่างกันออกไปตามแต่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคล อาการที่พบ เช่น เกิดอาการบวมของลิ้น ปาก ใบหน้า ผื่นคัน น้ำมูกไหล ไอ ระคายเคืองที่ตา เป็นต้น แต่ในบางรายที่พบอาการหนัก เช่น แน่นหน้าอก หายใจไม่ออก และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ [5] และยังพบอีกด้วยว่าภูมิแพ้ที่เกิดขึ้นนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นนี้ ผู้ที่แพ้นมที่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ จึงต้องระมัดระวังไม่ให้ทานอาหารที่นำมารับประทานมีส่วนผสมของนม จึงมีแนวคิดที่จะทำการพัฒนาชุดตรวจอย่างง่ายสำหรับตรวจวัดหาเคซีน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการตรวจวัดเคซีนด้วยวิธีทางเคมีในอาหารก่อนจะนำอาหารเหล่านั้นมาบริโภคโดยใช้เครื่องมือ เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) ทั้งยังเอาเทคนิค cation exchange high performance

chromatography มาใช้ในการหาเคซีนใน halloumi cheese ซึ่งวิธีการนี้จะต้องมีการสกัดเอา casein extract ออกจาก halloumi cheese ก่อนนำเอามาวิเคราะห์ [6] นอกจากนี้แล้วยังนำเอานม และโยเกิร์ตที่ไม่มีไขมัน มาทำการแยกเคซีนออกและวิเคราะห์หาปริมาณเคซีนด้วย hydrophobic interaction chromatography (HIC) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน [7] ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 Miralles, B. และคณะ ได้นำตัวอย่างที่มีเคซีนมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ tryptic ทำการเก็บตัวอย่างจากการทำ reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) ทำอยู่ในรูปผงด้วยการ freeze-drying และนำตัวอย่างที่คาดว่ามิเคซีนมาทำการละลายในน้ำที่มีเมทานอล แล้วจึงนำเข้าสู่เครื่อง mass spectroscopy (MS) เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป [8] ซึ่งเมื่อพิจารณาวิธีทางเคมีทั้งหมดนั้น จะต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการซื้ออุปกรณ์มาทำการตรวจหาเคซีน จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลองซึ่งมีความยุ่งยากมาก และจำเป็นต้องใช้เวลานานในการที่จะตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างหลายๆ ตัว นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์ต่างๆ เช่น gel electrophoresis [9] surface plasmon resonance (SPR) [10, 11] ที่ถูกนำมาใช้วิเคราะห์เคซีน แต่ก็มีข้อจำกัดเช่นเดียวกับวิธีทางเคมีข้างต้น จึงทำให้มีการคิดค้นวิธีการใหม่ขึ้นโดยจะใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาใช้ในการตรวจหาเคซีน [12] ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้มีข้อดีค่อนข้างมาก กล่าวคือ ทำให้สามารถตรวจสอบตัวอย่างปริมาณมากในเวลาสั้นกว่า ประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อเครื่องมือราคาแพงมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถนำไปพัฒนาต่อสำหรับการปฏิบัตินอกห้องปฏิบัติการได้ เช่นทำเป็น casein kit ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อผู้บริโภค เนื่องจากจะช่วยลดปริมาณและความเสี่ยงของผู้ที่เกิดอาการแพ้ให้น้อยลง โดยเฉพาะผู้ที่มีอาการแพ้อย่างรุนแรง เพราะผู้ที่เสียชีวิตส่วนมากนี้เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีโปรตีนเคซีน และแพทย์รักษาไม่ทันการณ์ ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ได้แก่ การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโบรินปีตาเคซีน โดยทำการเตรียมเคซีนด้วยวิธีของ Fox, P. F. และ Guiney, J. (1972) [13] และทำให้เคซีนบริสุทธิ์ด้วย chromatography DEAE Sephacel และ SDS-PAGE แล้วนำเคซีนที่มีความบริสุทธิ์มาทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโบรินปีตาเคซีน ด้วยวิธีของ Köhler และ Milstein (1975) [14] เมื่อได้แอนติบอดีแล้วจึงนำแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย affi-Gel Protein A แล้วนำวิเคราะห์หาไอโซไทป์ของแอนติบอดีด้วย rabbit anti-mouse IgG<sub>a</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> และ goat anti mouse IgA และ IgM และศึกษาการจับกันของ  $\beta$ -casein และ  $\beta$ -casein fragment ต่อแอนติบอดี ด้วยวิธี competitive radioimmunoassay [15] ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Oudshoorn

และคณะ ทำการผลิตและการศึกษาลักษณะของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อปีตา เคซีน โดยทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และเทคนิค immune-blotting analysis เพื่อยืนยันผลจากเทคนิค ELISA ในการตรวจสอบบริเวณของแอนติเจนที่ใช้จับด้วยแอนติบอดี โดยในการศึกษานี้จะทำการย่อยเคซีนออกเป็นส่วนๆ ซึ่งจะพบว่าจับกับบริเวณของแอนติบอดีได้ในช่วง f106-192 อีกทั้งยังทำการศึกษาหาไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่ได้ [12] นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1995 Anguita, G. และคณะ ได้นำเอาเทคนิค indirect ELISA มาใช้ในการวิเคราะห์หามอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโโบไวน์ปีตาเคซีน [16] วิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยานี้จำเป็นต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะและไวต่อเคซีน ดังนั้นหากมีการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของโโบไวน์เคซีนได้สำเร็จก็จะนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจสอบเคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต ทำให้ง่ายต่อการบริโภคและการวินิจฉัยของแพทย์ในการรักษา เพื่อลดอัตราการเสียชีวิตในประเทศไทยจากการรับประทานนมที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ได้

## 1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโโบไวน์เคซีน
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโโบไวน์เคซีน

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ค้นคว้า ศึกษาและรวบรวมข้อมูลสำหรับการทำวิจัย
2. กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง
3. เตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดี
4. ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี
5. วิจัย และสรุปผล
6. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้มือนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปไวรัสเคซินและมีลักษณะสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

##### 2.1.1 ส่วนประกอบของน้ำนมวัว

น้ำนม (milk) เป็นอาหารเหลวที่ถูกหลั่งจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมีย เพื่อเป็นสารอาหารสำหรับลูก น้ำนมวัวมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ประเภทหนึ่งที่ไม่สามารถละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันได้ ที่เรียกว่า อิมัลชัน (emulsion) ชนิดน้ำมันในน้ำ ถูกนำมาบริโภคมาก เนื่องจากมีคุณประโยชน์มากมาย ได้แก่ ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของกระดูกและป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) ช่วยพัฒนาและรักษาสุขภาพของฟัน โดยช่วยในการป้องกันการสูญเสียแคลเซียมและฟอสเฟตเมื่อฟันมีการสัมผัสกับกรด โดยนมจะสร้างเป็นฟิล์มบางๆ เคลือบที่ฟัน ช่วยลดความดันโลหิตสูงทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเบาหวานรูปแบบที่ 2 (type 2 diabetes) เมื่อบริโภคผลิตภัณฑ์นมไขมันต่ำ ช่วยป้องกันความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) และโรคมะเร็งเต้านม (breast cancer) ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นและปริมาณน้ำในร่างกาย (hydration) [17] น้ำนมมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักประมาณร้อยละ 87 ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางให้ส่วนประกอบอื่นๆ กระจายตัวอยู่ได้ และยังทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายน้ำตาล วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ไขมันในน้ำนม พบประมาณร้อยละ 3.5 ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิพิด และคอเรสเตอรอล วิตามิน เป็นวิตามินที่สามารถละลายได้ในไขมัน ได้แก่ วิตามิน A, D, E, K และ แร่ธาตุคือ แคลเซียมและฟอสฟอรัส จะพบอยู่ร้อยละ 0.7 นอกจากนี้ในน้ำนมยังประกอบไปด้วย ของแข็งที่ไม่รวมไขมันในน้ำนม (nonfat solids) ได้แก่ น้ำตาลในนม ร้อยละ 5 และโปรตีน ร้อยละ 3.5 ในส่วนของน้ำตาลในนม (milk sugar) เป็นน้ำตาลแล็กโทส (lactose) พบประมาณ 2.4-6.1% เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ของน้ำตาลกลูโคส (glucose) กับน้ำตาลกาแล็กโทส (galactose) ต่อกันด้วยพันธะพีตา 1-4 ไกลโคซิดิก (glycosidic bond) และส่วนของโปรตีนจะถูกแยกออกจากกันโดยการตกตะกอนส่วนที่ละลายที่ถูกแยกออกจากตะกอนจะเรียกว่า เวย์ (whey) และส่วนที่เป็นตะกอนจะเรียกว่า เคซีน (casein; CN) [18, 19] จะพบว่านมถูกนำมาทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เช่น โยเกิร์ต

ครีม ไอศกรีม ชีส ของหวาน เวย์โปรตีน Whey Protein Concentrate (WPC) และ ผลิตภัณฑ์นมผง [20]

### 2.1.2 การผลิตและการบริโภคน้ำนมในประเทศไทย

การสร้างฟาร์มนมในประเทศไทยเริ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2499 จะถูกเก็บโดยสหกรณ์โคนม (73.7%) และภาคเอกชนที่เป็นบริษัทเก็บรวบรวมนม (26.3%) [21] พบการบริโภคนมในประเทศไทย มีอัตราการเพิ่มขึ้นประมาณ 20% ในแต่ละปี [22] แต่การผลิตและการบริโภคนมในช่วงปี ค.ศ. 1999-2004 ยังมีอัตราการบริโภคต่อปีของการดื่มนมของประเทศไทยก็ยังน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ การบริโภคของประชาชนของประเทศสิงคโปร์ และประชาชนของประเทศมาเลเซีย ประเทศไทยมีผู้ผลิต นมแล้วส่งออกผลิตภัณฑ์นมให้กับประเทศเพื่อนบ้านในกลุ่มอาเซียน (ASEAN) เช่น นมพร้อมดื่ม สเตอริไลซ์ (sterilised drinking milk) นมข้นหวาน (condensed sweetened milk) ไอศกรีม และ นมผงสำหรับเด็กทารก (infant milk powder) นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีการนำเข้าของผลิตภัณฑ์ นมผงพร่องมันเนย (skimmed milk powder) จากประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ [23]

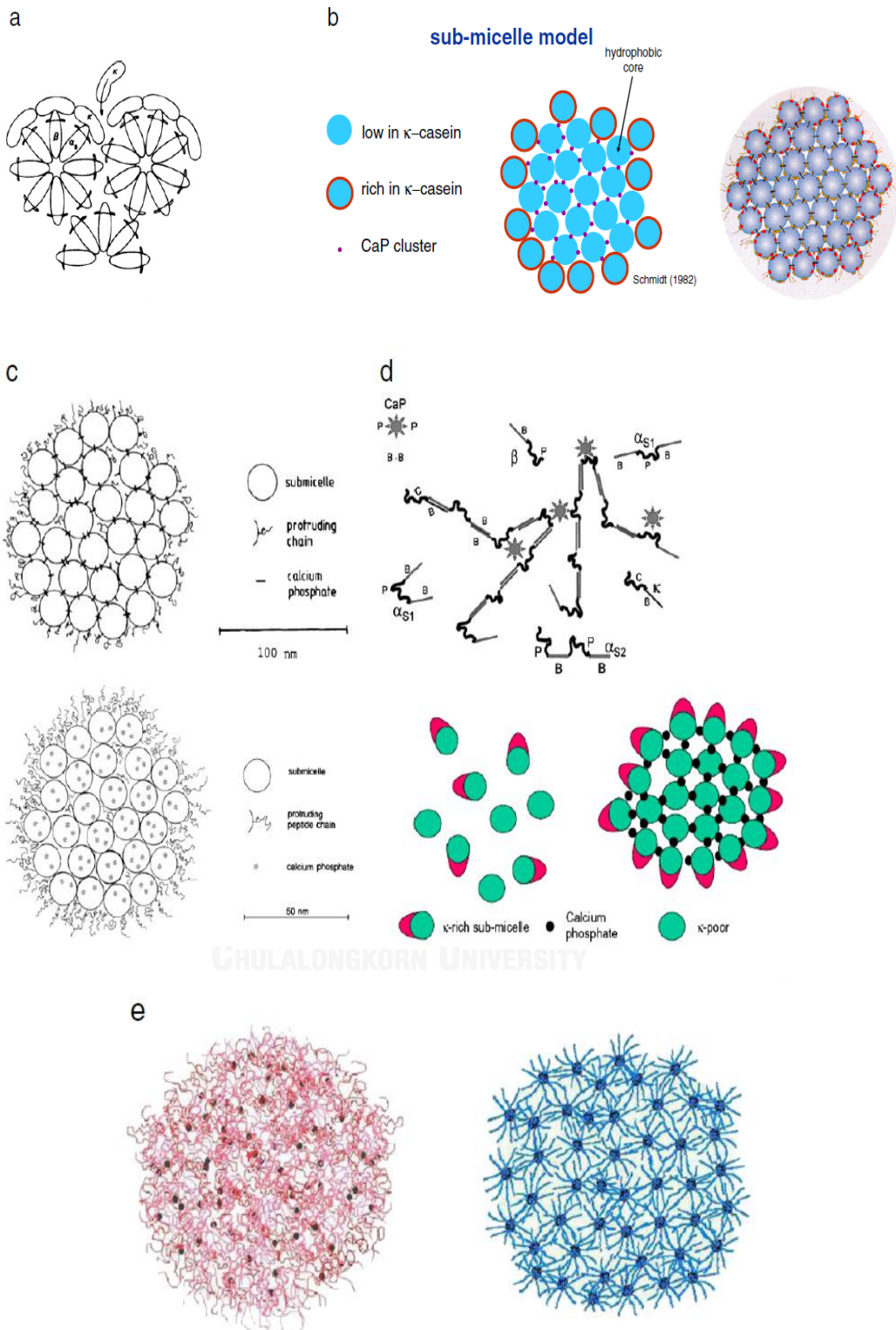
### 2.1.3 เคซีนในน้ำนมวัว (Bovine casein)

นมมีอนุภาคเป็นคอลลอยด์ (colloid) ประกอบด้วยโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กันอย่างซับซ้อน กับแคลเซียมฟอสเฟต คอลลอยด์ที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันเหล่านี้ ถูกเรียกว่าเคซีนไมเซลล์ (casein micelles) [4] ส่วนประกอบของเคซีนจะมีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ที่อุณหภูมิประมาณ 62 ถึง 71 องศาเซลเซียส [24] พบประมาณ 80% ของโปรตีน ทั้งหมดในน้ำนม และมีกรดอะมิโนครบถ้วนที่จำเป็นต่อร่างกาย โปรตีนเคซีนในนมสามารถแยกออก จากน้ำนม โดยการตกตะกอนด้วยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมให้เท่ากับ 4.6-4.7 ซึ่งเป็น Isoelectric point ของโปรตีนเคซีน หรือ ตกตะกอนด้วยเรนนิ (rennin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิด โปรติเอส (protease) สามารถย่อยเคซีนให้มีโมเลกุลเล็กลง ในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้เคซีนในการ ผลิตเนยแข็ง โดยเรนนิจะย่อยเคซีน แล้วรวมกับแคลเซียมไอออน แยกตัวออกมาเป็นตะกอนขาวขุ่น [18]

#### 2.1.4 โครงสร้างเคซีน (Casein)

เคซีน เป็นโมเลกุลของฟอสโฟโปรตีน เป็นคอลลอยด์ในรูปแบบไมเซลล์ มีการรวมตัวกันของ ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ที่ช่วยในการคงตัวของโครงสร้างเคซีน มีโครงสร้างขนาดใหญ่ที่สุดในน้ำนม ขนาด 50–500 นาโนเมตร [25] มีโปรตีนของเคซีน 4 ชนิด ได้แก่ แอลฟา<sub>s1</sub> เคซีน (alpha s<sub>1</sub>-casein;  $\alpha_{s1}$ -CN) แอลฟา<sub>s2</sub> เคซีน (alpha s<sub>2</sub>-caseins;  $\alpha_{s2}$ -CN) บีตา เคซีน (beta-caseins;  $\beta$ -CN) และ แคปปา เคซีน (kappa-caseins;  $\kappa$ -CN) ถูกรวมอยู่ในน้ำนม พบประมาณ 76-86% ของโปรตีน ในนม [13] ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 190-224 ลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 19-25 กิโล ดาลตัน [24]

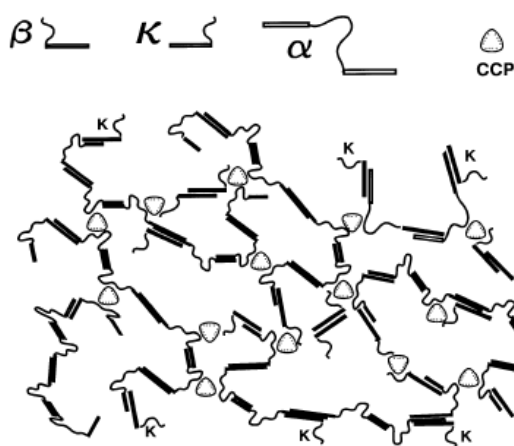
โบไวน์เคซีนไมเซลล์จะประกอบด้วยกลุ่มของแคลเซียมฟอสเฟต (colloidal calcium phosphate ; CCP) อยู่ 7% ของน้ำหนักแห้ง มีการใช้เครื่อง neutron scattering spectra เพื่อ ศึกษาโครงสร้างของเคซีนไมเซลล์ และวิเคราะห์โมเดลโครงสร้างจาก scattering spectrum โมเดล ก่อนหน้านี้ได้ถูกนำเสนอโดย Waugh [26] (รูปที่ 2.1a) โมเดลต่อมาถูกคิดด้วย Schmidt [27] (รูปที่ 2.1b) และถูกแก้ไขเพิ่มเติมโดย Walstra (รูปที่ 2.1c) [28, 29] และ Horne [30, 31] ได้นำเสนอ โมเดลการจับกันเป็นคู่ พบว่าแต่ละโมเดลโครงสร้างมีความสอดคล้องกันในแต่ละโมเดล โดยพื้นฐาน ของทุกโมเดลจะสังเกตเห็นว่า โครงสร้างเคซีนนั้นเกิดจากการรวมตัวกันของแต่ละไอโซไทป์เคซีนและ เกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์ได้ แม้ว่าบางโมเดลโครงสร้างจะไม่พบแคลเซียมอยู่ในโครงสร้างก็ตาม โมเดลโครงสร้างของ Horne รายละเอียดความจำเพาะจะเกิดการจับกันที่มีความสัมพันธ์แบบอ่อน เป็นโมเดลการจับกันเป็นคู่มากกว่าการจับแบบอุณหพลศาสตร์ (thermodynamics) และจาก การศึกษา geometrical point พบว่าโมเดลโครงสร้างของ Waugh model , Schmidt model และ Walstra model มีความคล้ายคลึงกันมากดังแสดงรูป 2.1a-c และพบว่า CCP จะไม่พบอยู่ใน โครงสร้างของเคซีนที่มีกลุ่มขนาดเล็ก [30, 31] ต่อมา Walstra [28] (รูปที่ 2.1c) ได้นำเสนอชนิดของ การรวมกันโมเดล sub-micelle โดยที่ไม่มี CCP วางอยู่ในตำแหน่งรอบนอกของ sub-micelle แต่ CCP จะถูกวางอยู่ภายในของ sub-micelles



รูปที่ 2.1 โมเดลโครงสร้างเคซีน [4]



ตัวอย่างโมเดลการจับกันเป็นคู่ของโครงสร้าง (dual binding model) ของเคซีนไมเซลล์ ด้วยโปรตีนเคซีนทั้ง 3 ชนิด คือ แอลฟา<sub>1</sub> เคซีน แอลฟา<sub>2</sub> เคซีน และ บีตา เคซีน จะเกิดการจับกันของตำแหน่ง hydrophobic ด้วยกัน และตำแหน่ง hydrophilic ด้วยกัน ซึ่งตำแหน่ง hydrophilic ประกอบด้วยส่วนของ phosphoserine clusters ที่จะจับกับกลุ่มของ CCP และ แคปปา เคซีน โดย แคปปา เคซีน เป็นโมเลกุลที่ช่วยจำกัดขนาดโมเลกุลของเคซีนไมเซลล์ และยังช่วยในการเพิ่มความเสถียรของโมเลกุลอีกด้วย [32] ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 รูปแบบการจับกันเป็นคู่ (Dual bonding model) ของเคซีนไมเซลล์ [32]

#### 2.1.5 ผลจากการแพ้เคซีนในน้ำนม

ส่วนประกอบในนมที่ทำให้เกิดอาการแพ้ คือ น้ำตาลแล็กโทสและโปรตีน เนื่องจากเด็กทารกไม่สามารถสร้างโปรตีนแล็กเทสที่ย่อยน้ำตาลแล็กโทสได้ และเนื่องจากเด็กทารกเห็นโปรตีนที่อยู่ในน้ำนมวัวเป็นสิ่งแปลกปลอม โปรตีนที่อยู่ในน้ำนมวัวสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ในเด็กมากกว่าการแพ้ น้ำตาลแล็กโทส [19] โปรตีนที่สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ ได้แก่ อัลฟา แลคตัลบูมิน บีตา แล็กโทโกลบูลิน และเคซีน โปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้มากที่สุดคือ เคซีน เนื่องจากพบในปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ โปรตีนที่เหลือที่พบในน้ำนม ได้แก่ ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin; BSA) อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) [24] หลังจากรับประทานเคซีน ผู้ที่มีอาการแพ้จะเกิดอาการแพ้ได้แตกต่างกันในแต่ละบุคคล อาจเกิดขึ้นภายในเวลาไม่กี่นาทีเมื่อรับประทานเคซีน ปริมาณเพียงเล็กน้อย หรืออาจเกิดอาการแพ้ในเวลาเป็นชั่วโมงถึงเป็นวัน หลังได้รับเคซีนจำนวนปานกลางถึงจำนวนมาก รูปแบบการแพ้แบ่งออกได้ 3 รูปแบบคือ รูปแบบที่ 1 เกิดแบบฉับพลัน

(immediate) จะเกิดเมื่อได้รับเคซีนในปริมาณน้อย แล้วเป็นเหตุให้เกิดอาการแพ้ เช่น อาการแพ้ทางผิวหนัง ที่เรียกว่า ลมพิษ (urticarial) อาการทางระบบทางเดินหายใจ คือ น้ำมูกไหล ไอ หรือ หอบ ซึ่งในรูปแบบนี้เป็นรูปแบบที่มีอันตราย เนื่องจากอาจทำให้เกิดภาวะการณการตายได้อย่างเฉียบพลัน (anaphylaxis) ได้รูปแบบที่ 2 เกิดขึ้นเร็วในระดับปานกลาง เกิดอาการในระยะเวลาเป็นชั่วโมง เมื่อได้รับปริมาณเคซีนในปริมาณปานกลาง โดยอาการหลักๆ จะมีอาการอาเจียน และท้องเสีย รูปแบบที่ 3 เกิดขึ้นช้า จะเกิดอาการเมื่อเวลาผ่านไปหลังจาก 20 ชั่วโมงถึงเป็นวันๆ หลังจากรับปริมาณเคซีนในปริมาณมาก อาการจะประกอบไปด้วย ท้องเสีย หรือไม่เกิดอาการแพ้ทางผิวหนังและอาการท้องเสียเลย [33]

## 2.1.6 วิธีตรวจวิเคราะห์เคซีน

### 2.1.6.1 อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

เป็นวิธีการที่อนุภาคถูกทำให้แยกและเคลื่อนที่ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าอย่างสม่ำเสมอ วิธีนี้เป็นพื้นฐานที่ใช้ทางด้านชีวเคมี สำหรับแยกโมเลกุลตามขนาด ประจุ หรือแรงยึดจับ (binding affinity) สามารถแยกชนิดของอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ตามประจุของอนุภาคที่ต้องการแยก คือ อนุภาคที่มีประจุบวกจะเรียกว่า cataphoresis ขณะที่อนุภาคที่มีประจุลบ จะเรียกว่า anaphoresis กระบวนการจำเป็นต้องมีการใช้วัสดุติดในการแยกคือเจล ชนิดของเจลส่วนมากที่ใช้จะมี 2 ชนิด คือ อะกาโรสเจล (agarose gel) ใช้สำหรับแยก ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดโมเลกุล 50-20,000 เบสแพร์ (bp) และ โพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ใช้สำหรับแยกโปรตีน ที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กในช่วง 5-500 เบสแพร์ [34] ปี 2002 Kaminarides S.E. และ Koukiassa P. ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนน้ำนมวัวในโยเกิร์ตของแกะ จากการสังเกตแคปป์า เคซีน ด้วยเทคนิค cationic polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ผลการทดลองสามารถบอกได้ว่าแคปป์า เคซีนสามารถใช้เป็นโปรตีนบ่งบอก (protein marker) ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของน้ำนมวัวในโยเกิร์ตแกะได้ [35]

### 2.1.6.2 Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

RP-HPLC ถูกนำมาใช้ในการแยกสารประกอบในสารผสม เพื่อบ่งชี้สารประกอบแต่ละชนิด และบ่งบอกปริมาณสารได้ เป็นวิธีการตรวจสอบที่ง่ายและรวดเร็ว (เนื่องจากใช้แรงดันสูงมากกว่า

400 บาร์) สามารถทำการดัดแปลงวิธีนี้ให้เหมาะกับการใช้งาน [36-38] จึงถูกใช้ในการแยกโปรตีนหลักๆ ในน้ำนมวัว ได้แก่ โปไวน์เคซีน อัลฟา แลตต์ลูบูลิน และบีตา แล็กโทโกลบูลิน ในกระบวนการเดียว ปี 1998 Bobe G. และคณะ ได้ทำการแยกโปรตีนในน้ำนมโดยใช้ reverse-phase ได้ 6 โปรตีนหลัก และ 7 genetic variants ที่หลากหลายของบีตา เคซีน แคปปา เคซีน และ บีตา แล็กโทโกลบูลิน จากการหาส่วนประกอบของโปรตีนในนมของวัว 234 ตัว ให้ผลปริมาณโปรตีนที่มีสอดคล้องกัน ต่อมาในปี 2009 Bonizzi I. และคณะ ได้ทำการแยกและหาปริมาณแต่ละไอโซไทป์ของเคซีน ( $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN และ  $\kappa$ -CN) ด้วย RP-HPLC และการบ่งชี้เคซีนแต่ละชนิดด้วยวิธี electrospray ionization mass spectrometry จากข้อมูลในการทดลองนี้บ่งบอกได้ว่า RP-HPLC มีประสิทธิภาพมากในการแยกโปไวน์เคซีนโดยใช้สภาวะการทดลองอย่างง่าย และมีความแม่นยำสูงมาก [39]

#### 2.1.6.3 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method)

วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการจะเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ [40] เป็นวิธีที่ใช้เป็นเครื่องมือสำคัญในการใช้ทำบริสุทธ์โปรตีน และทำให้รู้ตำแหน่งของโปรตีนที่ต้องการภายในเซลล์ หรือรู้ถึงปริมาณโปรตีนที่ปรากฏอยู่ได้ วิธีการเหล่านี้ต้องการแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายเหล่านั้น การติดฉลากแอนติบอดีนั้นก็หมายถึงได้รู้ว่ามีโปรตีนที่จำเพาะเหล่านั้น ดังนั้นก็สามารถที่จะแยก รู้ปริมาณ และมองเห็นโปรตีนนั้นได้ [41] โดยทั่วไปจะนึกถึงเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เทคนิคนี้เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ทางด้านการแพทย์ และหน่วยงานควบคุมด้านคุณภาพอาหาร เพื่อตรวจสอบและหาสารก่อภูมิแพ้ในอาหาร โดยเทคนิค ELISA สามารถตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้หรือโปรตีนอื่นๆ ได้ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการจับกับแอนติบอดีที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ [42] เมื่อต้องการได้รับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย (หรือแอนติเจน) จึงจำเป็นต้องมีการผลิตแอนติบอดีในกระบวนการเริ่มแรก

## 2.1.7 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

### 2.1.7.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

แอนติเจน เป็นสับสเตรต (substrate) ที่มีคุณสมบัติเป็น อิมมูโนเจน (immunogen) สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด adaptive immune response ได้ [43] แอนติเจนจะเป็นสิ่งแปลกปลอมหรือเป็นพิษต่อร่างกาย ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย (bacteria) และจะถูกจดจำแบบจำเพาะด้วยแอนติบอดี จึงถูกเรียกได้ว่า แอนติเจนเป็นโมเลกุลที่เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย แอนติบอดีแต่ละตัวจะถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เข้ามากระตุ้น (specific immune response) เนื่องจากแอนติบอดีมีส่วน complementarity determining regions (CDRs) ที่สร้างมาให้จับจำเพาะกับแอนติเจน [44] โดยอิมมูโนเจนทุกชนิดจะเป็นแอนติเจน แต่แอนติเจนบางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน โดยแอนติเจนบางชนิดจะไม่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้ เพราะไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแอนติเจนด้วย [45]

#### 1) ความแปลกปลอม (Foreignness)

สารที่มีความแตกต่าง หรือไม่พบสารนี้มีอยู่ในร่างกาย หรืออาจจะมีการอยู่ในร่างกายแต่อยู่ในบริเวณภาวะปกติไม่เคยสัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างการปลูกถ่ายไต ถ้าไตที่เกิดจากการนำไตจาก identical twin ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม จะไม่ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบทางภูมิคุ้มกัน แต่ถ้านำไตมาจากลิงชิมแปนซีมาปลูกถ่ายไตในคน จะทำให้มีการตอบสนองต่อระบบทางภูมิคุ้มกันอย่างรวดเร็วและมีการปฏิเสธไตที่ได้รับมาภายในไม่กี่ชั่วโมง ซึ่งคนจะถือว่าไตที่ได้รับมาเป็นสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นถ้าความเป็นสิ่งแปลกปลอมยิ่งมาก ก็ยิ่งกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันมากตาม

#### 2) ขนาดของโมเลกุล (size)

ขนาดโมเลกุลที่สามารถก่อให้เกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีมาก คือสารที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 1,000 กิโลดาลตัน และจากการศึกษาที่ผ่านมาสสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน มักกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ไม่ดี ปัจจุบันสารที่มีขนาดเล็กก็สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้โดยการติดกับโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาด

ใหญ่ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเป็นอิมมูโนเจนในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กได้

### 3) ความคงตัวของสาร (structure stability)

สารที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (highly flexible molecule) จะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี ตัวอย่างเช่น เจลลาติน (gelatin) และสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลคงตัว เช่น โปรตีน จะเป็นอิมมูโนเจนที่ดี ในธรรมชาติโปรตีนจะเป็นอิมมูโนเจนได้ดีกว่า ไขมัน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต

### 4) การสลายตัวได้ (degradability)

แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย จะถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลง เมื่อถูกทำให้มีขนาดเล็กแล้วจะไปกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์และทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นสารที่ไม่สามารถย่อยให้มีอนุภาคขนาดเล็กได้จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี นอกจากนี้หากสารที่มีถูกย่อยให้มีอนุภาคขนาดเล็กจนมากเกินไปจะถูกกำจัดออกจากร่างกายรวดเร็วเกินไป จึงทำให้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ดีเช่นกัน เนื่องจากถูกกำจัดออกจากร่างกายก่อนไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

### 5) คุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

สารประกอบชีวโมเลกุลต่างๆ ล้วนทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ พบว่าโปรตีนสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ดีที่สุด เนื่องจากโปรตีนเป็นสารประกอบที่มีความซับซ้อนมากกว่าสารอื่นๆ ด้วยอาจจะมีการม้วนทบและเกิดพันธะต่างๆ ทำให้เกิดรูปร่างแตกต่างกัน นอกจากนี้โปรตีนที่มี aromatic amino acid จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่มี aromatic amino acid เป็นส่วนประกอบ

#### 6) ปริมาณและทิศทางการเข้าสู่ร่างกายของสาร (dose and route of administration)

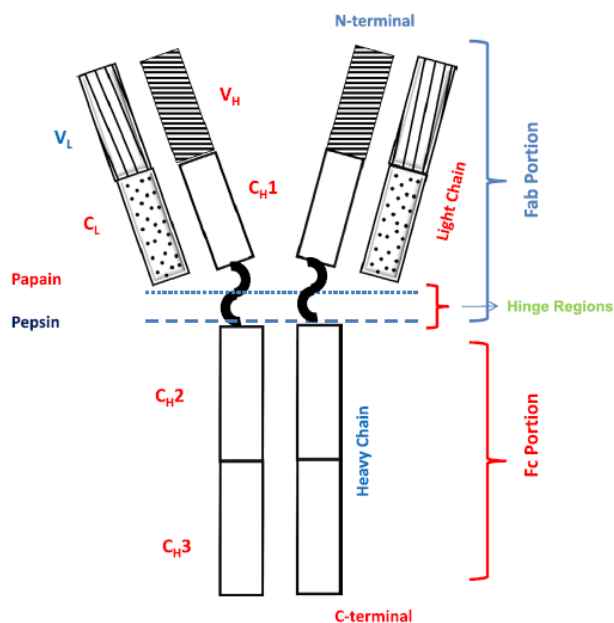
ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้มีความสำคัญต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หากการใช้ปริมาณอิมมูโนเจนมากหรือน้อยเกินไป จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันลดลง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า immunological tolerance นอกจากนี้ทิศทางการที่แตกต่างกันในการนำอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายก็มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน ที่จะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีทั้งในแง่ของระยะเวลาและปริมาณที่แตกต่างกัน

#### 7) พันธุกรรมของร่างกาย (host genetics)

ระบบภูมิคุ้มกันถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม ดังนั้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจะแตกต่างกันในแต่ละบุคคลและจะแตกต่างกันมากขึ้นในสัตว์ต่างสปีชีส์กัน สารชนิดเดียวกันอาจจะสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูได้ดี แต่อาจจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ไม่ดีในคนและกระต่าย [45]

#### 2.1.7.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

ปี 1939 Tiselius A. และ Kabat E. A. ได้ยืนยันโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulins; Ig) เป็นโปรตีนทรงกลม (globular proteins) พบอยู่ในส่วนของ  $\gamma$ -globulin ของซีรัม [46, 47] แต่ต้องใช้เวลาอีก 20-30 ปีที่นักวิทยาศาสตร์ได้อธิบายโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินให้เป็นที่รู้จักกันทั่วโลก นักวิทยาศาสตร์ 2 คนคือ Porter R. R. และ Edelman G. M. ชี้แจงถึงโครงสร้างของแอนติบอดี ทำให้พวกเขาได้รับรางวัลโนเบล (Nobel Prize) ทางด้านการแพทย์และสรีรวิทยาในปี 1972 [48, 49] มีนักวิทยาศาสตร์คนอื่นๆ ได้อธิบายโครงสร้างอิมมูโนโกลบูลินเช่นกัน คือ Nisonoff A. [50] ซึ่งมีความสำคัญในการค้นพบนี้เช่นกัน ต่อมา Porter R. R. และ Edelman G. M. ได้ทำการทดลองในวิธีที่แตกต่างไปจากวิธีของนักวิทยาศาสตร์คนอื่นๆ ได้วิจารณ์ผลที่ได้และรวบรวมสรุปถึงโครงสร้างโมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลิน [51] แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างต้นแบบของอิมมูโนโกลบูลิน G; IgG [51]

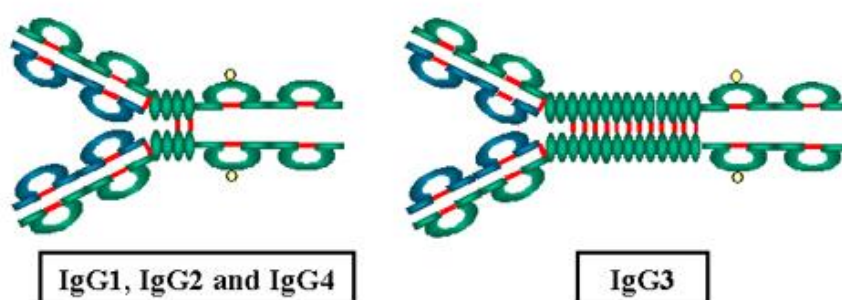
IgG มี 2 heavy chains และ 2 light chains โดย CH1 CH2 และ CH3 เป็นส่วนของ constant domains ของ heavy chains (H-chain) และ CL เป็นส่วนของ constant domain ของ light chain (L-Chain) ส่วน VH เป็น variable domain ของ heavy chain และส่วน VL เป็น variable domain ของ light chains ส่วนของบานพับ (hinge region) จะมีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดได้ด้วย papain และ pepsin ในส่วนล่างของ IgG จะเป็นส่วนของ constant domains ของ heavy chain ที่รู้จักกันในชื่อ ส่วนของ Fc (fraction crystallizable) ส่วนที่จับกับแอนติเจน (fraction antigen binding) เรียกว่า ส่วน Fab จะประกอบไปด้วย CH1 และ VH domains ของ heavy chain และส่วน CL และ VL domains ของ light chain ส่วนของ heavy chain และ light chain จะยึดติดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (interchain-disulfide bonds)

### 2.1.7.3 ไอโซไทป์ของแอนติบอดี

แอนติบอดีถูกแบ่งออกเป็นหลายรูปแบบ เรียกกันว่า ไอโซไทป์ (isotype) หรือ คลาส (classes) แบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ IgG, IgE, IgA, IgM และ IgD แอนติบอดีแต่ละชนิดมีความแตกต่างทางด้านโครงสร้าง คุณสมบัติทางชีววิทยา ตำแหน่งในการทำหน้าที่ และความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ต่างกัน [52]

### 1) Immunoglobulin G (IgG)

โครงสร้างประเภทย่อยของ IgG แสดงดังรูปที่ 2.4 โครงสร้างย่อยของ IgG ทั้งหมดมีความเหมือนกันคือเป็นโมโนเมอร์ (monomer) และมีความแตกต่างกันคือ มีพันธะไดซัลไฟด์แตกต่างกัน และความยาวของบานพับแตกต่างกัน IgG จะเป็นอิมมูโนโกลบูลินหลักที่พบอยู่ในซีรัม พบประมาณ 75% ของซีรัมอิมมูโนโกลบูลิน พบอยู่ในช่องว่างลำเลียงพิเศษ (extra vascular spaces) มีหน้าที่ในการเป็นตัวขนส่ง เนื่องจากเป็นอิมมูโนโกลบูลินเดี่ยวที่สามารถส่งผ่านไปยังรกได้ การขนส่งจะทำได้โดยตัวรับที่อยู่บนผิวของเซลล์รจจับกับบริเวณส่วนของ Fc ของ IgG (ยกเว้น IgG<sub>2</sub> ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งได้) นอกจากนี้ IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>3</sub> มีความสามารถในการจับกับบริเวณตัวรับ Fc ของเซลล์แมคโคเฟจ (macrophages) เซลล์โมโนไซด์ (monocytes) เซลล์เม็ดเลือดขาว (polymorphonuclear cell) และ เซลล์ลิมโฟไซด์บางชนิด (lymphocytes) ทำให้เซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการเคลื่อนตัวไปหาแอนติเจนแล้วเกิดกระบวนการ phagocytosis ได้ดียิ่งขึ้น



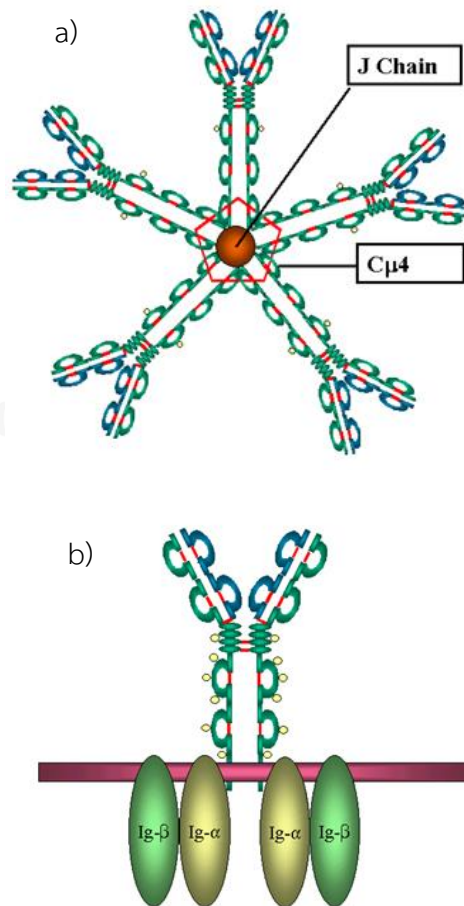
รูปที่ 2.4 อิมมูโนโกลบูลิน จี [53]

### 2) Immunoglobulin M (IgM)

โครงสร้างของ IgM ปกติแล้ว IgM จะเป็นเพนตาเมอร์ (pentamer) แสดงดังรูปที่ 2.5a แต่ มันสามารถมีโครงสร้างเป็นโมโนเมอร์ได้ แสดงดังรูปที่ 2.5b ส่วน heavy chains ทุกบริเวณในโครงสร้างแบบเพนตาเมอร์เหมือนกัน และทุกบริเวณ light chains ในโครงสร้างแบบเพนตาเมอร์จะเหมือนกัน



IgM จะมีโดเมนพิเศษบนสายของ  $\mu$  chain ( $C_{\mu}4$ ) แล้วถูกติดกันด้วยพันธะโควาเลนต์เกิดเป็นพันธะระหว่าง S-S และถูกเรียกว่าสาย J (J chain) ซึ่งสายนี้มีหน้าที่ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างแบบเพนตาเมอร์ จะพบ IgM อยู่ในซีรัมเป็นอันดับที่ 3 ของซีรัมอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่สร้างเป็นอันดับแรกในทารก (fetus) และเป็นอิมมูโนโกลบูลินตัวแรกที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อแอนติเจนเข้ามากระตุ้นเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte หรือ B cell) เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นเพนตาเมอร์ของแอนติบอดี IgM จึงทำให้มีประสิทธิภาพมากของการยึดจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน และมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ Fc เป็นผลให้ส่วนนี้สามารถกระตุ้นโปรตีนต่างๆ ในซีรัม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่แอนติเจน จึงการนำไปสู่การย่อยจุลินทรีย์ต่างๆ (complement system) และยังเป็นอิมมูโนโกลบูลินที่ดีในการตกตะกอนที่ทำให้เกิดเป็นก้อนของจุลินทรีย์สำหรับการกำจัดออกจากร่างกาย

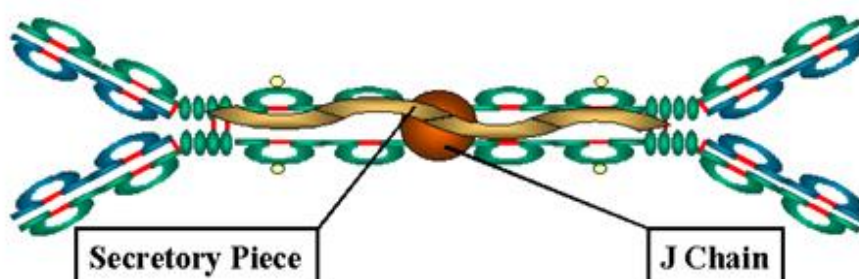


รูปที่ 2.5 โครงสร้างอิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม a) แบบเพนตาเมอร์ b) แบบโมโนเมอร์ [53]

IgM ที่มีโครงสร้างเป็นโมโนเมอร์ จะมีการจับกับบางเซลล์ผ่าน Fc receptor จะไม่มีส่วนของสาย J แต่จะมีส่วนของกรดอะมิโนพิเศษเพิ่มขึ้นมา 20 กรดอะมิโน ที่บริเวณปลาย C-terminal ที่จะช่วยในการยึดเกาะกับเมมเบรน บริเวณพื้นผิวของ IgM จะมีความสามารถจับกับโปรตีนของ B cell คือ  $Ig\text{-}\alpha$  และ  $Ig\text{-}\beta$  ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เป็นตัวส่งสัญญาณ เนื่องจากโมเลกุล cytoplasmic tail ของ Ig สั้นเกินที่จะเป็นตัวส่งสัญญาณ บริเวณผิวของ Ig กับแอนติเจน ต้องการสัญญาณที่เหนี่ยวนำโดยสายของ  $Ig\text{-}\alpha$  และ  $Ig\text{-}\beta$  แอนติเจนที่จะกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ต้องอาศัย T helper (T-dependent antigens) แต่ในกรณีของแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ด้วยตัวของมันเอง ที่ไม่ต้องอาศัยการช่วยเหลือจาก T helper cell (T-independent antigens) แคลใช้แอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีก็เพียงพอแล้วที่จะกระตุ้น B cell แล้วนำไปสู่การหลั่งแอนติบอดีโดยพลาสมาเซลล์ (plasma cells) [54]

### 3) Immunoglobulin A (IgA)

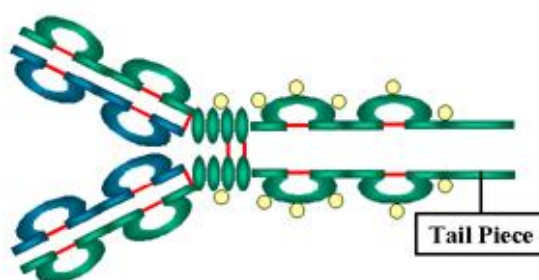
โครงสร้างเป็นโมโนเมอร์ แต่ IgA ที่พบในสารคัดหลั่งจะมีโครงสร้างเป็นไดเมอร์ (dimer) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โครงสร้างแอนติบอดี IgA จะมีการเชื่อมกันด้วยสาย J ในสารคัดหลั่งจะมีโปรตีนอื่นๆ มาเกี่ยวข้องด้วย คือ secretory piece หรือ T piece ซึ่งช่วยให้ IgA ถูกขนส่งผ่านเยื่อเมือกและป้องกันการถูกย่อยสลาย IgA เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบมากเป็นอันดับ 2 ในซีรัมอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด เป็นคลาสหลักที่พบอยู่ในสารคัดหลั่ง ได้แก่ น้ำตา น้ำลาย และเมือก ดังนั้น IgA จึงมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยปกติแล้ว IgA จะไม่มีคุณสมบัติยึดจับกับแอนติเจนแบบ fix complement ที่ช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแอนติเจน แล้วเกิดการย่อยแอนติเจน



รูปที่ 2.6 อิมมูโนโกลบูลิน เอ [53]

#### 4) Immunoglobulin D (IgD)

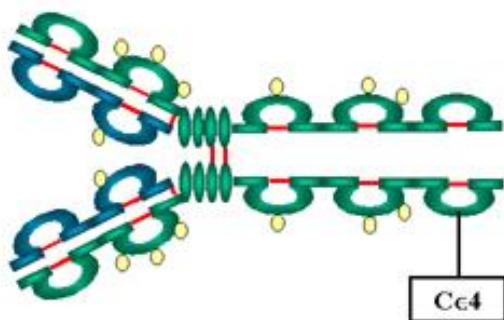
โครงสร้างเป็นแบบโมโนเมอร์ได้แบบเดียว ดังแสดงในรูปที่ 2.7 พบน้อยมากในซีรัม ซึ่งยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัด โดยปกติจะพบ IgD อยู่ที่บริเวณพื้นผิวของ B cell ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับแอนติเจน โดย IgD ที่อยู่บนพื้นผิวของ B cell จะมีกรดอะมิโนพิเศษที่บริเวณส่วนปลาย C-terminal สำหรับติดกับเมมเบรน (membrane) ของ B cell และเกี่ยวข้องกับโปรตีน Ig- $\alpha$  และ Ig- $\beta$  แต่ IgD ยังไม่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนต่างๆ ในซีรัมได้ จึงไม่เกิด complement system



รูปที่ 2.7 อิมมูโนโกลบูลิน ดี [53]

#### 5) Immunoglobulin E (IgE)

โครงสร้างจะเป็นแบบโมโนเมอร์ แสดงดังรูปที่ 2.8 มีส่วนของ extra domain อยู่ในส่วนของ constant region เป็นแอนติบอดีที่พบน้อยที่สุดในซีรัม อิมมูโนโกลบูลิน IgE จะจับอย่างแน่นที่บริเวณรับ (Fc receptor) บนเซลล์เบโซฟิล (basophils cell) และแมสต์เซลล์ (mast cell) ก่อนที่จะมีปฏิกิริยากับแอนติเจน แอนติบอดีนี้มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยากับการแพ้ เมื่อมีการจับกันของแอนติเจนต่อ IgE บนเซลล์ จะส่งผลให้มีการปลดปล่อยสารตัวกลาง (pharmacological mediators) แล้วเกิดอาการแพ้ นอกจากนี้ IgE ยังมีบทบาทกับโรคพยาธิ (parasitic helminth diseases) คือจะมีระดับของ IgE เพิ่มขึ้นเมื่อเป็นโรคพยาธิ นั่นหมายถึงว่าการวัดระดับของ IgE จะช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อปรสิต อีกทั้งเซลล์อีโอซิโนฟิล (eosinophils) มีส่วนรับกับส่วน Fc สำหรับ IgE เมื่อมี IgE ติดอยู่ที่ผิวของเซลล์อีโอซิโนฟิล และ IgE จับกับหนอนพยาธิ (helminths) จะทำให้เกิดการฆ่าปรสิตนั้นได้ [53]



รูปที่ 2.8 อิมมูโนโกลบูลิน อี [53]

### 2.1.8 มอนอโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody, MAb)

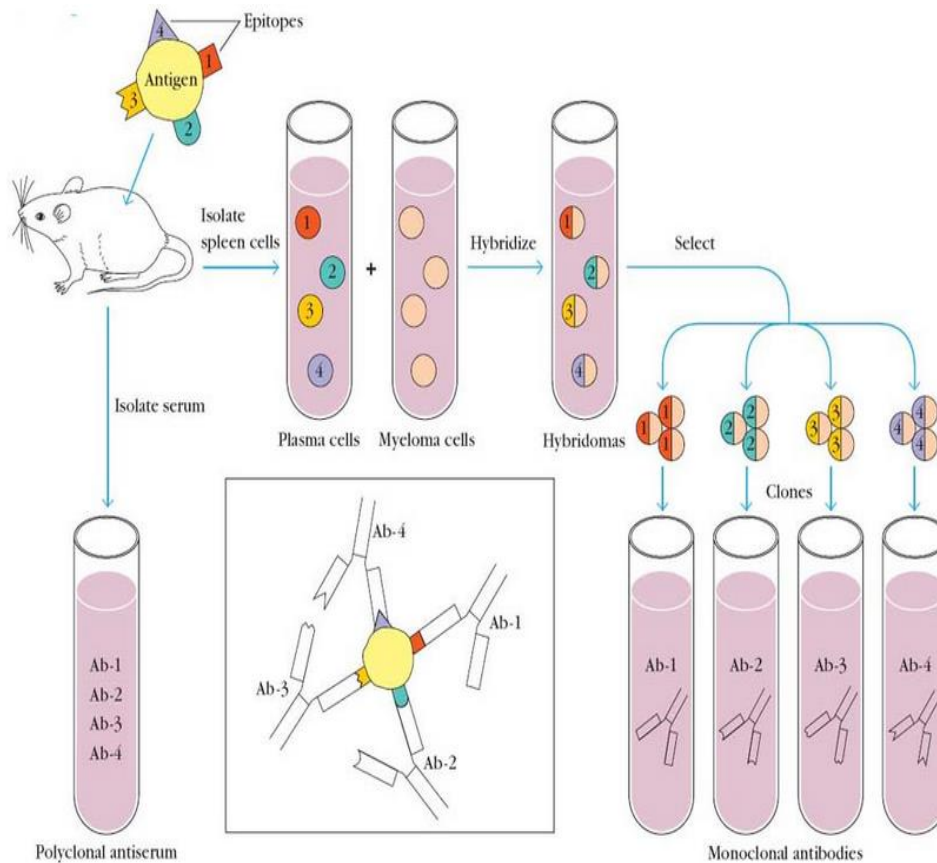
มอนอโคลนอลแอนติบอดีถูกสร้างจาก บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocytes) หนึ่งเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ antigen determination หนึ่งๆ บนแอนติเจนเท่านั้น มอนอโคลนอลแอนติบอดีจะถูกผลิตโดยเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) โดยการหลอมรวมเซลล์ของ บี-ลิมโฟไซต์กับเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) สามารถผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีในระยะเวลายาวนาน ทำให้ได้แอนติบอดีจำนวนมาก ทั้งที่ผลิตในระบบ in vivo และ in vitro มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะให้คุณสมบัติที่ดีกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีคือ มีความจำเพาะเดียวกันทั้งหมด และการศึกษาคุณลักษณะสมบัติอื่นๆ ยังสามารถปฏิบัติได้ง่ายด้วย เนื่องจากผลิตมาจากกลุ่มเซลล์เดี่ยว (single clone) ดังนั้นเซลล์ไฮบริโดมายังคงผลิตแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนเดิมตลอด นอกจากนี้มอนอโคลนอลแอนติบอดียังมีความเหมาะสมมากในการนำไปเชื่อมต่อกับตัววัดอื่นๆ เพื่อนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการบำบัดรักษา แต่แอนติบอดีที่ผลิตได้จะถูกต่อต้านด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ได้ (human anti-mono-clonal antibody (HAMA) response) ดังนั้น จึงมีการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เป็นการผสมระหว่างส่วนของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับส่วนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มาจากร่างกายของมนุษย์ (chimeric antibodies) ทำให้แอนติบอดีที่ได้ไม่ถูกต่อต้านด้วยภูมิคุ้มกันของมนุษย์ จึงสามารถนำแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการรักษามนุษย์ได้ มอนอโคลนอลแอนติบอดียังเป็นตัวเลือกที่ดี ในการใช้เป็นเครื่องมือในการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity purification และเหมาะที่จะใช้ในการตรวจสอบโปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured proteins) เนื่องจากแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนตัวเดียว นอกจากนี้

มอนอโคลนอลแอนติบอดียังให้ผลการทดลองในการทดสอบซ้ำ ที่มีความเที่ยงตรงสูง (highly reproducible) จึงแสดง background ที่ต่ำในระหว่างการทำ การทดลองหรือเมื่อใช้แอนติบอดีนั้นเป็นตัวชี้วัด (probes) แต่การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต้องใช้ระยะเวลานานในการผลิตเพื่อให้ได้มอนอโคลนอลแอนติบอดี จำเป็นที่จะต้องใช้ผู้ที่มีทักษะมากในการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี และด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดีมีความเหมือนกันทุกโมเลกุล จึงทำให้มีความอ่อนแอมาก จึงถูกย่อยสลายได้ง่ายในสารละลาย เนื่องจากมีแอนติบอดีที่มีความเหมือนกันของทุกโมเลกุล

### 2.1.9 โพลีโคลนอลแอนติบอดี

โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ได้จากซีรัมของสัตว์ทดลองที่มีการกระตุ้นด้วยแอนติเจน แอนติบอดีนี้ จะมีความจำเพาะต่อบริเวณพื้นผิวของแอนติเจน (antigen determination) และแอนติบอดีแต่ละชนิดประกอบอยู่ในโพลีโคลนอลแอนติบอดี แสดงดังรูปที่ 2.9 ซึ่งแอนติบอดีแต่ละชนิดที่รวมอยู่ด้วยกันจะมีความแตกต่างกันในด้านความจำเพาะ คลาส ไตเตอร์ (titer) และอัฟฟินิตี (affinity) โพลีโคลนอลแอนติบอดีจะถูกผลิตได้จากหลากหลาย บี-ลิมโฟไซต์ สามารถผลิตได้ง่ายและใช้เวลาไม่นานนัก ซึ่งได้จากการผลิตใน *in vivo* จึงต้องการสัตว์ทดลองที่เหมาะสมในการผลิต โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้น ไม่ได้เกิดจากแอนติบอดีรูปแบบเดียวกัน นั่นคือมีแอนติบอดีที่หลากหลายทั้งด้านความไวและความจำเพาะ ทำปฏิกิริยาได้กับหลาย antigenic determinant ดังนั้นจึงเป็นไปได้ยากที่จะศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดี แต่ที่ความเสี่ยงน้อยที่จะถูกย่อยสลายไปในสารละลาย การผลิตนั้นไม่ต้องการคนที่มาทักษะในการผลิตมาก ไม่ต้องการเครื่องมือที่มีความซับซ้อนในการผลิต แต่ความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีความแปรปรวนมากๆ และในการกระตุ้นสัตว์ทดลองนั้น บ่อยครั้งจะมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนและติดเชื้อจากสิ่งที่เราไม่ต้องการ สามารถนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจสอบเมื่อแอนติเจนถูกทำให้เสียสภาพด้วยวิธี western blotting และยังเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมในการใช้จับกับแอนติบอดีในด้านภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) immunofluorescence และมีความเหมาะสมมากในปฏิกิริยา agglutination และ precipitation แต่ไม่เหมาะในการเป็นเครื่องมือสำหรับทำบริสุทธิ์แบบ affinity purification โดยต้องใช้งบประมาณมากในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในระยะเวลานาน (long-term production) เนื่องจากต้องมีค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาสัตว์ทดลอง แต่ก็มีประโยชน์ในการใช้เพื่อผลิตแอนติบอดีไปเรื่อยๆ ข้อด้อยของโพลีโคลนอล

แอนติบอดีคือ อาจจะเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ได้กับแอนติเจนชนิดอื่นได้ เนื่องจากมี antigen determination ที่พบร่วมได้ในแอนติเจนที่แตกต่างกัน และการเตรียมโพลีโคลนอลแอนติบอดีแต่ละครั้ง จากสัตว์แต่ละตัว หรือสัตว์คนละชนิด อาจได้แอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในแง่ความจำเพาะ ไตเตอร์ และ อีพิตอปี้ [45, 51]



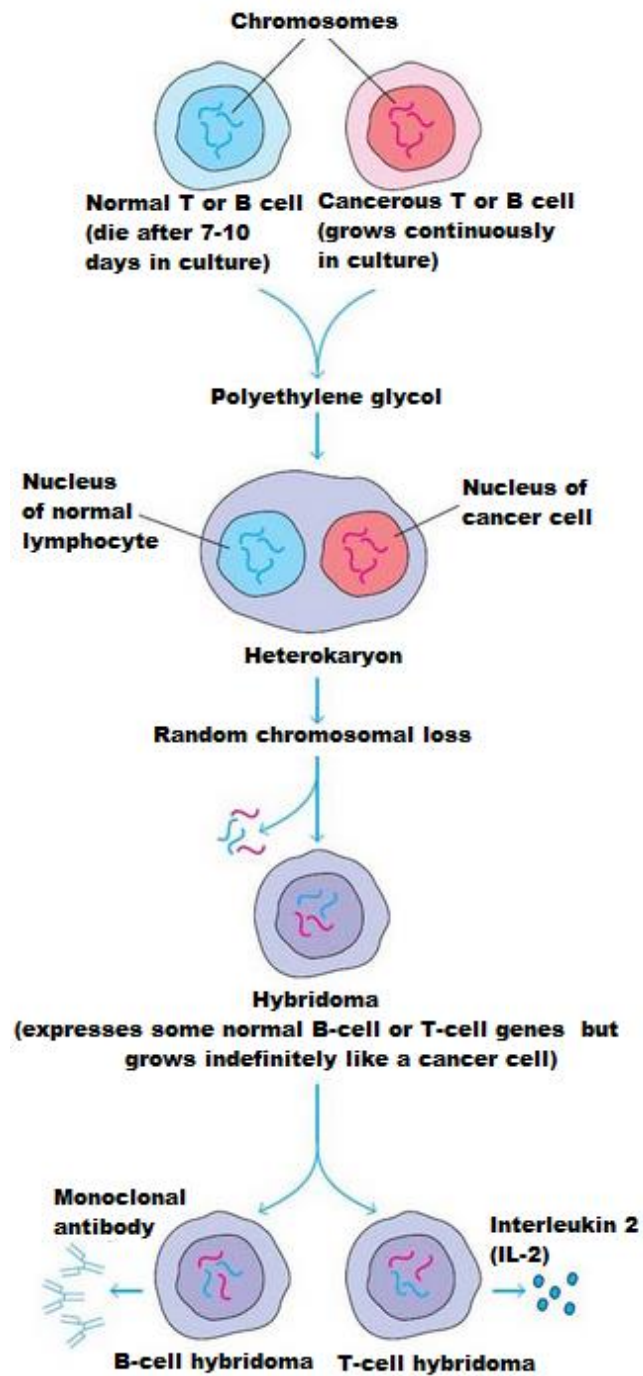
รูปที่ 2.9 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ที่มา <http://biosiva.50webs.org/mab.htm>

#### 2.1.10 การผลิต MAb ด้วย hybridoma technology

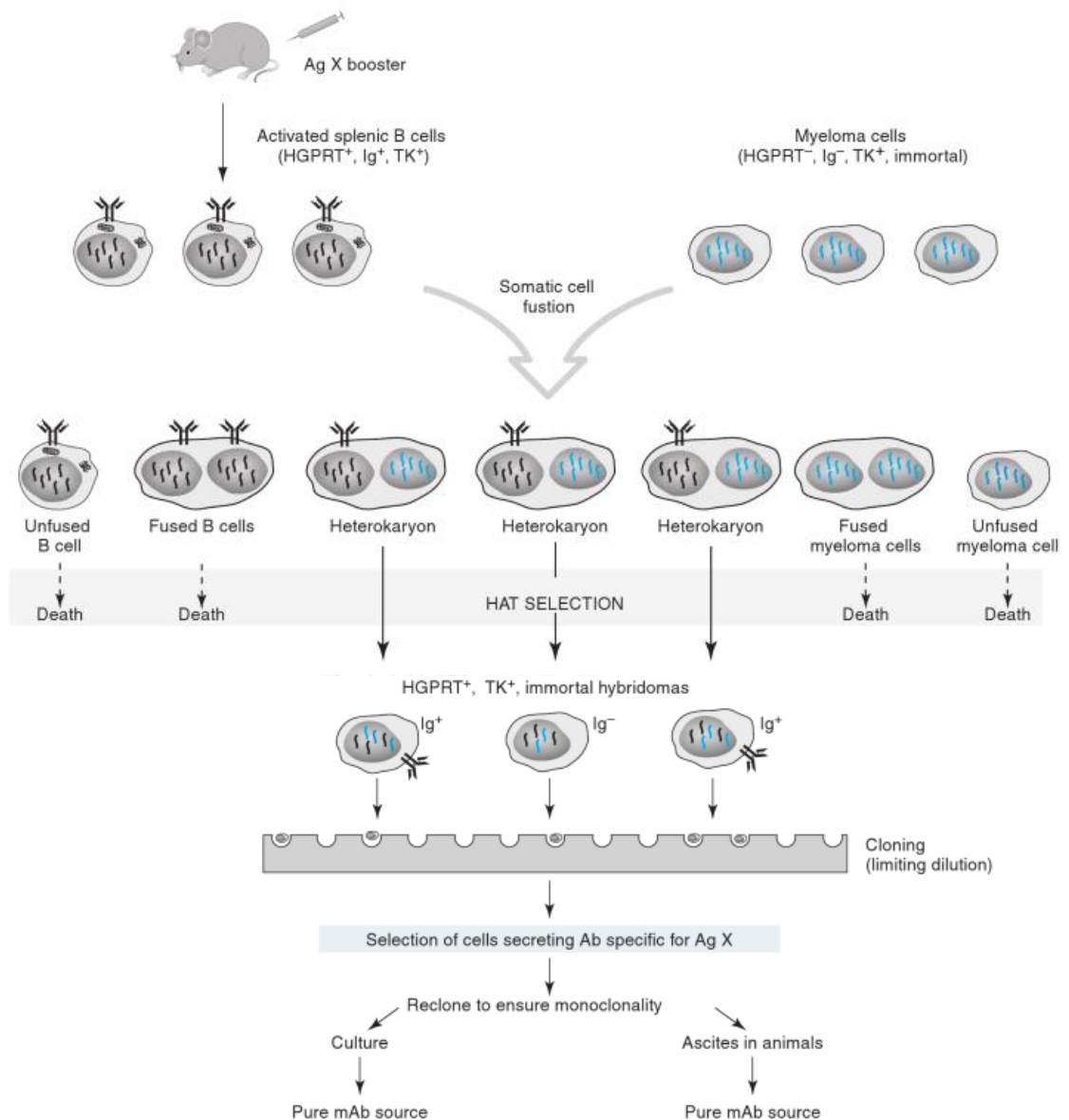
เทคโนโลยีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cells) ด้วยการรวมเซลล์ที่เราสนใจกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เซลล์ที่เจริญด้วยอายุขัยแบบไม่จำกัดและมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างสารที่เราสนใจได้ปริมาณมาก การผสมเซลล์ที่สนใจกับเซลล์มะเร็งจะต้องใช้สารที่ช่วยการหลอมรวมกันของเซลล์ (fusogens) เช่น ไวรัสบางชนิด คือ ไวรัสเซนได (sendavirus) หรือ

โพลีเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) โดยจะทำให้เมมเบรนของเซลล์ทั้งสองเกิดการหลอมรวมกัน เบื้องต้นเมื่อเกิดการหลอมรวมเซลล์แล้ว เซลล์จะมีนิวเคลียสภายในที่แตกต่างกัน 2 นิวเคลียส เรียกเซลล์ลักษณะนี้ว่า เฮเทอโรแครีออน (heterokaryon) เมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัว จะเกิดการรวมกันของนิวเคลียส เรียกเซลล์นี้ว่า เซลล์ลูกผสม หรือ เซลล์ไฮบริโดมา (hybrid cells or hybridoma cell) แสดงดังรูปที่ 2.10 เซลล์ใหม่จะต้องมีนิวเคลียสเพียงนิวเคลียสเดียวเท่ากับจำนวนโครโมโซมปกติ เนื่องจากโครโมโซมของเซลล์ที่เราสนใจจะไม่สามารถจำลองตัวเองได้ดี เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์จึงมักเกิดการสูญหายของโครโมโซมของเซลล์ที่เราสนใจ แต่โครโมโซมของเซลล์มะเร็งยังอยู่ครบ เซลล์ไฮบริโดมาที่เสถียรจะมีโครโมโซมจากเซลล์ที่เราสนใจเหลืออยู่เพียง 3-4 โครโมโซมเท่านั้น โดยวิธีการนี้นิยมนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่ต้องการ ดังแสดงขั้นตอนการผลิตดังรูปที่ 2.11 โดยขั้นตอนหลักๆ ในการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี คือ การกระตุ้นสัตว์ทดลอง (immunization animal) หลอมรวมเซลล์ (fusion of cell) การคัดเลือกกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (selection of clone) ขยายเซลล์ (expansion of clone) และการทำบริสุทธิ์แอนติบอดี (purification of monoclonal antibody) [55, 56]



รูปที่ 2.10 การหลอมรวมของเซลล์ ด้วย Polyethylene glycol [55]





รูปที่ 2.11 ขั้นตอนการผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี [57]

### 1) การกระตุ้นสัตว์ทดลอง (immunization of mouse)

การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีจะต้องมีการกระตุ้นสัตว์ทดลอง เพื่อให้สัตว์ทดลองเกิดการผลิตแอนติบอดี เนื่องจากการกระตุ้นสัตว์ทดลองจะช่วยให้การกระตุ้น B cell หลังจากทำการกระตุ้น ม้ามจะถูกนำมาเป็นไข เพราะเป็นแหล่งของเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ในม้ามจะประกอบด้วย บี ลิมโฟไซต์ ที่หลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนที่เรากระตุ้น ขั้นตอนสำคัญ

ในการกระตุ้นหนู คือการเตรียมแอนติเจน การกระตุ้นหนู และการหาระดับการสร้างแอนติบอดี (antibody titer)

## 2) หลอมรวมเซลล์ (fusion of cell)

### - การเตรียมเซลล์ม้าม (Preparation of Splenocytes)

ปริมาตรเลือด (peripheral blood) ที่สามารถนำออกมาจากร่างกายหนูนั้นถูกจำกัด จึงทำให้ได้ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจำกัดด้วย ซึ่งแหล่งของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ดีคือม้าม (spleen) การผ่าเอาม้ามและการเตรียมเซลล์จากม้าม splenocytes ต้องทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ aseptic conditions หนูจะถูกฆ่าแบบการุณยฆาต และผิวหนังจะถูกทำให้ปลอดเชื้อด้วย 70% เอทานอล ก่อนที่จะนำม้ามออกมาภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ม้ามจะถูกผ่าออกมาแยกส่วนของไขมันที่ติดมาทิ้ง และทำให้กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ในบางวิธีจะมีการกำจัดเซลล์อื่นๆ ที่ปะปนมาพร้อมเซลล์ม้าม เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง กำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ โดยการ lysing RBCs ที่ใช้ RBC lysis buffer แล้วค่อยนำเซลล์ม้ามไปใช้ เซลล์ม้ามจะถูกเตรียมสำหรับการหลอมรวมกับมัยอีโกลมาเซลล์ (myeloma cell) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของหนู โดยมัยอีโกลมาเซลล์จะถูกทำให้มีคุณสมบัติจำเพาะ เพื่อที่จะถูกคัดเลือกออกในอาหารคัดเลือก HAT medium (Hypoxanthine, Aminopterin, and Thymidine medium) หลังการหลอมรวมเซลล์

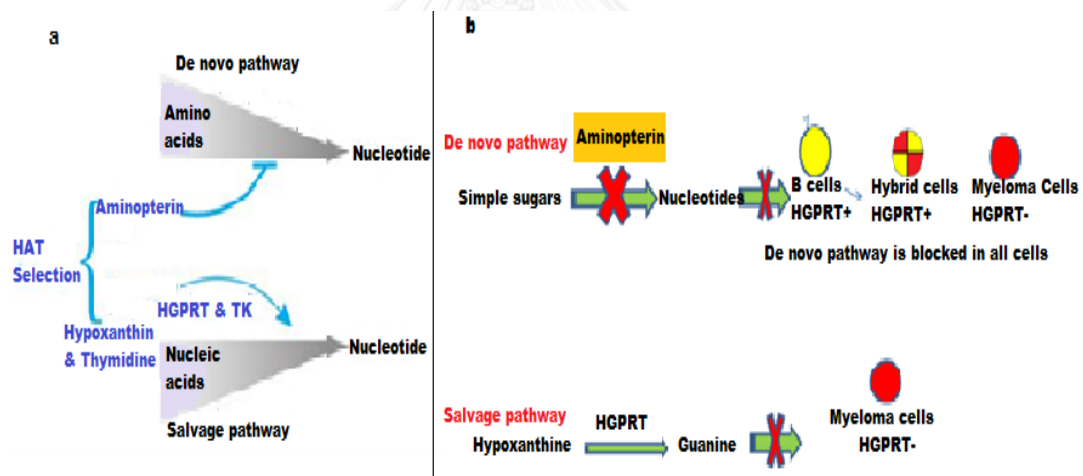
### - การหลอมรวมเซลล์ (Fusion of Cells)

ขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์ เซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโกลมาจะถูกผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วนที่จำเพาะ เซลล์จะถูกผสมให้เข้ากันดีและเติมสารที่เหนียวนำไปเกิดการหลอมรวมกัน ดังแสดงดังรูปที่ 2.11 สารหลากหลายตัวที่ถูกนำมาใช้ในการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโกลมา เช่น ไวรัส โพลีเอทิลีน ไกลคอล ฯลฯ ปัจจุบันวิธีที่สะดวกและราคาถูกที่สุดในการหลอมรวมเซลล์ คือการใช้ โพลีเอทิลีน ไกลคอล หลังจากการหลอมรวมเซลล์จะกลายเป็นเซลล์ที่มีความเปราะบางมาก ดังนั้นขั้นตอนปฏิบัติหลังจากนี้จะต้องดูแลเซลล์อย่างดี แต่ก็ยังไม่มีวิธีใช้ในการแก้ปัญหาเซลล์มีชีวิตรอดน้อยในระหว่างการหลอมรวมเซลล์ได้

### 3) การคัดเลือกกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี

#### - การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ที่ได้จากหลอมรวมจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร HAT medium โดย aminopterin จะทำหน้าที่บล็อก de novo pathway ที่เป็นเส้นทางในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ดังนั้นเซลล์ที่ไม่ได้ใช้เส้นทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ด้วย salvage pathway ก็จะต้องตายในที่สุด ในอาหารคัดเลือก HAT medium แต่ใน B cell จะตาย เนื่องจากมีอายุขัยที่จำกัด เซลล์มัยอิโลมาที่ไม่ได้รับการหลอมรวมก็จะตาย เนื่องจากการบล็อก de novo pathway และไม่สามารถใช้ salvage pathway ได้ สุดท้ายจะมีเพียงเซลล์ที่เกิดการหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมาเท่านั้นที่สามารถเจริญในอาหารคัดเลือกได้ และมีชีวิตรอด แต่การบ่งชี้เซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถสร้างแอนติบอดีก็จำเป็นที่จะทำการคัดเลือกในขั้นตอนถัดไป



รูปที่ 2.12 กลไกอาหาร HAT medium a) กลไกการสร้างนิวคลีโอไทด์ และการบล็อกกลไก De novo ด้วย aminopterin b) HAT medium ที่มีการเติม aminopterin และ hypoxathine  
ที่มา: <http://www.biologyexams4u.com>

HAT medium ถูกนิยมใช้เป็นอาหารคัดเลือกสำหรับเซลล์ไฮบริโดมา เรียกว่า HAT selection โดยปกติเซลล์จะใช้ 2 วิธีทางในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์เพื่อสร้าง DNA คือ de novo pathway จะสร้างนิวคลีโอไทด์ใหม่โดยใช้กรดอะมิโน และ salvage pathway สร้างนิวคลีโอไทด์ใหม่จากการย่อยของนิวคลีโอไทด์เก่า แสดงดังรูปที่ 2.12a ดังนั้น เมื่อ de novo pathway ถูกบล็อก

คือมีการปรากฏของ aminopterin ดังนั้นเซลล์จะมีชีวิตอยู่รอดได้โดยใช้ salvage pathway ที่จะขึ้นอยู่กับ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) (เป็นตัวเริ่มต้นในการสังเคราะห์ guanosine monophosphate; GMP และ adenosine monophosphate; AMP จาก hypoxanthine) และ thymidine kinase (TK) ซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการช่วยสร้าง thymidylate ถ้าเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงอยู่ใน HAT medium (ประกอบด้วย aminopterin และเสริมด้วย hypoxanthine และ thymidine) จะมีเพียงเซลล์ที่สามารถสร้าง HGPRT และ TK อย่างใดอย่างหนึ่งก็สามารถมีชีวิตรอดได้ ในทางตรงกันข้าม เซลล์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองนี้ได้ และการปรากฏของ aminopterin ก็จะทำให้ตาย ดังนั้นการใช้อาหาร HAT medium จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการหลอมรวมเซลล์ เพื่อให้มั่นใจถึงการมีชีวิตของเซลล์ที่ได้หลอมรวมกัน [58] จากรูปที่ 2.12b aminopterin ที่จะบล็อกการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในเส้นทาง de novo pathway และเซลล์มัยอีโลมาที่ใช้ในการหลอมรวมกับเซลล์ม้าม จะถูกออกแบบมาให้ไม่สามารถสร้าง HGPRT<sup>-</sup> จึงไม่สามารถใช้ hypoxanthine ได้ ดังนั้น เซลล์มัยอีโลมาจะไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งสองเส้นทาง คือ de novo pathway และ salvage pathway เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่เกิดการหลอมรวม หรือเซลล์มัยอีโลมาที่หลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในอาหาร HAT medium มีแต่เซลล์ไฮบริดมาระหว่างเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา และเซลล์ม้ามที่สามารถมีชีวิตรอดได้ เนื่องจากเซลล์ม้ามมีความสามารถในการสร้าง HGPRT<sup>+</sup> ที่นำเอา hypoxanthine มาใช้สร้าง guanine จึงนำไปสร้างนิวคลีโอไทด์ได้

#### - การคัดเลือกโคลน

เซลล์เกิดการแบ่งเซลล์ โดยโครโมโซมจากพ่อแม่จาก 2 จีโนม จะถูกแบ่งแบบอิสระจนกระทั่งได้เซลล์ไฮบริดมาอยู่ในสถานะ diploid state หลังจากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริดโตมาที่สร้างแอนติบอดีสารเรา จะทำการคัดเลือกหนึ่งโคลนที่มีความจำเพาะในการหลั่งแอนติบอดีจากประชากรของเซลล์ไฮบริดโตมา โดยจะมีการเลี้ยงเซลล์ในงานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ด้วยการเจือจางเซลล์ เพื่อให้ได้ 1 เซลล์ในแต่ละหลุม หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มแบ่งตัวและสร้างจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อมีจำนวนเซลล์มากพอ จะทำการตรวจระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจน โดยในแต่ละหลุมควรที่จะสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเดียว เพราะเซลล์ที่เจริญในหลุมควรที่จะเกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว เรียกว่า มอนอโคลน (monoclonal) ในระหว่างขั้นตอนนี้ น้ำเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมจะ

ถูกใช้ตรวจการสร้าแอนติบอดี ในการทดลองนี้ต้องการได้โคลนเพื่อที่จะทำการขยายจำนวน มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

#### 4) ขยายเซลล์ (expansion of clone)

หลังจากตรวจสอบความจำเพาะของโคลน จะทำการขยายจำนวนเซลล์ เพื่อผลิตแอนติบอดี ให้ได้ปริมาณมาก กระบวนการขยายจำนวนเซลล์ขึ้นอยู่กับความจำเป็นและจำนวนแอนติบอดีที่ ต้องการ มี 2 วิธีที่ใช้ในการขยายปริมาณของโคลน ดังนี้

##### - วิธี in vitro

ในวิธีนี้เซลล์ถูกเลี้ยงเพิ่มปริมาณและเคลื่อนย้ายลงภาชนะที่ใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ (เช่น 96-, 48-, 24-, 12-, และ 6- หลุมต่อเพลท) เพื่อให้เซลล์มีอาหารและพื้นที่ที่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโต หลังจากนั้นเซลล์จะถูกเคลื่อนย้ายลงใน tissue culture flask ที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป เมื่อได้ จำนวนเซลล์ที่มากพอ สามารถที่จะเก็บบางส่วนเป็นเซลล์แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมาก (ultra-low temperatures) โดยเซลล์แช่แข็งเหล่านี้สามารถที่จะนำกลับมาเลี้ยงเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อใหม่ได้

##### - วิธี in vivo

ในวิธีนี้โคลนที่สร้างแอนติบอดีจะถูกนำเข้าไปบริเวณช่องท้องของหนู และเซลล์ที่ถูกนำเข้าจะ มีการเจริญเป็นเนื้องอก แล้วแอนติบอดีจะหลั่งออกมาจากเซลล์เนื้องอกเหล่านั้น ออกมาเป็น ของเหลวในช่องท้อง (ascites fluid) ซึ่งวิธีนี้จะให้ปริมาณแอนติบอดีน้อยกว่าวิธี in vitro การขยาย จำนวนแอนติบอดีจะขึ้นอยู่กับความต้องการ การมีชีวิตอยู่ของหนู และความเชี่ยวชาญของ ผู้ปฏิบัติงาน

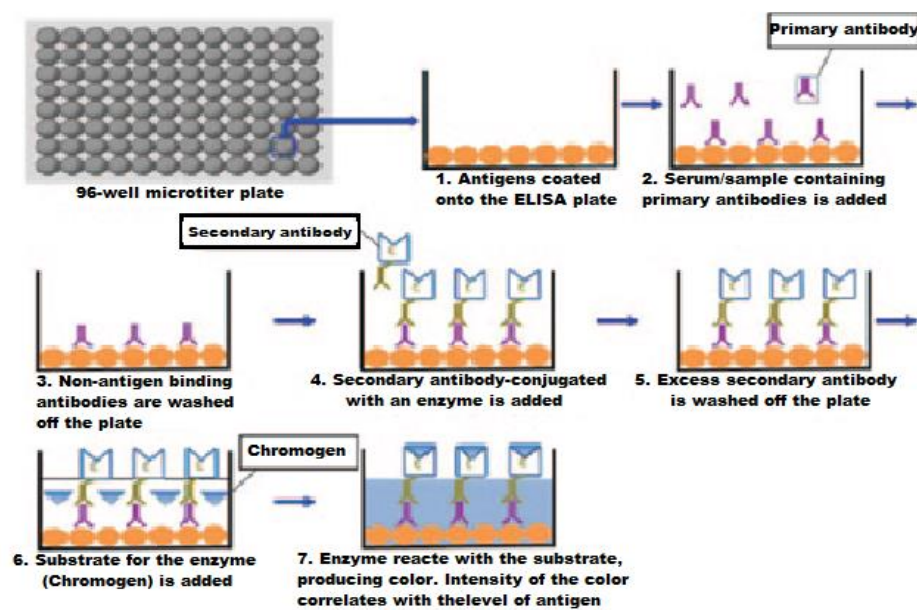
#### 5) การทำบริสุทธิ์แอนติบอดี (purification of monoclonal antibody)

บางครั้งไม่มีความจำเป็นมากในการทำบริสุทธิ์แอนติบอดี เนื่องจากสามารถนำเอาอาหาร เลี้ยงเซลล์ หรือของเหลวในช่องท้องไปใช้ได้โดยตรง ในกรณีที่จะทำบริสุทธิ์แอนติบอดี คือ 1. ความ เข้มข้นแอนติบอดีต่ำมาก จึงต้องการเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดี 2. ส่วนประกอบอื่นๆ ในอาหาร เลี้ยงเซลล์ หรือของเหลวในช่องท้องรบกวนการนำไปทดสอบอื่นๆ 3. แอนติบอดีถูกใช้ในวัตถุประสงค์

ของการบำบัดรักษา 4. แอนติบอดีถูกใช้ในวัตถุประสงค์ของการตรวจวินิจฉัย หรือ 5. แอนติบอดีต้องถูกนำมาใช้ติดฉลากด้วย Horse Radish Peroxidase (HRP) ด้วย alkaline phosphatase ด้วย fluorescent dye และอื่นๆ สำหรับรูปแบบการนำไปใช้เหล่านี้จำเป็นที่จะต้องทำบริสุทธิ์ มอนอโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งวิธีทำบริสุทธิ์สำหรับมอนอโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำได้หลากหลาย แต่วิธีที่นิยมมากในการทำบริสุทธิ์แอนติบอดีคือ affinity column chromatography [51, 59]

### 2.1.11 หลักการ Enzyme linked-immunosorbent assay

Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีการตรวจสอบทางชีวเคมี เป็นชื่อเรียกอย่างกว้างขวางทางด้านปฏิบัติการด้านการแพทย์ การผลิตผลิตภัณฑ์ในการตรวจวินิจฉัย และในการประเมินคุณภาพและทดสอบความชำนาญขององค์กร การค้นพบและพัฒนาวิธีนี้ในปี ค.ศ. 1960 ด้วยการติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการตรวจสอบแบบ immunoassay และนำไปใช้ก่อนปี ค.ศ. 1970 ถึง ค.ศ. 1980 [60] เทคนิค ELISA ใช้แอนติบอดีและการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยเอนไซม์ เพื่อตรวจสอบแอนติเจนแต่ละตัว (โปรตีน เปปไทด์ ฮอร์โมน และอื่นๆ) หรือแอนติบอดีในตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 2.13 มีหลากหลายชนิดของ ELISA ที่ดัดแปลงขั้นตอนพื้นฐานที่แตกต่างกัน เพื่อให้เหมาะแก่การนำไปใช้งาน



รูปที่ 2.13 เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ใช้ในการตรวจสอบแอนติเจน [60]

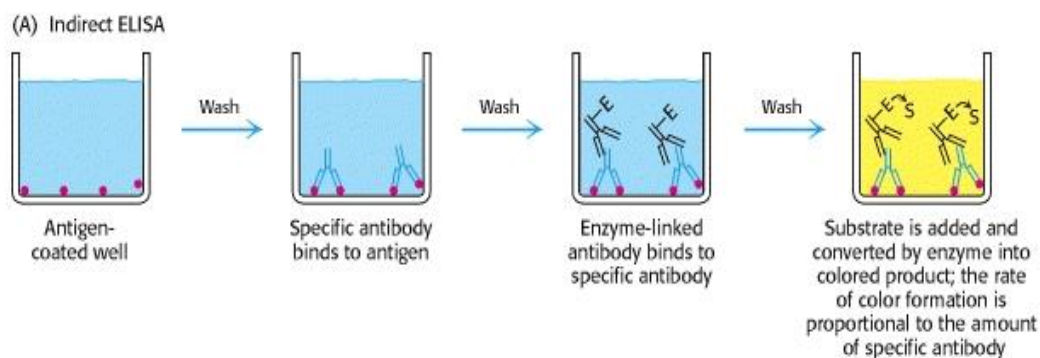
หัวใจสำคัญของเทคนิค ELISA คือการตรวจสอบแอนติเจนด้วยวิธีทางตรง (direct) และทางอ้อม (indirect) โดยการเคลือบแอนติเจน หรือแอนติเจนที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากลงบนพื้นผิวหลุมของจานทดสอบ ELISA นอกจากนี้แอนติเจนยังสามารถจับกับแอนติบอดีเป็นดังรูปแบบแซนวิช (sandwich) คือ การจับระหว่างแอนติบอดีที่ถูกเคลือบกันหลุมจับกับแอนติเจนแล้วแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบถูกเติมลงมาจับกับแอนติเจนอีกที ถ้าแอนติเจนที่มีขนาดเล็กและมีเพียง 1 อีพิโทป (epitope) สามารถวัดการจับกับแอนติบอดีด้วยวิธี competitive method ซึ่งจะใช้แอนติเจนที่ถูกติดฉลาก แข่งขันกับแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลาก เพื่อต้องการจับกับแอนติบอดีให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน หรืออาจจับขึ้นระหว่างแอนติบอดีที่ถูกติดฉลาก เกิดการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่ถูกเคลือบบนพื้นผิวหลุมกับแอนติเจนในตัวอย่าง [61]

#### 2.1.11.1 รูปแบบของ ELISA

##### 1) Indirect ELISA

ตัวอย่างจะต้องถูกตรวจสอบความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบติดอยู่ที่พื้นผิวของหลุมของจานทดสอบ ELISA (microtiter plate) หลังจากนั้นทำการบล็อก เพื่อปกปิดส่วนที่เหลือที่แอนติเจนไม่จับ ลดการจับแบบไม่จำเพาะ (ใช้สารละลายโปรตีนที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนของเรา และให้ค่าตัวควบคุมลบ (negative control) ที่ต่ำที่สุด) แอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) จะจับจำเพาะกับแอนติเจน เมื่อมีการเติมแอนติบอดีตัวแรกลงไป หลังจากนั้นจะทำการเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme-conjugated secondary antibody) สับสเตรต (substrate) จะถูกนำมาใช้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่มีในหลุมจะขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติบอดีตัวที่สองที่จับกับแอนติบอดีตัวแรก แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีหลังจากการเกิดปฏิกิริยา ดังแสดงรูปที่ 2.14 ดังนั้นการปรากฏของแอนติบอดีตัวแรกจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มของสี มีการนำวิธี indirect ELISA ไปใช้ แสดงในงานวิจัยของ Haapakoski, R. และคณะ (2013) [62] โดยพวกเขาได้ทำการตรวจสอบกิจกรรมของ Toll-like receptor ระหว่างการหาความไวต่อสารก่อภูมิแพ้ที่ผิวหนังจะใช้ ovalbumin (OVA) ในการปรับระดับอาการแพ้ โดยข้อเสียของเทคนิค indirect ELISA คือแอนติเจนที่เคลือบอยู่ที่ผิวจะถูกตรึงแบบไม่จำเพาะเจาะจงบนพื้นผิว ดังนั้นการทดสอบหาแอนติเจนในซีรัม โปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในซีรัมก็จะถูกเคลือบอยู่บนผิวของหลุมจานทดสอบ ELISA ด้วย ซึ่ง

ข้อจำกัดนี้ สามารถที่จะแก้ไขได้ โดยจะใช้แอนติบอดีเป็นตัวจับกับแอนติเจนที่จำเพาะ เพื่อคัดเลือกแอนติเจนออกจากซีรัม ซึ่งจะเป็นการใช้เทคนิค Sandwich ELISA ที่แสดงในรูปแบบถัดไป



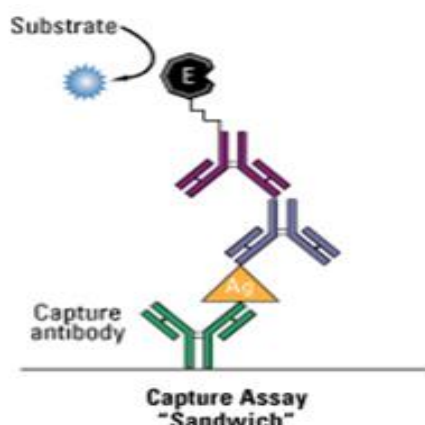
รูปที่ 2.14 Indirect ELISA

ที่มา: <https://exploreable.wordpress.com>

## 2.) Sandwich ELISA

เทคนิคในรูปแบบแซนวิช ถูกใช้เพื่อบ่งบอกความจำเพาะต่อแอนติเจนในตัวอย่าง พื้นผิวของหลุมจะถูกเตรียมด้วยแอนติบอดีตัวเคลื่อน (capture antibody) ที่จับจำเพาะกับแอนติเจนที่รู้ปริมาณของแอนติบอดีที่แน่นอน หลังจากการเคลือบแอนติบอดีแล้ว จะถูกบล็อกด้วยอัลบูมิน (bovine serum albumin) หลังจากนั้นแอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกเติมลงจาทดสอบ ELISA แอนติบอดีตัวแรกที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจะถูกเติมลง ซึ่งจะเห็นลักษณะรูปแบบเป็นดังแซนวิช ดังแสดงในรูปที่ 2.15 แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จะถูกลงไปจับกับแอนติบอดีตัวแรก โดยแอนติบอดีตัวที่สองที่ไม่จับกับแอนติบอดีตัวแรกจะถูกล้างออก สับสเตรตจะถูกเติมและสารละลายจะถูกเปลี่ยนสีด้วยเอนไซม์ ซึ่งสีที่เกิดขึ้นสามารถบ่งบอกปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างได้ ในปี 2013 Canady, J. และคณะ [63] ได้ทำการวิเคราะห์ซีรัมจากผู้ป่วยด้วยเทคนิคแซนวิช ในการช่วยตรวจสอบระดับ keratinocyte growth factor (KGF) ในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลนูน (keloid) และ โรคหนังแข็ง (scleroderma) โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยสุขภาพดีเป็นตัวควบคุม ข้อดีของการใช้แอนติบอดีตัวจับ ที่มีความจำเพาะกับแอนติเจน คือจะช่วยกำจัดปัญหาเรื่องการต้องเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์จากแอนติเจนอื่นๆ



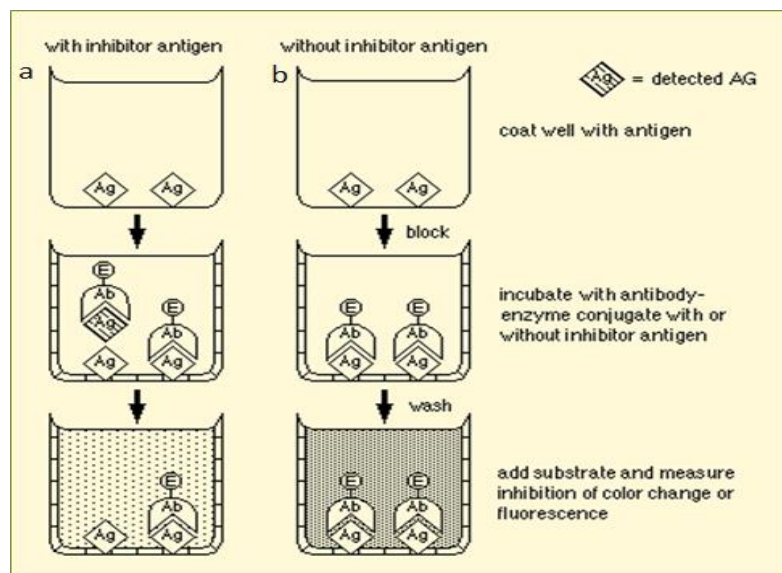


รูปที่ 2.15 Sandwich ELISA  
ที่มา: <http://www.rajaha.com>

### 3.) Competitive ELISA

เป็นเทคนิคที่มีกระบวนการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างและแอนติเจนที่จับอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ต่อแอนติบอดีตัวแรก ในเริ่มแรก ตัวอย่างที่มีแอนติเจนจะถูกเติมลงในหลุม ซึ่งภายในหลุมมีแอนติเจนตัวเดียวกันได้ติดอยู่บนพื้นผิวหลุม แล้วแอนติบอดีตัวแรกจะถูกเติมลงไปเพื่อจับกับแอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างและแอนติเจนที่ติดอยู่บนพื้นผิวหลุม แอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนที่ได้ติดบนพื้นผิวจะถูกล้างออก แอนติบอดีตัวที่สองถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์จะถูกเติมลงในหลุม ตามด้วยสับสเตรตที่ทำให้สีหรือทำให้เกิดการเรืองแสง การไม่ปรากฏสีจะบ่งบอกได้ว่ามีแอนติเจนอยู่ในตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 2.16 ข้อดีหลักของวิธี competitive ELISA คือ ให้ค่าความไวสูงเมื่อแอนติเจนอยู่ในสารละลายผสมที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน แม้ว่าจะพบแอนติเจนอยู่ปริมาณเล็กน้อย วิธีนี้ยังสามารถใช้ในการหาสารสกัดมาตรฐานที่ทำให้เกิดการแพ้ในสหรัฐอเมริกาได้ [64] และใช้การวัดปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดต่อโพลีแซคคาไรด์ของ *Haemophilus influenzae* ชนิด b ในซีรัมของมนุษย์ เพื่อวัตถุประสงค์ในการนำไปทำเป็นวัคซีน [65] เทคนิค Competitive ELISA ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ HIV ในซีรัมผู้ป่วย โดยแอนติเจน HIV จะถูกเคลือบอยู่บนจานทดสอบ ELISA และเติมแอนติบอดี 2 ชนิดที่จำเพาะกับแอนติเจนลงในหลุม (แอนติบอดีตัวแรกจะถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์และแอนติบอดีจากผู้ป่วย) จะมีการแข่งขันเกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดี 2 ชนิด ด้วยแอนติเจนตัวเดียวกัน ถ้าแอนติบอดีมีอยู่ในซีรัม จะเกิดจับกับ

แอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิว จะมีแอนติเจนจำนวนน้อยมากที่จับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากได้ ส่วนมากแอนติบอดีที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ไม่ได้จับกับแอนติเจนก็จะถูกล้างออก การไม่ปรากฏของสีคือตัวอย่างนั้นมีแอนติบอดีต่อ HIV



รูปที่ 2.16 Competitive ELISA a) ตัวอย่างมีแอนติเจน b) ตัวควบคุมลบ  
ที่มา: <http://www.gopixpic.com>

ข้อจำกัดของเทคนิค ELISA คือ มีการเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีที่ใช้เอนไซม์เป็นตัวกลาง จะเกิดขึ้นไปเรื่อยๆ ไม่สิ้นสุด เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่ยาวนานเกินไป และสีของปฏิกิริยาที่เข้มมากจะสะท้อนถึงจำนวนของแอนติบอดีที่ปรากฏ จะทำให้ผลที่ได้ไม่ถูกต้องเนื่องจากเกิดผลบวกเทียม (false positive) และการจับของแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่บริเวณบนพื้นผิวจานทดสอบ ELISA จะนำไปสู่ผลบวกเทียมที่สูงมาก ทั้งวิธีของ “indirect” และ “sandwich” ELISAs สามารถใช้ในการตรวจสอบแอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ ส่วนในวิธีที่ใช้กระบวนการแข่งขันสามารถใช้ในการตรวจสอบส่วนประกอบที่มีความแตกต่างกันและมีแอนติเจนอยู่ภายในส่วนผสมนั้นด้วยความไวที่สูง แม้จะมีแอนติบอดีที่จำเพาะในปริมาณเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้เทคนิค ELISA ยังสามารถนำมาใช้ในการออกแบบเพื่อให้พร้อมในการใช้งาน เป็นชุดตรวจสอบที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ และมีความสามารถในการตรวจสอบสารต่างๆ สำหรับประชากรจำนวนมากที่ขาดแคลนเงินทุนในการดูแลสุขภาพตัวเองได้ (low resource settings)

## 2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แคปปา เคซีนเป็นโครงสร้างหลักที่ช่วยในการสร้างเป็นโครงสร้างเคซีนไมเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งแคลเซียมและฟอสฟอรัส จึงมีการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปปา เคซีน [66] โดยใช้เทคนิคการหลอมรวมเซลล์ เมื่อได้ MAb แล้วจะทำการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีภายในห้องทดลอง ทำบริสุทธิ์แอนติบอดีด้วยวิธี Fast protein liquid chromatography แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อแคปปา เคซีน และเคซีนผสมทุกไอโซโทป แต่ไม่จับกับโปรตีนอื่นๆ ในน้ำนมวัวด้วยเทคนิค ELISA ความไวของแอนติบอดีคือ  $0.3 \times 10^{-4}$  nM/ml ที่ทำการทดสอบด้วยเทคนิค radioimmunoassay นอกจากนี้ Konrad M. และคณะ (1990) ก็ได้ทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแคปปา เคซีน ผลิตได้ 2 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะมากต่อโบรินแคปปา เคซีน และใช้เทคนิค western analysis ของแคปปา เคซีนในรูปที่เสียสภาพมาใช้ เพื่อหาความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) นอกจากนี้ได้นำ chymosin และ neuraminidase มาใช้ในการทดสอบ พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะกับ Pro-Thr-Thr ที่ตำแหน่ง 92 ถึง 94 และ 134-136 [67]

การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโบรินแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน ( $\alpha_5$ -CN) และบีตา เคซีน ถูกผลิตขึ้น เนื่องจากโบริน บีตา เคซีน และโบรินแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน พบรวมกันมากถึง 80% ของเคซีนทั้งหมด ได้ 2 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโบรินแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน ที่มีค่าความไว  $1.63 \times 10^{11}$  และ  $2.13 \times 10^{11}$  M<sup>-1</sup> และได้ 5 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโบรินบีตา เคซีน ด้วยความไว  $>10^9$  M<sup>-1</sup> ด้วยเทคนิค competitive solid-phase RIA และไอโซโทปทั้งหมดเป็น IgG<sub>1</sub> ซึ่งสามารถจับจำเพาะกับแอนติเจนได้ทั้งในรูปที่เสียสภาพหรือไม่เสียสภาพ ใช้เทคนิค solid-phase indirect radioimmunoassay ในการทดสอบการสร้างแอนติบอดีหลังการหลอมรวมเซลล์ ใช้เทคนิค limiting dilution ในการชักโคลนเพื่อให้ได้มอนอโคลนอลแอนติบอดี นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่มีต่อแอนติเจนด้วย [68] มีการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโบรินบีตา เคซีน [69] ได้จำนวน 1 มอนอโคลนอลแอนติบอดี ทำการทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยเทคนิค Enzyme immunoassay (บล็อกด้วย 1% (w/v) ovalbumin solution; OVA) ทำการย่อยเพื่อให้ได้เปปไทด์ของบีตา ซีน ด้วยเอนไซม์ tryptic และแยกแต่ละเปปไทด์ด้วย

HPLC พบว่าเปปไทด์ของบีตา เคซีน ช่วง 184 ถึง 202 สามารถจับกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์ IgG<sub>1</sub> และทดสอบความสามารถในการจับด้วยเทคนิค competitive radioimmunoassay ต่อมาทีมงานวิจัยที่ทำการเตรียมและศึกษาคุณลักษณะ มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโบรินบีตา เคซีน โดยเตรียมแอนติบอดีด้วยการหลอมรวมเซลล์ ได้ มอนอโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลน เป็น IgG<sub>1</sub> แล้วทดสอบการความจำเพาะของแอนติบอดีต่อบีตา เคซีน และส่วนของบีตา เคซีน (proteolytic fragment) ด้วยเทคนิค ELISA พบว่ามอนอโคลนอล แอนติบอดีทั้ง 3 มีรูปแบบความจำเพาะที่เหมือนกัน และขยายจำนวนเซลล์ด้วย roller bottles หรือ ผลิตใน hollow-fiber bioreactor โดยทำการเลี้ยงในสภาวะที่ปลอดจากซีรัม ทำบริสุทธิ์แอนติบอดี ด้วย protein G- Sepharose 4 FF แล้วนำมาทดสอบความบริสุทธิ์แอนติบอดีด้วย SDS-PAGE [12] นอกจากนี้ Senocq D. และคณะ (2001) ทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีและศึกษา คุณลักษณะแอนติบอดีต่ออิพิโทปต่อบีตา เคซีน หลอมรวมเซลล์ลิมโฟไซโตจากต่อมน้ำเหลือง (lymph node) กับเซลล์มัยอีโลมาเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาด้วย 2 เทคนิค คือ mass fusion และ filter fusion นำเทคนิค ELISA มาใช้การหาเซลล์ไฮบริโดมาที่หลังแอนติบอดี หาความจำเพาะต่อแอนติเจน และทำ antigenicity mapping (ใช้ gelatin เป็นตัวบล็อก) ได้จำนวน 21 เซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะแตกต่างกัน และถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามตำแหน่งอิพิโทปที่แอนติบอดีจับได้ นอกจากนี้วิธี filter fusion ให้ไอโซไทป์ที่แตกต่างกัน คือ IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub> ในขณะที่การหลอมรวมเซลล์ ด้วยวิธีอื่นให้แอนติบอดีที่เป็น IgG<sub>1</sub> อย่างเดียว [70]

การนำเทคนิค immunochromatography มาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของซีสจาก นมแกะด้วยนมวัว [71] ซีสจากนมแกะเป็นซีสที่นิยมรับประทานในตุรกี แต่พบปัญหามากในเรื่องการ ปนเปื้อนจากนมวัว การทดสอบทำได้โดยใช้เมมเบรนที่มีการเคลือบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ และ ตรวจสอบด้วย anti-bovine immunoglobuline G ที่ติดฉลาก หากมีการปนเปื้อนของนมวัวใน ซีสนมแกะ จะเกิดแถบสีขึ้น ต่อมา Song H. และคณะ (2011) ได้ทำการพัฒนาการตรวจสอบ เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของนมวัวในนมแพะและผลิตภัณฑ์ในประเทศจีน จะใช้ PAb ที่จำเพาะต่อบีตา เคซีน และทำการดัดแปลงโดยการผสม PAb ลงใน lyophilized Saanen goat b-casein ที่ใช้เป็นตัวบล็อก เพื่อพัฒนาความจำเพาะของแอนติบอดี แอนติบอดีที่ถูกบล็อกถูก นำมาใช้ ซึ่งจะจดจำอิพิโทปที่จำเพาะของโบรินบีตา เคซีน ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

กับ แอลฟา<sub>5</sub> เคซีน แคปทา เคซีน และเวย์โปรตีน ผลการทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ทำให้เห็นความสัมพันธ์ความเข้มข้นของนมวัวที่ปนเปื้อนอยู่ในช่วง 2 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบด้วย ELISA เหมาะสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนนมวัวในนมแกะในชีวิตประจำวันได้ ซึ่งวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการหาคือ kjeldahl ซึ่งเป็นวิธีการหาโดยทางอ้อมจากปริมาณไนโตรเจน [72] ในวิธีของ Zhou Y. และคณะ, 2013 ได้มีการนำวิธีการตรวจสอบตัวอย่างนมวัว ด้วยการตรวจหาบีตา เคซีน จากเทคนิค double-antibody บนพื้นฐานวิธี immunoassay ซึ่งสามารถตรวจตัวอย่างทางตรง ทำการทดลองโดยใช้ MAb เป็นแอนติบอดีตัวเคลื่อน และติดฉลาก PAb ด้วย HRP เป็นตัวตรวจสอบ สามารถที่จะตรวจสอบบีตา เคซีน ในช่วง 0.1-10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจสอบได้จำนวนน้อยสุดได้ที่ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลการทดสอบที่มีความแม่นยำของผลการทดสอบที่ดีกว่าเทคนิค kjeldahl นอกจากนี้ เทคนิค double-antibody ไม่ต้องการเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบอีกด้วย [73]

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

- หนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

- เซลล์มัยอีโกลมา P3-X63Ag8 จาก American Type culture collection (ATCC; TIB-9)

#### 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย

ลำดับที่	เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1	กระดาษกรอง	บริษัท Whatman, Germany
2	กระบอกฉีดยาขนาด 1, 5 มิลลิลิตร	บริษัท Nipro, Japan
3	กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)	บริษัท Nikon, Japan
4	ขวดแก้วขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร	บริษัท Boro, Germany
5	เข็มขนาด 18G และ 21G	บริษัท นิโปร, Thailand
6	เครื่องกวนสาร (stirrer)	บริษัท เบคไทย, Thailand
7	เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)	บริษัท Udono-Rll memmert, Japan
8	เครื่องปั๊ม (pump)	บริษัท Iwaki, Japan
9	เครื่องผสมสาร (vortex)	บริษัท Scientific Industries, Inc., USA
10	เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	บริษัท Metter Toledo, USA
11	เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	บริษัท Hettich Zentrifugen, Germany
12	เครื่องให้ความร้อน (hot plate)	บริษัท ทริกุล กรุ๊ป จำกัด, Thailand
13	เครื่อง Microplate reader	บริษัท SynergyMx, USA
14	เครื่อง Microplate reader	บริษัท Titerlek multiskan, Finland
15	งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	บริษัท Nunc, Denmark

ลำดับที่	เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
16	จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเล็ก ใหญ่	บริษัท Corning Incorporated, USA
17	จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-, 24-, 96- หลุม	บริษัท Corning Incorporated, USA
18	ตัวกรองสารขนาดเล็ก	บริษัท Merck Millipore, USA
19	ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	บริษัท ธเนสพัฒนา, Thailand
20	ตู้บ่มเซลล์แบบแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	บริษัท Thermo Electron Corporation, USA
21	ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	บริษัท Mitsubishi Electric, Japan
22	ตู้อบแห้ง (oven)	บริษัท เบคไทย, Thailand
23	ตู้ laminar class II	บริษัท International Scientific Supply, Thailand
24	ถังไนโตรเจนเหลว	บริษัท Harsco Corporation, USA
25	ถุงมือยางธรรมชาติ	บริษัท ด็อกเตอร์ ปู จำกัด, Thailand
26	ถุง dialysis	บริษัท CelluSep, USA
27	ปิเกอร์ขนาด 50-500 มิลลิลิตร	บริษัท Boro, Germany
28	ปิเปตแก้ว	บริษัท HBG, Germany
29	ปิเปตอัตโนมัติ	บริษัท Gilson, France
30	มีดเฉาะเลือดหนู	บริษัท FEATHER Safety Razor, Japan
31	ไมโครปิเปต	บริษัท Eppendorf Co., Ltd., Thailand
32	ไมโครปิเปตชนิดมัลติชาแนล	บริษัท PZ HTL S. A., Poland
33	หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง	บริษัท Nunc, Denmark
34	หลอดเก็บเลือด eppendorf	บริษัท Axygen, USA
35	หลอดทดลองขนาด 15, 50 มิลลิลิตร	บริษัท CLP, USA
36	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	บริษัท Memmert, Germany

### 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีสำหรับวิจัย

ลำดับที่	สารเคมี	แหล่งที่มา
1	Albumin from chicken egg white (A7642)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
2	Alpha-casein from bovine milk (C6780)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3	Alpha-lactalbumin from bovine milk (L6010)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
4	Aminopterin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
5	Beta-casein from bovine milk (C6905)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
6	Beta-lactoglobulin from bovine milk (L3908)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
7	BCA <sup>TM</sup> protein assay kit	บริษัท Pierce, USA
8	Bovine serum albumin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
9	Casein (c3400)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
10	Casein hydrolysate for microbiology (22090FLUKA)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
11	Casein sodium salt from bovine milk (C8654)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
12	Citric acid	บริษัท Merck, Germany
13	D-glucose	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
14	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	บริษัท Fluke, Switzerland
15	Disodium hydrogenphosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	บริษัท Merck, Germany
16	Ethanol	บริษัท Merck, Germany
17	Fetal calf serum	บริษัท Invitromax, USA
18	Freund's complete adjuvant	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
19	Freund's incomplete adjuvant	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
20	Gentamicin	บริษัท T. P. drug laboratories, Thailand
21	Goat anti-mouse IgG- HRP; GAM- HRP	บริษัท Jackson Immuno, USA
22	holo-Transferrin human (T0665)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA



ลำดับที่	สารเคมี	แหล่งที่มา
23	Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	บริษัท Fluka, Switzerland
24	Hypoxanthine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
25	Immunoglobulin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
26	Insulin from bovine pancreas (I6634)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
27	Isoflurane	บริษัท Aesica Queenborough Limited, UK
28	Isotyping kit	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
29	Kappa-casein from bovine milk (C0406)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
30	L-glutamine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
31	3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
32	Polyethylene glycol	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
33	Protein G sepharose	บริษัท GE Healthcare, UK
34	Pyruvic acid	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
35	RPMI 1640 medium	บริษัท Biochrom AG, Germany
36	Skim milk	บริษัท Anline, Thailand
37	Sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
38	Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	บริษัท Merck, Germany
39	Sodium chloride (NaCl)	บริษัท Merck, Germany
40	Sodium dihydrogen phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	บริษัท Carlo Erba, USA
41	Sodium pyruvate	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
42	Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	บริษัท Merck, Germany
43	Thymidine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
44	Tween 20	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

### 3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของโบรินเคซิน

ผสมโบรินเคซินที่ละลายใน normal saline solution (NSS) มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัวสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธุ์ BALB/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ เข้าบริเวณช่องท้อง ฉีดซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ด้วยแอนติเจนเดิมที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 อีกจำนวน 3 ครั้ง หลังจากหลังการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือด โดยเจาะเลือดจากหางหนูมาตรวจหาการตอบสนองการสร้างแอนติบอดี (ไตเตอร์) ด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อได้ค่าไตเตอร์ที่สูงพอแล้ว ทำการกระตุ้นหนูครั้งสุดท้ายด้วยแอนติเจนของโบรินเคซินก่อนนำไปหลอมรวมเซลล์ในวันที่ 4 หลังการกระตุ้น

#### 3.4.2 เตรียมซีรัม (serum)

หลังการเจาะเลือดจากหางหนู ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,700xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใส หรือซีรัมออกมาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4.3 ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยโบรินเคซินความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 ที่มี 0.05% (v/v) tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมตัวบล็อก ได้แก่ 5% (w/v) นมถั่วเหลือง, 5% (w/v) หางนม, 1% (w/v) เจลาติน และ 1% (w/v) แอลบูมิน หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (ซีรัมหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) ที่ทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:500-1:512,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิจากแพะที่มีความจำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมต่อกับฮอสตราดดิซเปอร์ออกซิเดส (goat anti-mouse IgG-HRP; GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วนการเจือจาง 1: 10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินออกด้วย PBS-T เติม

สารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 1.25 mM 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) และ 0.034% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1.0 M กรดซัลฟิวริก (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

#### 3.4.4 เตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อโบริเวโนเคซิน

##### 3.4.4.1 เตรียมเซลล์มัยอีโลมา (myeloma)

นำเซลล์มัยอีโลมา P3-X63Ag8 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัวในท้องแม่ (fetal calf serum; FCS) ด้วยความเข้มข้น 10% (v/v) จะทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 4-5 วัน ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในการหลอมรวมเซลล์ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตในจำนวนที่มากกว่า 10<sup>7</sup> เซลล์ และนำเซลล์มัยอีโลมาไปปั่นล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 มีเจนนามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มเข้าอีก 10 มิลลิลิตร จะได้เซลล์มัยอีโลมาสำหรับหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

##### 3.4.4.2 การเตรียมสารตัวกลางสำหรับหลอมรวมเซลล์

ซังโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3000 กิโลดาลตัน ปริมาตร 5 มิลลิกรัม นำไป autoclave เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ ทำให้ละลายด้วยการอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส สังเกตให้ PEG ละลายจนหมด แต่ให้สารละลายอุ่นๆ แล้วจึงเติม RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ 50% (w/v) PEG แบ่งใส่หลอดหลอดละ 1 มิลลิลิตร ปฏิบัติการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาใช้ให้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้อควรระวัง ต้องละลาย PEG ไม่ให้ตกตะกอน และไม่ร้อนเกินไปเมื่อทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

##### 3.4.4.3 เตรียมเซลล์ม้าม

ทำการสลบหนูตัวด้วยไอโซฟลูเรน (isoflurane) ทำการเจาะเลือดจากหัวใจเพื่อเก็บซีรัม เพื่อเตรียมไว้เป็นซีรัมในการใช้เป็นตัวควบคุมบวกด้วยวิธี indirect ELISA ทำความสะอาดบริเวณส่วนท้องด้วย 70% (v/v) เอทานอล จากนั้นทำการเปิดช่องท้องโดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อนำม้ามออกมา ใช้

กรรไกรตัดส่วนของไขมันที่ติดมาบริเวณรอบม้าม แล้วจึงตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ ใช้ตำของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด แล้วนำเซลล์ม้ามที่ได้ไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที 1-2 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำเซลล์ม้ามไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาที่เตรียมไว้

#### 3.4.4.4 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมา

นำเซลล์ม้ามมาผสมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา อัตราส่วนความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1: 2 โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 380xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเขย่าเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองรวมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วค่อยๆ เติมน้ำละลาย 50% PEG ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงไปในตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ภายใน 1 นาที และเขย่าหลอดเบาๆ นาน 1 นาที ล้าง PEG ออกด้วย RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ดูดชั้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 380xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้าง PEG ออกจากเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT medium (Hypoxanthine, Aminopterin, and Thymidine medium) ที่มี 20% (v/v) FCS ลงไป นำไปเพาะเลี้ยงบนจานชนิด 96 หลุมหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังการหลอมรวมเซลล์ พยายามอย่าเคลื่อนย้ายเซลล์ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ ให้สังเกตเซลล์ในแต่ละหลุมว่าเมื่อผ่านไป 10-14 วัน เซลล์ไมอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะตาย ต้องสังเกตและติดตามเซลล์ไฮบริโดมาพร้อมกับการเปลี่ยนอาหาร จะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 2 อาทิตย์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT แล้วดูอาหารเก่าออกประมาณครึ่งหลุมเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ใหม่ลงไป เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นที่หลุมจะดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 ไมโครลิตร มาตรวจหาการจับกันของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของโปวินเคซินโดยวิธี ในข้อ 3.4.3 จะทำการเปลี่ยนอาหารให้เซลล์มีชีวิตอยู่ในอาหาร HT ประมาณ

2 อาทิตย์ แล้วจึงเปลี่ยนมาใช้ RPMI 1640 ที่มี 20% (v/v) FCS และเปลี่ยนเป็น 10% (v/v) FCS ตามลำดับ

#### 3.4.5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อโบรินเคซิน

ขั้นตอนในการทดสอบจะเคลือบจานทดสอบ ELISA ด้วยโบรินเคซินที่ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาทดสอบ มาเติมตั้งขั้นตอนการเติมตัวอย่างและวิธีการตั้งข้อ 3.4.3 แล้วนำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นบวก เมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงจากซีรัมของหนูที่ไม่ได้ทำการฉีดกระตุ้น (normal mouse) มาทำการแยกให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution

#### 3.4.6 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี ต้องทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดเซลล์เพียงเซลล์เดียว นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโบรินเคซินที่ได้จากการคัดเลือกโดยวิธี indirect ELISA มาทำให้เป็นโคลนเดี่ยว โดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม ถ้ายังไม่ได้โคลนเดี่ยว จะทำซ้ำ 3-4 รอบ เพื่อให้แน่ใจว่าได้เป็นมอนอโคลน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเป็นโคลนเดี่ยวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นที่หลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาว่าเซลล์ยังคงมีแอนติบอดีต่อโบรินเคซินหรือไม่ด้วยวิธี indirect ELISA ถ้าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีต่อโบรินเคซิน จึงทำการขยายเซลล์เพิ่มจำนวน แล้วนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

##### 3.4.6.1 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 10% (v/v) FCS รอให้เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะเอ็กซโพเนนเชียล นำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 25% (v/v) FCS และ 10% (v/v) DMSO ในขณะที่เย็นประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสติกเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ก่อนย้ายไปแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

### 3.4.6.2 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงใหม่

นำ cryotube ที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งเซลล์แขวนลอยละลายจนมีลักษณะคล้ายวุ้น จึงดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป แล้วจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 20% (v/v) FCS แล้วค่อยเปลี่ยนเป็น 10% (v/v) FCS เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต

### 3.4.7 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

#### 3.4.7.1 ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

นำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปเคลือบหลุมจานทดสอบสำหรับทำ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย isotyping specific antibody ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนที่ไม่จับออกด้วย washing buffer (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบ (น้ำเลี้ยงเซลล์หรือแอนติบอดีบริสุทธิ์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มีเอนไซม์ HRP เชื่อมอยู่ โดยที่แอนติบอดีทุติยภูมิมีความจำเพาะกับส่วน Fab (HRP- Rabbit anti mouse IgG Fab specific) ของ IgG ของหนูที่เจือจาง 1: 2,000 ใน PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งแล้วเติม TMB และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน DMSO ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเป็นเวลา 10 นาที จึงเติม H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1.0 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

#### 3.4.7.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

##### 3.4.7.2.1 ตรวจสอบตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมสำหรับหาความไวและความจำเพาะของแอนติบอดี

ทำการเคลือบหลุมของจานทดสอบ ELISA ด้วยโบรินเคซินที่ความเข้มข้น 0 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่งชี้ด้วย 5% (w/v) หางนม, 1% (w/v) แอลบูมิน [12], 1% (w/v) เจลาตินใน PBS-T [70] 5% (w/v) นมถั่วเหลือง และ 5% (v/v) ซีรัมลูกวัว [67] และเติม

มอนอโคลนอลแอนติบอดี CN1F1 ถึง CN7F1 ซึ่งทำตามวิธี indirect ELISA มีขั้นตอนดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 3.4.3

#### 3.4.7.2.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

ความจำเพาะของมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะทดสอบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับสารอื่นหรือไม่ โดยการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งได้จากการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมามาทดสอบ ด้วยตัวบล็อกที่เหมาะสม จากหัวข้อ 3.4.7.2.1 โดยการเคลือบหลุมด้วยโบไวน์เคซีน (CN), แอลฟา<sub>s</sub> เคซีน ( $\alpha_s$ -CN), บีตา เคซีน ( $\beta$ -CN), แคปตา เคซีน ( $\kappa$ -CN), บีตา แล็กโทโกลบูลิน ( $\beta$ -Lg) อัลฟา แลตต์ลบูมิน ( $\alpha$ -la), แอลบูมิน (BSA), ทรานเฟอริน (transferrin), อินซูลิน (insulin) และ โอวัลบูมิน (OVA) ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (แกน X) กับสารต่างๆ (แกน y) และทำการจัดกลุ่มมอนอโคลนอลแอนติบอดีตามผลของความจำเพาะที่ได้

#### 3.4.7.3 การวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทปของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA

การทดสอบความจำเพาะต่ออีพิโทปของมอนอโคลนอลแอนติบอดี จะใช้หลักการของ Burdon R. H. และ van Knippenberg P. H. (1984) [74] โดยทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ทำการเคลือบหลุมจานทดสอบ ELISA ด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เนื่องจากเป็นช่วงแอนติเจนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นได้จากการที่ผสมแอนติบอดี 2 ตัว ซึ่งมีอีพิโทปแตกต่างกัน) เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางความเข้มข้นแต่ละมอนอโคลนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด นั่นคือ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดีก็ไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวทั้งหมดแล้ว ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมแต่ละโคลน ถูกนำมาหาความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค indirect ELISA (มีขั้นตอนดังหัวข้อ 3.4.3) แสดงการเติม MAb แต่ละตัวดังตารางที่ 3.3 และจำแนกระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่เติมแอนติบอดีตัวที่ 1 ( $A_1$ ) ที่เจือจาง X เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงของการเติมแอนติบอดีผสมของตัวที่ 1 กับตัวที่ 2 ( $A_{1+2}$ ) ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร แต่ความเข้มข้นผสมของแอนติบอดีตัวที่ 1 ยังคงเป็น X เท่าอยู่ โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของ  $A_1$  และ





#### 3.4.7.4 ทดสอบสัมพรรคภาพ (affinity) ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ทดสอบเจือจางความเข้มข้นของ MAb ทุกมอนอโคลนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1:1000 ถึง 1:16384000 ด้วยวิธี indirect ELISA ที่ความเข้มข้นแอนติเจน คือ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วได้ช่วงความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสมของแต่ละตัว เลือกช่วงความเข้มข้นของ MAb ที่เหมาะสมของทุกมอนอโคลน เริ่มทำการทดสอบสัมพรรคภาพของ MAb ด้วยเทคนิค indirect ELISA ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกเคลือบลงหลุมของจานทดสอบ ELISA และเติม MAb ช่วงความเข้มข้นที่เลือก และทำตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.4.3 หาก MAb ที่มีสัมพรรคภาพระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนสูงจะให้ความชันของกราฟสูง และ MAb ที่ให้สัมพรรคภาพระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนต่ำจะให้ความชันของกราฟต่ำ

#### 3.4.7.5 ทดสอบความไว (sensitivity) และปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของโบว์นเคซิน หรือ สารทดสอบที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 50% (50% of effective concentration; EC50) เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เคลือบโบว์นเคซินและสารที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ MAb กันหลุม ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และทำตามขั้นตอนของ indirect ELISA ที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า % Absorbance และแกน X เป็นค่าล็อกกาลีทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ และคำนวณค่า LOD ตามสูตร [ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่ได้เคลือบกันหลุมด้วยสาร + 3SD] นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟ จะได้ค่า LOD ออกมาในรูปของความเข้มข้น โดย SD คือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=20) และปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%CR) เกิดจากการนำค่า EC50 ของแอนติบอดีต่อโบว์นเคซิน และ EC50 ของแอนติบอดีต่อสารทดสอบอื่นๆ มาคำนวณได้จากสูตร

$$\%CR = \frac{EC50 \text{ ของเคซิน}}{EC50 \text{ ของสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

### 3.4.8 การทำบริสุทธิ์มอนอโคลนอลแอนติบอดี

#### 3.4.8.1 การเพิ่มจำนวนมอนอโคลนอลแอนติบอดีปริมาณมาก

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกคุณลักษณะที่ต้องการออกจาก -170 องศาเซลเซียส ตามกระบวนการนำเซลล์กลับมาเลี้ยงใหม่ (หัวข้อ 3.4.6.2) เลี้ยงเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 8 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ให้เจริญอยู่ในช่วง log phase ทำการขยายจำนวนลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้จำนวน 10 เพลท เพื่อทำการเลี้ยงขยายลงในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มี RPMI 1640 และ 10% (v/v) FCS อยู่ 800 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์โดยเขย่าขวดตลอดเวลาที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> (อาจใช้ spinner flask ในการเลี้ยงเซลล์ได้) สังเกตสีอาหารเลี้ยงเซลล์ และการมีชีวิตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากอาหารเลี้ยงเซลล์มีสีเหลือง และจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตายไปมากกว่า 60%ให้นำขวดอาหารที่มีเซลล์นี้กรองผ่านเมมเบรนเพื่อแยกเซลล์ออก และเก็บส่วนใสที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

#### 3.4.8.2 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจี (Protein G)

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนผ่านคอลัมน์ affinity chromatography ที่มีโปรตีนจีเซฟารอส (protein G sepharose) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แขนวลอยใน 2.0 mM sodium phosphate buffer ที่ pH 7.0 แพ็คอยู่ในคอลัมน์ แล้วปรับอัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที ผ่านอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีมอนอโคลนอลแอนติบอดีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 2.0 mM sodium phosphate buffer ที่ pH 7.0 เก็บ 2 fraction (ส่วนของ flow through) ก่อนชะด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M glycine-HCl ที่ pH 2.7 เก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร โดยที่รองกันหลอดด้วย 1M tris-HCl ที่ pH 9.0 เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของแอนติบอดีให้เป็นกลาง (ควรทดสอบปริมาตรของ 1M tris-HCl ที่ pH 9.0 ที่ใช้ในสำหรับปรับค่าความเป็นกรด-ต่าง) นำสารละลายแอนติบอดีแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร นำสารละลายแอนติบอดีที่เก็บรวมจาก fraction ไปเข้าสู่ขั้นตอนการ dialysis ด้วยถุงขนาดโมเลกุล 12,000 ถึง 14,000 ดาลตัน แขนวลอยอยู่ใน PBS buffer ที่ pH 7.4 เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้งต่อวัน จำนวน 2 วัน หลังจากนั้นสารละลายแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดวัดปริมาตร นำสารละลายแอนติบอดีเข้าสู่กระบวนการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

### 3.4.8.3 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA)

เตรียมกราฟมาตรฐาน BCA ด้วยอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางความเข้มข้นของสารละลายแอนติบอดีที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ เติมตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานลงในจานทดสอบ ELISA 96-หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร ใช้ชุด BCA Protein Assay kits สำหรับทำการทดสอบด้วยการเตรียมรีเอเจนท์ A (ประกอบด้วยโซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต กรดโบคาร์บอนิก และโซเดียมทาเทรตใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์) และรีเอเจนท์ B (ประกอบด้วย สารละลายที่มี 4% คูปลิกซัลเฟต) ผสมรีเอเจนท์ทั้งสองให้เข้ากันในอัตราส่วน 50:1 (v/v) แล้วเติมลงในหลุมที่มีสารละลายแอนติบอดีอยู่ หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ทำการเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน และคำนวณค่าออกมาในรูปความเข้มข้นของโปรตีน และโปรตีนที่ได้ทั้งหมด

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อโบรินเคซีน

ทำการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธุ์ BALB/c 3 ตัว ด้วยโบรินเคซีน (casein, catalog no. C3400, Sigma-Aldrich) จำนวน 4 ครั้ง เก็บเลือดจากหางหนู แล้วทำการแยกส่วนของซีรัมออกมาตรวจวัดระดับการสร้างแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA พร้อมทั้งทดสอบ blocking buffer ที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ โดยการระบุระดับการสร้างแอนติบอดีจะดูจากการให้การดูดกลืนแสงเป็น 2 เท่าของค่าการดูดกลืนแสงจากซีรัมหนูที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้น ผลการทดลองที่ได้ หนูตัวที่ 2 ให้ระดับการสร้างแอนติบอดี (ค่าไตเตอร์) ที่ 500 และหนูตัวที่ 1 และ 3 ให้ค่าไตเตอร์ต่ำกว่า 500 (ภาคผนวก ก ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโบรินเคซีนมีโครงสร้างที่แข็งแรงทำให้มีความสามารถในการละลายในน้ำกลั่นหรือ PBS ได้ต่ำมาก ในการทดลองจึงทำการละลายโบรินเคซีนในสารละลาย 1M NaOH ในความร้อน แล้วทำการ dialysis ใน PBS จึงอาจเกิดการสูญเสียคุณสมบัติบางอย่าง ทำให้ไม่เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในระหว่างขั้นตอนการเตรียม

การหาสารเคลือบหลุมเพื่อป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะ (ตัวบล็อก) ด้วยการทำ indirect ELISA จะเคลือบหลุมด้วยโบรินเคซีนความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเปรียบเทียบกับบล็อกต่างๆ ได้แก่ 5% (w/v) นมถั่วเหลือง 5% (w/v) หางนม 1% (w/v) เจลาติน และ 1% (w/v) แอลบูมิน ผลการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อเติมซีรัมหนูที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยตัวบล็อก 5% (w/v) นมถั่วเหลือง 1% (w/v) เจลาติน และ 1% (w/v) แอลบูมิน จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าสูง จึงทำให้ได้ค่า background สูง จึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้เป็นตัวบล็อก โดยพบว่า 5% (w/v) หางนม ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่ไม่ถูกกระตุ้นต่ำที่สุด (แสดงดังตารางที่ 4.1) จึงเป็นตัวบล็อกที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจสอบระดับการสร้างแอนติบอดีและตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์

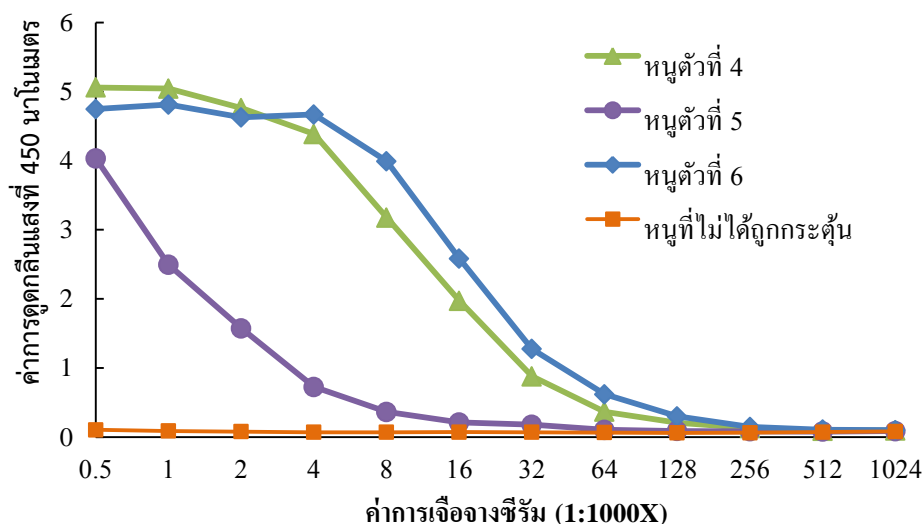
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนูตัวที่ 2 และ สารป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะที่เหมาะสม

หนูตัวที่	ค่าการเจือจาง (1:1000X)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
		โบวีนเคซีน*				
		5% (w/v) นมถั่วเหลือง <sup>a</sup>	5% (w/v) ทางนม <sup>a</sup>	1% (w/v) เจลาติน <sup>a</sup>	1% (w/v) แอลบูมิน <sup>a</sup>	-
2	0.5	1.164	<b>0.512</b>	0.935	0.832	0.962
	1	0.718	0.264	0.580	0.562	0.588
	2	0.402	0.197	0.319	0.316	0.354
	4	0.296	0.125	0.213	0.163	0.251
	8	0.213	0.112	0.157	0.128	0.173
	16	0.178	0.090	0.135	0.134	0.155
ซีรัม หนูไม่ถูก กระตุ้น	0.5	0.657	<b>0.269</b>	0.800	0.610	0.893
	1	0.484	0.157	0.573	0.377	0.627
	2	0.346	0.136	0.449	0.312	0.501
	4	0.344	0.134	0.381	0.238	0.416
	8	0.290	0.129	0.309	0.168	0.319
	16	0.238	0.115	0.237	0.148	0.262

\* หมายถึง สารเคลือบหลุม ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร, <sup>a</sup> หมายถึง ตัวบล็อก, ตัวเน้นหมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้ระบุค่าการเจือจางที่เหมาะสม,

จากผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทั้ง 3 ตัว ด้วยโบวีนเคซีน (C3400) ให้ค่าไตเตอร์ที่ต่ำ จึงทำการเปลี่ยนสารที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นโบวีนเคซีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate for microbiology, catalog no. FLUKA-22090, Sigma-Aldrich) ซึ่งมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่า หลังจากการกระตุ้น เก็บซีรัมเพื่อทดสอบค่าไตเตอร์ด้วยเทคนิค indirect ELISA (ภาคผนวก ก ตารางที่ 2) พบว่าหนูตัวที่ 1 และ 3 ยังคงให้ค่าไตเตอร์ที่ต่ำกว่า 500 อยู่ แสดงว่าโบวีนเคซีนไฮโดรไลเซตไม่ช่วยในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อโบวีนเคซีนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโบวีนเคซีนไฮโดรไลเซตมีขนาดเล็กมาก จึงถูกกำจัดออกจากร่างกายหนูได้อย่างรวดเร็ว ทำให้กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี [45]

จากการฉีดกระตุ้นหนู 3 ตัว ด้วยโบไวน์เคซีน (C3400) และโบไวน์เคซีนไฮโดรไลเซท (FLUKA-22090) พบว่าหนูมีค่าไตเตอร์ที่ต่ำมาก (การให้ค่าไตเตอร์ที่ต่ำของหนูจะมีผลต่อการได้รับมอนอโคลน) จึงทำการฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ด้วยโบไวน์เคซีน (casein sodium salt from bovine milk, catalog no. C8654, Sigma-Aldrich) เพิ่มอีก 3 ตัว จำนวน 6 ครั้ง เก็บซีรัมเพื่อทดสอบค่าไตเตอร์ด้วยเทคนิค indirect ELISA แสดงดังรูป 4.1 โบไวน์เคซีน (C8654) เกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างเคซีนเป็นโซเดียมเคซีนเนท (Na caseinates) ด้วยกรดและด่าง ทำให้มีสถานะเป็นเกลือที่มีความสามารถในการละลายสูงและขนาดของโครงสร้างใหญ่กว่าเดิมเป็น 2 เท่า [76] จึงทำให้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากขึ้น จากการทดลองพบว่าโบไวน์เคซีน (C8654) มีความสามารถในการกระตุ้นระดับการสร้างแอนติบอดี 256000 ในหนูตัวที่ 4, 6 และ 32000 ในหนูตัวที่ 5 (ภาคผนวก ก ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าโบไวน์เคซีน (C8654) มีความสามารถมากในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี ซึ่งระดับการสร้างแอนติบอดีเมื่อทำการฉีดกระตุ้นหนูทั้งหมดก่อนนำเซลล์ม้ามหนูมาหลอมรวมเซลล์ สรุปลดตาราง 4.2



รูปที่ 4.1 ระดับการสร้างแอนติบอดีจากซีรัมของหนูตัวที่ 4-6 กระตุ้นด้วยโบไวน์เคซีน (C8654) บล็อกด้วย 5% (w/v) หางนม ด้วยเทคนิค indirect ELISA เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 4.2 ระดับการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนก่อนการหลอมรวมเซลล์

หนูตัวที่	แอนติเจนที่ใช้กระตุ้น	ระดับการสร้างแอนติบอดี
1	โบรินเคซิน (C3400) และ โบรินเคซินไฮโดรไลเซท (22090 FLUKA)	< 500
2	โบรินเคซิน (C3400) และ โบรินเคซินไฮโดรไลเซท (22090 FLUKA)	500
3	โบรินเคซิน (C3400) และ โบรินเคซินไฮโดรไลเซท (22090 FLUKA)	< 500
4	โบรินเคซิน (C8654)	256000
5	โบรินเคซิน (C8654)	32000
6	โบรินเคซิน (C8654)	256000

#### 4.2 การหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์มัยอีโลมา

หลอมรวมเซลล์โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) ในการหลอมรวมเซลล์หนูตัวที่ 2 ด้วยค่าไตเตอร์ที่ 500 เซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมเซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหาร HAT medium (Hypoxanthine, Aminopterin, and Thymidine medium) จำนวน 11 เพลท หลังจาก 10 วันทำการสังเกตเซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ในแต่ละหลุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดในทุกหลุมคิดเป็นประสิทธิภาพการหลอมรวมเซลล์เท่ากับ 100% ในการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1 และ 3 เซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมถูกกระจายลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 8 เพลท ในอาหาร HAT medium สังเกตจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมหลัง 10 วัน เห็นโคโลนีของกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเติบโตทุกหลุมที่ทำการกระจาย จึงได้ประสิทธิภาพในการหลอมรวมเซลล์เท่ากับ 100% การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 ที่มีการสร้างแอนติบอดีในระดับเท่ากับ 256,000 หลังการหลอมรวมเซลล์กระจายเซลล์ลง 11 เพลท แต่ละหลุมพบโคโลนีเซลล์มีชีวิตทุกหลุม การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 ทำการเตรียมเซลล์มัยอีโลมาจำนวนน้อยไม่ได้อัตราส่วนระหว่างเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยอีโลมา 1:2 และเซลล์ถูกกระจายจำนวน 9 เพลท และสังเกตหลังจากการหลอมรวมเซลล์ 10

วัน พบว่าเซลล์ไม่มีชีวิตรอดทุกหลุม เปรียบเทียบหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาได้เป็น 75% ของหลุมทั้งหมด (75% confluence) ส่วนหนูตัวที่ 6 ได้ตายระหว่างการเลี้ยง

#### 4.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโบริเวคซิน

หลังการหลอมรวม เซลล์ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร HAT medium ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมเป็นเวลา 10-14 วัน ส่องดูเซลล์ภายใต้กล้อง สังเกตเซลล์ในหลุมให้มีเซลล์อยู่ในหลุมประมาณ 25% ของหลุม จึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมา มาทดสอบความสามารถในการสร้างแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA ผลการทดสอบการสร้างแอนติบอดีของเซลล์หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1 ถึง 5 ให้จำนวนหลุมที่สร้างแอนติบอดีเท่ากับ 14, 13, 5, 191, 172 หลุม จากจำนวนหลุมทั้งหมด 1056, 768, 768, 1056, 864 หลุม ตามลำดับ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.3 เซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีจะถูกนำมาทำให้เป็นมอนอโคลน ด้วยเทคนิค limiting dilution จำนวน 3 ครั้ง จะได้มอนอโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อโบริเวคซิน

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพการหลอมรวมเซลล์หนูที่กระตุ้นด้วยโบริเวคซิน

หนูตัวที่	จำนวนตั้งต้น	จำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตรอด		เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อโบริเวคซิน		จำนวนโคลนที่ได้	
	(หลุม)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(โคลน)	(%)
1	768	768	100	13	2	0	0
2	1056	1056	100	14	1	1	7
3	768	768	100	5	1	0	0
4	1056	1056	100	191	18	7	4
5	864	648	75	172	20	5	3

มอนอโคลนที่ได้จากด้วยวิธี limiting dilution (การเจือจางเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้ 1 เซลล์ต่อ 1 หลุม ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม) ในการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1 และ 3 พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาไม่มีความเสถียรในระหว่างการทำ limiting dilution จึงทำให้เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์เกิดการสูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดีและตายหมด ทำให้ไม่ได้มอนอโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1 และ 3 มอนอโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2, 4 และ 5 แสดงดังตารางที่ 4.4-4.6 ตามลำดับ ได้มอนอโคลนจากหนูตัวที่ 2 จำนวน 7



มอนอโคลน ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 2.806 ถึง 3.139 มอนอโคลนจากหนูตัวที่ 4 จำนวน 20 มอนอโคลน ให้ค่าการดูดกลืนแสงระดับสูงอยู่ในช่วง 1.123 ถึง 4.709 และมอนอโคลนจากหนูตัวที่ 5 จำนวน 33 มอนอโคลน ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.763 ถึง 4.638 จากข้อมูลหลังการหลอมรวมเซลล์ พบว่า หนูที่ให้ระดับการสร้างแอนติบอดีที่ต่ำก็จะให้จำนวนมอนอโคลนที่มาจากหลุมต้นกำเนิดต่างกันจำนวนน้อย

ตารางที่ 4.4 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN1F1	10/6B/6G/2A/6E	2.974
CN2F1	10/6B/6G/7A/11B	3.139
CN3F1	10/6B/6G/7A/8G	2.900
CN4F1	10/6B/1E/8G/9H	3.088
CN5F1	10/6B/6G/2A/5B	2.918
CN6F1	10/6B/1E/8G/8E	3.045
CN7F1	10/6B/6G/2A/2B	2.806
ตัวควบคุมลบ		0.129

ตารางที่ 4.5 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN1F4	2/6H/4F/11B/7G	4.709
CN2F4	8/1F/2C/11E/2E	3.832
CN3F4	8/1F/2C/11E/2G	3.920
CN4F4	8/1F/2C/12D/10A	2.784
CN5F4	8/1F/2C/12D/12G	3.899
CN6F4	3/4H/6A/3C/2C	2.593
CN7F4	3/4H/6A/3C/6A	3.931
CN8F4	5/3F/3C/9F/11B	2.774
CN9F4	5/3F/3C/9F/12F	2.876
CN10F4	8/4E/11C/11H/2C/5H	3.977
CN11F4	8/4E/11C/11H/2C/6C	3.812
CN12F4	10/4G/2A/10G/9D	4.263

ตารางที่ 4.5 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 (ต่อ)

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN13F4	10/4G/2A/10G/12G	4.503
CN14F4	11/4B/2D/2C/8D	1.279
CN15F4	11/4B/2E/11E/3A	1.123
CN16F4	4/7H/6B/4D/9F/8C	1.809
CN17F4	4/7H/6B/4D/9G/12B	3.252
CN18F4	11/4B/2E/8F/11G	1.975
CN19F4	11/4B/2F/5F/1F	3.419
CN20F4	3/2G/6G/12B	2.246
ตัวควบคุมลบ		0.102

ตารางที่ 4.6 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN1F5	35/4A/7H/8F	2.949
CN2F5	35/4A/7H/9A	3.819
CN3F5	35/4A/7H/9B	3.639
CN4F5	35/4A/7H/9D	1.554
CN5F5	35/4A/7H/10D	2.736
CN6F5	35/4A/7H/12F	3.791
CN7F5	35/4A/10A/3B	2.862
CN8F5	35/4A/10A/3D	3.668
CN9F5	35/4A/10A/4C	3.926
CN10F5	35/4A/10A/4D	3.635
CN11F5	35/4A/10A/4H	3.583
CN12F5	35/4A/10A/5B	3.635
CN13F5	81/1B/10D/2B	3.424
CN14F5	81/1B/10D/3A	2.575

ตารางที่ 4.6 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 (ต่อ)

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN15F5	81/1B/10D/4A	1.585
CN16F5	81/1B/10D/4E	2.051
CN17F5	81/1B/10D/5G	2.043
CN18F5	81/1B/10D/6F	2.130
CN19F5	81/1B/10D/7F	2.579
CN20F5	81/1B/10D/9A	3.714
CN21F5	81/1B/8C/9E	2.815
CN22F5	81/1B/8C/11G/8E	3.259
CN23F5	73/10A/10H/4A/8E	3.066
CN24F5	73/10A/10H/4A/8H	4.638
CN25F5	73/10A/10H/4A/10G	4.527
CN26F5	169/1A/8D/6D/9B	1.547
CN27F5	169/1A/10H/8G/5G	1.757
CN28F5	169/1A/10H/9C/10H	2.608
CN29F5	169/1A/10H/8G/12E	2.922
CN30F5	152/5A/2H/9D/1B	1.689
CN31F5	152/5A/2H/9D/1E	3.466
CN32F5	152/5A/2H/9D/2G	1.960
CN33F5	152/5A/2H/9D/10H	0.763
ตัวควบคุมลบ		0.152

จากการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 2, 4 และ 5 ได้มอนอโคลนจำนวน 7, 20 และ 33 โคลน ตามลำดับ ซึ่งแยกมาจากหลุมต้นกำเนิดจำนวน 1, 7 และ 5 หลุม ตามลำดับ จากการที่ได้จำนวนมอนอโคลนจำนวนมาก จึงต้องทำการคัดเลือกมอนอโคลนที่ได้ โดยทำการศึกษาลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี เพื่อแยกและจัดกลุ่มแอนติบอดีจากมอนอโคลนที่มีลักษณะสมบัติจำเพาะและมีความเหมือนกันเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้งานได้อย่างเหมาะสม

#### 4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

##### 4.4.1 ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

นำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดมาหาไอโซไทป์ โดยใช้ชุดตรวจ sandwich ELISA สำเร็จรูป (isotyping kit) โดยจะมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแต่ละไอโซไทป์ที่ถูกเคลือบแยกกันอยู่ในแต่ละหลุม ซึ่งจะจับกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ทำการทดสอบ แสดงผลออกมาเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่จะนำค่าการดูดกลืนแสงเหล่านี้มาทำการเปรียบเทียบกันในแต่ละไอโซไทป์ โดยติดตามการจับด้วยการใช้แอนติบอดีของหนูที่ติดฉลากด้วย Horse radish peroxidase (HRP) หลังการทำปฏิกิริยาและวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยการบ่งบอกไอโซไทป์ของมอนอโคลน จะดูจากการให้ค่าการดูดกลืนแสงของไอโซไทป์เป็น 2 เท่าของค่าการดูดกลืนแสงต่อไอโซไทป์อื่นๆ แสดงว่ามอนอโคลนนั้นมีคุณสมบัติเป็นไอโซไทป์นั้น นอกจากนี้จะบ่งบอกไอโซไทป์ของ MAbs แล้ว การตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดียังมีประโยชน์ คือ ทำให้รู้ว่าแอนติบอดีนั้นเป็นมอนอโคลนอลแอนติบอดีแล้วหรือยัง (หากเป็นมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะให้ค่าการดูดกลืนแสงเพียง 1 ไอโซไทป์เท่านั้น) และยังมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการทำบริสุทธิ์แอนติบอดีด้วยเทคนิค affinity chromatography ด้วยโปรตีนจี หรือโปรตีนเอ เนื่องจาก MAbs แต่ละชนิดมีความสามารถในการยึดจับได้แตกต่างกันในโปรตีนจีหรือโปรตีนเอ จึงถูกชะออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ผลการตรวจสอบพบว่า แอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์แตกต่างกันจากการหลอมรวมเซลล์ในแต่ละครั้ง (ภาคผนวก ก ตารางที่ 4) โดยในการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 จะได้ไอโซไทป์ของแอนติบอดีเป็น IgM ทั้งหมด การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 ได้ไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่มีความหลากหลายมาก คือ IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> และ IgM และการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 ได้ไอโซไทป์ของแอนติบอดีเป็น IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>2a</sub> สามารถรวมจำนวนมอนอโคลนอลแอนติบอดี (MAbs) จากทุกการหลอมรวมเซลล์ตามแต่ละไอโซไทป์ IgG<sub>1</sub> IgG<sub>2a</sub> และ IgM คือ 46, 5 และ 9 ตามลำดับ สรุปผลการตรวจสอบไอโซไทป์ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 สรุปไอโซไทป์ของ MAb ของแต่ละมอนอโคลน

การหลอมรวมเซลล์ ของหนูตัวที่	แอนติบอดีของมอนอโคลน	ไอโซไทป์				
		IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgM	IgA
2	CN1F1 ถึง CN7F1	-	-	-	7	-
4	CN1F4 และ CN4F4	-	2	-	-	-
	CN2F4, CN3F4, CN5F4 และ CN8F4 ถึง CN20F4	16	-	-	-	-
	CN6F4 และ CN7F4	-	-	-	2	-
5	CN1F5 ถึง CN22F5 และ CN26F5 ถึง CN26F5	30	-	-	-	-
	CN23F5 ถึง CN25F5	-	3	-	-	-
	รวมจำนวน MAb ในแต่ละไอโซไทป์ที่ได้	46	5	-	9	-

#### 4.4.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

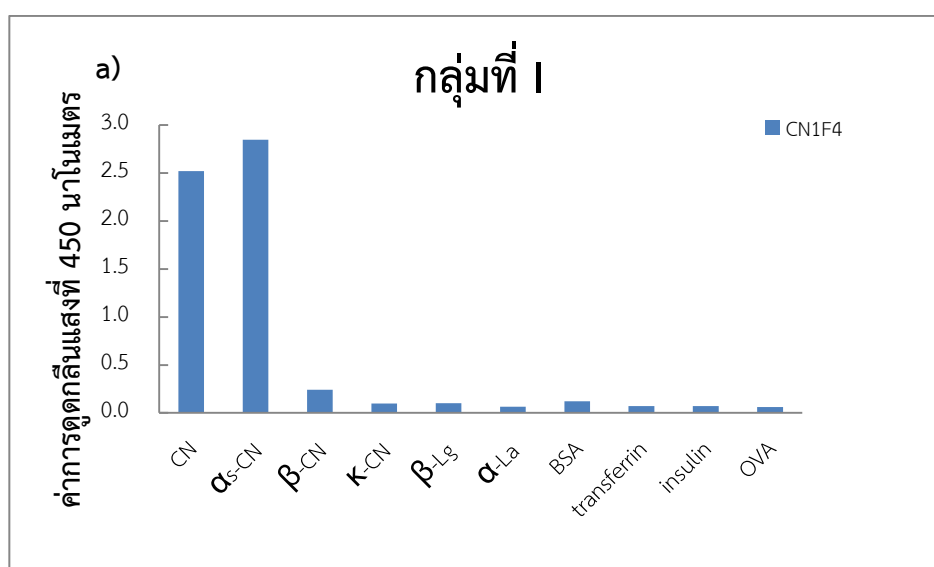
ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Indirect ELISA จะทำการตรึงแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่พื้นผิวของหลุม แต่การตรึงอาจไม่ครอบคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมด จึงต้องมีการใช้ตัวบล็อกเพื่อคลุมพื้นที่ผิวส่วนที่เหลือเพื่อป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่นำมาทดสอบที่จะมาจับกับแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ตรึงอยู่ก่อนแล้ว โดยตัวบล็อกที่เหมาะสมในหัวข้อ 4.1 คือ 5% (w/v) หางนม และใช้ตัวควบคุมลบที่เคลือบหลุมด้วยโบไวน์เคซีนทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นด้วยตัวบล็อกต่างๆ เพื่อบ่งบอกว่าระบบการทดสอบจะไม่ถูกรบกวนด้วยแอนติบอดีที่ไม่มีความจำเพาะกับโบไวน์เคซีน ด้วยให้ค่าการดูดกลืนแสงในตัวควบคุมลบต่ำเมื่อบล็อกด้วย 5% (w/v) หางนม แสดงว่าแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะต่อโบไวน์เคซีนไม่สามารถจับกับตัวบล็อกได้ จะให้ค่า background ต่ำ อีกทั้งในการทดสอบการสร้างแอนติบอดีของหนูและของเซลล์ไฮบริโดมานั้นไม่จำเป็นต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของโบไวน์เคซีนที่เคลือบกันหลุม จึงสามารถใช้หางนม (skim milk) ซึ่งมีเคซีนเป็นส่วนประกอบได้ แต่ตัวบล็อกสำหรับระบบการทดสอบความจำเพาะและความไวของแอนติบอดีจำเป็นต้องรู้ความเข้มข้นที่แน่นอนของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ใช้ จึงไม่เหมาะที่จะใช้ตัวบล็อกหลุม 5% (w/v) หางนม เพราะทำให้ปริมาณโบไวน์เคซีนที่เคลือบหลุมที่ใช้เปลี่ยนแปลงไปด้วยหางนมมีโบไวน์เคซีนเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้ไม่ทราบค่าปริมาณเคซีนที่แน่นอน ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบหาตัวบล็อกชนิดใหม่ที่ไม่รบกวนปริมาณโบไวน์เคซีนที่เคลือบหลุมไว้ ในการทดลองได้

ทำการเปรียบเทียบตัวบล็อกต่างๆ ดังนี้ คือ 5% (w/v) หางนม, 1% (w/v) แอลบูมิน, 1% (w/v) เจลาติน, 5% (w/v) นมถั่วเหลือง และ 5% (v/v) ซีรัมลูกวัว ซึ่งความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบหลุม คือ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้แอนติบอดีจาก 7 มอนอโคลน (CN1F1 ถึง CN7F1) ที่ไม่ได้ทำการเจือจางความเข้มข้นสำหรับการทดสอบ การบ่งบอกตัวบล็อกที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นของแอนติเจน 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อขจัดปัญหาในเรื่องปริมาณแอนติเจนที่น้อยเกินไป สามารถพิจารณาผลการทดลองได้ดังนี้ หากได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง แสดงว่าแอนติบอดีมีความสามารถในการจับกับตัวบล็อกได้ และทำให้ผลในการทดสอบด้วย indirect ELISA เป็นผลบวกเทียม ตัวบล็อกนั้นก็เลยไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะและความไวต่อไป หากได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำ แสดงว่า แอนติบอดีไม่เกิดการจับกับตัวบล็อก จะเป็นตัวบล็อกที่เหมาะสมกับการทดสอบต่อไป ผลการเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโบไวน์เคซีนกับตัวบล็อก โดยไม่ได้เคลือบโบไวน์เคซีนที่หลุม พบว่าเมื่อใช้ตัวบล็อกเป็น 5% (w/v) หางนม จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง เนื่องจากในหางนมมีเคซีนเป็นองค์ประกอบ และเมื่อใช้ตัวบล็อกเป็น 1% (w/v) แอลบูมิน, 1% (w/v) เจลาติน และ 5% (w/v) นมถั่วเหลือง พบว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงเช่นกัน เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาอย่างไม่จำเพาะ (ผลบวกเทียม) แต่เมื่อบล็อกด้วย 5% (v/v) ซีรัมลูกวัว พบว่าตัวบล็อกไม่มีความสามารถในการจับกับแอนติบอดีได้ MAb ทุกตัวจึงให้ผลเป็นลบ ดังตารางที่ 4.8 ดังนั้น 5% (v/v) ซีรัมลูกวัว จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นตัวบล็อกสำหรับการตรวจสอบความจำเพาะและความไวของแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อไป

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบตัวบล็อกที่เหมาะสมสำหรับ indirect ELISA

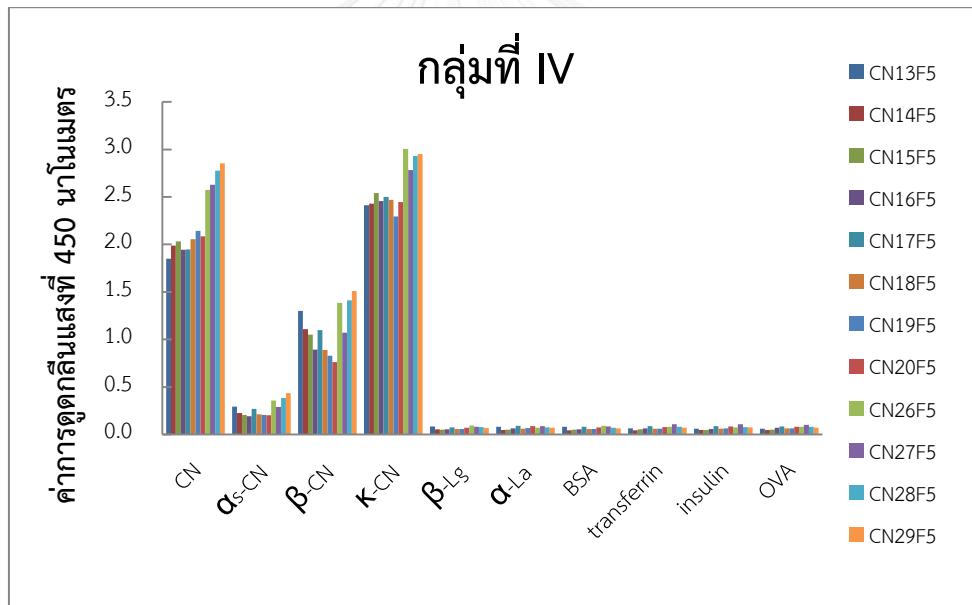
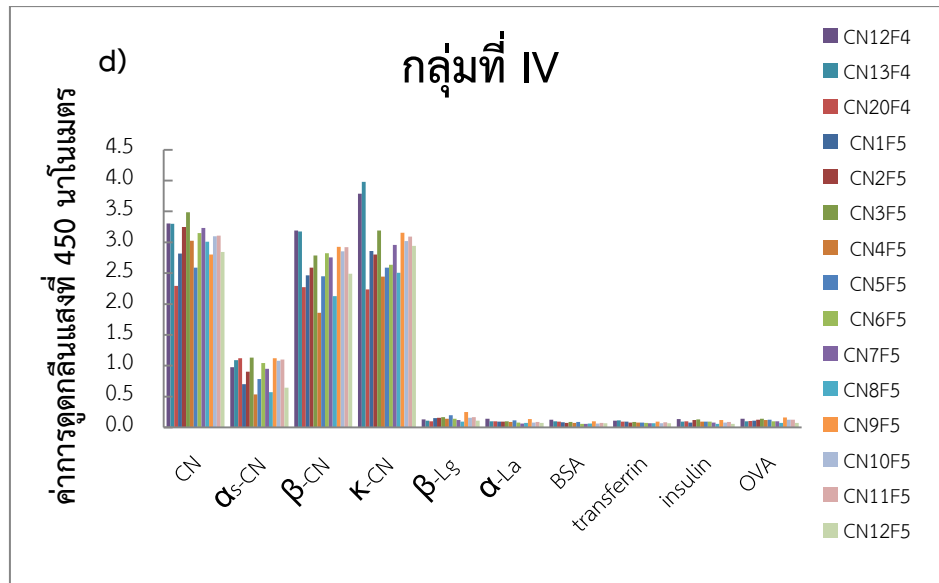
โคลน	โโบวีนเคซีน 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร					โโบวีนเคซีน 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร				
	ค่าการดูดกลืนแสงด้วยตัวบล็อกต่างๆ (blocking buffer)									
	5% (w/v) หางนม	1% (w/v) แอล-บูมิน	1% (w/v) เจลาติน	5% (w/v) นมถั่วเหลือง	5% (v/v) ซีรัมลูกวัว	5% (w/v) หางนม	1% (w/v) แอล-บูมิน	1% (w/v) เจลาติน	5% (w/v) นมถั่วเหลือง	5% (v/v) ซีรัมลูกวัว
CN1F1	4.075	4.085	3.956	3.847	4.010	3.366	1.354	0.622	0.319	0.153
CN2F1	4.191	4.206	4.118	4.071	4.095	3.566	2.200	1.630	0.352	0.160
CN3F1	4.041	4.095	3.974	3.884	3.925	3.225	1.549	0.815	0.311	0.143
CN4F1	3.988	4.300	3.919	4.152	4.128	3.745	1.246	1.673	0.686	0.250
CN5F1	3.990	3.905	3.854	3.753	3.783	2.769	0.464	0.278	0.197	0.124
CN6F1	4.002	3.851	3.804	3.705	3.714	2.867	1.907	0.659	0.297	0.156
CN7F1	2.584	2.555	2.675	2.468	2.288	0.830	0.353	0.100	0.114	0.074

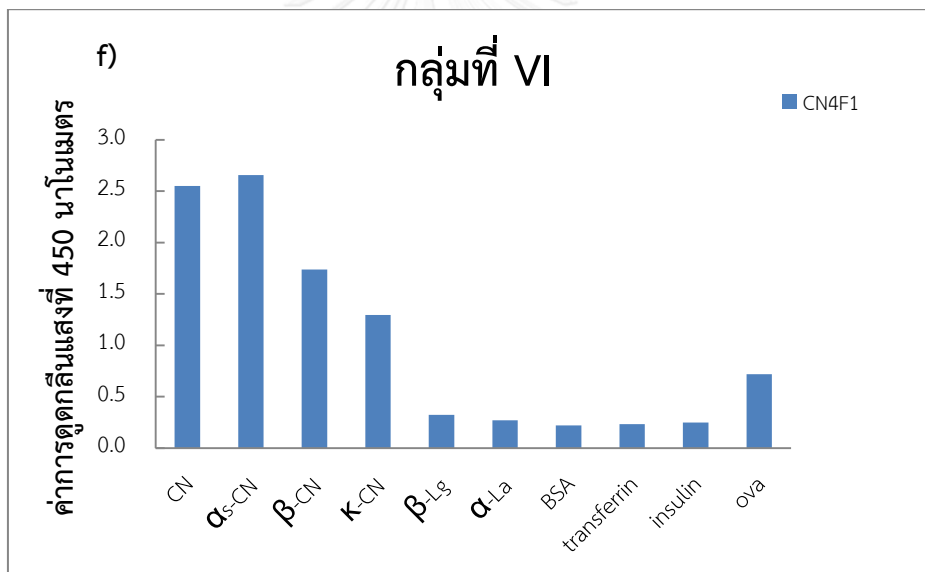
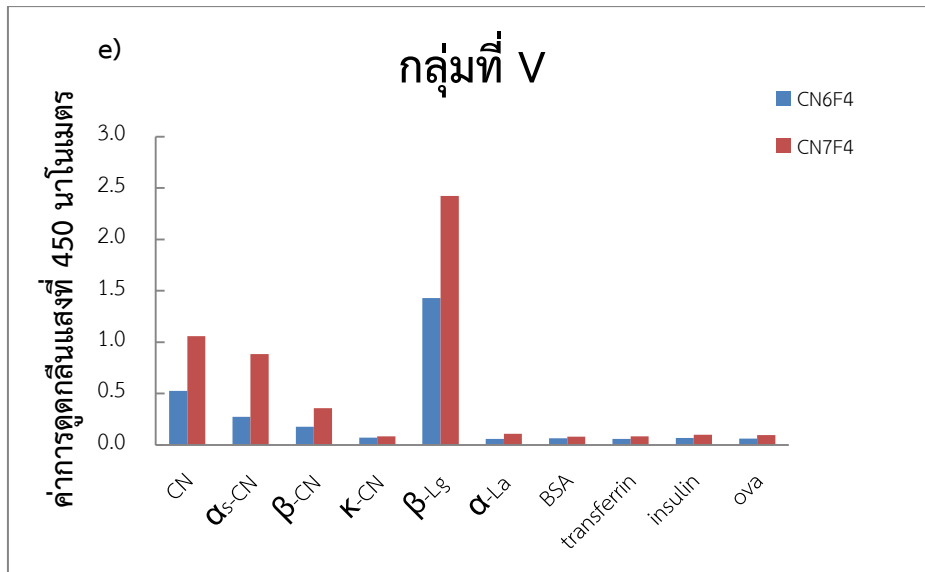
การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยการเคลือบหลุมด้วยโโบวีนเคซีน (CN), แอลฟา<sub>s</sub> เคซีน ( $\alpha_s$ -CN), บีตา เคซีน ( $\beta$ -CN), แคปปา เคซีน ( $\kappa$ -CN), บีตาแล็กโทโกลบูลิน ( $\beta$ -Lg) อัลฟา แลตต์บูลมิน ( $\alpha$ -La), แอลบูมิน (BSA), ทรานเฟอริน (transferrin), อินซูลิน (insulin) และ โอวัลบูมิน (OVA) เติม MAb ลงไปเพื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี โดยไม่ได้เจือจางความเข้มข้น ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี (ภาคผนวก ก ตารางที่ 5) สามารถแบ่งกลุ่มของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแตกต่างกันได้ 7 กลุ่ม ตามความสามารถในการจับกับสารที่ทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.9

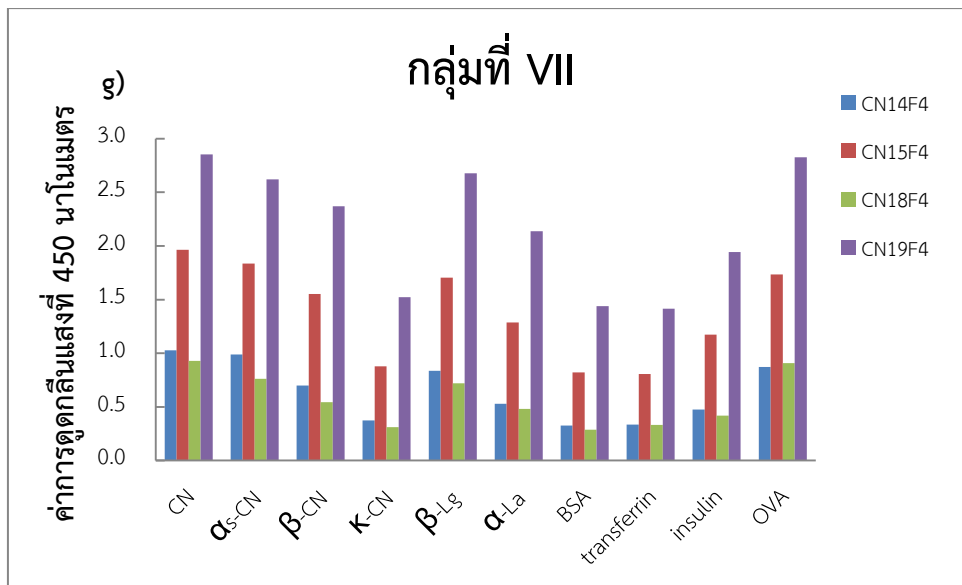












รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ความจำเพาะของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (ไม่เจือจาง) ต่อสารต่างๆ ด้วยเทคนิค indirect ELISA: (a) กลุ่มที่ I, (b) กลุ่มที่ II, (c) กลุ่มที่ III, (d) กลุ่มที่ IV, (e) กลุ่มที่ V, (f) กลุ่มที่ VI, (g) กลุ่มที่ VII

กลุ่มที่ I เป็นมอนอโคลนจำนวน 1 โคลนที่สร้าง MAb ที่มีความจำเพาะต่อโบไวน์เคซีน และแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน คือ CN1F4 ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 กลุ่มที่ II เป็นมอนอโคลนที่สร้าง MAb จำนวน 6 โคลน ที่มีความจำเพาะต่อบีตา เคซีน และแคปปา เคซีน คือ CN21F5, CN22F5, CN30F5, CN31F5, CN32F5, CN33F5 ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 ในกลุ่มที่ III ได้มอนอโคลนที่สร้าง MAb ที่มีความจำเพาะต่อโบไวน์เคซีน แอลฟา<sub>5</sub> เคซีน และบีตา เคซีน จำนวน 10 โคลน จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 และ 5 กลุ่มที่ IV เป็นมอนอโคลนที่สร้าง MAb ที่มีความจำเพาะต่อทุกไอโซไทป์ของเคซีน จำนวน 27 โคลน จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 และ 5 กลุ่มที่ V เป็นมอนอโคลนที่สร้าง MAb ที่มีความจำเพาะต่อโบไวน์เคซีน แอลฟา<sub>5</sub> เคซีน บีตา เคซีน และ บีตา แล็กโทโกลบูลิน จำนวน 2 โคลน คือ CN6F4 และ CN7F4 จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 กลุ่มที่ VI เป็นมอนอโคลน CN4F1 ที่สร้าง MAb ที่จำเพาะต่อทุกไอโซไทป์ของโบไวน์เคซีนและโอวัลบูมิน ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 และกลุ่มที่ VII เป็นมอนอโคลนที่สร้าง MAb ที่จำเพาะกับสารทุกตัวที่ทดสอบ จำนวน 4 โคลน ได้แก่ CN14F4, CN15F4, CN18F4 และ CN19F4 จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4

โดยพบว่า MAb จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 มีความจำเพาะกับสารอื่นๆ เหมือนในการหลอมรวมของหนูตัวที่ 4 (ภาคผนวก ก ตารางที่ 5) และเมื่อทดสอบความจำเพาะกับสารอื่นๆ ก็พบว่า MAb จากมอนอโคลน CN4F1 (กลุ่มที่ VI) สามารถจับกับทุกไอโซไทป์ของโปวไน์เคซิน และโอวัลบูมิน (OVA) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (f) MAb จากมอนอโคลน CN4F1 จึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้งานในการตรวจสอบโปวไน์เคซิน MAb ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 เกิดการจับกับสารต่างๆ ตามกลุ่มที่ III และ IV ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะเดียวกับแอนติบอดีจากมอนอโคลนในการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 และระหว่างทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา มาทดสอบลักษณะสมบัติ พบว่ามอนอโคลน CN4F4, CN8F4 และ CN9F4 สูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

มอนอโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่ม II มีความจำเพาะต่อบีตา เคซิน และแคปปา เคซิน แต่ไม่จำเพาะต่อโปวไน์เคซิน ซึ่งเป็นตัวที่มีดีกรดสั้น และไม่จำเพาะต่อแอลฟา<sub>2</sub> เคซิน ซึ่งพบประมาณ 50% ของไอโซไทป์เคซิน จึงไม่ถูกเลือกไปศึกษาลักษณะในขั้นตอนถัดไป แอนติบอดีจากมอนอโคลนกลุ่ม V มีความสามารถในการจับกับบีตา แล็กโทโกลบูลิน ( $\beta$ -Lg) ได้มากกว่าโปวไน์เคซินทุกไอโซไทป์ จึงไม่เหมาะต่อการนำไปใช้ในการพัฒนาในการตรวจสอบโปวไน์เคซิน และแอนติบอดีจากมอนอโคลนกลุ่มที่ VII เป็น MAb ที่ไม่มีความเหมาะสมอย่างมากต่อการนำไปใช้งาน เนื่องจาก MAb ที่ได้สามารถจับได้กับทุกตัวที่นำไปทดสอบ จึงถูกคัดทิ้ง ดังนั้น MAb ในกลุ่มที่ I คือแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN1F4 มีความสามารถในการจับได้กับโปวไน์เคซิน และแอลฟา<sub>2</sub> เคซิน ได้อย่างดี ดังรูปที่ 4.2 (a) MAb ในกลุ่ม III มีความจำเพาะต่อโปวไน์เคซิน แอลฟา<sub>2</sub> เคซิน และบีตา เคซิน และ MAb ในกลุ่ม IV มีความจำเพาะต่อทุกไอโซไทป์ของเคซิน จะถูกนำศึกษาลักษณะสมบัติในขั้นตอนถัดไป สรุปผลการจัดกลุ่มจากการทดสอบความจำเพาะต่อสารดังตารางที่ 4.9 ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Leung C. T. และคณะ (1991) ได้ทำการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อแอลฟา<sub>2</sub> เคซิน โดย MAb ที่ได้ไม่เกิดการจับกับสารอื่นๆ ที่ทดสอบได้แก่ บีตา เคซิน แคปปา เคซิน และโปรตีนอื่นๆ ในน้ำนม [77]

ตารางที่ 4.9 สรุปผลกลุ่มของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ตามความจำเพาะต่อสารอื่นๆ

กลุ่มที่	สารที่ทำปฏิกิริยากับ MAb	การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่		
		2	4	5
I	CN, $\alpha_5$ -CN	-	CN1F4	-
II	$\beta$ -CN, $\kappa$ -CN	-	-	CN21F5, CN22F5, CN30F5, CN31F5, CN32F5, CN33F5
III	CN, $\alpha_5$ -CN, $\beta$ -CN	-	CN2F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN16F4 และ CN17F4	CN23F5, CN24F5, CN25F5
IV	CN, $\alpha_5$ -CN, $\beta$ -CN, $\kappa$ -CN	-	CN12F4, CN13F4, CN20F4	CN1F5, CN2F5, CN3F5, CN4F5, CN5F5, CN6F5, CN7F5, CN8F5, CN9F5, CN10F5 ถึง CN20F5, CN26F5, CN27F5, CN28F5, CN29F5
V	CN, $\alpha_5$ -CN, $\beta$ -CN, $\beta$ -Lg	-	CN6F4, CN7F4	-
VI	CN, $\alpha_5$ -CN, $\beta$ -CN, $\kappa$ -CN, OVA	CN4F1	-	-
VII	จับสารทดสอบทุก ตัว	-	CN14F4, CN15F4, CN18F4, CN19F4	-

#### 4.4.3 การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีต่ออีพิโทปด้วยเทคนิค indirect ELISA

การพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบจะใช้เทคนิค sandwich ELISA เนื่องจากให้ความไวในการตรวจสอบได้สูง และต้องใช้แอนติบอดีที่มีอีพิโทปแตกต่างกันระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบกันหลุมกับแอนติบอดีที่เป็นตัวตรวจสอบ จึงต้องวิเคราะห์อีพิโทปของ MAb ที่แตกต่างเพื่อลดการเลือก MAb ที่มีอีพิโทปเดียวกันมาใช้ และในการจัดกลุ่มแอนติบอดีตามความจำเพาะต่อสารนั้น กลุ่มความจำเพาะของแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันก็อาจจะมีการจับกับตำแหน่งอีพิโทปได้แตกต่างกันในความจำเพาะต่อสารที่เหมือนกัน นั่นคือหากมี 2 MAb ที่มีความจำเพาะต่อโบรินเคซินเหมือนกัน MAb ตัวที่ 1 อาจจำเพาะต่อ 1 อีพิโทป ซึ่งแตกต่างจากอีก 1 MAb ที่จำเพาะกับอีก 1 อีพิโทบบนโบรินเคซิน เนื่องจากโบรินเคซินมีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงมีหลากหลายอีพิโทป ทำให้มอนอโคลนที่ได้มีความหลากหลายในการจับกับอีพิโทปเช่นกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ความจำเพาะของอีพิโทปจึงมีความจำเป็น

พื้นฐานในการตรวจสอบลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี การทดสอบความจำเพาะของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่ออีพิโทปจะอาศัยหลักการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจน แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยาของเทคนิค indirect ELISA [74] ซึ่งการวิเคราะห์เหล่านี้จำเป็นต้องรู้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มากที่สุดที่ความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสม คือ 0.5  $\mu\text{g/ml}$  จึงทำการหาค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง แสดงผลดังแสดงตารางที่ 4.10 พบอัตราส่วนการเจือจางของแอนติบอดีอยู่ในช่วง 1:64 ถึง 1:5000 สำหรับการวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทปต่อไป

ตารางที่ 4.10 ระดับการเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีต่ออีพิโทปด้วยเทคนิค indirect ELISA

แอนติบอดีจากมอนอโคลน	อัตราส่วนการเจือจางแอนติบอดี
CN1F4	1:5000
CN3F4	1:64
CN5F4	1:64
CN10F4	1:1280
CN11F4	1:128
CN12F4	1:64
CN13F4	1:64
CN16F6	1:1280
CN17F4	1:1280
CN20F4	1:160

เมื่อได้ค่าการเจือจางของแอนติบอดีและความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสม จะนำค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีเหล่านี้มาทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของ MAb ต่ออีพิโทปต่อไป ผลทดลองที่ได้แสดงออกมาในค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร แสดงดังตารางที่ 4.11 จากปฏิกิริยาของเทคนิค indirect ELISA จะเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ MAb ที่ให้ค่ามากที่สุดกับค่าการดูดกลืนแสงของ MAb ทั้ง 2 มอนอโคลนที่ผสมกัน โดยค่าที่ได้จะออกมาใน 2 ลักษณะ คือ ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ หมายถึง MAb ที่เราทดสอบทั้งสองตัวมีอีพิโทปเดียวกัน และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตั้งแต่ประมาณ 0.100 หมายถึง MAb ที่ทำการทดสอบทั้งสองตัวมีอีพิโทปที่แตกต่างกัน เนื่องจาก MAb แต่ละตัวจับได้ในแต่ละอีพิโทป จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจากเดิม

ตารางที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ความจำเพาะของอิมูโนโอบีโอบที่จับด้วย MAb ต่อ โปไวรัสเคซีน

MAbs	กลุ่มที่ I	กลุ่มที่ III						กลุ่มที่ IV		
	1 CN1F4	2 CN3F4	3 CN5F4	4 CN10F4	5 CN11F4	6 CN16F4	7 CN17F4	8 CN12F4	9 CN13F4	10 CN20F4
1 CN1F4	2.047	2.583	2.547	2.031	2.703	2.731	2.469	1.756	1.470	2.842
2 CN3F4		1.872	1.815	2.053	2.178	2.201	2.280	1.619	1.796	3.368
3 CN5F4			1.946	1.896	2.092	2.323	2.123	2.296	1.892	2.707
4 CN10F4				1.471	1.889	2.157	1.672	1.382	1.344	2.516
5 CN11F4					1.607	1.981	1.776	1.703	1.711	2.870
6 CN16F4						2.176	1.928	1.963	1.998	2.531
7 CN17F4							1.994	1.466	1.358	2.198
8 CN12F4								0.722	0.727	2.476
9 CN13F4									0.711	2.846
10 CN20F4										1.856

\* หมายถึง ส่วนสีเทา หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตั้งแต่ประมาณ 0.100

ตัวอย่างการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN13F4 จากตารางที่ 4.11 ในกลุ่มความจำเพาะต่อสารต่างๆ ในกลุ่มที่ IV

เมื่อผสม MAb ของ CN13F4 กับ MAb ของ CN13F4 จะให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.711

MAb ของ CN12F4 กับ MAb ของ CN12F4 จะให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.722

MAb ของ CN20F4 กับ MAb ของ CN20F4 จะให้ค่าการดูดกลืนแสง 1.856

MAb ของ CN13F4 กับ MAb ของ CN12F4 จะได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.727

และ MAb ของ CN13F4 กับ MAb ของ CN20F4 จะได้ค่าการดูดกลืนแสง 2.846

จากผลค่าการดูดกลืนแสงมอนอโคลนผสม CN20F4 กับ CN20F4 ให้ค่าการดูดกลืนมากกว่าค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN13F4 กับ CN13F4 ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของ MAb จากมอนอโคลน CN20F4 ให้ค่ามากที่สุด จึงถูกนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของ MAb จากมอนอโคลนผสมระหว่าง CN13F4 กับ CN20F4 โดยผลที่ได้ให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจาก 1.856 เป็น 2.846 ดังนั้น MAb จากมอนอโคลน CN13F4 จึงมีความจำเพาะกับอีพิโทปที่แตกต่างจากมอนอโคลน CN20F4 และ MAb จากมอนอโคลน CN13F4 มีความจำเพาะกับอีพิโทปเหมือนกับ CN12F4 เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่คือ 0.722 เป็น 0.727

ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของอีพิโทปที่จับด้วย MAb ต่อไบโไวน์เคซีน (ตารางที่ 4.11) จากการสังเกตค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าได้ MAb ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปบนไบโไวน์เคซีน และแอลฟา<sub>2</sub> เคซีน ที่แตกต่างกันจำนวน 1 มอนอโคลน คือ CN1F4 ในกลุ่มที่ I และยังให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น (ความจำเพาะต่ออีพิโทปต่างกัน) ของ MAb ต่างกลุ่มของกลุ่มที่ III คือ แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN16F4, CN17F4 และกลุ่มที่ IV คือ CN20F4

มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปบนไบโไวน์เคซีน แอลฟา<sub>2</sub> เคซีน และบีตา เคซีน ประกอบด้วย 6 คือ CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN16F4 และ CN17F4 ซึ่งเป็นแอนติบอดีกลุ่มที่ III (ตามความจำเพาะต่อสาร) มีความจำเพาะต่ออีพิโทปแตกต่างของ MAb แบ่งได้ 3 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่ III.A คือแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN3F4, กลุ่มที่ III.B คือแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN3F4 กลุ่มที่ III.C คือแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN10F4 และกลุ่มที่ III.D คือแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN11F4, CN16F4 และ CN17F4

แอนติบอดีกลุ่มที่ IV ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปบนทุกไอโซโทปของเคซีน ประกอบด้วย MAb จากมอนอโคลน 3 มอนอโคลน ได้แก่ CN12F4, CN13F4 และ CN20F4 สามารถแบ่ง MAb จากความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันได้เป็นกลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่ IV.A คือ แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 และ CN13F4 กลุ่มที่ IV.B คือ แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN20F4 ดังนั้น MAb จากมอนอโคลนกลุ่มที่ IV จะได้มอนอโคลนที่มีความแตกต่างกัน 2 กลุ่มย่อย



นอกจากนี้การวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทปสามารถบอกความจำเพาะที่มีความแตกต่างกันด้วยค่า % Additive index (AI) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตรในบทที่ 3 [75]

ค่าการดูดกลืนแสงจากผลการทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่มีค่าเพิ่มขึ้นจากตาราง 4.11 ถูกนำมาคำนวณหา AI จากสูตร แสดงดังตารางที่ 4.12 MAb กลุ่มที่ I ได้แก่ CN1F4 ให้ค่าการจับกับอีพิโทปที่แตกต่างกับ MAb ในกลุ่มที่ III ได้แก่ CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN16F4 และ CN17F4 และกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN20F4 โดยคิดค่า AI ได้ 32, 28, 15, 48, 29, 22 และ 46 ตามลำดับ สำหรับ MAb ในกลุ่มที่ III มอนอโคลน CN3F4 ให้ค่า AI แตกต่างกับ MAb ของมอนอโคลน CN10F4, CN11F4, CN16F4 และ CN17F4 และกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN20F4 โดยมีค่า AI เท่ากับ 23, 25, 9, 18 และ 81 ตามลำดับ MAb ในกลุ่มที่ III มอนอโคลน CN5F4 ให้ค่า AI แตกต่างกับ MAb ของมอนอโคลน CN11F4, CN16F4 และ CN17F4 และกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN20F4 โดยมีค่า AI เท่ากับ 18, 13, 8 และ 42 ตามลำดับ MAb ในกลุ่มที่ III มอนอโคลน CN10F4 ให้ค่า AI แตกต่างกับ MAb ของมอนอโคลน CN11F4 และกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN20F4 โดยมีค่า AI เท่ากับ 23 และ 51 ตามลำดับ MAb ในกลุ่มที่ III มอนอโคลน CN11F4 ให้ค่า AI แตกต่างกับ MAb ของมอนอโคลนกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN12F4, CN13F4 และ CN20F4 โดยมีค่า AI เท่ากับ 46, 48 และ 51 ตามลำดับ MAb ในกลุ่มที่ III มอนอโคลน CN16F4 และ CN17F4 ให้ค่า AI แตกต่างกับ MAb ของมอนอโคลนกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN20F4 โดยมีค่า AI เท่ากับ 26 และ 14 ตามลำดับ MAb ในกลุ่มที่ IV มอนอโคลน CN12F4 และ CN13F4 ให้ค่า AI แตกต่างกับ MAb ของมอนอโคลนกลุ่มที่ IV ได้แก่ CN20F4 โดยมีค่า AI เท่ากับ 92 และ 122 ตามลำดับ จากผลการคำนวณค่า AI ของ MAb จากมอนอโคลน CN3F4 มีอีพิโทปที่แตกต่างกับ MAb จากมอนอโคลน CN11F4 ถึง 25% ซึ่งมีค่า AI ที่แตกต่างกันมากที่สุดในความจำเพาะต่อสารกลุ่มที่ III นอกจากนี้แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 และ CN13F4 ซึ่งมีอีพิโทปแตกต่างจากแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN20F4 แล้วให้ค่า AI คือ 92% และ 122% ตามลำดับ และพบความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันมากในความจำเพาะต่อสารที่แตกต่างกัน คือแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN3F4 และ CN20F4 ที่ให้ค่า AI เท่ากับ 81% ด้วยการให้ค่าความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันมากจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการทำ แอนติบอดีผสม (cocktail antibody)



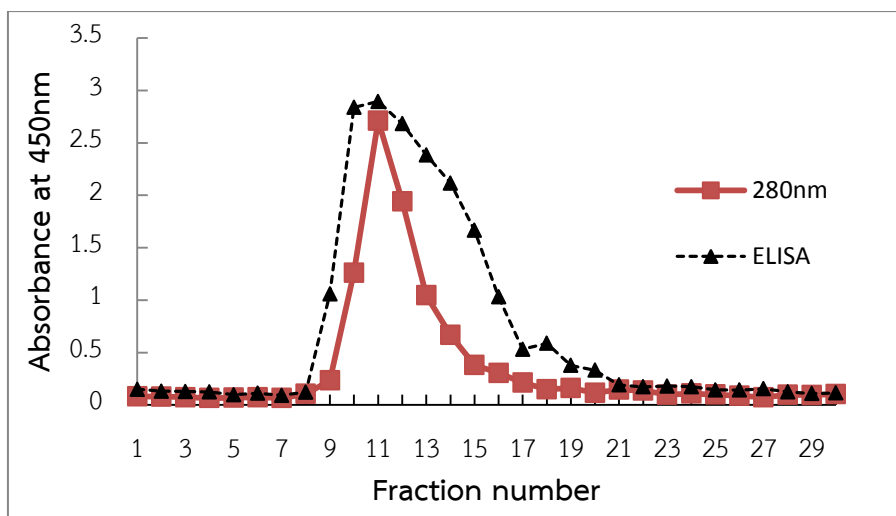
จากผลการจัดกลุ่ม MAb ตามความจำเพาะต่ออีพิโทปและคำนวณค่า AI ทำให้สามารถเลือก MAb จากมอนอโคลน CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 จำนวน 8 โคลน มาทำการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีเพื่อทำบริสุทธิ์แอนติบอดี ทดสอบความไว และปฏิกิริยาข้ามของ MAb ต่อไป

#### 4.4.4 การทำบริสุทธิ์มอนอโคลนอลแอนติบอดี

##### 4.4.4.1 การทำบริสุทธิ์แอนติบอดีด้วยโปรตีนจี

จากการศึกษาคุณลักษณะของ MAb ได้แก่ การทดสอบความจำเพาะต่อสารอื่นๆ และวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทป ทำให้สามารถเลือก MAb ที่มีความจำเพาะต่อโบรินเคซิน และมีความจำเพาะต่ออีพิโทปแตกต่างกัน จึงนำเอา MAb เหล่านี้มาเพิ่มปริมาณ โดยการเพาะเลี้ยงมอนอโคลนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% (v/v) FCS และทำบริสุทธิ์อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ affinity ด้วยโปรตีนจี โดยที่อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน โปรตีนจีเตรียมจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนจีของ Streptococccia จะจับบริเวณ Fc region ของอิมมูโนโกลบูลิน จี ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งสามารถใช้ในการแยกและทำบริสุทธิ์ไอโซไทป์ของอิมมูโนโกลบูลินได้จากของเหลวทางชีวภาพหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ได้

MAb จะถูกนำผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที ใช้น้ำบัฟเฟอร์ 0.1M glycine-HCl ที่ pH 2.7 และตรวจหาแต่ละ fraction ว่ามีปริมาณโปรตีนหรือไม่ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (ภาคผนวก ก ตารางที่ 7a-7b) ตัวอย่างภาพโครมาโตแกรมของแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 แสดงรูปที่ 4.3 โปรตีนมีค่าสูงขึ้นที่ fraction 9 ถึง 17 และเมื่อทำการทดสอบ indirect ELISA เพื่อดูประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการจับกับโบรินเคซิน โดยการเคลือบหลุมด้วย 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางความเข้มข้นที่ 1:500 พบว่าแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 ยังคงมีความสามารถในการจับกับโบรินเคซินได้ดี



รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมจากการทำมอนอโคลนอลแอนติบอดี CN12F4 ให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจีคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

#### 4.4.4.2 การหาปริมาณโปรตีนหลังจากการทำให้บริสุทธิ์

หลังการทำบริสุทธิ์แอนติบอดีทั้งหมด 8 มอนอโคลนอลแอนติบอดี จะทำการตรวจหาปริมาณโปรตีน ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธี BCA ในการตรวจสอบจากการสร้างกราฟมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ก รูปที่ 2) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการหาปริมาณโปรตีน แต่ก็มีข้อเสีย คือทำให้โปรตีนเสียสภาพหลังการทดสอบ

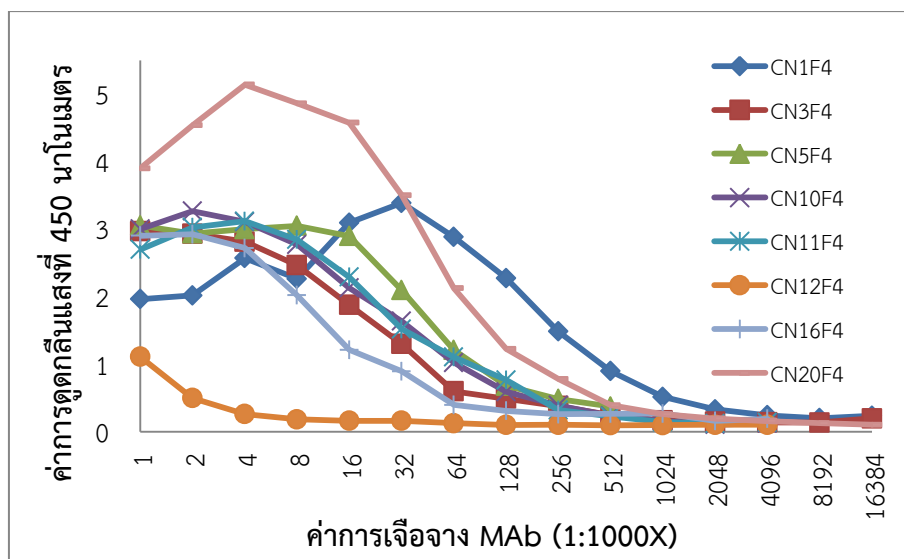
ตารางที่ 4.13 ปริมาณโปรตีนจากวิธี BCA หลังทำบริสุทธิ์มอนอโคลนอลแอนติบอดี

โคลน	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนจากวิธี BCA	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	รวม (มิลลิกรัม)
CN1F4	15	2.35	35.30
CN3F4	14	2.12	29.72
CN5F4	14	2.38	33.32
CN10F4	15	2.95	44.30
CN11F4	15	2.91	43.67
CN12F4	14	2.61	36.58
CN16F4	11	2.47	27.12
CN20F4	6.5	3.50	22.75

ผลการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ของมอนอโคลน CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 มีความเข้มข้นโปรตีน เท่ากับ 2.35, 2.12, 2.38, 2.95, 2.91, 2.61, 2.47 และ 3.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และได้ปริมาณโปรตีนรวม เท่ากับ 35.30, 29.72, 33.32, 44.30, 43.67, 36.58 27.12 และ 22.75 มิลลิกรัม ตามลำดับ ดังตาราง 4.13

#### 4.4.4.3 ทดสอบสัมพรรคภาพของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (affinity) หลังการทำให้บริสุทธิ์

การทดสอบสัมพรรคภาพระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนสามารถบ่งบอกถึงความแข็งแรงในการจับกันระหว่างอีพิโทปของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจน และตรวจสอบการทำงานของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ MAb นอกจากนี้การได้รับ MAb ที่มีสัมพรรคภาพสูงจึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการทำ immunoassay ในรูปแบบต่างๆ เนื่องจาก MAb เหล่านี้จะสามารถเกิดการจับอย่างความเสถียรกับแอนติเจนได้อย่างรวดเร็ว และทำให้ได้รับการตรวจสอบโบว์นเคซินที่มีความไวมาก MAb ที่มีสัมพรรคภาพต่อโบว์นเคซินสูง จะใช้เวลาน้อยกว่าที่ MAb สามารถตรวจพบโบว์นเคซินได้ ดังนั้น MAb ที่มีสัมพรรคภาพต่อโบว์นเคซินสูงจึงช่วยในการเพิ่มความไวในการพัฒนาชุดตรวจสอบ ซึ่งหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ MAb จะยังไม่ทราบช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่เห็นการลดลงของ MAb ทุกมอนอโคลน จึงทำการหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของทุก MAb โดยเคลือบแอนติเจนปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีแต่ละตัวในช่วงการเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 1:1000 ถึง 1: 524,288,000 ผลแสดงดังรูปที่ 4.4 (ภาคผนวก ก ตารางที่ 8)



รูปที่ 4.4 ทดสอบค่าการเจือจางมอนอโคลนอลแอนติบอดีสำหรับ indirect ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยโพรไวน์เคซีน 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

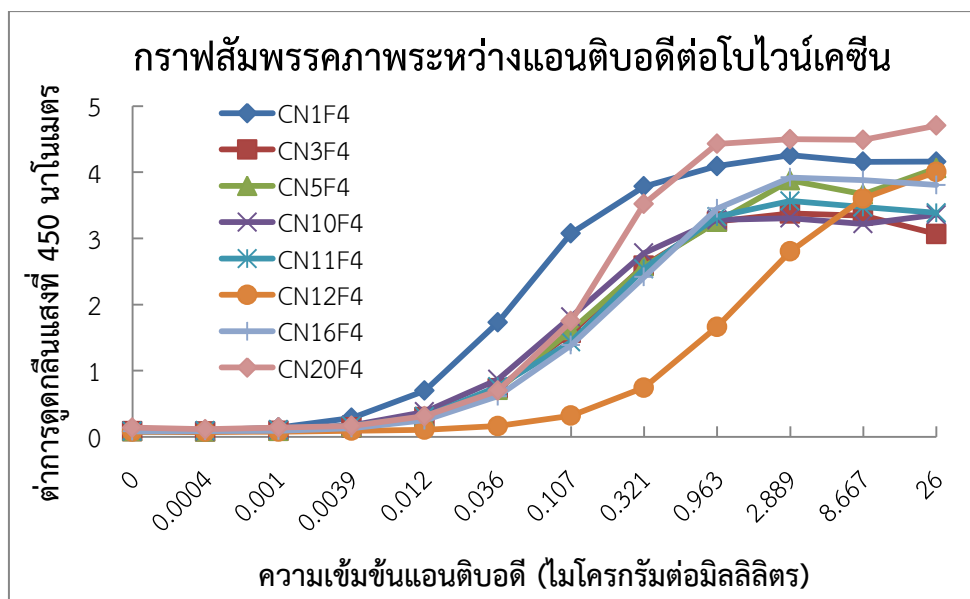
เมื่อทดสอบหาช่วงค่าการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับทุก MAb หลังจากทำบริสุทธิ์ จากรูปที่ 4.4 สามารถเลือกช่วงความเข้มข้นของแต่ละมอนอโคลนอลแอนติบอดีได้ (ตารางที่ 4.14) แต่แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 ให้ค่าที่ไม่เห็นช่วงการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ชัดเจน จึงได้ปรับค่าการเจือจางของแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 ให้มีช่วงค่าการเจือจางคือ 1:100 ถึง 1:16000 ดังนั้นช่วงความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับทุก MAb คือ  $4 \times 10^{-4}$  ถึง 26  $\mu\text{g/ml}$  จึงได้ช่วงความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับทุก MAb ในการหาสัมพรรคภาพระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี คือ 0, 0.0004, 0.0013, 0.0039, 0.0119, 0.0357, 0.1070, 0.3210, 0.9630, 2.8889, 8.6667 และ 26.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.14 ช่วงความเข้มข้นของแต่ละมอนอโคลนอลแอนติบอดีจากการทดสอบค่าการเจือจาง

โคลน	Dilution (1:1000X)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ช่วงความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
CN1F4	32- 4096	2.35	$7.35 \times 10^{-2}$ ถึง $5.00 \times 10^{-4}$
CN3F4	2-512	2.12	1.06 ถึง $4.10 \times 10^{-3}$
CN5F4	8-512	2.38	$2.98 \times 10^{-1}$ ถึง $4.70 \times 10^{-3}$
CN10F4	2-512	2.95	1.48 ถึง $5.80 \times 10^{-3}$
CN11F4	4-512	2.91	$7.28 \times 10^{-1}$ ถึง $5.70 \times 10^{-3}$
CN12F4	0.1-16	2.61	26.1 ถึง $1.63 \times 10^{-1}$
CN16F4	2-128	2.47	1.23 ถึง $1.93 \times 10^{-2}$
CN20F4	8-1024	3.50	0.44 ถึง $3.42 \times 10^{-3}$

กราฟแสดงผลการทดสอบสัมพรรคภาพ (ดังแสดงในรูปที่ 4.5) เมื่อทำการพล็อตจุดที่ให้ค่าการลดลงของกราฟที่เป็นเส้นตรง พบว่าแอนติบอดีของมอนอโคลน CN1F4 มีความชันของกราฟมากที่สุด จึงให้ค่าคงที่สัมพรรคภาพดีที่สุด นั่นคือแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพสูงจะจับกับแอนติเจนอย่างหนาแน่นและอยู่ได้นาน [78]

สำหรับแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN3F4 CN5F4 CN10F4 CN11F4 CN16F4 และ CN20F4 มีสัมพรรคภาพกับแอนติเจนใกล้เคียงกัน แต่น้อยกว่าแอนติบอดีของมอนอโคลน CN1F4 และแอนติบอดีของมอนอโคลน CN12F4 มีสัมพรรคภาพกับแอนติเจนต่ำที่สุด เนื่องจากให้ความชันของกราฟน้อยที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองของ David B. J. และคณะ (1987) ซึ่งพบว่าความชันของกราฟมาก จะให้ค่าคงที่สัมพรรคภาพของแอนติบอดีที่สูง [79] โดยสัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อแอนติเจนเกิดจากความแรงในการจับระหว่างแอนติบอดีกับอีพิโทปตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนแอนติเจน อย่างไรก็ตาม ถ้าอีพิโทปนี้มีหลายตำแหน่งบนแอนติเจน จะทำให้โอกาสของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น ซึ่งความแรงจับรวมของแอนติบอดี (antibody avidity) ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นสัมพรรคภาพในการจับกันจึงไม่สะท้อนถึงความแรงในการจับกับแอนติเจนเสมอไป โดยเฉพาะในกรณีที่แอนติเจนมีอีพิโทปซ้ำๆ กันหลายตำแหน่ง



รูปที่ 4.5 ผลสัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อแอนติเจน

#### 4.4.5 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ค่าความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีแสดงค่าในรูป EC50 คือ ค่าความเข้มข้นของโบรินเคซินที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 50% และค่า LOD คือความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งได้ค่าจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มาคำนวณด้วยโปรแกรม graph pad prism 4 ความเข้มข้น MAb ที่น้อยที่สุดที่ให้ค่ามากที่สุดของทุกแอนติบอดี จะถูกนำมาใช้เป็นการวัดความเข้มข้นของทุก MAb สำหรับทดสอบความไว คือ 8.67 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.5) และช่วงความเข้มข้นของแอนติเจนคือ 0 ถึง 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีแต่ละตัว แสดงดังตารางที่ 4.15 ความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดี EC50 อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD อยู่ในช่วง 6.1 ถึง 21.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่าความถูกต้องของสมการในการหาค่า (R-square) ของ EC50 และ LOD อยู่ในช่วง 96% ถึง 99%



ตารางที่ 4.15 ผลความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

มอนอโคลนอลแอนติบอดี จากมอนอโคลน	EC50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	R-square
CN1F4	0.09	8.3	0.97
CN3F4	0.76	15.4	0.99
CN5F4	0.46	18.0	0.99
CN10F4	0.86	18.2	0.99
CN11F4	0.83	21.5	0.99
CN12F4	0.75	15.8	0.99
CN16F4	0.28	19.2	0.96
CN20F4	0.14	6.1	0.98

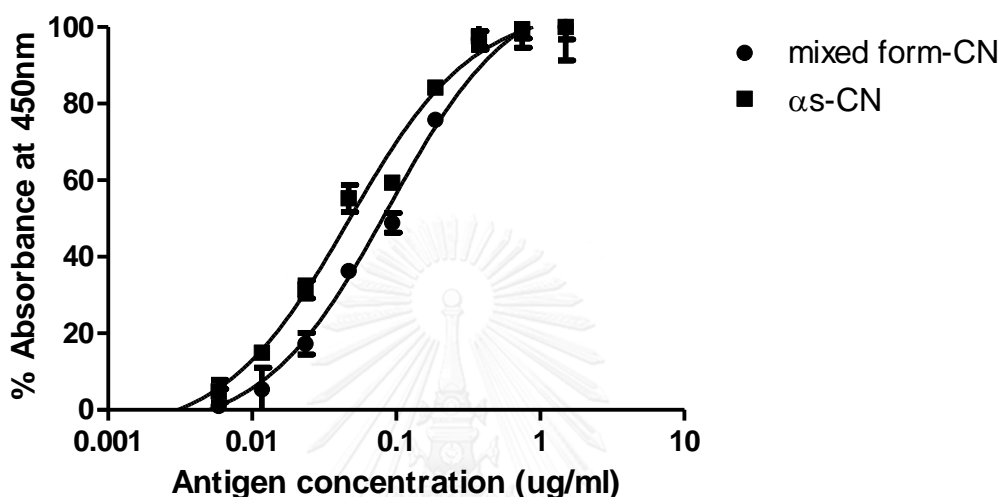
จากการทดสอบความไวของแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA ให้ค่า EC50 อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD อยู่ในช่วง 6.1 ถึง 21.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หากใช้เทคนิค sandwich ELISA ในการตรวจสอบความไวจะให้ค่าความไวในการตรวจสอบเพิ่มขึ้น 2-5 เท่าของเทคนิค indirect ELISA [80] มอนอโคลนแอนติบอดีทั้ง 8 มอนอโคลนนี้ให้ค่าความไวที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบของบริษัท Neogen ที่ให้ค่า LOD อยู่ในช่วง 5 ถึง 10 ppm [81] ดังนั้น MAb เหล่านี้เหมาะสมสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบได้

ในการวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA แสดงค่าเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%CR) (แสดงผลดังตารางที่ 4.16) ซึ่งคำนวณได้จากการนำ EC50 ของสารที่ทำทดสอบมาคำนวณเทียบกับ EC50 ของโบไวน์เคซีน ดังสมการต่อไปนี้

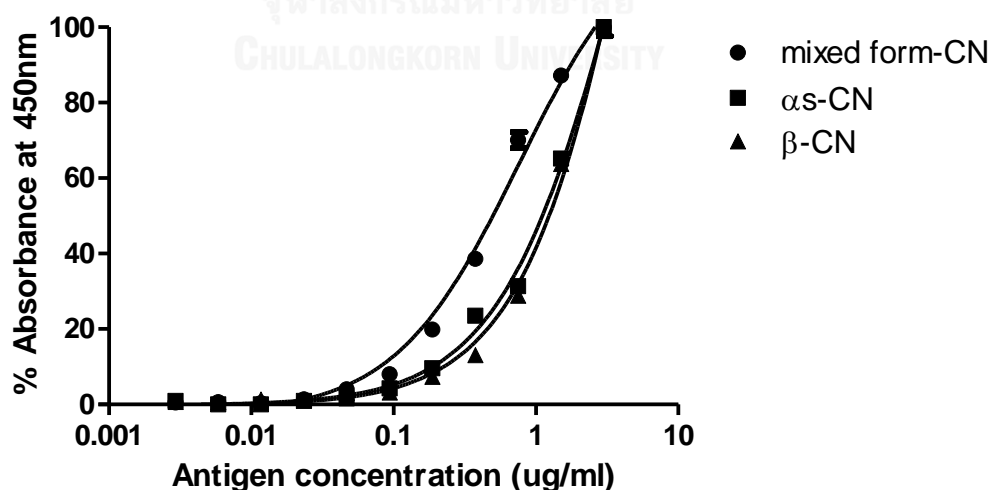
$$\%CR = \frac{\text{EC50 ของโบไวน์เคซีน}}{\text{EC50 ของสารทดสอบต่างๆ}} \times 100$$

ผลปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีจากโปรแกรม graph pad prism 4 แสดงผลดังรูปที่ 4.6 ถึง 4.13 ปฏิกิริยาข้ามเกิดจากแอนติเจนอื่นที่มีอิพิโทปที่คล้ายคลึงกับโบไวน์เคซีน หรืออาจมีโครงสร้างทางเคมีของแอนติเจนที่คล้ายกัน จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามได้ ผลการทดลองแอนติบอดี

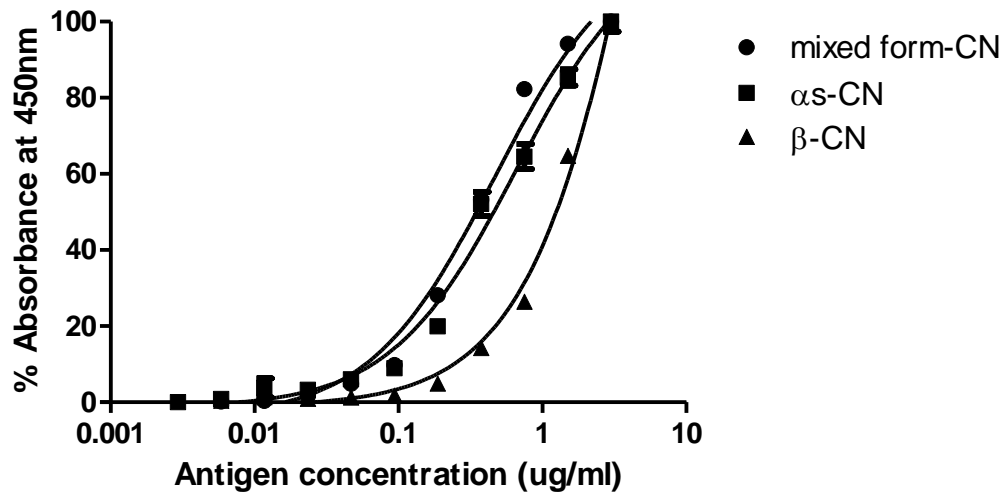
จากมอนอคอลน 8 มอนอคอลน เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไอโซไทป์ของเคซีน เนื่องจากทุกไอโซไทป์ของเคซีนพบเป็นส่วนผสมอยู่ในโบไวน์เคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Feng, Z. K. และ Cunningham-Rundles, C. (1989) ที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแคปตา เคซีน แล้วเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโบไวน์เคซีน เนื่องจากแคปตา เคซีน เป็นส่วนผสมในโบไวน์เคซีน [66]



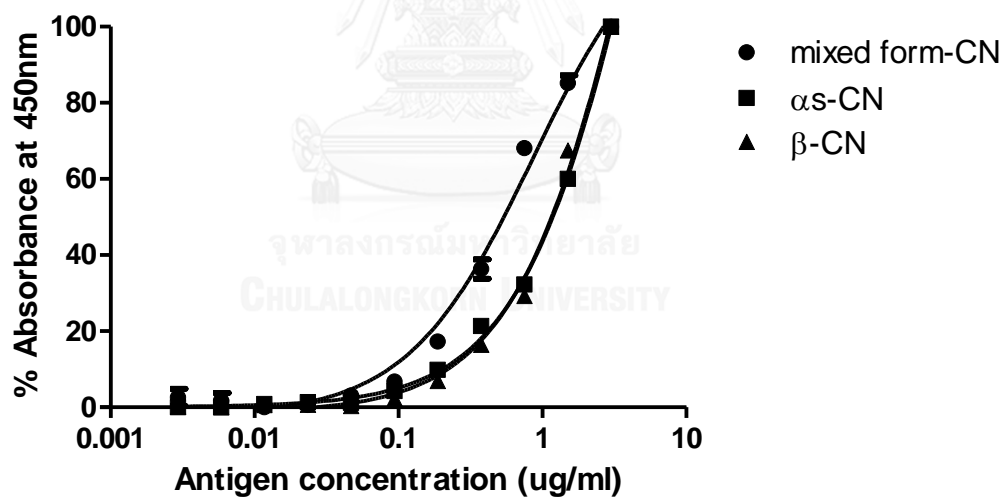
รูปที่ 4.6 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN1F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



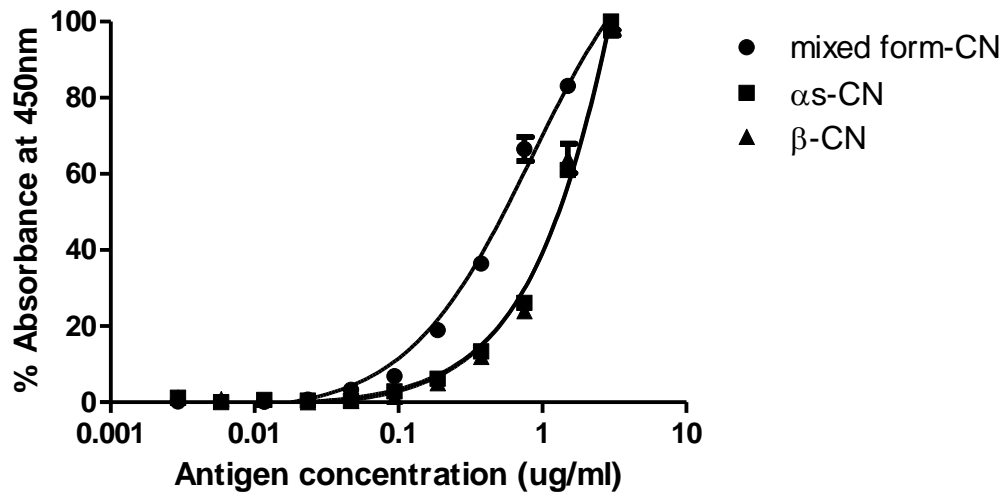
รูปที่ 4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN3F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



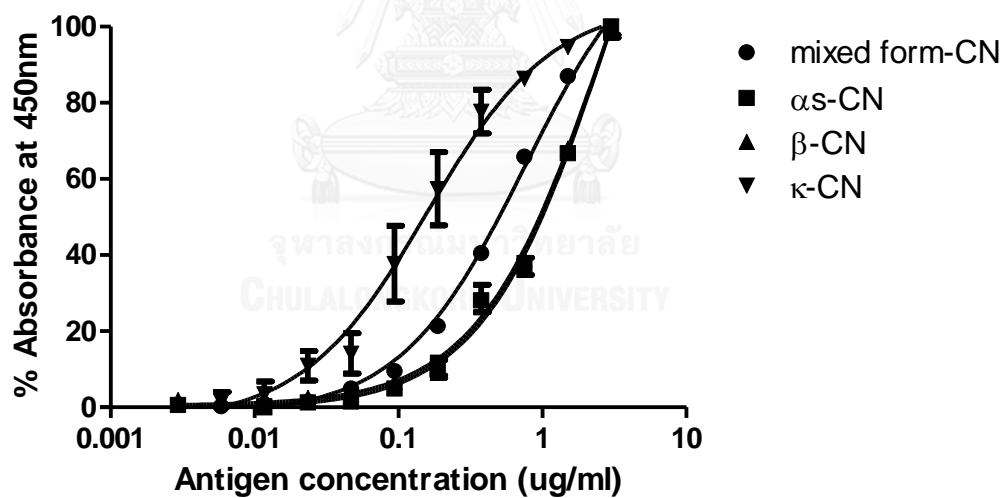
รูปที่ 4.8 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN5F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



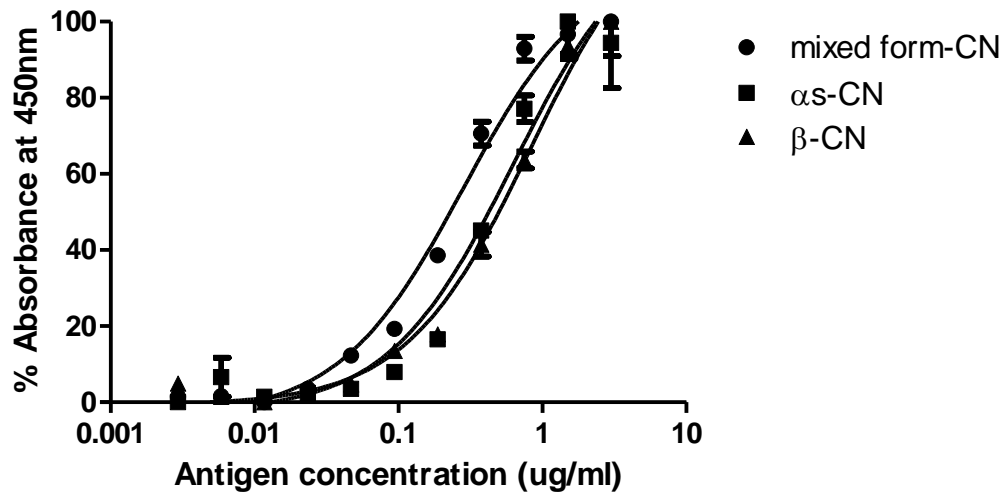
รูปที่ 4.9 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN10F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



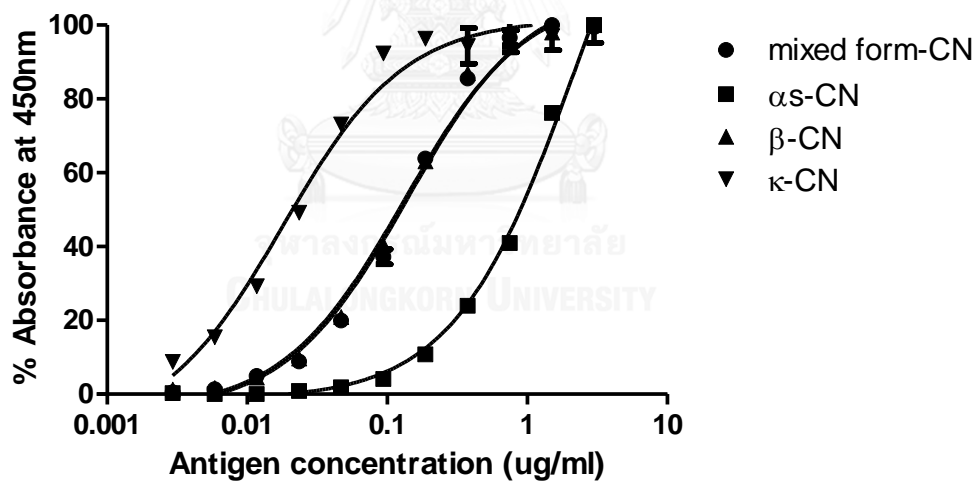
รูปที่ 4.10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN11F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



รูปที่ 4.11 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN12F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



รูปที่ 4.12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN16F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4



รูปที่ 4.13 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีจากโคลน CN20F4 โดยเทคนิค indirect ELISA ด้วย graph pad prism 4

ตารางที่ 4.16 ค่า EC50 และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแต่ละไอโซไทป์ของโบไวน์เคซีนด้วยเทคนิค indirect ELISA

MAb จาก มอนอโคลน	โบไวน์เคซีน		แอลฟา <sub>s</sub> เคซีน		บีตา เคซีน		แคปปา เคซีน	
	EC50	% CR	EC50	% CR	EC50	% CR	EC50	% CR
CN1F4	0.09	100	0.05	190	-	-	-	-
CN3F4	0.76	100	4.34	17	7.60	10	-	-
CN5F4	0.46	100	0.65	71	7.62	6	-	-
CN10F4	0.86	100	5.52	16	5.19	17	-	-
CN11F4	0.83	100	10.18	8	9.81	9	-	-
CN12F4	0.76	100	2.87	26	2.68	28	0.16	476
CN16F4	0.28	100	0.63	45	0.83	34	-	-
CN20F4	0.14	100	2.24	6	0.13	105	0.02	770

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb พบว่าแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN1F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อแอลฟา<sub>s</sub> เคซีนมากที่สุด แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 และ CN20F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อทุกไอโซไทป์ของเคซีน และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแคปปา เคซีนมากที่สุด อย่างไรก็ตาม มอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดนี้สามารถถูกนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบได้ โดยการเลือกแอนติบอดีสำหรับเป็นตัวตรวจสอบ และแอนติบอดีสำหรับเป็นตัวเคลือบหลุมที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบโบไวน์เคซีนต่อไป

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c เพศเมียจำนวน 3 ตัว ด้วยโบไวน์เคซีน (catalog no. C3400, 22090 Fluka) พบว่าระดับการสร้างแอนติบอดี (ไตเตอร์) ได้ต่ำ คือ < 500 และ 500 ด้วยเทคนิค indirect ELISA แสดงว่าโบไวน์เคซีนนี้ไม่มีความสามารถในการเป็นอิมมูโนเจนที่ดี เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 2 (ให้ค่าไตเตอร์ในเลือด 500) กับเซลล์มัยโอโลมาด้วยสารตัวกลาง ให้มอนอโคลนจำนวน 7 มอนอโคลน จากโคลนต้นกำเนิดจำนวน 1 โคลน ที่มีไอโซไทป์เป็น IgM ทั้งหมด ในระหว่างการทำ limiting dilution เพื่อให้ได้มอนอโคลนที่สร้าง MAb ในการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1 และ 3 ซึ่งให้ค่าไตเตอร์ < 500 โคลนที่ได้ไม่มีความเสถียรจึงไม่ได้มอนอโคลนจากการหลอมรวมเซลล์นี้ เพื่อให้ได้จำนวนมอนอโคลนที่สร้าง MAb เพิ่มขึ้นจึงทำการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c เพศเมีย เพิ่มอีกจำนวน 3 ตัว (คือหนูตัวที่ 4-6) ด้วยโบไวน์เคซีน (C8654) ให้ค่าไตเตอร์ของหนูอยู่ในช่วง 32000 ถึง 256000 แสดงให้เห็นว่าโบไวน์เคซีนนี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนูระดับสูง จึงเป็นอิมมูโนเจนที่ดี การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 ซึ่งให้ค่าไตเตอร์ 256000 ได้มอนอโคลนที่สร้าง MAb ที่มีไอโซไทป์หลายหลาย คือ IgG<sub>1</sub> IgG<sub>2a</sub> และ IgM การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 ซึ่งให้ค่าไตเตอร์ 32000 ได้มอนอโคลนที่มีไอโซไทป์เป็น IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>2a</sub> การทดสอบความจำเพาะของ MAb ทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มของ MAb ได้จำนวน 7 กลุ่ม ความจำเพาะ MAb จากมอนอโคลน CN4F1 ของการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความจำเพาะที่ VI คือสามารถจับได้กับทุกไอโซไทป์ของโบไวน์ เคซีน และโอวัลบูมิน MAb จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 5 ส่วนใหญ่มีความจำเพาะคล้าย MAb จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 (คือกลุ่มที่ III และ IV) การหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 4 ในกลุ่มที่ I (มีความจำเพาะกับโบไวน์เคซีน และแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน), III (มีความจำเพาะกับโบไวน์เคซีน แอลฟา<sub>5</sub> เคซีน และบีตา เคซีน) และ IV (มีความจำเพาะกับทุกไอโซไทป์ของโบไวน์เคซีน) ถูกนำมาศึกษาลักษณะสมบัติถัดไป ในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทปในกลุ่มที่ I ได้ MAb จากมอนอโคลน CN1F4 ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทป 1 มอนอโคลน ในกลุ่มที่ III ได้ MAb ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปแตกต่างกัน จำนวน 4 กลุ่มย่อยได้แก่ กลุ่มที่ III.A คือ MAb จากมอนอโคลน CN12F4 กลุ่มที่ III.B คือ MAb จากมอนอโคลน CN13F4 กลุ่มที่ III.C คือ MAb จาก

มอนอโคลน CN10F4 และกลุ่มที่ III.D คือ MAbs จากมอนอโคลน CN11F4, CN16F4 และ CN17F4 และสุดท้ายกลุ่มที่ IV พบว่าได้มอนอโคลนแอนติบอดีที่แตกต่างกันได้ 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มที่ IV.A ได้แก่ MAbs จากมอนอโคลน CN12F4 และ CN13F4 และกลุ่มที่ IV.B คือ MAbs จากมอนอโคลน CN20F4 เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างด้วยค่า AI สูงสุดในกลุ่มที่ III คือ 25% ของ MAbs ผสมระหว่าง CN5F4 และ CN11F4 และในกลุ่มที่ IV ให้ค่า AI คือ 92% และ 122% ของ MAbs ผสมระหว่าง CN12F4 กับ CN20F4 และ CN13F4 กับ CN20F4 ตามลำดับ มอนอโคลน CN1F4 CN3F4 CN5F4 CN10F4 CN11F4 CN12F4 CN16F4 และ CN20F4 ถูกเลือกมาทำเพิ่มจำนวน MAbs และทำบริสุทธิ์ เมื่อนำแอนติบอดีที่บริสุทธิ์มาทดสอบสัมพรรคภาพกับโบรินเคซิน พบว่าแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN1F4 ให้สัมพรรคภาพต่อแอนติเจนสูงสุด และเมื่อทดสอบความพบความไวของมอนอโคลนแอนติบอดีแสดงค่า EC<sub>50</sub> อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD อยู่ในช่วง 6.1 ถึง 21.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAbs พบว่าแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN1F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน เท่ากับ 190% แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4 และ CN16F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน เท่ากับ 17%, 71%, 16%, 8% และ 45% ตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับบีตา เคซีน เท่ากับ 10%, 6%, 17%, 9% และ 34% ตามลำดับ สำหรับแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 และ CN20F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน เท่ากับ 26% และ 6% เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อบีตา เคซีน เท่ากับ 28% และ 105% เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแคปปา เคซีน เท่ากับ 476% และ 770% ตามลำดับ MAbs ที่เกิดปฏิกิริยาข้าม

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่า MAbs จากมอนอโคลน CN1F4 สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอลฟา<sub>5</sub> เคซีนสูง แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับบีตา เคซีน และแคปปา เคซีน ส่วน MAbs จากมอนอโคลน CN20F4 สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับบีตา เคซีน และแคปปา เคซีน ในระดับสูง แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอลฟา<sub>5</sub> เคซีน ได้ในระดับต่ำ หากต้องการแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อทุกไอโซไทป์ของเคซีน เพื่อทำแอนติบอดีผสม (cocktail) จึงควรเลือก MAbs จากมอนอโคลน CN1F4 และ CN20F4 มาทำปฏิกิริยาร่วมกัน เนื่องจากการผสมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะหลากหลายต่อแต่ละไอโซไทป์ของเคซีนในการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี sandwich ELISA จะช่วยในการเพิ่มความไวในการตรวจเคซีนเพิ่ม



มากขึ้น [82] เนื่องจากโบรินเคซินมีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นการเตรียมชุดตรวจสอบใช้เทคนิค sandwich ELISA โดยใช้แอนติบอดีผสมระหว่าง MAbs จากมอนอโคลน CN1F4 กับ CN20F4 เป็นแอนติบอดีที่ใช้สำหรับเคลือบหลุม เพราะสามารถตรวจจับกับทุกไอโซไทป์ของเคซิน และเลือก MAbs จากมอนอโคลน CN12F4 ใช้เป็นแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์สำหรับการตรวจจับกับโบรินเคซิน ซึ่งโดยส่วนใหญ่ในการนำมอนอโคลนแอนติบอดีไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบนั้น จะนำเทคนิค sandwich ELISA มาใช้ เนื่องจากให้ค่าความไวสูงกว่าเทคนิค indirect ELISA 2 ถึง 5 เท่า [80] และในการตรวจหาความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันสามารถนำมาพัฒนาเทคนิค sandwich ELISA ให้มีประสิทธิภาพในการตรวจหาแอนติเจนได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น



## รายการอ้างอิง

1. Bleumink E., Young E. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *International Archives of Allergy and Immunology* 1968;34(6):521-543.
2. Docena G., Fernandez R., Chirido F., Fossati C. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996;51(6):412-416.
3. Høst A., Samuelsson E. G. Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. *Allergy* 1988;43(2):113-118.
4. De Kruif C. G., Huppertz T., Urban V. S., Petukhov A. V. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science* 2012;171:36-52.
5. Benlounes N., Candalha C., Matarazzo P., Dupont C., Heyman M. The time-course of milk antigen-induced TNF- $\alpha$  secretion differs according to the clinical symptoms in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999;104(4):863-869.
6. Moatsou G., Hatzinaki A., Psathas G., Anifantakis E. Detection of caprine casein in ovine Halloumi cheese. *International Dairy Journal* 2004;14(3):219-226.
7. Bramanti E., Ferri F., Raspi G., Lampugnani L., Carla Spinetti M., Miller K. E., Synovec R. E. New method for separation and determination of denatured caseins by hydrophobic interaction chromatography. *Talanta* 2001;54(2):343-349.
8. Miralles B., Leaver J., Ramos M., Amigo L. Mass mapping analysis as a tool for the identification of genetic variants of bovine  $\beta$ -casein. *Journal of Chromatography A* 2003;1007(1):47-53.
9. Deshmukh A., Donker J., Addis P., Jenness R. Cellulose acetate and polyacrylamide gel electrophoresis for quantification of milk protein fractions. *Journal of Dairy Science* 1989;72(1):12-17.

10. Muller-Renaud S., Dupont D., Dulieu P. Quantification of  $\beta$ -casein in milk and cheese using an optical immunosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52(4):659-664.
11. Muller-Renaud S., Dupont D., Dulieu P. Development of a biosensor immunoassay for the quantification of  $\alpha$ S1-casein in milk. *Journal of Dairy Research* 2005;72(1):57-64.
12. Oudshoorn P., Hiemstra P., Hessing M., Rutten G., Visser S., Simons G. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against bovine  $\beta$ -casein. *International Dairy Journal* 1994;4(8):671-678.
13. Fox P., Guiney J. A procedure for the partial fractionation of the  $\alpha$ s-casein complex. *Journal of Dairy Research* 1972;39(1):49-53.
14. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495-497.
15. Kobayashi T., Ametani A., Yamauchi K., Kaminogawa S. Differences in defining residues relevant to antibody binding by ELISA and proteolysis protection at the level of peptide antigenic determinants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1991;1077(1):11-18.
16. Anguita G., Martín R., García T., Morales P., Haza A. I., González I., Sanz B., Hernández P. E. Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine  $\beta$ -casein. *Journal of Dairy Research* 1995;62(4):655-659.
17. The Dairy Council. Health benefits of milk. 2007 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.milk.co.uk/>
18. ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, และศ.เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนานนท์ ส่วนประกอบของน้ำนม. 2010 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.foodnetworksolution.com/>
19. Mandal A. How Does Milk Allergy Differ from Lactose Intolerance? 2013 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.news-medical.net/>
20. European Commission. Milk and milk products. 2014 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://ec.europa.eu/>

21. Docstoc. Thailand's Dairy Industry Modernization. 2011 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.docstoc.com/>
22. IndexMundi. Thailand dairy, milk, fluid domestic consumption by year. 2014 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.indexmundi.com/>
23. Chantalakhana C., Skunmun P. Dairy development in Thailand and a case study on environmental impacts of peri-urban dairy colonies, Part I. Smallholder dairy development. Ch. 12 in Smallholder dairy production and marketing-opportunities and constraints. 2001; 2001.
24. Sigma-Aldrich. General Properties of Casein. 2014 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/>
25. O'Mahony J. A., Fox P. F. Chapter 2 - Milk: an overview. In: Singh H, Boland M, Thompson A, editors. Milk Proteins (Second edition). San Diego: Academic Press; 2014. p. 19-73.
26. Waugh D. F. The interactions of  $\alpha$ s-  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in micelle formation. Discussions of the Faraday Society 1958;25:186-192.
27. Schmidt D. Association of caseins and casein micelle structure. Developments in Dairy Chemistry 1982;1:61-86.
28. Walstra P. On the stability of casein micelles. Journal of Dairy Science 1990;73(8):1965-1979.
29. Walstra P. Casein sub-micelles: do they exist? International Dairy Journal 1999;9(3):189-192.
30. Horne D. S. Casein micelle structure: models and muddles. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2006;11(2):148-153.
31. Horne D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2003;213(2):255-263.
32. Horne D. S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. International Dairy Journal 1998;8(3):171-177.
33. Allergy Society of South Africa. Food - Milk Allergy & Intolerance. 2001 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.allergysa.org/>

34. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York*; 1989.
35. Kaminarides S., Koukiassa P. Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- $\kappa$ -casein. *Food Chemistry* 2002;78(1):53-55.
36. Ferreira I. M., Caçote H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A* 2003;1015(1):111-118.
37. Bobe G., Beitz D. C., Freeman A. E., Lindberg G. L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998;46(2):458-463.
38. Veloso A. C., Teixeira N., Ferreira I. M. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A* 2002;967(2):209-218.
39. Bonizzi I., Buffoni J. N., Feligini M. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. *Journal of Chromatography A* 2009;1216(1):165-168.
40. Jafar S. What is immunology? 2014 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.answers.com/>
41. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W H Freeman; 2002.
42. Poms R., Klein C., Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(1):1-31.
43. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Chapter 24, The adaptive immune system. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
44. Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* 2008;8(6):473-480.
45. วัชรระ กสิณฤกษ์. แอนติบอดี: ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้. เชียงใหม่: โครงการตำรา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2551.

46. Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin. I. *Biochem J* 1937;31:313-317.
47. Tiselius A., Kabat E. A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *The Journal of Experimental Medicine* 1939;69(1):119-131.
48. Porter R. Structural studies of immunoglobulins. *Science* 180 1973:713-716.
49. Edelman G. M. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 1973;180(88):830-840.
50. Nisonoff A., Hooper J. E., Spring S. B. *The antibody molecule*. New York: Academic Press; 1975.
51. Singh A., Chaudhary S., Agarwal A., Verma A. S. Chapter 15 - Antibodies: monoclonal and polyclonal. In: Singh ASV, editor. *Animal Biotechnology*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 265-287.
52. Woof J. M., Burton D. R. Human antibody–Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews Immunology* 2004;4(2):89-99.
53. David Male, Jonathan Brostoff, David B Roth, Roitt I. *Immunoglobulins - structure and function*. 5th ed; 2006.
54. สุวิน ว่องวัจนะ. แอนติเจน (Antigen). 2003 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://oc.md.kku.ac.th/>
55. Bio-Siva. *Monoclonal antibody production*. 2010 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://biosiva.50webs.org/>
56. กนกพร บุญศิริชัย. รั้งสี่ช่วยในการวิเคราะห์การยึดเรียงของยีนบนโครโมโซมได้อย่างไร. 2010 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www0.tint.or.th/>
57. Mak T. W., Saunders M. E. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*: Elsevier/Academic; 2006.
58. Biology Exams4u. What is Monoclonal antibody? How it is produced through hybridoma technology? 2013 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.biologyexams4u.com/>
59. Coligan J. E., Bierer B. E., Margulies D. H., Shevach E. M., Strober W. *Short protocols in immunology: a compendium of methods from current protocols in immunology*. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons; 2005.

60. Lequin R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 2005;51(12):2415-2418.
61. Gan S. D., Patel K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology* 2013;133(9):e12.
62. Haapakoski R., Karisola P., Fyhrquist N., Savinko T., Lehtimäki S., Wolff H., Lauerma A., Alenius H. Toll-like receptor activation during cutaneous allergen sensitization blocks development of asthma through IFN-gamma-dependent mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2012;133(4):964-972.
63. Canady J., Arndt S., Karrer S., Bosserhoff A. K. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology* 2012;133(3):647-657.
64. Dobrovolskaia E., Gam A., Slater J. Competition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can be a sensitive method for the specific detection of small quantities of allergen in a complex mixture. *Clinical & Experimental Allergy* 2006;36(4):525-530.
65. Mariani M., Luzzi E., Proietti D., Mancianti S., Casini D., Costantino P., van Gageldonk P., Berbers G. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the levels of serum antibody to *Haemophilus influenzae* type b. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998;5(5):667-674.
66. Feng Z.-K., Cunningham-Rundles C. Production of a monoclonal antibody to bovine k-casein. *Hybridoma* 1989;8(2):223-230.
67. Kuzmanoff K. M., Andresen J. W., Beattie C. W. Isolation of monoclonal antibodies monospecific for bovine  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Science* 1990;73(10):2741-2748.
68. Kuzmanoff K. M., Andresen J., Beattie C. W. Isolation and characterization of monoclonal antibodies monospecific for bovine  $\alpha$ -casein and  $\beta$ -casein. *Journal of Dairy Science* 1991;74(3):803-810.
69. Nagaune S.-i., Kaminogawa S., Enomoto A., Kobayashi T., Kurisaki J.-i., Yamauchi K. Preparation of Anti-bovine  $\beta$ -Casein Monoclonal Antibody and Analysis of the Interaction between the Antibody and  $\beta$ -Casein Fragment

- (Biological Chemistry). *Agricultural and Biological Chemistry* 1988;52(10):2577-2581.
70. Senocq D., Dupont D., Rolet-Répécaud O., Levieux D. Monoclonal antibodies against bovine  $\beta$ -casein: production and epitope characterization. *Food and Agricultural Immunology* 2001;13(4):213-224.
  71. Colak H., Aydin A., Nazli B., Ergun O. Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. *Food Control* 2006;17(11):905-908.
  72. Song H., Xue H., Han Y. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control* 2011;22(6):883-887.
  73. Zhou Y., Song F., Li Y., Liu J., Lu S., Ren H., Liu Z., Zhang Y., Yang L., Li Z. Double-antibody based immunoassay for the detection of  $\beta$ -casein in bovine milk samples. *Food Chemistry* 2013;141(1):167-173.
  74. Ailsa M. C. Chapter 10 Characterisation of monoclonal antibodies. In: Burdon RH, Knippenberg PHv, editors. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*: Elsevier; 1984. p. 186-215.
  75. Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Pages J., Bussard A., Goldberg M. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the  $\beta$ 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase. *Journal of Immunological Methods* 1983;60(3):351-358.
  76. Qi P. X. Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Dairy Science and Technology* 2007;87(Lait):363-383.
  77. Leung C. T., Kuzmanoff K. M., Beattie C. W. Isolation and Characterization of Monoclonal Antibody Directed Against Bovine  $\alpha$ s2Casein. *Journal of Dairy Science* 1991;74(9):2872-2878.
  78. ไพศาล สิทธีกรกุล. วิทยานิพนธ์การศึกษากันสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพฯ; 2548.
  79. Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods* 1987;100(1):173-179.



80. Sino Biological Inc. Sandwich ELISA, Highly Sensitive. 2013 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.elisa-antibody.com/>
81. Neogen Corporation. Veratox for Casein. 2009 [cited 2014 August 8th]; Available from: <http://www.neogen.com/>
82. Dabir P. D., Ottosen P., Høyer S., Hamilton-Dutoit S. Comparative analysis of three-and two-antibody cocktails to AMACR and basal cell markers for the immunohistochemical diagnosis of prostate carcinoma. Diagnostic Pathology 2012;7(1):1-6.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายสำหรับเทคนิค ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer pH 7.4 (PB stock)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.6	กรัม	เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
----------------------------------	------	------	---------------------

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	71.63	กรัม	เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร
----------------------------------	-------	------	---------------------

ไตเตรต Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ด้วย NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> จนได้เป็น pH 7.4

2) 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 20 ลิตร

NaCl	175.2	กรัม	ละลายใน DI 1 ลิตร
------	-------	------	-------------------

PB stock	1	ลิตร	
----------	---	------	--

เติมน้ำกลั่นลงให้น้ำกลั่นปริมาตร 18 ลิตร

3) 0.05 % (v/v) Tween 20 ในสารละลาย PBS (PBS-T)

Tween 20	500	มิลลิลิตร	
----------	-----	-----------	--

PBS	1	ลิตร	
-----	---	------	--

4) 5% (w/v) นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม	
---------------	---	------	--

PBS	100	มิลลิลิตร	
-----	-----	-----------	--

5) 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA)

Bovine serum albumin	1	กรัม	
----------------------	---	------	--

PBS	100	มิลลิลิตร	
-----	-----	-----------	--

6) 1% (w/v) เจลาตินใน PBS-T

เจลาติน	1	กรัม	
---------	---	------	--

PBS-T	100	มิลลิลิตร	
-------	-----	-----------	--

## 7) 5% (w/v) นมถั่วเหลือง

ผงนมถั่วเหลือง	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

## 8) 5% (v/v) fetal calf serum (FCS)

Fetal calf serum	5	มิลลิลิตร
PBS	95	มิลลิลิตร

## 9) 205 mM potassium citrate buffer pH 4.0

Citric acid	43.1	กรัม	ละลายใน DDI 1 ลิตร
Potassium citrate	66.5	กรัม	ละลายใน DDI 1 ลิตร

ไตเตรต citric acid ด้วย potassium citrate จนได้เป็น pH 4.0

## 10) Substrate solution

3,3', ,5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB)	3.0	มิลลิกรัม
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	300	มิลลิลิตร
205 mM potassium citrate buffer	9.9	มิลลิลิตร
50% hydrogen peroxide	3.4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมสารละลายก่อนใช้)

11) 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายสำหรับทำบริสุทธิ์แอนติบอดี

1) 20mM sodium phosphate pH 7.0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.77 กรัม

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.69 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน

2) 0.1M glycine-HCl pH 2.7

Glycine-HCl 7.51 กรัม

Conc.HCl 2.42 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 2.7 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน

3) 1M Tris HCl buffer, pH 9.0

Trizma base (Tris hydroxymethyl aminomethane) 121.14 กรัม

Conc. HCl 6.41 มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรดจนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

## 1) Stock HAT 100X

Hypoxanthine	136 มิลลิกรัม	ละลายในน้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร
Aminopterin	2 มิลลิกรัม	ละลายในน้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร
Thymidine	39 มิลลิกรัม	ละลายในน้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายแต่ละสารเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ อุณหภูมิ Aminopterin ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนกว่าจะละลายหมด

## 2) stock HT 100X

Hypoxanthine	136 มิลลิกรัม	ละลายในน้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร
Thymidine	39 มิลลิกรัม	ละลายในน้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 สารให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4 กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	2.0 กรัม
L-glutamin	0.1 กรัม
Glucose	2.0 กรัม
Pyruvic acid	0.11 กรัม

นำสารทั้งหมดผสมกัน แล้วละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร กรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

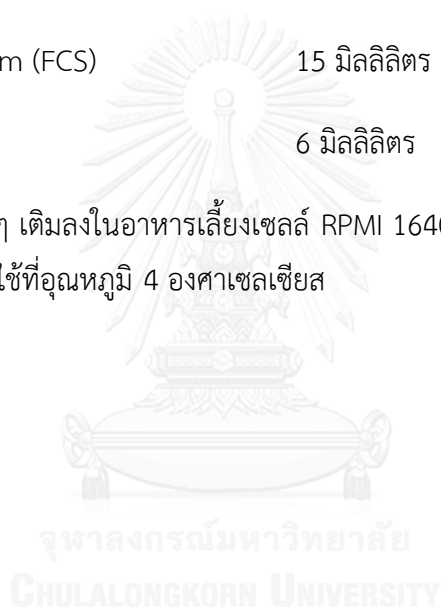
อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1 ลิตร
HAT 100X	10 มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 5) อาหารสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ปริมาตร 60 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	39 มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS)	15 มิลลิลิตร
DMSO	6 มิลลิลิตร

นำ DMSO ค่อยๆ เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 แล้วเติม FCS เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำมาใช้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนู และสาร  
ป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะที่เหมาะสม

หนู ตัวที่	ค่าการ เจือจาง (1:1000X)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
		โพรไวน์เคซิน*				
		5% (w/v) นมถั่วเหลือง <sup>๑</sup>	5% (w/v) หางนม <sup>๑</sup>	1% (w/v) เจลาติน <sup>๑</sup>	1% (w/v) แอลบูมิน <sup>๑</sup>	-
1	0.5	0.866	0.216	0.170	0.146	0.162
	1	0.285	0.198	0.166	0.171	0.164
	2	0.241	0.185	0.170	0.153	0.160
	4	0.233	0.177	0.172	0.130	0.175
	8	0.446	0.167	0.504	0.298	0.527
	16	0.290	0.137	0.323	0.213	0.361
	32	0.251	0.127	0.253	0.206	0.255
	64	0.221	0.089	0.177	0.143	0.205
	128	0.409	0.148	0.171	0.155	0.180
	256	0.193	0.142	0.269	0.120	0.156
	512	0.179	0.112	0.158	0.123	0.167
	1024	0.216	0.119	0.269	0.135	0.154
2	0.5	1.164	<b>0.512</b>	0.935	0.832	0.962
	1	0.718	0.264	0.580	0.562	0.588
	2	0.402	0.197	0.319	0.316	0.354
	4	0.296	0.125	0.213	0.163	0.251
	8	0.213	0.112	0.157	0.128	0.173
	16	0.178	0.090	0.135	0.134	0.155
	32	0.181	0.087	0.127	0.117	0.139
	64	0.177	0.086	0.116	0.111	0.134
	128	0.582	0.090	0.119	0.125	0.132
	256	0.540	0.096	0.128	0.136	0.151
	512	0.175	0.102	0.133	0.124	0.140
	1024	0.180	0.121	0.146	0.113	0.160

\* หมายถึง สารเคลือบหลุม ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, <sup>๑</sup> หมายถึง ตัวบล็อก,  
ตัวเน้นหมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้ระบุค่าการเจือจางที่เหมาะสม



ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนู และสาร  
ป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะที่เหมาะสม (ต่อ)

หนูตัวที่	ค่าการ เจือจาง (1:1000X)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
		โพรไวน์เคซีน*				
		5% (w/v) นมถั่วเหลือง <sup>๑</sup>	5% (w/v) หางนม <sup>๑</sup>	1% (w/v) เจลาติน <sup>๑</sup>	1% (w/v) แอลบูมิน <sup>๑</sup>	-
3	0.5	0.893	0.409	1.115	0.885	1.146
	1	0.593	0.242	0.741	0.597	0.781
	2	0.385	0.189	0.457	0.430	0.500
	4	0.268	0.139	0.306	0.227	0.331
	8	0.226	0.103	0.202	0.163	0.237
	16	0.184	0.091	0.167	0.147	0.190
	32	0.195	0.084	0.142	0.125	0.164
	64	0.153	0.084	0.141	0.119	0.158
	128	0.153	0.096	0.120	0.120	0.135
	256	0.161	0.092	0.138	0.114	0.148
	512	0.168	0.132	0.144	0.122	0.147
	1024	0.174	0.147	0.145	0.108	0.182
ซีรัมหนู ไม่ได้ถูก กระตุ้น	0.5	0.657	<b>0.269</b>	0.800	0.610	0.893
	1	0.484	0.157	0.573	0.377	0.627
	2	0.346	0.136	0.449	0.312	0.501
	4	0.344	0.134	0.381	0.238	0.416
	8	0.290	0.129	0.309	0.168	0.319
	16	0.238	0.115	0.237	0.148	0.262
	32	0.237	0.110	0.208	0.121	0.215
	64	0.206	0.110	0.189	0.126	0.194
	128	0.188	0.115	0.164	0.150	0.171
	256	0.182	0.095	0.166	0.106	0.171
	512	0.172	0.097	0.177	0.139	0.179
	1024	0.190	0.099	0.168	0.124	0.167

\* หมายถึง สารเคลือบหลุม ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, <sup>๑</sup> หมายถึง ตัวบล็อก,  
ตัวเน้นหมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้ระบุค่าการเจือจางที่เหมาะสม

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนูหลังฉีด  
กระตุ้นด้วยเคซีนไฮโดรเซท (22090 FLUKA) หนูตัวที่ 1, 3 และซีรัมของหนูที่ไม่ถูกกระตุ้น

หนู	ค่าการ เจือจาง (1:1000X)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
ตัวที่ 1	0.5	0.534
	1	0.407
	2	0.346
	4	0.297
	8	0.223
	16	0.168
ตัวที่ 3	0.5	0.507
	1	0.378
	2	0.232
	4	0.215
	8	0.142
	16	0.147
ซีรัมของหนู ที่ไม่ถูก กระตุ้น	0.5	0.294
	1	0.224
	2	0.168
	4	0.151
	8	0.137
	16	0.172

\*หมายเหตุ หนูตัวที่ 2 ถูกนำเข้าสู่กระบวนการหลอมรวมเซลล์

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนูหลังฉีด  
กระตุ้นด้วยโวกไวน์เคซีน (C8654) หนูตัวที่ 4-6 และซีรัมของหนูที่ไม่ถูกกระตุ้น

ค่าการ เจือจาง (1:1000X)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากซีรัมของหนู			
	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6	ไม่ฉีดกระตุ้น
0.5	4.746	4.034	5.061	0.105
1	4.812	2.496	5.043	0.088
2	4.627	1.572	4.761	0.078
4	4.668	0.724	4.386	0.069
8	3.991	0.364	3.177	0.068
16	2.584	0.212	1.971	0.071
32	1.274	<b>0.179</b>	0.879	0.069
64	0.619	0.103	0.367	0.064
128	0.298	0.088	0.206	0.061
256	<b>0.145</b>	0.082	<b>0.129</b>	0.062
512	0.107	0.079	0.088	0.071
1024	0.099	0.086	0.096	0.080

\*หมายเหตุ ตัวเน้น หมายถึงระดับการสร้างแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี  
ด้วยวิธี sandwich ELISA

clone	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
CN1F1	0.336	0.631	0.228	0.264	<b>3.695</b>	0.319
CN2F1	0.196	0.596	0.190	0.214	<b>3.776</b>	0.314
CN3F1	0.345	0.591	0.242	0.249	<b>3.434</b>	0.289
CN4F1	0.335	0.584	0.216	0.248	<b>3.617</b>	0.329
CN5F1	0.364	0.678	0.295	0.289	<b>3.744</b>	0.344
CN6F1	0.220	0.650	0.238	0.257	<b>3.648</b>	0.355
CN7F1	0.317	0.639	0.206	0.236	<b>3.478</b>	0.281
CN1F4	0.100	<b>0.537</b>	0.098	0.135	0.254	0.085
CN2N4	<b>0.544</b>	0.091	0.103	0.094	0.107	0.129
CN3N4	<b>0.479</b>	0.105	0.109	0.112	0.118	0.124
CN4F4	0.106	<b>0.460</b>	0.100	0.116	0.092	0.094
CN5F4	<b>0.820</b>	0.330	0.090	0.118	0.260	0.078
CN6F4	0.108	0.094	0.100	0.095	<b>0.532</b>	0.176
CN7F4	0.126	0.126	0.093	0.097	<b>1.395</b>	0.149
CN8F4	<b>0.794</b>	0.103	0.118	0.108	0.160	0.114
CN9F4	<b>0.779</b>	0.108	0.088	0.117	0.138	0.108
CN10F4	<b>0.472</b>	0.080	0.088	0.084	0.101	0.108
CN11F4	<b>0.208</b>	0.076	0.094	0.077	0.100	0.099
CN12F4	<b>0.708</b>	0.067	0.074	0.075	0.068	0.076
CN13F4	<b>0.344</b>	0.065	0.066	0.082	0.071	0.077
CN14F4	<b>0.668</b>	0.060	0.064	0.064	0.075	0.078
CN15F4	<b>0.396</b>	0.061	0.068	0.070	0.071	0.082
CN16F4	<b>0.367</b>	0.070	0.098	0.081	0.106	0.151
CN17F4	<b>0.209</b>	0.070	0.077	0.096	0.083	0.105
CN18F4	<b>0.575</b>	0.071	0.073	0.068	0.077	0.082
CN19F4	<b>0.609</b>	0.078	0.087	0.080	0.082	0.098
CN20F4	<b>0.371</b>	0.074	0.081	0.083	0.090	0.103
CN1F5	<b>2.999</b>	0.275	0.155	0.138	0.397	0.230
CN2F5	<b>3.088</b>	0.260	0.128	0.119	0.319	0.113
CN3F5	<b>2.948</b>	0.275	0.139	0.149	0.344	0.130
CN4F5	<b>2.901</b>	0.202	0.128	0.123	0.270	0.106

\*หมายเหตุ ส่วนเน้น หมายถึง ไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ด้วยวิธี sandwich ELISA (ต่อ)

clone	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgM	IgA
CN5F5	<b>2.997</b>	0.232	0.131	0.121	0.291	0.095
CN6F5	<b>2.957</b>	0.206	0.115	0.101	0.340	0.104
CN7F5	<b>3.040</b>	0.236	0.113	0.093	0.307	0.107
CN8F5	<b>3.033</b>	0.420	0.143	0.161	0.514	0.106
CN9F5	<b>3.264</b>	0.445	0.265	0.154	0.510	0.215
CN10F5	<b>3.207</b>	0.369	0.217	0.157	0.461	0.297
CN11F5	<b>3.120</b>	0.518	0.163	0.160	0.695	0.165
CN12F5	<b>3.054</b>	0.321	0.134	0.118	0.342	0.121
CN13F5	<b>2.802</b>	0.191	0.114	0.098	0.183	0.105
CN14F5	<b>2.527</b>	0.157	0.105	0.090	0.162	0.115
CN15F5	<b>2.462</b>	0.172	0.091	0.114	0.174	0.108
CN16F5	<b>2.552</b>	0.221	0.214	0.120	0.193	0.115
CN17F5	<b>2.515</b>	0.201	0.119	0.100	0.157	0.102
CN18F5	<b>2.353</b>	0.130	0.083	0.079	0.126	0.097
CN19F5	<b>2.373</b>	0.132	0.078	0.074	0.141	0.082
CN20F5	<b>2.383</b>	0.134	0.076	0.080	0.122	0.076
CN21F5	<b>2.313</b>	0.128	0.073	0.065	0.118	0.074
CN22F5	<b>2.158</b>	0.111	0.062	0.068	0.120	0.101
CN23F5	0.105	<b>0.396</b>	0.082	0.081	0.131	0.084
CN24F5	0.098	<b>0.421</b>	0.099	0.087	0.141	0.095
CN25F5	0.096	<b>0.341</b>	0.077	0.090	0.124	0.091
CN26F5	<b>2.385</b>	0.294	0.083	0.099	0.102	0.078
CN27F5	<b>2.416</b>	0.175	0.059	0.115	0.088	0.119
CN28F5	<b>2.418</b>	0.193	0.086	0.102	0.202	0.093
CN29F5	<b>2.422</b>	0.199	0.076	0.103	0.175	0.159
CN30F5	<b>1.599</b>	0.137	0.072	0.064	0.1338	0.068
CN31F5	<b>1.512</b>	0.123	0.066	0.064	0.127	0.068
CN32F5	<b>1.308</b>	0.0100	0.059	0.063	0.116	0.063
CN33F5	<b>1.307</b>	0.090	0.053	0.058	0.108	0.060

\*หมายเหตุ ส่วนเน้น หมายถึง ไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 5 วิเคราะห์การจับของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับสารที่สนใจต่างๆ

ด้วยวิธี indirect ELISA

MAb จาก มอนอโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่สารทดสอบการจับต่างๆ						
	casein	$\alpha_s$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -Lg	$\alpha$ -La	BSA
CN1F1	3.714	3.550	2.155	1.601	0.301	0.202	0.186
CN2F1	3.940	3.831	3.037	2.879	0.376	0.250	0.236
CN3F1	3.816	3.629	2.838	1.813	0.332	0.210	0.200
CN4F1	4.220	3.873	3.550	2.582	0.635	0.380	0.310
CN5F1	3.722	3.660	2.524	1.366	0.190	0.133	0.131
CN6F1	3.926	3.744	3.031	2.078	0.411	0.282	0.250
CN7F1	3.669	3.589	2.311	0.871	0.140	0.105	0.101
ตัวควบคุม ผลลบ	0.200	0.094	0.265	0.101	0.130	0.087	0.095



ตารางที่ 6 วิเคราะห์การจับของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับสารที่สนใจต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA

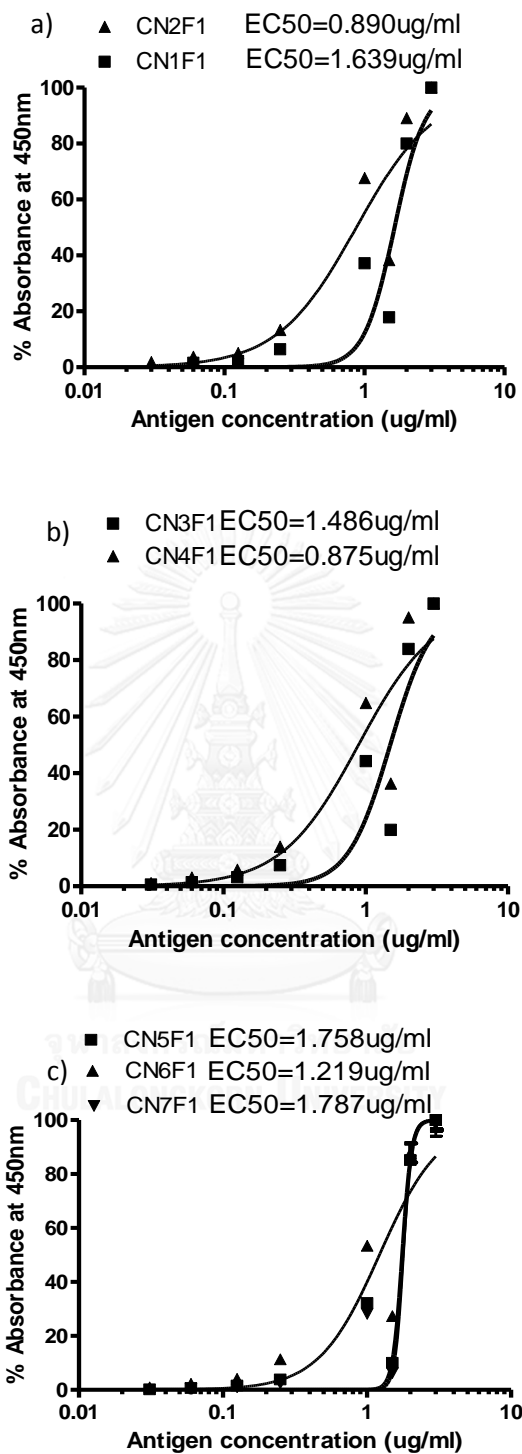
โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่สารทดสอบการจับต่างๆ									
	CN	$\alpha_s$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -Lg	$\alpha$ -La	BSA	transferrin	insulin	OVA
CN1F1	2.550	2.658	1.737	1.294	0.324	0.272	0.221	0.234	0.250	0.720
CN1F4	2.522	2.848	0.240	0.099	0.101	0.065	0.120	0.073	0.070	0.062
CN2F4	3.050	1.857	1.943	0.470	0.177	0.156	0.110	0.139	0.125	0.146
CN3F4	2.789	1.277	1.202	0.417	0.177	0.202	0.106	0.106	0.103	0.101
CN4F4	0.112	0.107	0.103	0.074	0.128	0.063	0.057	0.075	0.061	0.063
CN5F4	2.027	1.763	2.016	0.378	0.078	0.083	0.088	0.095	0.082	0.074
CN6F4	0.526	0.274	0.178	0.072	1.430	0.060	0.065	0.059	0.067	0.063
CN7F4	1.058	0.883	0.359	0.082	2.423	0.110	0.079	0.084	0.100	0.098
CN8F4	0.089	0.104	0.110	0.214	0.108	0.110	0.094	0.091	0.111	0.129
CN9F4	0.168	0.139	0.123	0.081	0.103	0.109	0.102	0.105	0.129	0.218
CN10F4	2.523	1.004	1.130	0.111	0.095	0.074	0.054	0.068	0.110	0.153
CN11F4	2.573	1.173	1.305	0.260	0.137	0.088	0.059	0.074	0.070	0.067
CN12F4	3.304	0.977	3.193	3.786	0.132	0.142	0.128	0.109	0.136	0.141
CN13F4	3.298	1.092	3.175	3.977	0.112	0.098	0.100	0.114	0.097	0.101
CN14F4	1.026	0.987	0.700	0.375	0.836	0.528	0.326	0.336	0.474	0.873
CN15F4	1.965	1.835	1.552	0.877	1.704	1.287	0.821	0.805	1.173	1.733
CN16F4	1.456	1.172	1.200	0.272	0.086	0.079	0.091	0.098	0.084	0.088
CN17F4	3.031	2.457	2.477	0.612	0.085	0.088	0.091	0.085	0.094	0.087
CN18F4	0.929	0.763	0.543	0.311	0.721	0.481	0.288	0.331	0.419	0.908
CN19F4	2.852	2.620	2.371	1.523	2.677	2.136	1.439	1.414	1.944	2.826
CN20F4	2.294	1.120	2.273	2.238	0.097	0.097	0.096	0.096	0.099	0.107
CN1F5	2.816	0.701	2.465	2.859	0.150	0.096	0.085	0.093	0.080	0.110
CN2F5	3.247	0.903	2.590	2.803	0.157	0.097	0.076	0.082	0.122	0.124
CN3F5	3.485	1.132	2.787	3.192	0.165	0.099	0.089	0.090	0.131	0.139
CN4F5	3.025	0.534	1.858	2.443	0.142	0.092	0.074	0.080	0.095	0.120
CN5F5	2.588	0.784	2.447	2.588	0.198	0.115	0.088	0.081	0.097	0.126
CN6F5	3.150	1.046	2.821	2.636	0.142	0.078	0.060	0.074	0.092	0.100
CN7F5	3.234	0.949	2.753	2.959	0.122	0.064	0.060	0.068	0.079	0.100
CN8F5	3.010	0.574	2.128	2.506	0.094	0.076	0.066	0.067	0.061	0.076
CN9F5	2.800	1.123	2.926	3.155	0.248	0.136	0.098	0.093	0.120	0.164
CN10F5	3.097	1.079	2.855	3.019	0.157	0.078	0.064	0.070	0.078	0.127
CN11F5	3.110	1.103	2.920	3.093	0.168	0.091	0.072	0.086	0.089	0.126

ตารางที่ 6 วิเคราะห์การจับของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับสารที่สนใจต่างๆ ด้วยวิธี

indirect ELISA (ต่อ)

โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่สารทดสอบการจับต่างๆ									
	CN	$\alpha$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -Lg	$\alpha$ -La	BSA	transferrin	insulin	OVA
CN12F5	2.843	0.646	2.489	2.944	0.110	0.074	0.068	0.069	0.060	0.074
CN13F5	1.850	0.292	1.301	2.413	0.084	0.080	0.080	0.065	0.060	0.061
CN14F5	1.988	0.226	1.108	2.429	0.052	0.047	0.043	0.044	0.045	0.047
CN15F5	2.032	0.204	1.050	2.540	0.049	0.051	0.051	0.053	0.048	0.049
CN16F5	1.944	0.191	0.891	2.455	0.054	0.062	0.055	0.064	0.056	0.069
CN17F5	1.947	0.269	1.098	2.499	0.073	0.092	0.080	0.087	0.089	0.085
CN18F5	2.054	0.211	0.891	2.469	0.056	0.062	0.057	0.060	0.062	0.062
CN19F5	2.143	0.204	0.830	2.295	0.056	0.066	0.056	0.061	0.063	0.062
CN20F5	2.085	0.203	0.761	2.445	0.070	0.086	0.073	0.078	0.084	0.082
CN21F5	0.285	0.157	0.950	2.176	0.064	0.064	0.063	0.065	0.090	0.079
CN22F5	0.233	0.103	0.593	1.807	0.063	0.057	0.060	0.061	0.058	0.060
CN23F5	2.243	3.413	1.524	0.533	0.075	0.072	0.082	0.081	0.083	0.094
CN24F5	2.396	3.518	1.713	0.659	0.062	0.059	0.049	0.053	0.060	0.065
CN25F5	1.427	2.721	0.918	0.290	0.070	0.047	0.051	0.071	0.057	0.063
CN26F5	2.576	0.357	1.386	3.006	0.095	0.071	0.091	0.081	0.075	0.081
CN27F5	2.627	0.290	1.071	2.783	0.082	0.086	0.085	0.109	0.109	0.102
CN28F5	2.775	0.383	1.413	2.931	0.079	0.075	0.072	0.082	0.078	0.079
CN29F5	2.853	0.435	1.509	2.951	0.067	0.071	0.063	0.070	0.073	0.071
CN30F5	0.534	0.292	1.380	2.744	0.061	0.056	0.055	0.059	0.057	0.055
CN31F5	0.665	0.347	1.745	3.011	0.063	0.056	0.054	0.056	0.055	0.059
CN32F5	0.590	0.309	1.624	2.931	0.062	0.062	0.060	0.129	0.105	0.069
CN33F5	0.245	0.132	0.607	1.983	0.055	0.057	0.057	0.061	0.066	0.064
ตัวควบคุมลบ	0.111	0.106	0.099	0.103	0.102	0.100	0.077	0.100	0.092	0.101





รูปที่ 1 วิเคราะห์ความไว ด้วยวิธี indirect ELISA ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

a) CN1F1 (■), CN2F1 (▲) b) CN3F1 (■), CN4F1 (▲)

และ c) CN5F1 (■), CN6F1 (▲), CN7F1 (▼)

ตารางที่ 7 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ระหว่างทำบริสุทธิ์ที่อัตราไหล

1 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที

Fraction	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร							
	CN1F4		CN3F4		CN5F4		CN10F4	
	ไหลครั้งที่		ไหลครั้งที่		ไหลครั้งที่		ไหลครั้งที่	
	1	2	1	2	1	2	1	2
FT1	0.097	0.079	0.089	0.101	0.082	0.074	0.087	0.087
FT2	0.085	0.071	0.083	0.082	0.075	0.096	0.080	0.089
1	0.092	0.072	0.091	0.089	0.074	0.074	0.079	0.085
2	0.078	0.081	0.098	0.089	0.067	0.090	0.094	0.085
3	0.078	0.116	0.083	0.092	0.078	0.085	0.100	0.091
4	0.085	0.070	0.083	0.080	0.073	0.089	0.083	0.077
5	0.082	0.112	0.095	0.097	0.061	0.101	0.104	0.081
6	0.077	0.100	0.265	0.097	0.073	0.111	0.120	0.093
7	0.253	0.246	0.650	0.173	0.417	0.285	0.442	0.103
8	0.990	2.439	1.139	0.818	2.158	0.730	2.520	0.142
9	2.219	1.799	2.500	2.838	2.960	1.576	2.843	0.266
10	2.817	1.729	2.924	3.416	1.627	2.389	2.038	0.653
11	2.107	0.689	2.183	2.429	0.705	2.381	1.416	1.883
12	1.422	0.454	1.330	1.814	0.424	1.805	1.104	2.714
13	0.882	0.346	0.671	0.787	0.275	1.014	0.730	2.648
14	0.512	0.281	0.381	0.700	0.216	0.677	0.529	1.821
15	0.292	0.195	0.300	0.331	0.170	0.496	0.247	1.008
16	0.279	0.186	0.241	0.224	0.129	0.322	0.183	0.618
17	0.236	0.139	0.174	0.202	0.107	0.279	0.173	0.434
18	0.145	0.119	0.145	0.166	0.093	0.223	0.133	0.281
19	0.162	0.120	0.144	0.144	0.109	0.196	0.131	0.256
20	0.184	0.108	0.160	0.122	0.113	0.149	0.105	0.218
21	0.121	0.114	0.117	0.101	0.097	0.166	0.095	0.150
22	0.118	0.096	0.127	0.104	0.095	0.138	0.093	0.138
23	0.129	0.100	0.104	0.111	0.089	0.139	0.113	0.116
24	0.119	0.095	0.105	0.101	0.099	0.120	0.094	0.103

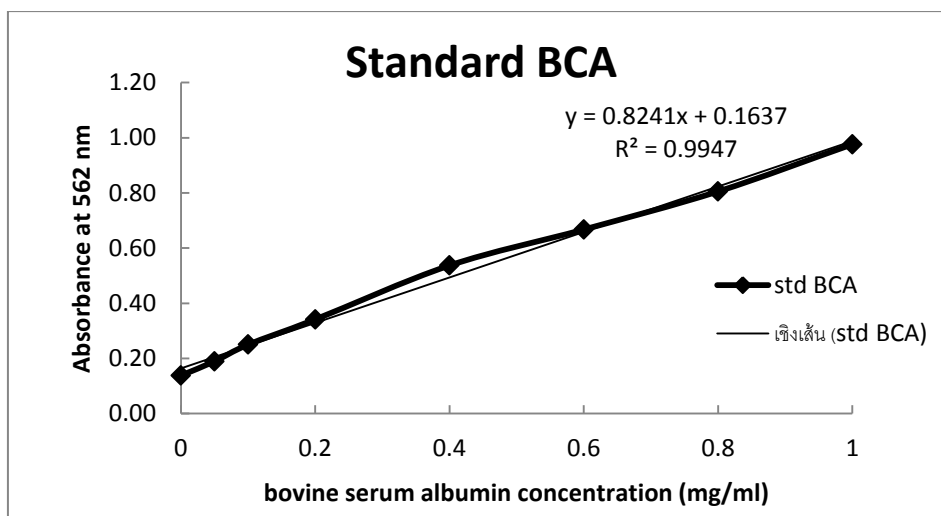
\*หมายเหตุ FT (flow through) หมายถึง fraction ที่เก็บก่อนการชะและหลังการล้างส่วนที่ไม่จับ

ตารางที่ 7 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ระหว่างทำบริสุทธิ์ที่อัตราไหล

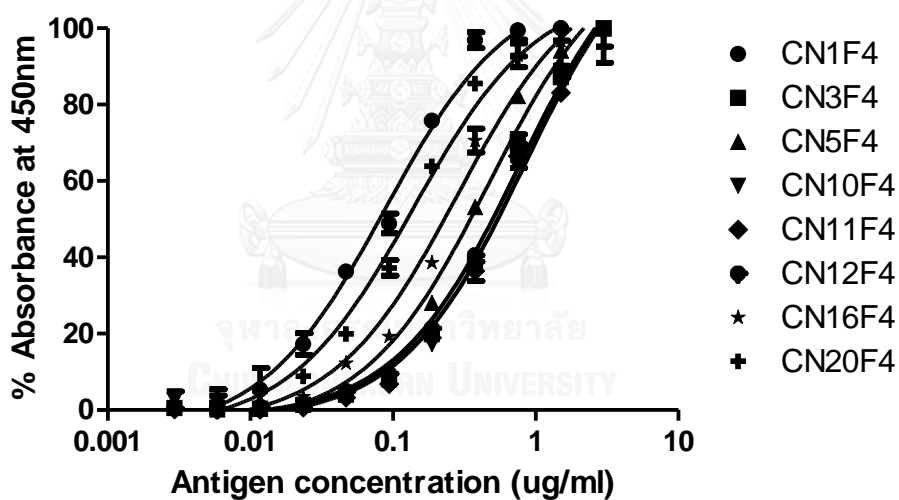
1 มิลลิเมตรต่อ 1 นาที (ต่อ)

Fraction	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร						
	CN11F4		CN12F4		CN16F4		CN20F4
	ไหลครั้งที่		ไหลครั้งที่		ไหลครั้งที่		ไหลครั้งที่
	1	2	1	2	1	2	1
FT1	0.108	0.105	0.081	0.075	0.079	0.080	0.122
FT2	0.100	0.103	0.080	0.080	0.081	0.081	0.110
1	0.099	0.104	0.073	0.075	0.071	0.080	0.103
2	0.096	0.109	0.066	0.079	0.071	0.092	0.119
3	0.097	0.117	0.069	0.085	0.072	0.097	0.133
4	0.099	0.103	0.073	0.087	0.082	0.092	0.143
5	0.085	0.133	0.066	0.105	0.074	0.110	0.257
6	0.109	0.123	0.105	0.096	0.106	0.120	0.397
7	0.168	0.117	0.234	0.071	0.096	0.097	0.657
8	0.455	0.254	1.262	0.088	0.212	0.191	1.347
9	2.145	1.656	2.712	1.019	1.038	1.575	2.185
10	2.924	2.791	1.943	2.889	2.573	2.290	2.725
11	2.924	2.987	1.046	2.822	2.535	2.943	2.478
12	1.909	2.748	0.668	1.397	1.459	2.522	1.897
13	1.186	1.823	0.381	0.562	0.745	1.811	1.461
14	0.784	1.113	0.305	0.342	0.505	1.042	1.121
15	0.532	0.562	0.212	0.260	0.362	0.716	0.897
16	0.410	0.368	0.150	0.199	0.297	0.423	0.708
17	0.270	0.256	0.161	0.194	0.254	0.362	0.605
18	0.206	0.233	0.117	0.117	0.160	0.260	0.490
19	0.200	0.170	0.146	0.154	0.186	0.233	0.408
20	0.188	0.133	0.138	0.134	0.184	0.166	0.359
21	0.154	0.110	0.098	0.100	0.127	0.146	0.319
22	0.145	0.114	0.109	0.087	0.116	0.124	0.323
23	0.123	0.131	0.100	0.137	0.116	0.123	0.230
24	0.133	0.094	0.088	0.099	0.105	0.113	0.214

\*หมายเหตุ FT (flow through) หมายถึง fraction ที่เก็บก่อนการชะและหลังการล้างส่วนที่ไม่จับ



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA



รูปที่ 3 วิเคราะห์ความไว ด้วยวิธี indirect ELISA ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนกภรณ์ ปฏิพัทธ์ศิลปกิจ เกิดเมื่อวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2533 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ (วท.บ.) คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ในปีการศึกษา 2554 และได้เข้าศึกษาในระดับปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ (วท.ม.) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 ได้นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (TSB International Forum 2014 “Green Bioprocess Engineering”) เมื่อวันที่ 17-19 กันยายน พ.ศ. 2557 ณ Hall EH101-102 ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ ในหัวข้อเรื่อง PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BOVINE CASEIN

