การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้านกรดออกโซลินิค

นายภาณุพันธ์ มั่งมี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

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

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXOLINIC ACID

Mr. PanupanMungmee

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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้านกรดออกโซลินิค
โดย	นายภาณุพันธ์ มั่งมี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. พอจิต นันทนาวัฒน์)

ภาณุพันธ์ มั่งมี : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้านกรดออกโซลินิค. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXOLINIC ACID) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. นันทิกา คงเจริญพร, 88 หน้า.

กรดออกโซลินิค (oxolinic acid) เป็นสารปฏิชีวนะสังเคราะห์ในกลุ่มของควิโนโลน (quinolone) ที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ในวงกว้างในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งได้รับการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์และมนุษย์ แต่จากการตกค้างของกรดออกโซลินิคในผลิตภัณฑ์สัตว์ เป็นสาเหตุให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์และเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการตรวจการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA โดยทำการเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับอัลบูมินจากซีรัมของวัวและใช้เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้ม กันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c และ ICR ซึ่งหนูทดลองทุกตัวมีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคและมีระดับแอนติบอดี 1:512,000 ถึง 1:4,096,000 เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค จึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยอีโลมา P3X พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคจำนวน 2 โคลน คือ 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้พบว่าเป็นไอโซไทป์ ชนิด IgG_{2a} ทั้ง 2 โคลน และมีความไวที่คำนวณในรูปของค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.27 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และโมโนโคลนอลที่ได้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนที่นำมาทดสอบ คือ เอนโรฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และ ซิโพรฟลอกซาซินอยู่ในช่วง 7 - 11% แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ทำการทดสอบ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5272479423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : OXOLINIC ACID / QUINOLONE / MONOCLONAL ANTIBODY

PANUPAN MUNGMEE : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXOLINIC ACID. ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO-ADVISOR: NANTHIKA KHONGCHAREON-PORN, Ph.D., 88 pp.

Oxolinic acid (OXA) is a synthetic quinolone antibiotic used against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. It is, therefore, widely used to treat disease in livestock and human. But OXA residue in livestock products can cause adverse effects and drug resistance in human, so it is essential to detect its residue in the products. This research concentrated on the production and characterization of monoclonal antibodies against oxolinic acid for development of ELISA test kit. Oxolinic acid conjugate to bovine serum albumin and then used as an antigen to immunize BALB/c and ICR mice. All mice reposed by producing antibodies against OXA and gave antiserum 1:512,000 to 1:4,096,000. To generate hybridoma cell secreting antibody against OXA, fusion of splenocytes and myeloma cells P3X were performed yielding two hybridoma clones, 7/A3/B6 and 10/D5/A4. Characterization of monoclonal antibodies showed that the isotype of all clones was IgG_{2a}. Their sensitivities calculated as limit of detection were 0.27 and 0.18 ppm respectively. The monoclonal antibodies cross react to antibiotics in quinolone group, enrofloxacin, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin ranging from 7 to 11 % but did not cross react with other groups of substances tested.

Field of Study: Biotechnology Student's Signature .....

Academic Year : 2012 Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ และอาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้บริหาร และอาจารย์ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ทำวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง คุณอณุมาศ บัวเขียว และคุณอุมาพร พิมพิทักษ์และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านรวมทั้งพี่ๆและน้องๆในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ ตั้งแต่เริ่มต้นการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (AM1023A) และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาโดยตลอด อีกทั้งเป็นกำลังใจที่ดีให้เสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สาบัญตาราง.....ฎ
สารบัญรูป.....ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฒ

บทที่

1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....4
2.1.1 ที่มาของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน.....4
2.1.2 กรดออกโซลินิค.....4
2.1.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีลักษณะ และคุณสมบัติทางกายภาพของกรดออกโซลินิค.....5
2.1.4 ความเป็นพิษของกรดออกโซลินิค.....6
2.1.5 การกำหนดปริมาณของกรดออกโซลินิค.....6
2.1.6 ปัญหาการตกค้างของกรดออโซลินิคในประเทศไทย.....8
2.1.7 วิธีการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของกรดออกโซลินิค.....9

บทที่ หน้า

2.1.7.1 วิธีการทางเคมี....9
2.1.7.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)....9
2.1.7.1.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)....10
2.1.7.1.3 Capillary Electrophoresis (CE)....10
2.1.7.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา....11
2.1.8 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา....11
2.1.8.1 แอนติเจน....11
2.1.8.2 แอนติบอดี....15
2.1.8.3 การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี....18
2.1.8.4 โมโนโคลแอนติบอดี....19
2.1.8.5 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอล-แอนติบอดี....20
2.1.8.6 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิค somatic hybridization...23
2.1.8.7 การสร้างและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา....25
2.1.9 หลักการ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)....27
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....30

3 วิธีการดำเนินการวิจัย....32
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย....32
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย....32
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย....33
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย....35
3.4.1 การเตรียมแอนติเจน....35
3.4.1.1 การเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับโปรตีน....35
3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมกับแอนติเจน....36
3.4.1.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอมีนอิสระ....36
3.4.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วยแอนติเจน....37
3.4.2.1 การฉีดกระตุ้น....37

บทที่ หน้า

3.4.2.2 การเตรียมซีรัม.....37
3.4.2.3 การทำ indirect ELISA เพื่อวัดไตเตอร์แอนติบอดีต่อกรดออกโซลิ-นิคในซีรัม.....37
3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถสร้างโมโนโคล-นอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค.....38
3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา.....38
3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม.....38
3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์.....39
3.4.3.4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....39
3.4.3.4.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA.....39
3.4.3.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA.....40
3.4.3.5 การเตรียมเซลล์เดี่ยว.....41
3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาระยะยาว.....41
3.4.3.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง.....41
3.4.4 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....42
3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....42
3.4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....42
3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....43
3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....44
3.4.5.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี.....44
3.4.5.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay.....45
3.4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....45

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....46
4.1 การเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับโปรตีน.....46
4.1.1 การเชื่อมต่อ OXA กับ BSA.....46

บทที่ หน้า

4.1.2 การเชื่อมต่อ OXA กับ OVA…….....47
4.2 ผลการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค.....48
4.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี OXA.....51
4.4 ลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....54
4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....54
4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ.....55
4.4.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค...57
4.5 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....60
4.5.1 ผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี.....60
4.5.2 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์.....61
4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....62

5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....65

รายการอ้างอิง.....68
ภาคผนวก.....73
ภาคผนวก ก.....74
ภาคผนวก ข.....83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....88

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่า MRLs ที่กำหนดปริมาณกรดออกโซลินิคต่ำที่สุดที่ยอมให้มีในเนื้อเยื่อต่างๆ และนม....7

2.2 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ.....17

2.3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....22

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย.....32

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....32

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....33

4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน OXA-BSA โดยใช้วิธี BCA.....46

4.2 ค่า % ของการเชื่อมต่อระหว่าง OXA กับโปรตีน BSA โดยวิธี TNBS.....47

4.3 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน OXA-OVA โดยวิธี BCA.....47

4.4 ค่า % ของการเชื่อมต่อระหว่าง OXA กับโปรตีน OVA โดยวิธี TNBS.....48

4.5 สรุประดับแอนติบอดี และความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจน ในรูปอิสระ ของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OXA-BSA.....49

4.6 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 25 ครั้งที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OXA-BSA.....52

4.7 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์.....54

4.8 ผลการทำ indirect ELISA เพื่อตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....54

4.9 การทดสอบ indirect ELISA ที่ค่าความเจือจางต่างๆ ของแอนติบอดีจากโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 55

4.10 เปรียบเทียบค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค indirect competitive ELISA.....57

4.11 ค่า IC_{50} และ % ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารกลุ่มควิโนโลน และสารนอกกลุ่ม โดยวิธี indirect competitive ELISA.....58

4.12 ผลการสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 2 โคลนให้บริสุทธิ์.....62

4.13 การเปรียบเทียบค่าความไวของแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 2 โคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ indirect competitive ELISA.....64

ตารางที่ หน้า

ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี BCA.....74
ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน OVA ด้วยวิธี BCA.....75
ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 2 โคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอน-ติเจน OXA-OVA ความเข้มข้น 5 μg/ml เคลือบ้นหลุมในจานทดสอบ ELISA.....76
ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISAที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7/A3/B6 จากการทำให้บริสุทธิ์.....77
ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10/D5/A4 จากการทำให้บริสุทธิ์.....78
ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA.....79
ก.7 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA.....80
ก.8 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA.....80
ก.9 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 7/A3/B6 ที่เหมาะสมกับแอนติเจน OXA-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจาน ELISA โดยวิธี indirect ELISA.....81
ก.10 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลลน 10/D5/A4 ที่เหมาะสมกับแอนติเจน OXA-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจาน ELISA โดยวิธี indirect ELISA.....81
ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 2 โคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect com-petitive ELISA โดยใช้แอนติเจน OXA-OVA ความเข้มข้น 5 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA.....82

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดออกโซลินิค.....5

2.2 พัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี.....13

2.3 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี.....16

2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์.....18

2.5 การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี.....19

2.6 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง.....24

2.7 วิธีการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ไฮบริโดมา.....26

2.8 ขั้นตอนการทำ indirect ELISA และ competitive ELISA.....29

3.1 การเชื่อมต่อระหว่างกรดออกโซลินิคกับโปรตีนพาหะ โดยใช้สาร NHS และ EDC.....35

3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\%B/B_0$ และ ค่าล็อกการิทึมความเข้มข้นของสารแข่งขัน.....43

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง $\%(B/B_0)$ และปริมาณ OXA ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 7/A3/B6.....56

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง $\%(B/B_0)$ และปริมาณ OXA ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 10/D5/A4.....56

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง $\%(B/B_0)$ กับความเข้มข้นของสารเอนโร-ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และ ซิโพรฟลอกซาซิน ในการทด สอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 7/A3/B6 โดยวิธี indirect competitive ELISA.....59

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง $\%(B/B_0)$ กับความเข้มข้นของสารเอนโร-ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และ ซิโพรฟลอกซาซิน ในการทด สอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 10/D5/A4 โดยวิธี indirect competitive ELISA.....59

รูปที่ หน้า

4.5 โครมาโทแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7/A3/B6 ให้บริสุทธิ์ โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร และทำการชะแอนติบอดีด้วยไกลซีน ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 2.7 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บตัวอย่าง 30 แฟรคชัน แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร.....60

4.6 โครมาโทแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10/D5/A4 ให้บริสุทธิ์ โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร และทำการชะแอนติบอดีด้วยไกลซีน ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 2.7 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บตัวอย่าง 30 แฟรคชัน แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร.....61

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง %(B/B_0) และปริมาณ OXA ในการแข่งขัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 7/A3/B6 หลังจากทำให้บริสุทธิ์.....63

4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง %(B/B_0) และปริมาณ OXA ในการแข่งขัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 10/D5/A4 หลังจากทำให้บริสุทธิ์.....63

ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ด้วยวิธี BCA.....74

ก.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน OVA ด้วยวิธี BCA.....75

ก.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ด้วยวิธี BCA.....79

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	Absorbance
Ab	Antibody
APS	Ammoniumpersulfate
Ag	Antigen
B	Absorbance obtain from ELISA with competitors
B_0	Absorbance obtain from ELISA without competitors
BCA	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
C	Constant region
C_H	Constant region of heavy chain
C_L	Constant region of light chain
CAP	Chloramphenicol
CDRs	Complementarity determining region
CE	Capillary Electrophoresis
CNX	Cinoxacin
CPFX	Ciprofloxacin
Da	Dalton (g/mol)
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochloride
EDTA	Ethylene diamine teteaacetate
EIA	Enzyme immune assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOF	Electro osmotic flow
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum

FIA	Freund's incomplete adjuvant
FRs	Framework region
g	Gram
GAM-HRP	Anti-mouse IgG (whole molecular)-peroxidase
H	Heavy chain
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HCl	Hydrochloric acid
HT	Hypoxanthine และ thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phoepnoribossyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IC_{50}	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
l	liter
L	Light chain
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LOD	Limit of detection
M	Molar (mol/l)
Mab	Monoclonal antibody
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MRLs	Maximum residue limits
MW	Molecular weight
N	Normal
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OVA	Ovalbumin
OXA	Oxolinic acid
PAb	Polyclonal antibody

PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline ที่มี 0.05% Tween20
PEG	Polyethylene glycol
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
RIA	Radioimmunoassay
SPE	Solid phase extraction
T_C	Cytotoxic kinase
T_H	Helper T cell
TK	Thymidine kinase
TMB	3,3', 5,5" -Tetramethylbenzidine
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid
μg	Microgram
v	Volume
V_H	Variable region of heavy chain
V_L	Variable region of light chain
%	Percent

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดออกโซลินิค (Oxolinic acid; OXA) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (Quinolone) ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีประกอบด้วยสารเช่น กรดออกโซลินิค ซิโนซาซิน (Cinoxacin; CNX) และ ซิโพรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin; CPFX) เป็นต้น โดยกรดออกโซลินิคเป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่เริ่มนิยมนำมาใช้กันมากขึ้นในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ เนื่องมาจากแบคทีเรีย ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ของแบคทีเรียแกรมลบ (Holtzapple และคณะ, 2001) และยับยั้งดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรส IV (DNA topoisomerase) ในแบคทีเรียแกรมบวก (Arkady และ Nicholas, 1998) สำหรับวิธีการใช้กรดออกโซลินิคนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จะใช้วิธีละลายยาในน้ำ และฉีดพ่นสารละลายยาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากับเม็ดอาหารแล้วให้สัตว์กิน เช่น ปลา กุ้ง หมู วัว และสัตว์ปีก แต่อย่างไรก็ตามการนำสารเหล่านี้ไปใช้ในทางที่ไม่ถูกต้อง โดยนำมาผสมกับอาหารเพื่อให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายสัตว์ได้ เช่น เนื้อเยื่อ ไขมัน ตับ ไต และไข่ จากการศึกษาในสัตว์พบว่าสารปฏิชีวนะกรดออกโซลินิค ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อตัวอ่อนแรกเกิดของหนู อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงในมนุษย์ทางด้านระบบประสาท เช่น ระบบประสาทถูกกระตุ้น มีพฤติกรรมเคลื่อนไหวซ้ำๆ (Stereotypic behavior) ประสาทหลอน ชัก และนอนไม่หลับ เป็นต้น (European Commission Regulation, 2000)

ปัจจุบันจากการที่มีการใช้สารปฏิชีวนะกรดออกโซลินิค ในการทำปศุสัตว์อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ซึ่งนำมาทดแทนหรือใช้ควบคู่กับยาออกซิเตตราไซคลีนที่ให้ประสิทธิภาพในการรักษาลดลง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2535) จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตกค้างของสารอยู่ในเนื้อสัตว์ที่ใช้บริโภคและสิ่งแวดล้อมรอบข้าง เช่น ตะกอนดิน แหล่งน้ำซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์จากช่องทางห่วงโซ่อาหารรวมทั้งกระตุ้นให้เกิดการดื้อยาในเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย (Kummerer, 2004) จากสาเหตุดังกล่าวทำให้แต่ละประเทศตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหาร โดยมีมาตรการการตรวจสอบการตกค้างของกรดออกโซลินิคในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งได้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างในอาหารบริโภค โดยสหภาพยุโรปมีการกำหนดค่า MRL (Maximum residue limit) ของกรดออกโซลินิคในโค สุกร ไก่ ปลาและไข่ ไว้ที่

50-300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขึ้นกับชนิดและเนื้อเยื่อของสัตว์ เช่น ส่วนตับและไต ของโค สุกร และไก่ กำหนดค่า MRL เท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เป็นต้น (European Commission Regulation, 2000) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของกรดออกโซลินิคในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออก ซึ่งในห้องปฏิบัติการนั้นมีหลายวิธี เช่น ใช้วิธีทางเคมีด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (มณฑิรา และคณะ, 2550) Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) (Stubbings และคณะ, 2009) และ Capillary Electrophoresis (CE) (Bahruddin และคณะ, 2002) การตรวจด้วยวิธีเหล่านี้สามารถหาปริมาณสารตกค้างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำสูง แต่เนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพงและใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์และไม่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในจำนวนมาก

ส่วนการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจคัดกรองสารตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งอาศัยหลักการการตรวจวัดแอนติเจนที่พบในตัวอย่าง โดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว ราคาประหยัด มีความแม่นยำสูงและเป็นวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจคัดกรอง (Screening test) ในปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก ก่อนที่จะนำไปตรวจยืนยันด้วยเทคนิคทางเคมีต่อไป จึงทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบลดลง แต่ปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA จำนวนมากสำหรับตรวจหาสารตกค้าง เช่น ชุดตรวจสอบ ELISA สารในกลุ่มควิโนโลนของ R-Biopharm จากประเทศเยอรมัน ซึ่งมีราคาสูงประมาณ 25,000 บาทต่อชุดและสามารถตรวจตัวอย่างได้ประมาณ 50 ตัวอย่าง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปขึ้นใช้เองภายในประเทศจะสามารถช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้ โดยการเตรียมชุดตรวจสอบนั้นต้องอาศัยแอนติบอดีซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชุดตรวจสอบ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OXA และศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ผลิตโมโนโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู
3. ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค
4. หลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์มัยอีโลมาและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค
5. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้
   5.1 การทดสอบไอโซไทป์ (Isotype)
   5.2 การทดสอบความไว (Sensitivity)
   5.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มควิโนโลน
   5.4 การทำโมโนโคนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมโนโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคและทราบลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ที่มาของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (Quinolone)

สารในกลุ่มควิโนโลน (Quinolone) เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้ออกฤทธิ์ในวงกว้างสำหรับทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารตัวแรกที่ค้นพบคือ กรดนาลิดิซิค (Nalidixic acid) ค้นพบในปี 1962 โดยมาจากการกลั่นสังเคราะห์ตัวยาต้านมาลาเรีย (Chloroquine synthesis) ของ George Lesher และคณะ (Wentland, 1993) ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาอาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในมนุษย์ แต่ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวกและไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ต่อมาในช่วงต้นปี 1970 ได้มีการพัฒนาโครงสร้างของกรดนาลิดิซิค เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยา โดยมีการค้นพบสารควิโนโลนรุ่นแรก ดังนี้ กรดเปปมิดิก (Pipemidic acid) กรดออกโซลินิค (Oxolinic acid) และ ซิโนซาซิน (Cinoxacin) ในปัจจุบันได้มีการผลิตสารในกลุ่มนี้ใหม่อีกหลายตัวได้แก่ นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) ในรุ่นที่สอง บาโลฟลอกซาซิน (Balofloxaxin) ในรุ่นที่สาม และ มอกซิฟลอกซาซิน (Moxifloxacin) ในรุ่นที่สามหรือที่เรียกว่า ฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) เป็นต้น (Norris และ Mandell, 1988)

2.1.2 กรดออกโซลินิค (Oxolinic acid)

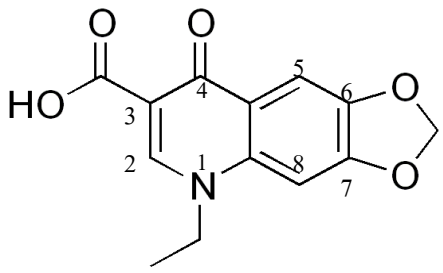
กรดออกโซลินิค หรือ 5-Ethyl- 8-oxo- 5,8-dihydro [1,3] dioxolo [4,5-*g*] quinoline- 7-carboxylic acid เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนซึ่งสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) และยับยั้งดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรส (DNA topoisomerase) ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและขัดขวางกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ ส่งผลให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและแบ่งเซลล์ (Bacteriostatic) ด้านขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารกรดออกโซลินิคจะมีการออกฤทธิ์ในวงกว้าง (broad spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยเชื้อที่ไวต่อกรดออกโซลินิคนี้ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella*

sp. และ *Proteus sp.* และออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ยังใช้ป้องกันโรคในพืชที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas sp.* และ *Erwinia sp.* ในภาคการเพาะปลูก ส่วนด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกรดออกโซลินิคนิยมนำมารักษาโรคที่พบในปลาเช่น Furunculosis, Vibriosis และโรคปากแดง (Redmouth disease) (Wells R., 1995)

2.1.3 สูตรโครงสร้างทางเคมี ลักษณะ และคุณสมบัติทางกายภาพของกรดออกโซลินิค

กรดออกโซลินิคเป็นยาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีประเภทเฮทเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (Heterocyclic aromatic compound) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีหมู่คีโตนตรงตำแหน่งที่ 4 และหมู่คาร์บอกซิลิกตรงตำแหน่งที่ 3 รวมทั้งมีวงของไดออกโซล (Dioxole ring) ติดกับวงของไพลิดีน (Pyridine ring) ที่ตำแหน่ง 6 และ 7 ดังรูปที่ 2.1

กรดออกโซลินิคอยู่ในรูปผงสีขาว ไม่มีกลิ่น และมีรสขมเล็กน้อย สามารถเก็บไว้ได้นาน ซึ่งกรดออกโซลินิคมีฤทธิ์เป็นกรดจะสามารถละลายในน้ำได้เล็กน้อยที่ pH 7 แต่ละลายได้ดีในสารตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮกเซน ไซลีน และเมทานอล



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดออกโซลินิค

คุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของกรดออกโซลินิค คือ สามารถทนความร้อนได้ถึงระดับอุณหภูมิ 315 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 473 องศาเซลเซียสที่ความดัน 760 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งทำให้วิธีพาสเจอร์ไรซ์และสเตอร์ริไรซ์ไม่สามารถทำลายกรดออกโซลินิคให้หมดไปได้ แต่กรดออกโซลินิคเสื่อมสภาพได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมม่า กรดออกโซลินิคมีความเสถียรในสภาพที่เป็นกรด และจะสลายตัวในสภาพที่เป็นด่าง

2.1.4 ความเป็นพิษของกรดออกโซลินิค

เนื่องมาจากมีการใช้สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนในการรักษาอาการติดเชื้อทั้งในมนุษย์และการปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา USFDA (Food and Drug Administration) ได้มีประกาศแจ้งเตือนถึงผลกระทบจากการใช้สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน ซึ่งรวมถึงกรดออกโซลินิค เช่น ระคายเคืองผิวหนัง อาเจียน ท้องเสีย ตลอดจนส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว เกิดอาการซึมเศร้า นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก ในการเกิดการตกค้างของกรดออกโซลินิคในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว เนื่องจากการที่สารปฏิชีวนะที่ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงกับขนาดที่ใช้รักษาโรค ซึ่งไม่ทำให้เชื้อโรคในร่างกายตายแต่กลับทำให้เชื้อโรคเกิดการปรับตัวและดื้อต่อยา ทำให้เกิดปัญหาในการรักษาโรคในภายหลังได้ นอกจากนี้สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนยังเพิ่มความเสี่ยงต่ออาการเส้นเอ็นอักเสบหรือเกิดการฉีกขาดของเส้นเอ็นได้ในผู้ใช้ยาได้ โดยจะมีความเสี่ยงสูงในกลุ่มผู้สูงวัย (มากกว่า 60 ปี) และผู้ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ เช่น หัวใจ ปอดและไต ร่วมถึงกลุ่มผู้ใช้ยาสเตอร์รอยด์ร่วมในการรักษาด้วย (Casparian และคณะ, 2000)

2.1.5 การกำหนดปริมาณกรดออกโซลินิค

ปัจจุบันในประเทศสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และหลายประเทศในโซนเอเชียรวมถึงประเทศไทยนิยมใช้กรดออกโซลินิคอย่างแพร่หลาย จึงได้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุดในอาหารบริโภคหรือ MRL (maximum residue limits) โดยมักจะกำหนดหน่วยเป็นส่วนในพันล้านส่วน (ppb) หรือ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสูงสุดของกรดออกโซลินิคที่อนุญาตให้มีในผลิตผลเกษตรในอาหารคนนั้นมีกำหนดแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ (ตารางที่ 2.1)

คณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกากำหนดให้มีกรดออกโซลินิคในอาหารได้ไม่เกิน 100 ppb และห้ามตรวจพบในนม ส่วนคณะกรรมาธิการโคเด็กซ์ (Codex; Committee on Food Additived and Contaminants, Joint FAO/WHO Food Standard Programme) ซึ่งทำหน้าที่กำหนดและควบคุมมาตรฐานสากลของการปนเปื้อนในอาหารที่แลกซื้อขายระหว่างประเทศ ได้ตั้งข้อเสนอการกำหนดค่ามาตรฐานสากลว่าด้วยการปนเปื้อนของกรดออกโซลินิคในอาหารไว้ดังนี้ ในตับและไตของวัว สุกร และไก่ไม่เกิน 150 ppb และในกล้ามเนื้อของวัว สุกร และไก่ไม่เกิน 100 ppb ส่วนในกล้ามเนื้อปลารวมหนัง กล้ามเนื้อกุ้ง ไขมันในวัว สุกรและไก่ รวมทั้งไข่ไก่ได้ไม่เกิน 50 ppb

เช่นเดียวกับมาตรฐานของสหภาพยุโรป (EU; European Union) ที่กำหนดการตกค้างของกรดออกโซลินิคในอาหารเหมือนกับมาตรฐาน Codex ยกเว้นส่วนกล้ามเนื้อปลารวมหนังที่มีได้ไม่เกิน 300 ppb (European Commission Regulation, 2000) สำหรับประเทศไทยมีประกาศจากสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ พ.ศ. 2548 (มกอช. 9007-2548) เรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร กำหนดปริมาณกรดออกโซลินิคในอาหารทั่วไปได้ไม่เกิน 200 ppb (มณฑิรา และคณะ, 2550)

ตารางที่ 2.1 ค่า MRLs ที่กำหนดปริมาณกรดออกโซลินิคต่ำสุดที่ยอมให้มีในเนื้อเยื่อต่างๆ และนม

ชนิดสัตว์	เนื้อเยื่อเป้าหมาย	ค่าต่ำที่สุด (ppb)			
		U.S.[1]	Codex[1]	EU[2]	ประเทศไทย[3]
โค แกะ แพะ	กล้ามเนื้อ	100	100	100	200
	ไขมัน	100	50	50	200
	ตับ	100	150	150	200
	ไต	100	150	150	200
	นม	0	100	100	100
หมู	กล้ามเนื้อ	100	100	100	200
	ไขมัน	100	50	50	200
	ตับ	100	150	150	200
	ไต	100	150	150	200
ไก่	กล้ามเนื้อ	100	100	100	200
	ไขมัน	100	50	50	200
	ตับ	100	150	150	200
	ไต	100	150	150	200
	ไข่	50	50	50	50
ปลา	กล้ามเนื้อรวมหนัง	100	50	300	200
กุ้ง	กล้ามเนื้อ	-	-	50	50

ที่มา : [1]มณฑิรา และคณะ, 2550 ; [2]European Commission Regulation, 2000 ; [3]สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548

2.1.6 ปัญหาการตกค้างของกรดออกโซลินิคในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศส่งออกสินค้าอาหารทั้งในรูปสด กึ่งแปรรูป แปรรูป จากข้อมูลการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ระหว่างเดือนมกราคม - ธันวาคม 2555 ของกรมปศุสัตว์ พบว่ามีมูลค่ารวมถึง 44,130 ล้านบาท (กรมปศุสัตว์, 2555) ซึ่งมีประเทศผู้นำเข้าที่สำคัญในประเทศกลุ่มประชาคมยุโรป สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น แต่ประเทศไทยต้องเผชิญกับปัญหาการกีดกันทางการค้าของหลายประเทศที่เป็นคู่ค้ากับไทย โดยประเทศผู้นำเข้าสินค้าอาหารส่วนใหญ่ได้ใช้มาตรการในการคุ้มครองสุขภาพอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นข้ออ้าง เช่น ในกรณีในปีพ.ศ. 2538 ประเทศญี่ปุ่นสั่งห้ามนำเข้ากุ้งแช่แข็งจากประเทศไทย อันเนื่องมาจากตรวจพบกรดออกโซลินิคเกินกำหนด ทั้งในกรณีประเทศสหรัฐอเมริกาตรวจพบสารปนเปื้อนในอาหารที่ประเทศสหรัฐอเมริกาไม่อนุญาตให้ใช้ ตลอดจนประเทศอิตาลีปฏิเสธการรับซื้อหมึกแช่แข็งจากประเทศไทย เนื่องจากตรวจพบแคดเมียมปนเปื้อนหลายครั้ง และประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรปห้ามใช้สาร EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetate) ในอาหารกระป๋องเป็นต้น เป็นผลให้ประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้จากการส่งออกปีละกว่าหลายพันล้านบาท (ณัฐพงศ์ และคณะ , 2547)

ในอุตสาหกรรมกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ การป้องกันปัญหาการระบาดของโรควิบริโอซิสที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงที่ก่อให้เกิดความเสียหายทำให้กุ้งอ่อนแอและตาย ทำได้โดยการใช้สารปฏิชีวนะเช่น กรดออกโซลินิค ซึ่งทำให้มีการตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อกุ้งเป็นเหตุก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้า จึงเกิดกระแสการต่อต้านการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียขึ้น และทำให้ประเทศผู้ซื้อกุ้งแช่แข็งเกิดการตื่นตัวในการตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในกุ้งแช่แข็งทั้งหมดที่นำเข้าจากประเทศผู้ค้าต่างๆ รวมทั้งประเทศไทยด้วย (สุดา และคณะ, 2543)

ในปัจจุบันกรดออกโซลินิคมักนิยมนำมาทดแทน หรือใช้ควบคู่กับยาออกซิเตตราไซคลีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในรูปของการผสมในอาหารสัตว์ทำให้สัตว์ที่ได้รับสารเหล่านั้นปริมาณน้อยๆ ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานเกิดการดื้อยาได้ นอกจากนี้การที่ใช้กรดออกโซลินิคในปริมาณที่เกินกำหนดหรือไม่หยุดใช้ยาเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 7 วันก่อนทำการเก็บผลผลิตเป็นสาเหตุให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์ในระดับที่สูงกว่าค่า MRL ที่กำหนด (มณฑิรา และคณะ, 2550) ปัจจุบันได้มีประกาศห้ามตรวจพบกรดออกโซลินิคตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งที่จะส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

อย่างไรก็ตามการเลี้ยงสัตว์ในระบบฟาร์มมาตรฐาน เกษตรกรต้องดูแลฟาร์มไม่ให้มีการใช้ยาที่ห้ามใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จึงไม่สามารถรู้ได้ว่า อาหารสัตว์ ยาสัตว์ หรือปัจจัยการผลิตต่างๆ ที่นำไปใช้เลี้ยงสัตว์มีสารห้ามใช้หรือไม่ เนื่องจากไม่มีเครื่องมือในการตรวจสอบที่จะสามารถทำได้ในเบื้องต้นแม้ว่าการตรวจสอบสินค้าก่อนการส่งออกนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็น แต่ต้องใช้การลงทุนที่สูงมาก (ชมพูนิกช์ กาญจนพังคะ, 2551) ทั้งนี้การควบคุมการใช้ยาในสัตว์ โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากสัตว์มาตรวจในห้องปฏิบัติการนั้นมีขีดจำกัดที่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง บุคลากรต้องมีประสบการณ์และความชำนาญสูง อีกทั้งยังสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลามาก ดังนั้นการใช้วิธีการตรวจสอบอย่างง่าย รู้ผลรวดเร็วและราคาถูกจึงมีความจำเป็นในการตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่าง (screening method) เช่น ชุดตรวจสอบ ELISA หรือ ชุดแถบทดสอบ (strip test) ก่อนที่จะใช้วิธีทดสอบแบบยืนยันผลในพื้นที่ก่อนการวิเคราะห์ยืนยันผลในห้องปฏิบัติการ แต่ในปัจจุบันประเทศไทยยังขาดการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA ของกรดออกโซลินิคทำให้มีการนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA เป็นจำนวนมากสำหรับการตรวจหาการตกค้างของกรดออกโซลินิคในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอื่นๆ

2.1.7 วิธีการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของกรดออกโซลินิค

2.1.7.1 วิธีการทางเคมี

2.1.7.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติการ โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC การตรวจโดยวิธีนี้จะมีความละเอียดสูง มีความถูกต้องแม่นยำ โดยในปี 2543 เรวัตรและคณะ ใช้เทคนิค HPLC ในการตรวจหากรดออกโซลินิคในเนื้อกุ้งกุลาดำ พบว่าปริมาณต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดกรดออกโซลินิคได้คือ 1 ppb แต่เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้เป็นงานประจำ

2.1.7.1.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

ในปี 2002 Johnston และคณะ ได้ใช้เทคนิค LC-MS ในการหาสารตกค้างในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนในตัวอย่างปลาและอาหารทะเล โดยใช้การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (Clean up) ด้วยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดกรดออกโซลินิคในตัวอย่างเนื้อปลาเท่ากับ 5 ppb ดังนั้นเทคนิคการตรวจหาสารตกค้างด้วย วิธี LC-MS จึงเป็นวิธีที่มีความสามารถในการตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ แต่เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมากและยังต้องใช้บุคลากรมี่มีความชำนาญการ โดยเฉพาะดัง นั้นเทคนิคนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนาม หรือใช้ในงานประจำเช่นเดียวกับวิธี HPLC

2.1.7.1.3 Capillary Electrophoresis (CE)

Capillary Electrophoresis ใช้หลักการเกี่ยวข้องกับการให้ศักย์ไฟฟ้าสูงแก่หลอดรูเล็ก (Capillary tube) ที่ภายในหลอดและปลายทั้ง 2 ข้างจะจุ่มอยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าสูง จะทำให้ไอออนในตัวอย่างวิ่งจากขั้วไฟฟ้าบวกไปยังขั้วลบตามแรงของ Electroosmotic flow (EOF) โซนของสารที่แยกจากกันหลังจากผ่านกระแสไฟฟ้าจะเคลื่อนผ่าน Detection Window ซึ่งสัญญาณจาก detector (deuterium lamp) จะส่งผ่านไปยัง data processor ผลที่ได้ออกมา เรียกว่า Electropherogram เทียบได้กับ chromatogram ใน HPLC การตรวจโดยวิธีนี้สามารถหาปริมาณสารตกค้างได้ถูกต้องแม่นยำ และใช้สารตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย ในปี 2002 Bahruddin และคณะ ได้ใช้เทคนิค CE สำหรับตรวจสอบการตกค้างของกรดออกโซลินิคในตัวอย่างอาหารปลาและเนื้อเยื่อปลา พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณต่ำที่สุดได้ 0.08 และ 0.5 ppb ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีเครื่องมือราคาแพงมาก รวมทั้งต้องใช้บุคคากรที่มีความชำนาญการสูง มีการเตรียมตัวอย่างเป็นเวลานาน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจภาคสนามหรือตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมาก

2.1.7.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunological Method)

ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจหาสารตกค้างกรดออกโซลินิคในส่วนผสมของอาหารสัตว์ อาหารและผลิตภัณฑ์นมอย่างแพร่หลาย Enzyme Immunoassay (EIA) เป็นวิธีตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง สะดวก และรวดเร็ว

การทดสอบทั่วไปมักใช้วัสดุ (solid phase) ประเภทพลาสติก เช่น พอลิโพรไพลีน (polypropylene) ที่ผ่านกระบวนการบางอย่างที่ทำให้พลาสติกเหล่านั้นดูดซับโปรตีนได้ดีขึ้น เพื่อเป็นตัวดูดซับแอนติเจนหรือแอนติบอดีไว้ก่อน และเมื่อปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนเกิดขึ้นแล้ว จะล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกส่วนที่ทำปฏิกิริยากันก็จะติดอยู่กับวัสดุ จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของสับเตรทที่ใส่ลงไปภายหลัง ทำให้เกิดสารมีสีขึ้น จากการทดสอบดังกล่าวเรียกว่า Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) จากงานวิจัยของ Huet และคณะในปี 2006 ทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารกลุ่มควิโนโลนรวมทั้งกรดออกโซลินิค เพื่อใช้ในการทดสอบหาการปนเปื้อนของกรดออกโซลินิคในอาหารทะเลและไข่ ด้วยวิธี ELISA พบว่าค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่น้อยกว่า 25 ppb ซึ่งความไวเพียงพอต่อการตรวจวัดสารปนเปื้อนในปริมาณที่ต่ำกว่าค่าที่ในหลายประเทศได้กำหนดไว้

2.1.8 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

2.1.8.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

แอนติเจน คือ สารที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ตอบสนอง โดยระบบภูมิคุ้มกันดังนั้นการเป็นแอนติเจน หมายถึงความสามารถของสารที่จะทำปฏิกิริยาจับแบบจำเพาะกับองค์ประกอบแบบต่างๆของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แอนติบอดีหรือตัวรับบนผิวเซลล์สารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนเกือบทุกชนิดจะมีคุณสมบัติการเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ ไม่ว่าจะเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated immune response) หรือการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบหลั่ง

แอนติบอดี (humeral immune response) ส่วนแอนติเจนที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนที่เรียกว่า แฮปเทน ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กและมีสมบัติเป็นแอนติเจน แต่โดยตัวสารนั้นไม่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นเมื่อต้องการทำการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดีต่อสาร จึงมักทำกระบวนการทางเคมีเชื่อมติดระหว่างแฮปเทนกับโปรตีนพาหะ (carrier protein) เพื่อให้เกิดสารเชื่อมต่อ (hapten-carrier conjugate) ที่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้ ซึ่งสมบัติของอิมมูโนเจนที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมี 4 ประการ ได้แก่ สิ่งแปลกปลอม ขนาดของโมเลกุล องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมีและความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ที่นำเสนอหรือผิวของเซลล์อื่นๆ (antigen presenting cell)

1. ความแปลกปลอม

ในกระบวนการที่สารจะตอบสนองต่อการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันได้นั้น สารนั้นจะต้องถูกตรวจจับโดยระบบภูมิคุ้มกันว่ามีองค์ประกอบแตกต่างกับองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ความสามารถในการตรวจจับดังกล่าวเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาการของลิมโฟไซต์ โดยโมเลกุลที่ไม่เคยสัมผัสกับลิมโฟไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature lymphocyte) ในช่วงระยะเวลาระหว่างการพัฒนา ซึ่งต่อมาเมื่อได้รับแอนติเจนนั้นเข้าสู่ร่างกายจะถูกตรวจจับโดยระบบภูมิคุ้มกันว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งระบบของการเป็นอิมมูโนเจนขึ้นอยู่กับระดับความแปลกปลอม ในบางกรณีระบบภูมิคุ้มกันอาจมีการตอบสนองต่อองค์ประกอบของตนเอง ซึ่งก่อให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันต่อตนเอง (autoimmunity หรือ autoallergy) ขึ้นได้

2. ขนาดของโมเลกุล

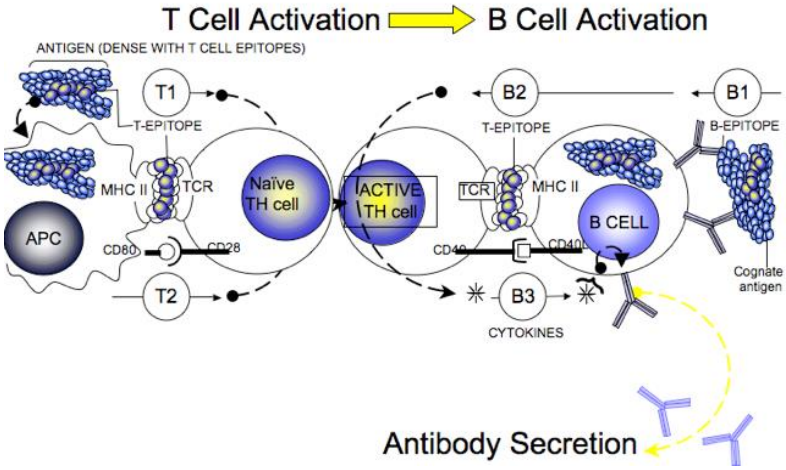
ขนาดของโมเลกุลมีความเกี่ยวข้องกันโดยตรงกับความเป็นอิมมูโนเจน โดยแอนติเจนขนาด 100,000 ดาลตัน จะกระตุ้นการตอบสนองที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากการที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นจะมีอิพิโทปมากขึ้น และมาโครฟาจจะสามารถจับกินได้ดีมากขึ้น โดยทั่วไปโมเลกุลขนาด 5,000 – 10,000 ดาลตันจะมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมมูโนเจนต่ำ ส่วนโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำจะมีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำ เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกฟาโกไซโทซิสได้ง่าย

3. องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมี

แอนติเจนที่มีโครงสร้างซึ่งมีความซับซ้อนทางเคมี (complex) จะไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ในกรณีของแอนติเจนที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีการซ้ำของโมโนเมอร์หากเป็นพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์ (co-polymer) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีมอโนเมอร์มากกว่า 2 ชนิดขึ้นไปเป็นองค์ประกอบจะมีความเป็นอิมมูโนเจนที่ดีกว่าพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ (homo-polymer) เนื่องจากความหลากหลายของหน่วยย่อยจะมีมากกว่า

4. ความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ที่นำเสนอหรือผิวของเซลล์

พัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดีและภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต้องการการเกิดปฏิกิริยาระหว่างที-เซลล์กับแอนติเจนที่ถูกแปรรูป โดยแอนติเจนจะถูกนำเสนอร่วมกับโปรตีนบนผิวเซลล์ที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) โดยแอนติเจนที่ถูกนำเสนอร่วมกับ class II MHC บนผิวเซลล์จะนำเสนอต่อ Helper T cell (T_H) หรือแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปถูกนำเสนอร่วมกับ class I MHC จะนำเสนอต่อ Cytotoxic T cells (T_c) กรณีของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้เมื่อถูกนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC จะมีความเป็นอิมมูโนเจนต่ำ (ดังรูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 พัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี

ที่มา : http:// www.epivax.com/wp-content/uploads/2010/06/B_Cell_T-Cell.png

ความสามารถในการเป็นแอนติเจนนั้นนอกจากความแปลกปลอม ขนาดของโมเลกุล องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมี และความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ แล้วนั้นยังขึ้นกับสมบัติทางชีววิทยาของสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง เช่น จีโนไทป์ของสัตว์ ปริมาณแอนติเจนและเส้นทางการให้แอนติเจน ตลอดจนการผสมและไม่ผสมแอดจูแวนท์ ล้วนส่งผลในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) หากพิจารณาสมบัติของสิ่งมีชีวิตเองที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่

1. จีโนไทป์ของสัตว์ที่ได้รับแอนติเจน

องค์ประกอบทางยีน หรือจีโนไทป์ของสัตว์ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันมีอิทธิพลต่อชนิด และระดับของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น หนูขาวสายพันธุ์ต่างๆ จะตอบสนองต่อแอนติเจนที่แตกต่างกัน ซึ่งบางสายพันธุ์จะสร้างแอนติบอดีในซีรัมสูง แต่บางสายพันธุ์จะสร้างแอนติบอดีได้ต่ำ โดยการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่ใน MHC และยีนที่ถอดรหัสเป็นตัวรับ (receptor) ของบี-เซลล์ และ ที-เซลล์ ซึ่งความแปรปรวนของยีนเหล่านี้นั้นจะมีผลต่อการเป็นอิมมูโนเจนของแอนติเจนในสัตว์แต่ละตัว

2. ปริมาณและเส้นทางการให้แอนติเจน

รูปแบบการให้ปริมาณแอนติเจนต่ำหรือสูงเกินไปจะมีผลทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ เนื่องจากมีปริมาณแอนติเจนน้อยเกินไปที่จะกระตุ้นลิมโฟไซต์ หรืออาจทำให้เกิดการชักนำให้เกิดสภาวะไม่ตอบสนองขึ้น (tolerance) ทั้งนี้การให้แอนติเจนเพียงครั้งเดียวนั้นทั่วไปจะไม่สามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้นอย่างรุนแรง จึงต้องทำการกระตุ้นซ้ำกันหลายๆ ครั้งเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ จึงทำให้เกิดการตอบสนองที่รุนแรงได้

เส้นทางการให้แอนติเจนในลักษณะต่างๆ ได้แก่

- การฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection)
- การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (intradermal injection)
- การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection)
- การฉีดเข้าชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection)
- การฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous injection)

ทั้งนี้รูปแบบการฉีดแอนติเจนในลักษณะต่างๆ จะมีความเกี่ยวข้องกับอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีเซลล์ต่างๆ สะสมอยู่จะมีผลต่อการตอบสนองของแอนติเจน เช่น การฉีดเข้าหลอดเลือดดำแอนติเจนจะถูกนำเข้าสู่ม้ามเป็นอวัยวะแรก ในขณะที่รูปแบบการฉีดเข้าสู่ร่างกายบริเวณต่างๆ แอนติเจนจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองในบริเวณนั้น โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอวัยวะต่อมน้ำเหลืองจะเป็นตัวบ่งบอกถึงสภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

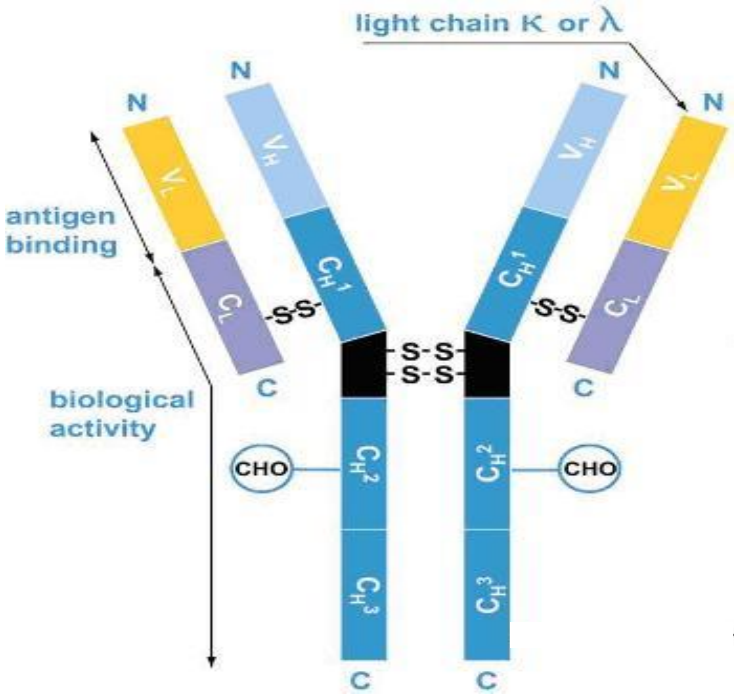
3. แอดจูแวนท์

แอดจูแวนท์เป็นสารที่นิยมมาผสมกับแอนติเจน เพื่อเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ผสมกับแอนติเจนที่มีปริมาณน้อยๆ หรือมีความเป็นอิมมูโนเจนต่ำ นอกจากนี้แอดจูเวนท์ ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้นและช่วยเพิ่มการกระตุ้นร่วมของสัญญาณต่างๆ (co-stimulatory signal) แอดจูแวนท์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ได้แก่ Freund's complete adjuvant และ Freund's incomplete adjuvent ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil) และ emulsifying agent ซึ่งเป็น mannide monooleate เมื่อแอดจูแวนท์ผสมกับแอนติเจนที่ละลายน้ำจะมีลักษณะกระจายเป็นถุงเล็กๆ ล้อมรอบแอนติเจนเป็นผลให้แอนติเจนถูกปล่อยจากบริเวณที่ฉีดอย่างช้าๆ ส่วน Freund's complete adjuvant ภายในจะมีเชื้อ *Mycobacterium* ที่ตายแล้วด้วยความร้อนผสมอยู่ด้วย เนื่องจาก muramyl dipeptide ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นแมคโครฟาจสูง โดยแมคโครฟาจจะมีการแสดงออกของ class II MHC และโปรตีน B7 ในเมมเบรน อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มระดับการหลั่งไซโทไคน์ (cytokine) ที่เป็นตัวกระตุ้นร่วมเพื่อเพิ่มสัญญาณต่างๆ ในการตอบสนองของ T_H

2.1.8.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนตรงบริเวณจำเพาะของโมเลกุลแอนติเจนที่เรียกว่าอิพิโทป (epitope) ซึ่งสร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์โดยแอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู่กระแสเลือด จะทำหน้าที่เป็นตัวหลักสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity)

โครงสร้างของแอนติบอดี (รูปที่ 2.3) อนุมานจากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนโปรตีนสายสั้น (L chain) และ โปรตีนสายยาวของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนทางด้านปลาย N เรียกว่าบริเวณแปรปรวน (variable region = V) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 100-110 หน่วย ซึ่งแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่จับแอนติเจน ส่วนบริเวณที่เหลือเป็นบริเวณคงที่ (constant region = C) ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน เช่นกรณีของสายสั้นมี 2 ชนิดเป็น κ หรือ λ สายยาวเป็นชนิด μ หรือ γ หรือ α หรือ δ หรือ ε โดยโปรตีนสายสั้นและสายยาวม้วนพับเป็นส่วนหรือโดเมน (domain) แต่ละโดเมนประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 110 หน่วย ซึ่งโปรตีนสายยาวบางชนิดเช่น γ , α และ δ จะมีบริเวณข้อพับ (hinge = สีเข้มทึบ) ประกอบด้วยกรดอะมิโนโพรลีน (proline) จำนวนมาก แต่ในกรณีของ μ และ ε ไม่พบบริเวณข้อพับ แต่ละโมเลกุลจะยาวขึ้นอีก 1 โดเมน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี

ที่มา : http://www.abcam.cn/ps/cms/images/abstructure.jpg

คลาส (class) หรือ ไอโซไทป (isotype) ของ Ig ชนิดต่างๆ ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE เกิดจากความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนสายยาวบริเวณคงที่ (ตารางที่ 2.2) ทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้าง และบทบาทการทำงานแตกต่างกันไป (รูปที่ 2.4) โดยบทบาทการทำงานของแต่ละไอโซไทป์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างส่วนของโปรตีนสายยาวกับองค์ประกอบต่างๆ ของโปรตีนในซีรัมหรือตัวรับบนผิวเซลล์ในหนูเมาส์ (mouse) โดยโปรตีนสายยาวชนิด γ สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (subclass) ได้แก่ γ_1 , γ_{2a} ,γ_{2b} และ γ_3 เกิดเป็นไอโซไทป์ IgG_1 , IgG_2 , IgG_{2b} และ IgG_3 ตามลำดับ ซึ่งจะแตกต่างกันตรงขนาดของข้อพับ จำนวนและตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในสายระหว่างโปรตีนสายยาว

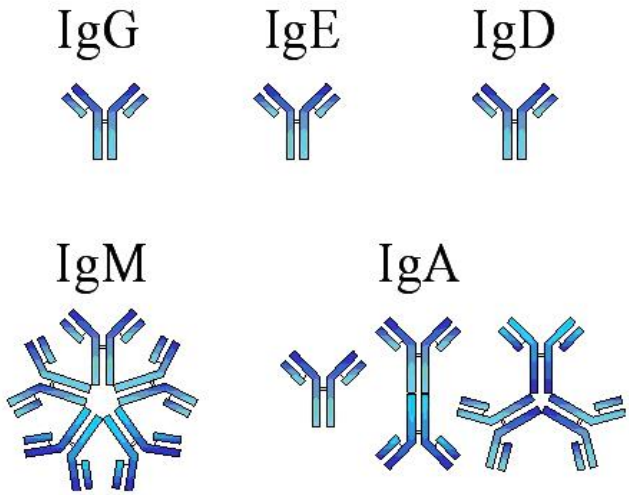
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ

ไอโซไทป์	สายยาว	สายสั้น	กลุ่มย่อย
IgG	γ	κ หรือ λ	ในมนุษย์ γ_1 , γ_2 , γ_3 และ γ_4 ในหนูเมาส์ γ_1 , γ_{2a} ,γ_{2b} และ γ_3
IgA	α	κ หรือ λ	α_1 หรือ α_2
IgM	μ	κ หรือ λ	ไม่มี
IgD	δ	κ หรือ λ	ไม่มี
IgE	ε	κ หรือ λ	ไม่มี

ที่มา : ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548

โดยคุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 5 ไอโซไทป์มีลักษณะดังต่อไปนี้ IgG เป็นกลุ่มที่พบปริมาณสูงสุดในซีรัมและมีความสำคัญในการกำจัดแอนติเจน โดยกลไกต่างๆ และเป็นชนิดเดียวที่สามารถพบในครรภ์ได้ ส่วน IgM นั้นประกอบไปด้วยแอนติบอดี 5 ชุด (pentamer) ซึ่งมีบริเวณที่จับกับแอนติเจนมาก (multivalence) จึงมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจจับไวรัสการจับรวมตัวกันของแบคทีเรีย และกระตุ้นคอมพลีเมนต์ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนภายในเลือด ซึ่งปกติจะอยู่ในสภาวะไม่ทำงาน แต่จะถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบต่างๆ แบบไม่จำเพาะและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งช่วยในการทำลายและกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย ในกรณี IgA จะประกอบไปด้วยแอนติบอดี 2 ชุด (dimer) หรือ 4 (tetramer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์กับ J chain ซึ่งเป็นพอลิเพปไทด์ที่เชื่อมบริเวณ Fc ของแอนติบอดี โดยแอนติบอดีกลุ่มนี้เป็นกลุ่มหลักที่หลั่งออกนอกร่างกายรวมถึงน้ำนมและเยื่อเมือกต่างๆ ด้าน IgD จะเป็นแอนติบอดี

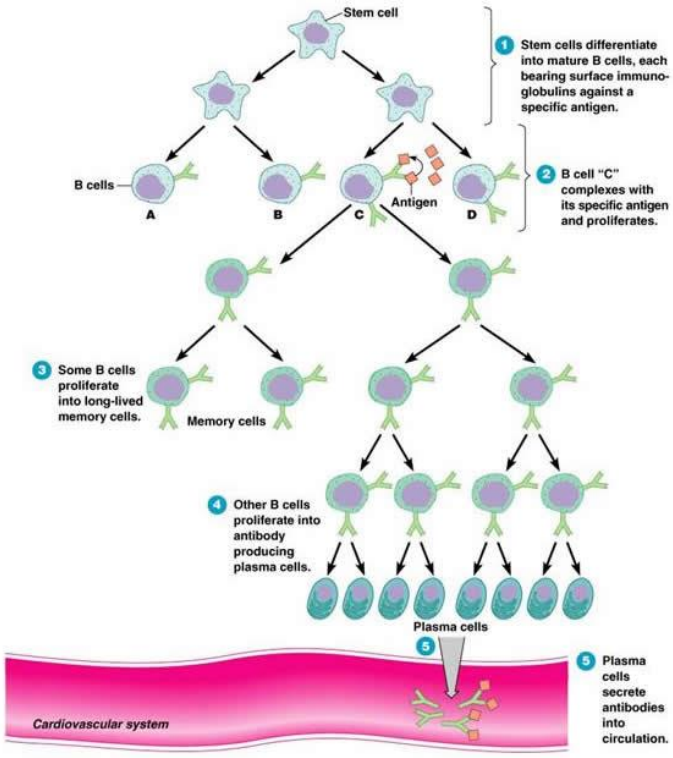
หลักที่ยึดอยู่บนผิวของบี-เซลล์ที่เจริญสมบูรณ์ โดยมีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นบีเซลล์เมื่อจับกับแอนติเจนส่วนกรณีของ IgE นั้นเป็นตัวก่อให้เกิดอาการแพ้ โดยทำหน้าที่จับกับเม็ดเลือดขาว ได้แก่ มาสต์เซลล์ (mast cell) และเบโซฟิล (basophil) โดยทำให้เกิดการชักนำและหลั่งสารที่อยู่ในแกรนูลของเซลล์จึงทำให้เกิดอาการแพ้ ด้านปริมาณของ IgD และ IgE จะสามารถพบได้น้อยมากในซีรัม (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์
ที่มา : http://www.scbrc.org.cn/sitecn/xcpzx/670.html

2.1.8.3 การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี

เซลล์บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) หรือ บีเซลล์ (B-cell) จะถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specific antibody) ซึ่งแอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลต่างๆ ได้ โดยโมเลกุลของแอนติบอดีจะมีบริเวณจำเพาะที่จะจับกับแอนติเจน ซึ่งความจำเพาะของบี-เซลล์เกิดจากการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ เมื่อบี-เซลล์มีการจับกับแอนติเจนที่เหมาะสมตรงบริเวณที่จับ (binding site) ของแอนติบอดีบนผิวเซลล์บี-เซลล์จะถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและพัฒนาเป็นเซลล์ความจำ (Memory B-cell) และบางส่วนพัฒนาเป็นพลาสมาเซลล์ (plasma cell) ทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเหมือนกับแอนติบอดีบนผิวเซลล์และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือด (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, 2541) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี

ที่มา: http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225chap17/Lecture3.htm

2.1.8.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือแอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มพลาสมาเซลล์ซึ่งกำเนิดมาจากบี-ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) เซลล์เดียวทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนและในด้านชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น แต่ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งรวมกันเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody)

2.1.8.5 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี

หากพิจารณาในระดับโมเลกุลแล้วพบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน 4 ประการหลักดังนี้ (ตารางที่ 2.3)

1. แหล่งกำเนิดและกระบวนการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไม่ว่าจะผลิตจากวิธี somatic hybridization หรือโดยวิธีทางพันธุวิศกรรมก็ตาม ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะและต้องใช้ขบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน เพื่อให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในกระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัมทำให้กระบวนการผลิตพอลิโคลนอล แอนติบอดีมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำได้ง่ายกว่า แต่ทั้งนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิดกัน หรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่คนละตัวก็อาจได้แอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งยังมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีวิธีควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นทุกๆ ครั้ง ส่วนในกรณีโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถทำการผลิตได้อย่างไม่มีจำกัดทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen specificity)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะต่อเอพิโทปชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นเอพิโทปที่จำเพาะหรือเอพิโทปที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactive epitope) ก็ได้ ส่วนในกรณีพอลิโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีหลายๆ ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อหลายเอพิโทปของตน ซึ่งทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีจะมีความจำเพาะต่อหลายเอพิโทปต่างๆ กันบนโมเลกุลของแอนติเจน

3. Effector function

Effector function เป็นคุณสมบัติที่จะถูกกำหนดด้วยบริเวณคงที่ (constant region) ของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ หรือกระบวนการจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ เป็นต้น ซึ่งสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซไทป์และสับคลาสของอิมมูโนโกลบูลินนั้นๆ โดยจะเป็นตัวกำหนดสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดให้มีสมบัติทางชีวภาพในด้านต่างๆ แตกต่างกัน แต่พอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้าน เนื่องจากอาศัยสมบัติของแอนติบอดีหลายๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน

4. สัมพรรคภาพ (affinity) และอะวิดิตี (avidity) ของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพ คือค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง ส่วนอะวิดิตี คือผลรวมแต่ละตำแหน่งของการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งสัมพรรคภาพและอะวิดิตีนั้นเป็นสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน หรือก็คือบริเวณส่วนแปรผัน (variable region) สัมพรรคภาพเป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของบี-ลิมโฟไซต์จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่างๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพมากน้อยแตกต่างกัน เพราะฉะนั้นหากต้องการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีสัมพรรภาพดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับกระบวนการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น ในปัจจุบันด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีนั้นๆได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลิน ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพที่ดีขึ้นกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากบี-ลิมโฟไซต์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนกรณีพอลิโคลนอลแอติบอดีนั้นจะมีอะวิดิตีที่เป็นผลรวมของสัมพรรคภาพของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล ที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดีอยู่ในระดับที่ปานกลางถึงดี (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

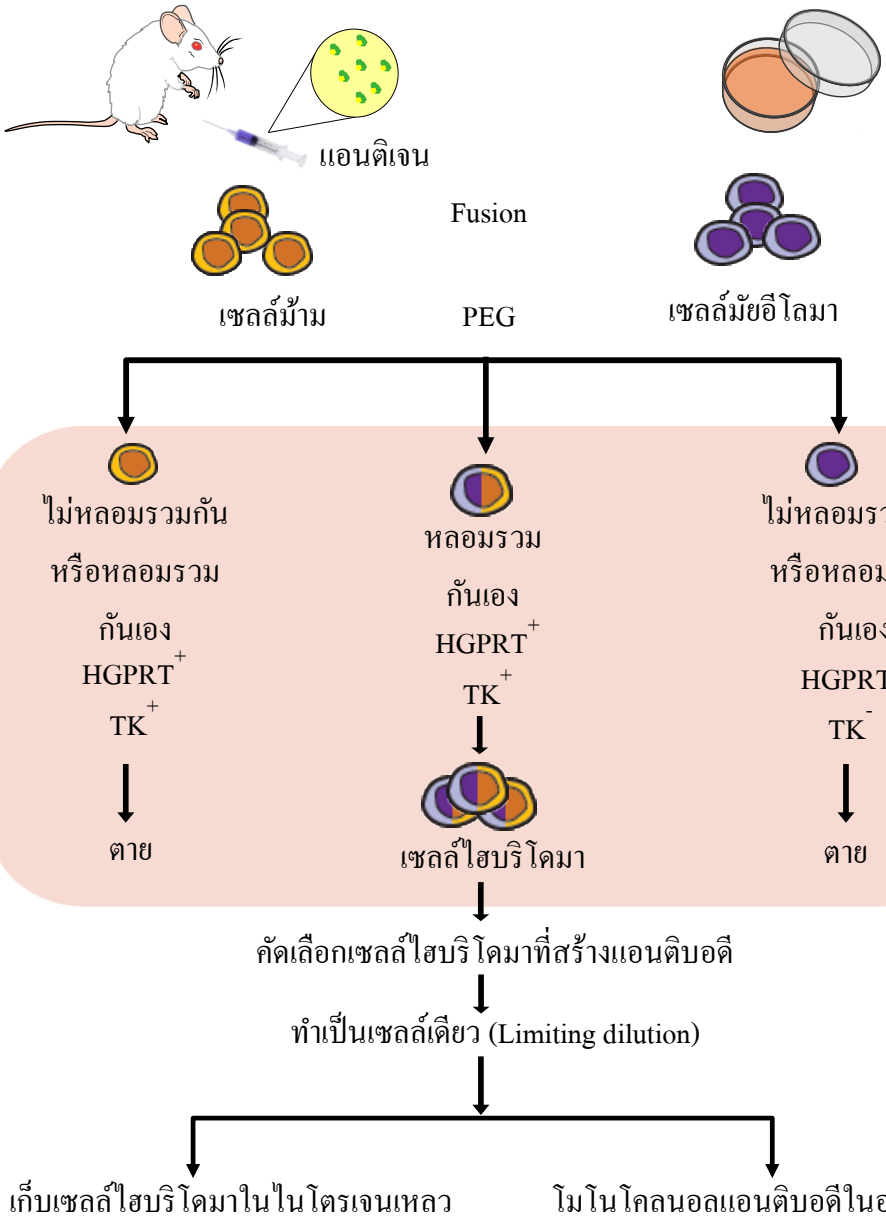
ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (Specificity)	ความจำเพาะไม่สูง มักพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม	มีความจำเพาะสูงและมีความคงที่เป็นมาตรฐานเดียว
สัมพรรคภาพ (Affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้เพียงอิพิโทปเดียว
ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้	ประมาณ 100 มิลลิลิตรจากซีรัมกระต่าย	ปริมาณไม่จำกัด
การปนเปื้อนของแอนติบอดีชนิดอื่น	อาจสูงถึง 100%	จะไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง แต่อาจพบประมาณ 10% ในน้ำช่องท้อง
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้ในกระตุ้นจึงจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจึงไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาในการผลิต	ระยะสั้น ไม่เกิน 6 สัปดาห์	ระยะยาว อย่างน้อย 4 เดือน
ข้อดี	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต	มีความจำเพาะสูง ผลิตได้ไม่จำกัด
ข้อเสีย	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาในการผลิตมาก ต้นทุนสูง

ที่มา : พรรัตน์ คงคาวิทูร, 2551

2.1.8.6 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิค somatic hybridization

ในสภาวะปกติร่างกายจะมีเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์พลาสมาที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการได้ แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวจะแบ่งตัวได้ไม่ดีและตายในเวลาอันสั้น ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลอดทดลองได้ ในขณะเดียวกันมีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งซึ่งกำเนิดมาจากเซลล์พลาส-มาเรียกว่า เซลล์มัยอีโลมา (myeloma) มีสมบัติของเซลล์มะเร็ง คือสามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไปเซลล์กลุ่มนี้อาจสูญเสียยีนอิมมูโนโกลบูลิน ไปทำให้ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ แต่ว่ามีสามารถสร้างแอนติบอดีได้ถ้าได้รับยีนจากอิมมูโนโกลบูลินของเซลล์ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์พลาส-มาอื่นๆ ในกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี somatic hybridization มีหลักการที่จะนำสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มารวมไว้ในเซลล์เดียวกัน ในปี 1975 Kohler และ Milstein ได้เป็นคนคิดค้นวิธีเตรียมเซลล์ให้สามารถสร้างแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะได้ และสามารถสร้างได้เป็นจำนวนมาก โดยอาศัยหลักการของการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) หรือ somatic cell hybridization ระหว่างบี-ลิมโฟไซต์ปกติ ซึ่งเป็นเซลล์สร้างแอนติบอดีกับเซลล์มัยอีโลมาหรือ plasmacytomas ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่อาศัยสารที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ เช่น พอลิเอทิลีนไก-คอล (polyethylene glycol ; PEG) ผลที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ก่อให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการและมีอายุที่ยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์มัยอีโลมา ซึ่งเรียกเซลล์ดังกล่าวว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) และแอนติบอดีที่ได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากแอนติบอดีนี้จะสร้างจากเซลล์ที่ได้มาจากโคลนเดียวกัน และมีความจำเพาะต่ออิพิโทปที่เป็นตัวชักนำให้สร้างมาเท่านั้น กระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค somatic hybridization แสดงดังรูปที่ 2.6 (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง

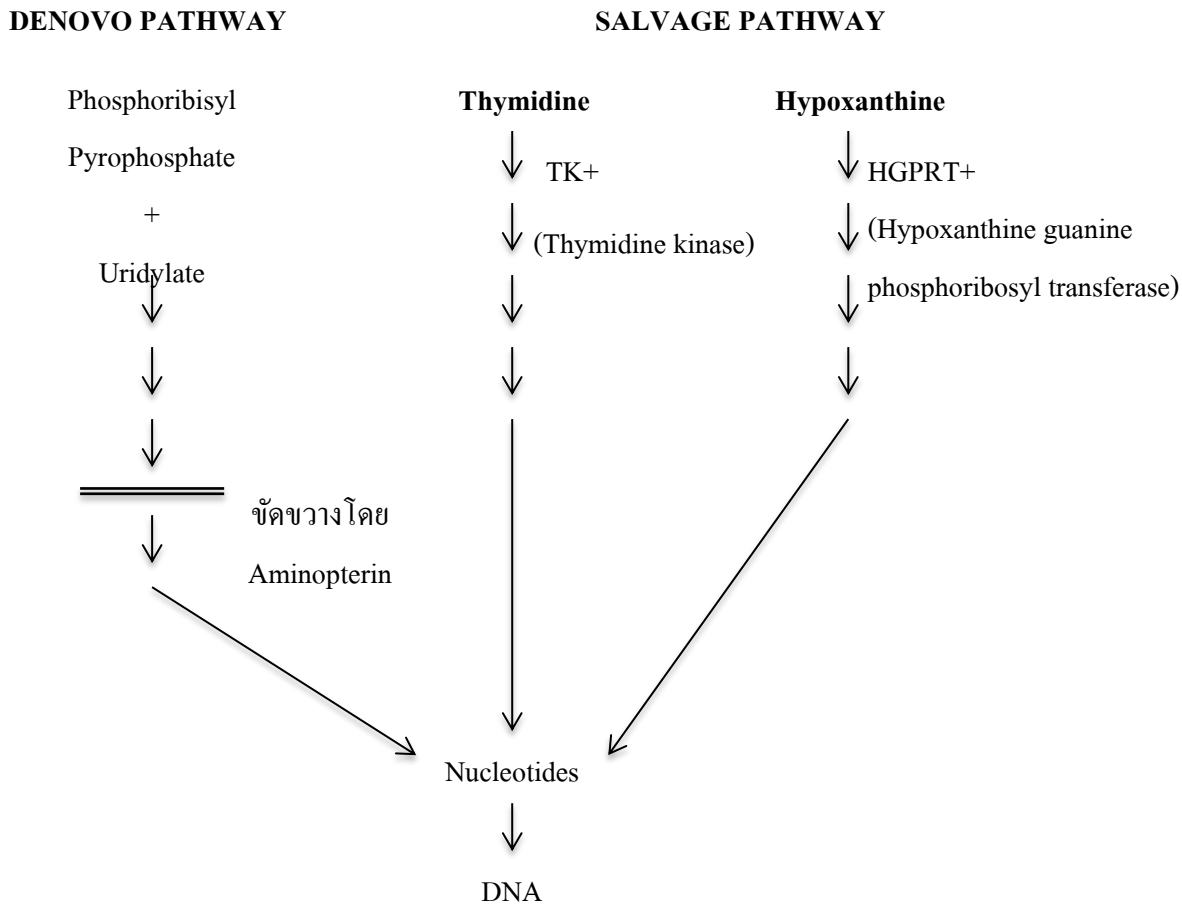
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก ชมพูนิกช์ กาญจนพังคะ, 2551

2.1.8.7 การสร้างและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

ในปี 1975 Kohler และ Milstein รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค somatic hybridization โดยเริ่มต้นการฉีดกระตุ้นหนูขาวด้วยแอนติเจนที่ต้องการพบว่าหนูสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนในระดับที่สูง จึงนำม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของหนูมาทำการแยกเอาเซลล์บีลิมโฟไซต์ เพื่อนำมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาของหนูขาว โดยใช้ Sendai virus หรือสารพอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสื่อ โดยพบว่าพอลิเอทิลีนไกลคอลมีสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์นุ่มและเหนียวหนืด เพื่อให้เซลล์สองเซลล์ที่เข้ามาติดกันสามารถหลอมรวมเป็นเซลล์เดียวกันได้ แต่เนื่องจากความเป็นพิษของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีต่อเซลล์จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการหลอมรวมเซลล์ ซึ่งพบว่าการใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 8.0-8.2 โดยใช้เวลาในการเชื่อมเซลล์ 1-2 นาที จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และต่อจากขั้นตอนการหลอมเซลล์แล้วจำเป็นต้องหาวิธีการคัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมา เนื่องจากเซลล์มัยอีโลมาที่เป็นเซลล์มะเร็งที่เติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุมเซลล์ไฮบริโดมา โดยการใช้อาหารคัดเลือก (selective media) ซึ่งมีสาร hypoxanthine, aminopterin และ thymidine เรียกว่า HAT medium ซึ่งมีสมบัติที่ทำให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นเจริญเติบโต (รูปที่ 2.7) โดยสาร aminopterin เป็นอะนาลอกของกรดฟอลิก (folic acid analog) สามารถจับกับเอนไซม์ที่จะใช้ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทาง denovo biosynthesis เซลล์ที่จะรอดชีวิตใน HAT medium ได้จึงจะต้องมีการสร้างนิวคลีโอไทด์ผ่านทาง salvage pathway ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ 2 ตัวที่ สำคัญคือ thymidine kinase (TK) และ hypoxanthine guanine phosphoribisyl transferase (HGPRT) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งไปจะไม่สามารถสร้างนิวคลีโอไทด์ได้ แต่ถ้านำเซลล์ที่ขาด TK หรือ HGPRT ไปทำการหลอมรวมกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ก็จะให้เซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมาสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ใน HAT medium

เซลล์มัยอีโลมาที่นำมาใช้ในการหลอมรวมกับเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมานี้เป็นเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมา (plasmacytoma) ที่แยกได้จากหนู mice โดยนำมาทำให้มีสมบัติขาด HGPRT ($HGPRT^-$) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร 6-thioguanine หรือ 8-azaguanine ซึ่งเป็น guanine base analogue และมีความเป็นพิษเมื่อเซลล์มัยอีโลมาใช้สารนี้ที่สามารถเข้าไปแทนที่เบสกัวนีนในการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์โดยใช้ HGPRT ทำให้ได้สายนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติ ซึ่งจะทำให้เซลล์มัยอีโลมาตายในที่สุด แต่เซลล์มัยอีโลมาบางตัวสามารถปรับตัวให้มีชีวิตรอดได้โดยเกิดการกลายพันธุ์สามารถใช้ HGPRT ในการสร้างสายนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะนำเซลล์มัยอีโลมาที่มีสมบัติ $HGPRT^-$ เหล่านี้มาหลอมรวมกับเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ที่

เป็นเซลล์ปกติ แล้วนำไปเลี้ยงใน HAT medium โดยเซลล์ที่จะมีชีวิตรอด คือ เซลล์ที่เกิดการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์มัยอีโลมา (HGPRT$^-$) และเซลล์บี-ลิมโฟไซด์ โดยอาศัยสมบัติเด่นของเซลล์มะเร็งที่เจริญเติบโตได้ดีในการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ และสมบัติทางจีโนมของเซลล์บี-ลิมโฟไซด์ในการสร้างแอนติบอดี โดยเซลล์บี-ลิมโฟไซด์ที่ไม่ได้เกิดการหลอมรวมตัวกับเซลล์มัยอีโลมาจะตายตามธรรมชาติภายในระยะเวลา 3-7 วัน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.7 วิธีการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ไฮบริโดมา
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก ชมพูนิกช์ กาญจนพังคะ, 2551

ทั้งนี้การผลิตโคลนที่ได้อาจมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ตามที่ต้องการ โดยการใช้วิธีทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา ได้แก่ วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.1.9 หลักการ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน คือ enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) หรือ enzyme immunoassay (EIA) ซึ่งใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดพื้นผิว และตรวจวัดสัญญาณจากปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดฉลากบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี วิธี ELISA ได้พัฒนาต่อมาจาก radioimmunoassay (RIA) โดยเปลี่ยนจากการติดฉลากด้วยรังสีเป็นการติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์และเปลี่ยนสีได้เมื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนจากสารรังสีมาเป็นเอนไซม์นี้ทำให้การตรวจมีความสะดวกมากขึ้น ไม่ต้องใช้รังสีที่มีอันตราย ทิ้งของเสียได้โดยง่าย และชุดตรวจมีอายุการใช้งานได้นานเพราะไม่มีการหมดอายุของสารรังสี การพัฒนา ELISA รูปแบบต่างๆ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้ โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่าง (ธารารัชต์ ธารากุล, 2545)

เทคนิค ELISA สามารถแบ่งตามหลักการได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. Direct ELISA

วิธี direct ELISA สามารถใช้ตรวจสอบหรือตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Ab1) ลงในหลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนในถาดหลุม 96 หลุมทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน และล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนออก เติมสับเตรทซึ่งปริมาณสีที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถวัดโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ออกแบบสำหรับอ่านถาดหลุม 96 หลุม ดังรูปที่ 2.8

2. Indirect ELISA

วิธี indirect ELISA ใช้ในการหาระดับของแอนติบอดีหลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจน และใช้ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ ทำได้โดยเติมซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ก้นหลุม แล้วล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนที่ก้นหลุมออก หลังจากนั้นตรวจสอบแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนโดยใช้แอนติ-บอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองจะมีความจำเพาะกับส่วน Fc ของแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีตัวที่สองออก เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ ปริมาณสีที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถวัดได้โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่สามารถอ่านหลุมทดสอบในจาก 96

หลุมได้ทั้งหมดในเวลาเดียวกัน และทราบผลค่าการดูดกลืนแสงจากทั้ง 96 ได้ภายในเวลาไม่ถึงนาที ดังรูปที่ 2.8

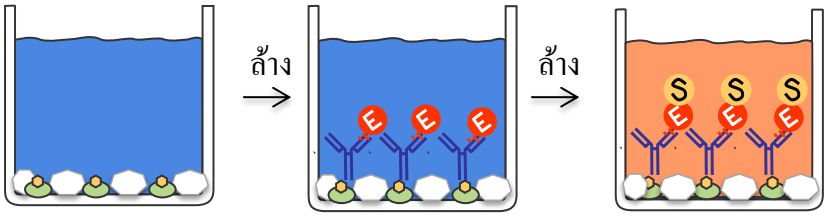
3. Competitive ELISA

วิธี competitive ใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะและความไวของแอนติบอดีต่อแอนติเจน โดยจะนำแอนติบอดีผสมกับตัวอย่างแอนติเจนมาตรฐานหรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจจากนั้นเติมลงในจานหลุม 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนเหมือนในกรณีของ indirect ELISA ซึ่งถ้าเติมความเข้มข้นของสารมากแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนที่ก้นหลุมจะมีน้อยลง ดังนั้นหลังจากเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์และมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีอิสระออกแล้วเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ โดยตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าหลุมที่มีความเข้มแอนติเจนต่ำ ดังรูปที่ 2.8

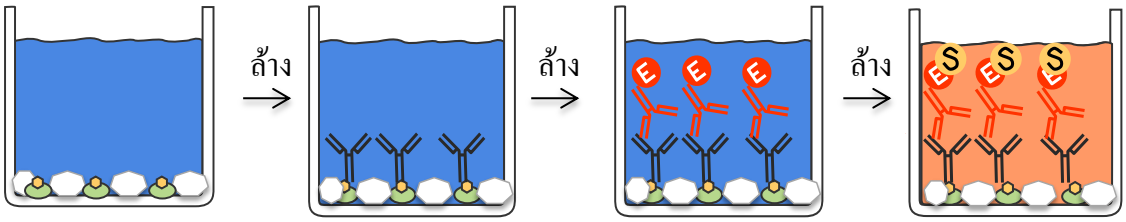
4. Sandwich ELISA

แอนติเจนสามารถตรวจสอบและตรวจวัดโดยวิธี sandwich ELISA วิธีนี้ใช้แอนติบอดีตรึงในถาดหลุม 96 หลุม จากนั้นเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจ ทิ้งให้ทำปฏิกิริยากับเอนติบอดีที่ตรึงอยู่ หลังจากล้าง เติมแอนติบอดีจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนบริเวณที่ต่างจากอิพิโทปที่แอนติบอดีตัวแรกจับอยู่และติดฉลากเอนไซม์ หลังจากล้างแอนติบอดีอิสระ เติมสับเตรทและวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดสีขึ้น ซึ่งกรณีนี้อาจดัดแปลงเป็นแบบวิธีทางอ้อมได้ โดยใช้แอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนตัวที่สอง แต่กรณีนี้แอนติบอดีตัวที่หนึ่งและแอนติบอดีตัวที่สองต้องมาจากสัตว์ต่างชนิดกัน ดังรูปที่ 2.8

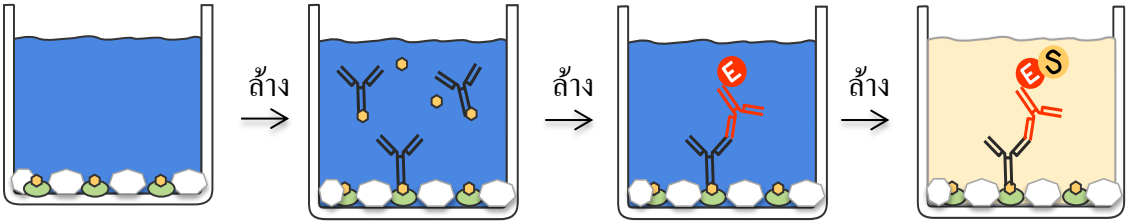
Direct ELISA



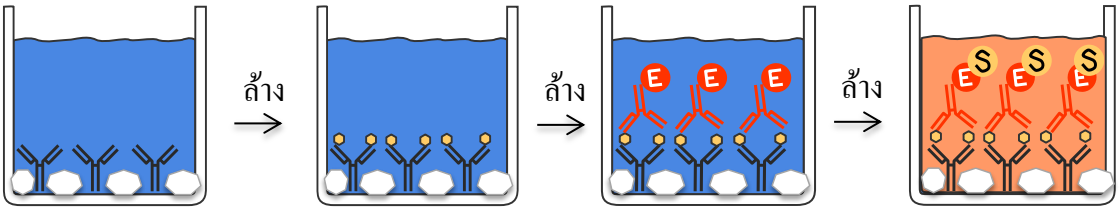
Indirect ELISA



Competitive ELISA



Sandwich ELISA



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการทำ indirect ELISA และ competitive ELISA

ที่มา : ดัดแปลงจากไพศาล สิทธิกรกุล,2548

: แอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนเฉพาะ : แอนติบอดี : สารตั้งต้นของเอนไซม์

: แอนติเจนอิสระ และ : แอนติบอดีที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์

4.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2002 Johnston และคณะ ได้ตรวจหาปริมาณสารตกค้างในกลุ่มควิโนโลน และฟลูออโรควิโนโลนในตัวอย่างปลาและอาหารทะเล โดยใช้เทคนิค LC-MS ซึ่งมีการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (Clean up) ด้วยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) พบว่าสามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดสามารถวัดได้ในสารกลุ่มควิโนโลนรวมทั้งกรดออกโซลินิคอยู่ที่ 5 ppb ส่วนซิโพรฟลอกซาซินที่อยู่ในฟลูออโรควิโนโลนสามารถตรวจวัดปริมาณต่ำสุดได้ที่ 10 ppb

ในปี 2002 Bahruddin และคณะ ได้ใช้เทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) สำหรับตรวจสอบการตกค้างของกรดออกโซลินิค ในตัวอย่างอาหารของปลาและเนื้อเยื่อปลา โดยสกัดสารตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่างด้วย 10 mM phosphate buffer, pH 3.0 และ solid-phase extraction (SPE) ที่แตกต่างกัน mobile phase ที่เหมาะสมคือสารละลาย 10 mM phosphate buffer, pH9.0 และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร และถูกตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร พบว่าสามารถวัดปริมาณกรดออกโซลินิคตกค้างอยู่ในช่วง 0.5-40 ppb และวัดปริมาณต่ำที่สุดได้ 0.08 และ 0.5 ppb ในตัวอย่างอาหารของปลาและเนื้อเยื่อปลา ตามลำดับ

ในปี 2006 Huet และคณะ ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบสารในกลุ่มควิโนโลนรวมทั้งกรดออกโซลินิคในอาหารทะเลและไข่ไก่ โดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วยสารในกลุ่มควิโนโลน ซึ่งจะถูกทำให้เป็นสารอนุพันธ์ก่อนแล้วทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะที่บริเวณ carboxylic group จากนั้นนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี direct competitive ELISA พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำที่สุดที่ 25 ppb ของกรดออกโซลินิค และสามารถตรวจวัดปริมาณต่ำสุดของสาร norfloxacin, difloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, ofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, lomefloxacin, enoxacin และ nalidixic acid ที่ 10 ppb แต่ในสาร sarafloxacin, flumequine และ cinoxacin สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดที่ 4, 100 และ 200 ppb ตามลำดับ

ในปี 2550 มณฑิรา และคณะ ได้ใช้เทคนิค HPLC สำหรับตรวจสอบการตกค้างของกรดออกโซลินิคในสัตว์น้ำจากธรรมชาติบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งทะเล ในจังหวัดสงขลาและพัทลุง เตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ที่กรองผ่าน hyperclean membrane nylon 0.45 μm โดยนำตรวจวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Nova-Pak C18 และใช้ acetonitrile และ oxalic acid ในอัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งมีเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ วัดความยาวคลื่นที่ 327 และ 369 นาโนเมตร พบว่าจากการตรวจตัวอย่าง 21 ตัวอย่าง ในตัวอย่างสัตว์น้ำในธรรมชาติตรวจพบกรดออกโซลินิคปนเปื้อนอยู่ในช่วง 10-49 ppb และพบว่าปริมาณที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 4 ppb

ในปี 2012 Ferhan และ Hasan ทดลองใช้ชุดตรวจ ELISA ในการตรวจสอบสารในกลุ่มควิโนโลน รวมถึงกรดออกโซลินิคที่ตกค้างในน้ำนมดิบและตับไก่ในประเทศตรุกี โดยทำการตรวจหาในตัวอย่างน้ำนมดิบและตับไก่อย่างละ 50 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณสารตกค้างของสารกลุ่มควิโนโลนในได้ในช่วง 18.5-147.88 ppb ในตัวอย่างตับไก่ จาก 17 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 34 แต่ไม่พบการตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบ ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารตกค้างของชุด ELISA ในปริมาณต่ำที่สุดคือ 10 ppb และมีค่า % recovery อยู่ระหว่าง 95-122% ในตัวอย่างน้ำนมดิบและ 80-110% ในตัวอย่างตับไก่ และเกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารซิโฟรฟลอกซาซิน ซาราฟลอกซาซิน และกรดออกโซลินิค ถึง 100 , 43 และ 24 % ตามลำดับ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
- หนูเมาส์ สายพันธุ์ BALB/c และ ICR - เซลล์มัยอีโลมา P3X 63AG8	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยศรีนครินวิโรฒ ประสานมิตร

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- ตู้ -70 องศาเซลเซียล	Sanyo, Osaka, Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply co., Ltd., Bangkok, Thailand
- ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato, Tokyo, Japan
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท	Titertek multiskan, Helsinki, Finland
- เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส	Metter Toledo, Greifensee, Switzerland
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	BIO-TEK Instrument, Inc., Virginia, USA
- เครื่องผสมด้วยแรงหมุน	Scientific Industries, Inc., Colorado, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII Memmert, Tokyo, Japan
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Munich, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Tokyo, Japan
- ปั๊มลม	Iwaki, Tokyo, Japan
- ขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน	Techne Incorporated, Staffordshire, UK

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- ปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร	HBG, Luetzellinden, Germany
- ปิเปตอัตโนมัติขนาด 100, 200, 1000 มิลลิลิตร	Discovery, Warsaw, Poland
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Ayutthaya, Thailand
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Ayutthaya, Thailand
- หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Corning Incorporated, Tamaulipas, Mexico
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Axygen, Union city, California
- หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, Union city, California
- จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 มิลลิเมตร	Sterilin, Newport, UK
- จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม 48 หลุมและ 24 หลุม	Corning Incorporated, New York, USA
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Corning Incorporated, New York, USA

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
- Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Jackson Immuno research, Pennsylvania, USA
- BCA™ protein assay kit	Thermo Scientific, Illinois, USA
- Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Carbon dioxide (CO_2)	Linde, Samut prakran, Thailand
- Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Citric acid	Merk, Darmstadt, Germany
- Clenbuterol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- D-glucose	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka, Buchs, Switzerland
- Di-Sodium hydrogenphosphate	Merck, Darmstadt, Germany
- Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Fetal calf serum (FCS)	PAA, Pasching, Austria
- Freund’s complete adjuvant	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Freund’s incomplete adjuvant	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Furazolidone	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

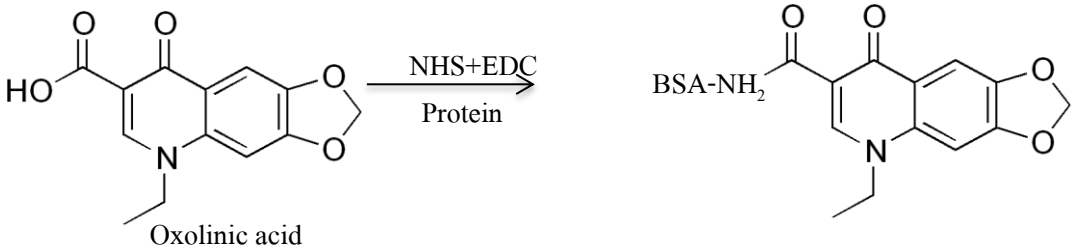
สารเคมี	แหล่งที่มา
- Glycine	Pacific science, Bangkok, Thailand
- Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Darmstadt, Germany
- Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2)	Fluka, Buchs, Switzerland
- Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Isotyping kit	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- L-glutamine	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Liquid nitrogen	Linde, Samut prakan, Thailand
- Methanol	BDH, Dammam, Kingdom of saudi arabia
- Norfloxacin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- N-Hydroxysuccinimide (NHS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochoride (EDC)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Ofloxacin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Oxolinic acid (OXA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Oxytertracycline hydrochloride (OTC)	Fluka, Buchs, Switzerland
- Penicillin G	GE Healthcare, Cardiff, UK
- Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Berlin, Germany
- Skim milk	Anline, Bangkok, Thailand
- Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merk, Darmstadt, Germany
- Sodium chloride (NaCl)	Merk, Darmstadt, Germany
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Carlo Erba, Rodano, Italy
- Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merk, Darmstadt, Germany
- Tetracycline hydrochloride	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- 3,3',5,5" - Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Thimerosal	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Thymidine	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Tween 20	Sigma-Aldrich, Gllinyhom, UK

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจน

3.4.1.1 การเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับโปรตีน

ทำการเชื่อมต่อกรดออกโซลินิค (OXA) กับ Bovine serum albumin (BSA) โดยการนำกรดออกโซลินิค 5 มิลลิกรัม และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ในอัตราส่วน 1:2 (w/w) หรือ 4.41 มิลลิกรัม มาทำการละลายด้วย Dimethylformamide (DMF) 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม N-(3-dimethylamino propyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) ในอัตราส่วน 1:2 (w/w) หรือ 7.34 มิลลิกรัม ตั้งกวนเบาๆ ด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นทำการเติมสารละลาย BSA 10 มิลลิกรัม ที่ละลายอยู่ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (Sodium carbonate buffer) pH 9.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งต้องหยดในปริมาตรน้อยๆ อย่างช้าๆ ในขณะที่ตั้งกวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน จากนั้นทำการกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการนำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซิสในฟอส เฟต บัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline) pH 7.2 เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการแยกตะกอนออกจากสารละลายส่วนใส (ภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล, 2554) จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับแอนติเจนด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA assay) และสามารถหา % การเชื่อมต่อของ OXA-BSA ด้วยวิธี 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) โดยสารละลายที่เตรียมได้จะทำการแบ่งใส่หลอดเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียลเพื่อใช้สำหรับฉีดกระ ตุ้นหนูทดลองต่อไป สำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISA จะใช้ OXA ที่เชื่อมต่อกับโอวัลบูมิน (Ovalbumin, OVA) ซึ่งจะทำการเตรียมด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้น เพียงแต่เปลี่ยนชนิดของโปรตีนเป็นโอวัลบูมิน



รูปที่ 3.1 การเชื่อมต่อระหว่างกรดออกโซลินิคกับโปรตีนพาหะ โดยใช้สาร NHS และ EDC

3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับแอนติเจน

ทำการหาปริมาณโปรตีนต่างๆ ด้วยวิธี bicinchoninic acid protein assay (BCA) โดยใช้ BCA™ protein assay kit โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย PBS และสารตัวอย่าง เพื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาโดยผสมสารละลาย A โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) กรดไบคาร์บอร์นินิค (bicinchoninic acid) และโซเดียมทาร์เทรต (sodium tartrate) ผสมอยู่ และสารละลาย B คูปริกซัลเฟต (cupric sulfate) เข้มข้น 4% ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) โดยปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุมหลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาหลุมละ 200 ไมโครลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณกลับเป็นปริมาณโปรตีน (ชมพูนิกช์ กาญจนพังคะ, 2551)

3.4.1.3 การวัดการเชื่อมต่อโดยวัดหมู่เอมีนอิสระ

ทำการเตรียมโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างในโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (sodium bicarbonate buffer) pH 8.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำการปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.05%(w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม SDS เข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตามด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ซึ่งสามารถคำนวณ หา % ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้ในการเชื่อมต่อของสารจาก (ภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล, 2554)

$$\% \text{ ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้} = \frac{A_{335}\text{โปรตีนพาหะ} - A_{335}\text{โปรตีนที่เชื่อมกับกรดออกโซลินิค}}{A_{335}\text{โปรตีนพาหะ}} \times 100$$

3.4.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วยแอนติเจน

3.4.2.1 การฉีดกระตุ้น

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วยกรดออกโซลินิคที่เชื่อมกับโปรตีน BSA โดยทำการกระตุ้นครั้งแรกจะทำการผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ฉีดเข้าภายในช่องท้องหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c หรือ ICR เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยปริมาตร 100 ไมโครกรัมต่อตัวและฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้งทุกๆ 2 สัปดาห์ ซึ่งจะทำการผสมกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทำการเก็บเลือดจากหางหลังจากฉีด 7 วัน เพื่อนำไปทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้หรือไม่ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ OXA-OVA มาเคลือบบนจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA จากนั้นเลือกหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงและสามารถจับกับ OXA อิสระได้ ไปทำต่อในขั้นตอนที่ 3.4.3.3 โดยก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วันจะทำการฉีดกระตุ้นหนูด้วย OXA-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมที่ไม่ผสม Freund's adjuvant เป็นครั้งสุดท้าย (Final boost)

3.4.2.2 การเตรียมซีรัม

นำเลือดหนูทดลองที่เก็บได้จากปลายหาง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที เพื่อทำการแยกเก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2.3 การทำ indirect ELISA เพื่อวัดไตเตอร์แอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคในซีรัม

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย OXA-OVA และ OVA ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงหรือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี Tween 20 (PBS-T) ที่มีความเข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ใน PBS ที่ความเข้มเข้น 5% (w/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3

ครั้ง ทำการเติมซีรัมที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ซึ่งเจือจางตั้งแต่ 1:1,000 - 1:4,096,000 ด้วยสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T อีก 3 ครั้ง ต่อจากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิชนิด Anti-Mouse IgG ที่ถูกเชื่อมกับ horseradish peroxidase (GAM-HRP) อัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง และเติมสารละลายสับสเตรทของ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5"-tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายอยู่ในซิเตรทบัฟเฟอร์ (205 mM citrate buffer) pH 4.0 ที่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานทดสอบชนิด 96 หลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโลมา P3X เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 10% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพแนนเชียลประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ โดยในวันหลอมรวมเซลล์ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มีเจนต้ามัยซินเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสออกแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้านของหนูทดลองที่เตรียมไว้

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

ทำการสลบหนูโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเจาะเลือดที่หัวใจ เพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้เป็นตัวควบคุมบวกต่อไป ทำการเปิดช่องท้องของหนูแล้วนำม้ามออกมา โดยวิธีปลอดเชื้อและใช้กรรไกรตัดม้ามออกเป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามให้ละเอียด เมื่อได้เซลล์ม้ามที่ละเอียดแล้วนำไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มีส่วนผสมของเจนต้ามัยซิน ที่เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1,500 รอบ

ต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาที่เตรียมไว้

3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์ของม้ามหนูจากข้อ 3.4.3.2 มารวมกับเซลล์มัยอีโลมาจากข้อ 3.4.3.1 ในอัตราส่วน 1:2 ทำการผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งก่อนใส่โพลีเอทีลีนไกลคอล ที่มีมวลโมเลกุล 3,000-3,700 ดาลตัน ที่ความเข้มข้น 50% (v/v) ซึ่งเป็นสารช่วยหลอมรวมเซลล์ลงไปพร้อมกับทำการหมุนหลอดช้าๆ เพื่อควบคุมปริมาณการหยดโพลีเอทีลีนไกลคอลให้หมดภายในเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนต้ามัยซินเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ค่อยๆ ดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่ตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำออกมาล้างด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 2 ครั้งเพื่อล้างโพลีเอทีลีนไกลคอลซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ออกจากเซลล์ ต่อจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ที่มีความเข้มข้น 20% (v/v) แล้วทำการปิเปตเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12-14 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม จึงสามารถนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมไปทำการทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคหรือไม่ตามวิธีในข้อ 3.4.3.4

3.4.3.4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

3.4.3.4.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย OXA-OVA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงหรือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ที่มีความเข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเติมสารละลายนมพร่องมันเนยใน PBS ที่ความเข้มข้น 5% (w/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง ทำการเติมอาหารเลี้ยง

เซลล์ไฮบริโดมา 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T อีก 3 ครั้ง ต่อจากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิชนิด Anti-Mouse IgG ที่ถูกเชื่อมกับ GAM-HRP อัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง และเติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายอยู่ในซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ที่มีความเข้มข้น 205 mM หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานทดสอบชนิด 96 หลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.4.3.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับกรดออกโซลินิคที่อยู่ในรูปอิสระ โดยการปิเปตสารละลายกรดออกโซลินิคความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในจานหลุม ELISA ที่เคลือบด้วย OXA-OVA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านกระบวนการเติมสารละลายนมพร่องมันเนยและล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกขั้นแรก (ข้อ 3.4.3.4.1) ลงไปผสมกับสารละลายกรดออกโซลินิค จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำเช่นเดียวกับขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติมกรดออกโซลินิคในรูปอิสระให้ค่าการดูดแสงที่ลดลง เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่เติมกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ แสดงว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่สามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้ ให้นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมดังกล่าวมาทำการเจือจาง (limiting dilution) ให้ได้โคลนเดี่ยวต่อไป

3.4.3.5 การเตรียมเซลล์เดี่ยว (limiting dilution)

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเซลล์เพียงเซลล์เดียว นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ จากการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม ถ้าหากยังไม่ได้โคโลนีเดี่ยวอีก จะทำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมามีที่มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 25% ของหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมนำไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ข้อ 3.4.3.4.2) ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกและมีความสามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระและมีเสถียรภาพในการสร้างแอนติบอดี ไปทำการขยายเซลล์เพิ่มจำนวน แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาระยะยาว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่อยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียลซึ่งเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่ 10% FCS มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ส่วนบนทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 25% และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 10% ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปตแก้ว เป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันได้ดี ใส่เซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว มาละลายที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากที่น้ำยาเก็บเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำด้านบนทิ้ง ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีความเข้มข้น FCS 20% (v/v)

3.4.4 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการทดลองตามข้อแนะนำของผู้ผลิตดังนี้ เตรียม Isotyping specific antibody ชนิด IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM มาเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:6,000 เท่า นำไปเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HRP-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:2,000 เท่าใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายอยู่ในซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ที่มีความเข้มข้น 205 mM หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาห์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานทดสอบชนิด 96 หลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ชมพูนิกช์ กาญจนพังคะ, 2551)

3.4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect competitive ELISA ทำได้โดยนำแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเจือจางที่เหมาะสมมาผสมรวมกับกรดออกโซลินิคที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 10^{3}-10^{-4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน PBS ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งคือค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ Indirect competitive ELISA ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับที่ไม่มีสาร สามารถทำการคำนวณได้โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.0 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้น

ของสารที่ทดสอบและคำนวณค่า LOD ได้จากสูตรเพื่อนำมาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ หรือ limit of detection; LOD คำนวณได้จากสูตร

Limit of detection (LOD) : $B_0 - 3SD$ โดยที่ $n \geq 20$

เมื่อ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน

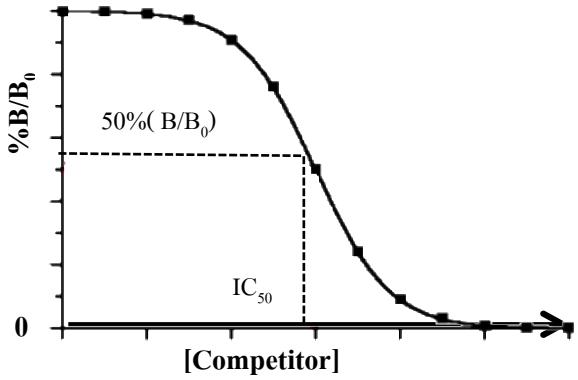
SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารทั้งในกลุ่มควิโนโลนและนอกกลุ่มหรือไม่ โดยทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ที่ทำได้โดยแอนติบอดีที่ความเจือจางที่เหมาะสมมาผสมรวมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ก้นหลุม นำมาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.0 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ 50 % (50% of inhibition concentration; IC_{50}) หาได้จากการนำค่า ที่ 50% ของ B/B_0 มาเทียบกับกราฟได้เป็นความเข้มข้น และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวที่ใช้เป็นตัวแข่งขัน ดังรูปที่ 3.2

IC_{50} = 50% (B/B_0)

$$\% \text{ ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของกรดออกโซลินิค}}{IC_{50} \text{ ของตัวแข่งขันอื่น}}$$



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\%B/B_0$ และ ค่าล็อกการิทึมความเข้มข้นของสารแข่งขัน

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออก-โซลินิคมาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีความเข้มข้นของ FCS 10% (v/v) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์แบบกวน (spinner flask) ขนาด 1 ลิตร โดยปั่นกวนที่ความเร็ว 20 รอบต่อนาที ขณะที่บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง เพื่อนำแอนติบอดีมาแยกต่อให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column)

3.4.5.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำโปรตีนจีเซฟาโรส 5 มิลลิลิตรที่อยู่ในภาชนะที่มีเอธานอลเข้มข้น 20% (v/v) เปลี่ยนให้อยู่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเตรียมคอลัมน์โปรตีนจีให้เข้าสู่สภาวะสมดุล โดยปรับอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ลงในคอลัมน์โปรตีนจี ปริมาตร 500 มิลลิลตร ทำการล้างโปรตีนที่ไม่จับกับกับคอลัมน์ออกด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (glycine-HCl) pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองที่มีทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) pH 9.0 เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 65 ไมโครลิตรอยู่ เพื่อปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำมาตรวจสอบหาแอนติบอดีในแต่ละหลอดด้วยวิธี Indirect ELISA จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนโครมาโทแกรม แล้วนำสารละลายในหลอดที่มีแอนติบอดีมารวมกัน นำไปทำไดอะไลซิสด้วย PBS ที่มี 0.01% ทีเมอโรซอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.4.5.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

การหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA ซึ่งทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS และเจือจางสารตัวอย่างในอัตราส่วน 1:5, 1:10, 1:20 และทำการทดสอบตามข้อ 3.4.1.3

3.4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความไวด้วยวิธี indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.2

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับโปรตีน

4.1.1 การเชื่อมต่อ OXA กับ BSA

กรดออกโซลินิค (Oxolinic acid; OXA) มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กเรียกว่าเฮปเทน (hapten) ซึ่งไม่สามารถทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู ให้สร้างแอนติบอดีต่อกรดโซลินิคได้ด้วยตัวมันเอง โดยสารที่เป็นแอนติเจนจำเป็นต้องมีขนาดโมเลกุลมากกว่า 5,000 ดาลตัน จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นจึงต้องเชื่อมกรดออกโซลินิคกับโปรตีนพาหะที่มีมวลขนาดใหญ่ก่อนนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับโปรตีน BSA โดยใช้ NHS และ EDC ช่วยในการเชื่อมต่อและทำการกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการนำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซิส ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.1 แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ที่ความเจือจางต่างๆ เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ BSA ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ได้ค่าความเข้มข้นของ OXA-BSA เฉลี่ยเท่ากับ 3.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.1 และรูปที่ ก.1 ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน OXA-BSA โดยใช้วิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:4	0.647	2.66
1:8	0.424	3.58
1:16	0.206	3.74
ความเข้มเข้นโปรตีนเฉลี่ย		3.33±0.58

จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ โดยการนำแอนติเจน OXA-BSA มาหาโมเลกุลของหมู่เอมีนของโปรตีน BSA ที่ถูกใช้ไปในการเชื่อมต่อกับ OXA โดยวิธี TNBS ได้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่ามีหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่าง OXA กับ BSA คิดเป็น 36 % (ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.2)

ตารางที่ 4.2 ค่า % ของการเชื่อมต่อระหว่าง OXA กับโปรตีน BSA โดยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{335} ของ BSA	A_{335} ของ OXA-BSA	ค่า % การเชื่อมต่อ
0.25	0.891	0.562	37
0.50	1.323	0.863	35
1.00	1.813	1.177	35
ค่า % การเชื่อมต่อของ OXA-BSA เฉลี่ย			36±1.2

4.1.2 การเชื่อมต่อ OXA กับ OVA

ทำการเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคกับโปรตีน OVA โดยใช้ NHS และ EDC ช่วยในการเชื่อมต่อและทำการกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการนำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซิส ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.1 แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ที่ความเจือจางต่างๆ เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ OVA ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 ได้ค่าความเข้มข้นของ OXA-OVA เท่ากับ 3.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.2 และรูปที่ ก.2 ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน OXA-OVA โดยวิธี BCA assay

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:4	0.705	3.12
1:8	0.430	3.87
1:16	0.187	3.57
ความเข้มเข้นโปรตีนเฉลี่ย		3.52±0.38

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ โดยการนำแอนติเจน OXA-OVA มาหาโมเลกุลของหมู่เอมีนของโปรตีน OVA ที่ถูกใช้ไปในการเชื่อมต่อกับ OXA โดยวิธี TNBS ได้ผลดังตารางที่ 4.4 พบว่ามีหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดระหว่าง OXA กับ OVA คิดเป็น 33 %

ตารางที่ 4.4 ค่า % ของการเชื่อมต่อระหว่าง OXA กับโปรตีน OVA โดยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{335} ของ OVA	A_{335} ของ OXA-OVA	ค่า % การเชื่อมต่อ
0.25	1.017	0.681	33
0.50	1.342	0.877	35
1.00	1.965	1.339	32
ค่า % เชื่อมต่อของ OXA-OVA เฉลี่ย			33±1.5

จากการเชื่อมต่อของกรดออกโซลินิคกับโปรตีน BSA และ OVA พบว่าการเชื่อมต่อของ OXA-BSA ให้ค่า % การเชื่อมต่อมากกว่าของ OXA-OVA ซึ่งมีค่าเท่ากับ 36 % และ 33 % ตามลำดับ ซึ่งมีสาเหตุมาจากโมเลกุลของ BSA มีหมู่เอมีนที่ทำปฏิกิริยาในการเชื่อมต่อมากกว่า OVA โดย BSA และ OVA ในหนึ่งหน่วยโมเลกุล พบหมู่เอมีนที่ใช้ทำปฏิกิริยาในการเชื่อมต่อเท่ากับ 583 และ 385 ตามลำดับ

4.2 ผลการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค

ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองทั้งหมด 25 ตัว โดยแบ่งเป็น 7 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1-3 เป็นหนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มที่ 4-7 ได้ใช้หนูสายพันธุ์ ICR (outbred stain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ซึ่งหนูทั้งหมดทำการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน OXA-BSA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อตัว จำนวนทั้งสิ้น 4 ครั้ง หลังจากทำการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและแยกซีรัมเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคด้วยวิธี indirect competitive ELISA เพื่อทำการคัดเลือกหนูทดลองที่มีระดับแอนติบอดีอย่างต่ำ 1,000 และสามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้สำหรับทำการหลอมรวมเซลล์

จากการทดสอบหาระดับแอนติบอดีของหนูทดลองทั้ง 25 ตัว ด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้แอนติเจน OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม โดยเลือกระดับแอนติบอดีคือความเจือจางของซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 ที่ 450 นาโนเมตร พบว่าหนูทุกตัวสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OXA-BSA ที่ระดับการสร้างแอนติบอดีในช่วง 1:512,000 – 1:4,096,000 จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยเลือกระดับความเจือจางในซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ประมาณ 0.9-1.3 มาทดสอบว่าแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมนั้นสามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระหรือไม่ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีของหนูทั้ง 25 ตัวสามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระที่ความเข้มเข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ โดยทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรลดลง เมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่ไม่มีการแย่งจับของกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ โดยมี % การแข่งขันในการแย่งจับของกรดออกโซลินิคอยู่ในช่วง 33 - 93 % ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 สรุประดับแอนติบอดีและความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจนในรูปอิสระของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OXA-BSA

หนูกลุ่มที่	หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดี	ระดับแอนติบอดีที่นำไปใช้ทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		% การแข่งขัน
				ไม่มี OXA	OXA 10 µg/ml	
1 BALC/c	1	1:1,024,000	1:128,000	1.219	0.713	42
	2	1:2,048,000	1:256,000	0.996	0.626	37
	3	1:512,000	1:64,000	1.209	0.820	32
2 BALC/c	4	1:512,000	1:64,000	1.124	0.635	44
	5	1:2,048,000	1:256,000	1.047	0.511	51
	6	1:1,024,000	1:64,000	1.244	0.807	35
3 BALC/c	7	1:1,024,000	1:128,000	0.986	0.539	45
	8	1:512,000	1:64,000	1.021	0.648	37
	9	1:1,024,000	1:128,000	1.166	0.663	43
	10	1:512,000	1:64,000	1.253	0.712	43

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) สรุประดับแอนติบอดีและความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจนในรูปอิสระของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OXA-BSA

หนูกลุ่มที่	หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดี	ระดับแอนติบอดีที่นำไปใช้ทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		% การแข่งขัน
				ไม่มี OXA	OXA 10 μg/ml	
4 ICR	11	1:2,048,000	1:256,000	1.077	0.178	83
	12	1:4,096,000	1:256,000	1.119	0.210	81
	13	1:2,048,000	1:512,000	0.994	0.145	85
5 ICR	14	1:2,048,000	1:512,000	1.212	0.154	87
	15	1:4,096,000	1:512,000	1.053	0.073	93
	16	1:1,024,000	1:128,000	0.988	0.179	82
	17	1:2,048,000	1:128,000	0.982	0.214	78
6 ICR	18	1:1,024,000	1:128,000	1.257	0.355	72
	19	1:512,000	1:64,000	0.926	0.294	68
	20	1:1,024,000	1:64,000	1.197	0.317	74
	21	1:1,024,000	1:128,000	0.956	0.335	65
7 ICR	22	1:2,048,000	1:256,000	0.909	0.243	73
	23	1:1,024,000	1:128,000	1.227	0.447	64
	24	1:1,024,000	1:64,000	1.059	0.296	72
	25	1:2,048,000	1:256,000	1.205	0.394	67

จากการทำการทดสอบพบว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ 1-3 ที่เป็นหนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) ส่วนใหญ่มีระดับการสร้างแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคในซีรัมต่ำกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ 4-7 ที่เป็นหนูสายพันธุ์ ICR (outbred strain) และแอนติบอดีที่ผลิตจากหนูสายพันธุ์ BALB/c มีความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้น้อยกว่าหนูสายพันธุ์ ICR ทั้งนี้เนื่องจากหนูแต่ละตัวแม้อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน แต่จะมีความแตกต่างของพันธุกรรมขึ้นกับสารพันธุกรรมที่ได้รับมาจากพ่อและแม่ ดังนั้นปัจจัยด้านความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้อาจส่งผลกระทบต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง เช่น ปริมาณการสร้างแอนติบอดีและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

4.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OXA

จากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทั้ง 25 ตัว ด้วย OXA-BSA ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนครบ 4 ครั้ง พบว่าหนูทดลองมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและแอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ จึงได้ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยอีโลมา ชนิด P3X โดยการนำเซลล์ม้ามของหนูมาผสมกับเซลล์มัยอีโลมา แล้วนำมาปั่นเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกมารวมกัน จากนั้นหลอมรวมเซลล์ด้วย 50% โพลีเอทิลีนไกคอลแล้วล้างออก จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เพื่อทำการกำจัดเซลล์มัยอีโลมา หลังจากการหลอมรวมประมาณ 10 วัน ตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ หากพบเซลล์เป็นโคโลนีประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมมาทำการตรวจหาแอนติบอดีเพื่อคัดกรองโดยวิธี indirect ELISA หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวก (ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 450 นาโนเมตร มากกว่าหรือเท่ากับ 0.5) มาทำการทดสอบต่อไป เพื่อตรวจดูว่าแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตได้ สามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้หรือไม่ โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA ให้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 25 ครั้งที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OXA-BSA

ครั้งที่	จำนวนตั้งต้น	จำนวนที่เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ		แอนติบอดีที่ผลิต (indirect ELISA)		แอนติบอดีที่จับกับ OXA (competitive ELISA)		จำนวนโคลนที่ได้	
	(หลุม)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(โคลน)	(%)
1	1,666	377	22.63	13	0.78	3	0.18	-	-
2	1,440	476	33.05	18	1.25	3	0.21	-	-
3	1,440	394	27.36	12	0.83	2	0.14	-	-
4	1,440	641	45.51	22	1.53	-	-	-	-
5	960	426	44.36	25	2.60	4	0.42	-	-
6	960	371	38.65	31	3.23	7	0.73	-	-
7	960	395	41.14	16	1.67	3	0.31	-	-
8	960	266	27.71	13	1.35	-	-	-	-
9	960	459	47.81	44	4.58	4	0.42	-	-
10	960	314	32.71	24	2.50	6	0.63	-	-
11	1,056	891	84.38	211	19.98	16	1.52	-	-
12	1,056	912	86.36	194	18.37	21	1.99	-	-
13	960	755	78.56	84	8.75	15	1.56	1	0.10
14	1,056	936	88.63	249	25.94	25	2.37	1	0.09
15	1,056	857	81.15	163	15.44	-	-	-	-
16	1,056	844	79.92	171	16.19	19	1.80	-	-
17	960	739	76.98	220	22.92	29	3.02	-	-
18	960	812	84.58	153	15.94	20	2.08	-	-
19	960	809	84.27	72	7.50	5	0.52	-	-
20	960	702	73.13	144	15.00	10	1.04	-	-
21	960	681	70.94	175	18.23	11	1.15	-	-
22	960	744	77.50	172	17.92	22	2.29	-	-
23	960	866	90.21	278	28.96	37	3.85	-	-
24	960	960	100	188	19.58	21	2.19	-	-
25	960	716	74.58	156	16.25	19	1.98	-	-

จากการทำการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 1-10 ที่เป็นหนูสายพันธุ์ BALB/c พบว่าได้จำนวนที่เซลล์ไฮบริโดมาเจริญต่อหลุมในจำนวนที่น้อย และ % ของจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญต่อจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่ต่ำเมื่อคิดจากจำนวนหลุมตั้งต้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการปะปนของเซลล์ไฟโบร-บลาสต์ (fibroblast) ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเซลล์ไฮบริโดมาและมีความสามารถในการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่า จึงส่งผลให้เกิดการบดบังการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา อย่างไรก็ตามสามารถพบเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและมีความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้ แต่เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาแยกเป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution จะพบว่าเซลล์ได้สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไป เนื่องจากโคลนที่ได้มีความไม่คงตัวจึงไม่สามารถนำมาวิจัยต่อไป

จากการทำการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 11-25 ที่เป็นหนูสายพันธุ์ ICR พบว่าได้จำนวนเซลล์ไฮบริโดมาเจริญต่อหลุมในจำนวนที่มาก และมี % ของจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญต่อจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่สูงกว่าการหลอมรวมโดยใช้จากหนูสายพันธุ์ BALB/c ทั้งนี้อาจเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิกันของหนู ICR ต่อกรดออกโซลินิคมีประสิทธิภาพมากกว่าหนูสายพันธุ์ BALB/c โดยพิจารณาจากระดับแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคและ % การแข่งขันที่แสดงความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ อีกทั้งการหลอมรวมเซลล์ที่เกิดจากหนูสายพันธุ์ ICR จะพบการปะปนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ต่อหลุมในจำนวนที่น้อยหรือไม่พบเลย โดยพบเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระในทุกการหลอมรวมเซลล์ แต่เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จะสูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีจากการย้ายโคลน หรือการทำเซลล์เดี่ยว อาจเนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความไม่คงตัว ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้บางส่วนไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอด ส่วนเซลล์ไฮบริโดมากลุ่มที่มีชีวิตอาจเกิดการกำจัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคออกจากดีเอ็นเอของเซลล์จึงทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีต่อออกโซลินิค อย่างไรก็ดีโคลนที่ได้จากการหลอมรวมในครั้งที่ 13 และ 14 ที่คงความสามารถผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ จึงได้กำหนดรหัสของเซลล์ไฮบริโดมาได้แก่ 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 ดังตารางที่ 4.7 ต่อมาจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาต่อไป โดยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการตรวจสอบลักษณะสมบัติต่อไป

ตารางที่ 4.7 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		% การแข่งขัน
	ไม่มี OXA	OXA (10 μg/ml)	
7/A3/B6	1.317	0.264	80
10/D5/A4	1.865	0.396	79

4.4 ลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 2 โคลน โดยวิธี indirect ELISA antigen capture โดยใช้แอนติบอดีมาตรฐาน IgG_{2b} เป็นตัวควบคุมบวก พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองมีไอโซไทปชนิด IgG_{2a} ซึ่งพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่ามากที่สุด (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ผลการทำ indirect ELISA เพื่อตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
7/A3/B6	0.096	1.124*	0.068	0.141	0.127	0.426
10/D5/A4	0.104	1.054*	0.158	0.129	0.126	0.317
ตัวควบคุมบวก IgG_{2b}	0.247	0.177	1.286	0.176	0.144	0.401

หมายเหตุ : * หมายถึง ไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลน

4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ

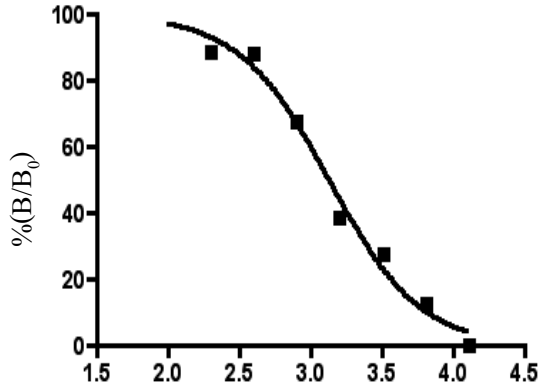
ในขั้นตอนทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำเป็นต้องหาความเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เนื่องจากความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันในแต่ละโคลน จึงทำให้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในสารละลายแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุมก่อนนำไปทดสอบในลำดับต่อไป จากการทดลองโดยทำการเคลือบก้นคลุมด้วย OXA-OVA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทำ indirect ELISA และพิจารณาเลือกระดับความเจือจางของแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.000 พบว่าความเจือจางที่เหมาะสมของโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 เท่ากับ 1:2 และ 1:4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 การทดสอบ indirect ELISA ที่ค่าความเจือจางต่างๆ ของแอนติบอดีจากโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4

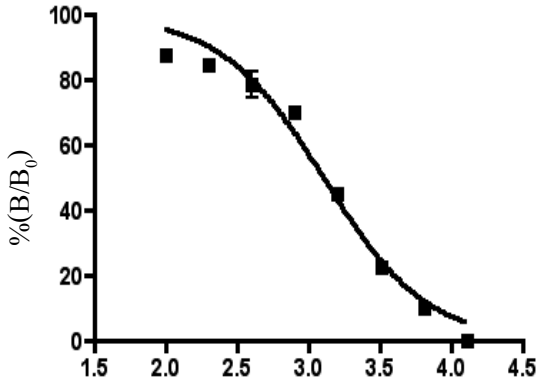
ระดับความเจือจางของแอนติบอดี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	
	7/A3/B6	10/D5/A4
ไม่เจือจาง	1.293	1.422
1:2	1.047*	1.341
1:4	0.732	1.128*
1:8	0.491	0.897
1:16	0.243	0.585
1:32	0.115	0.361
1:64	0.127	0.189

หมายเหตุ : * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียง 1.000 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

เมื่อทราบค่าความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของทั้ง 2 โคลนแล้ว จากนั้นทำการหาค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้งสองโคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA ใช้กรดออกโซลินิคในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วงความเข้มข้น 5.0 x 10 – 1.28 x 10^4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.1-4.2 (ตารางที่ ก.3)



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ OXA ในการแข่งขัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 7/A3/B6



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง (B/B_0) และปริมาณ OXA ในการแข่งขัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 10/D5/A4

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 2 โคลน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งใช้ OXA-OVA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.33 และ 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD

เท่ากับ 0.27 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.10) ซึ่งหากเปรียบเทียบค่า LOD ที่ได้จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลนกับการศึกษาของ Huet และคณะ ในปี 2006 ที่ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารในกลุ่มควิโนโลน แล้วมีค่า LOD ของกรดออกโซลินิคอยู่ที่ 111 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (0.111 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 มีค่าความไวที่สูงกว่าของ Huet และคณะได้ศึกษาไว้ แต่อย่างไรก็ตามค่าปริมาณของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) พบว่าโคลน 10/D5/A4 มีต่ำกว่าค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติคือ 0.2 ไมโครกรัมต่อกรัม (ppm) ยกเว้นในกรณีของน้ำนมจากวัวและไข่ไก่ที่มีตกค้างได้ไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ แต่เนื่องจากโคลนทั้งสองมีค่าความไวที่ใกล้เคียงกันจึงเลือกที่จะทำการทดสอบทั้ง 2 โคลนในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค indirect competitive ELISA

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC_{50} (μg /ml)	LOD (μg /ml)
7/A3/B6	1.33	0.27
10/D5/A4	1.27	0.18

4.4.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค

ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากทั้ง 2 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่มควิโนโลนจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เอนโรฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และซิโพรฟลอกซาซิน และสารนอกกลุ่มอีก 4 ชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน เททราไซคลิน และ คลอแรมเฟนิคอล คำนวนโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4 เพื่อหาค่า IC_{50} ของแต่ละสาร ดังตารางที่ 4.11 และในรูปที่ 4.3 – 4.4

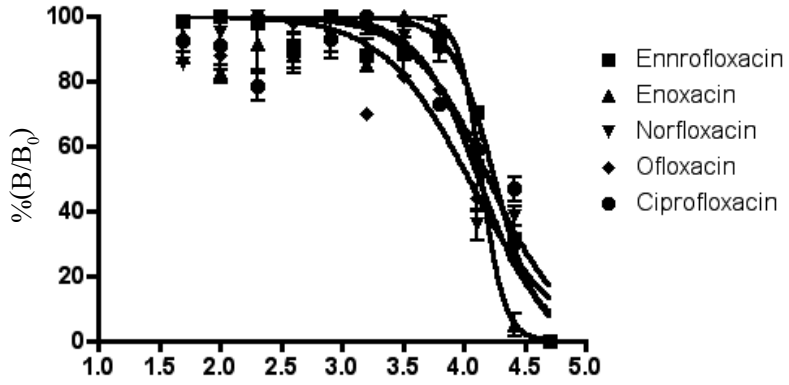
ตารางที่ 4.11 ค่า IC_{50} และ % ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารกลุ่มควิโนโลน และสารนอกกลุ่ม โดยวิธี indirect competitive ELISA

สารแข่งขัน	7/A3/B6		10/D5/A4	
	IC_{50} (ng/ml)	% CR	IC_{50} (ng/ml)	% CR
Quinolone				
Oxolinic acid	1,218	100	1,112	100
Enrofloxacin	17,776	7	16,446	7
Enoxacin	13,859	9	24,079	5
Norfloxacin	13,100	9	17,379	6
Ofloxacin	10,772	11	16,352	7
Ciprofloxacin	15,786	8	19,891	6
Other group				
Nitrofurantoin	>50,000	<2.0	>50,000	<2.0
Furazolidone	>50,000	<2.0	>50,000	<2.0
Tetracycline	>50,000	<2.0	>50,000	<2.0
Chloramphenical	>50,000	<2.0	>50,000	<2.0

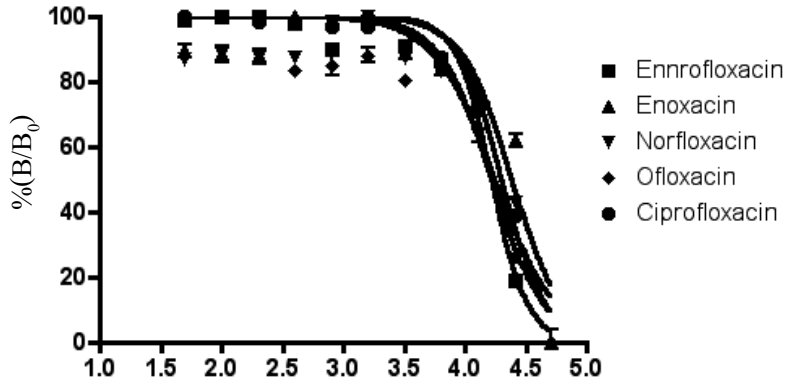
หมายเหตุ : % CR คือเปอร์เซ็นต์ของการเกิดปฏิกิริยาข้าม

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลน พบว่าเกิดปฏิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนที่ใช้ในการทดสอบ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม ดังตารางที่ 4.11 แม้ว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนมีความจำเพาะต่อกัน แต่เนื่องจากแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนหนึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งปฏิกิริยาข้ามอาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณี คือ กรณีที่แอนติเจนอาจมีอิพิโทปบางส่วนเหมือนกัน หรือกรณีที่แอนติบอดีอาจจะจับกับอิพิโทปอื่นที่มีโครงสร้างลักษณะสมบัติทางเคมีที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงคาดว่าเนื่องจากสารในกลุ่มควิโนโลนมีสูตรโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนได้ อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนมีค่าจากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่มควิโนโลนที่ใกล้เคียงกัน หากนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Huet และคณะในปี 2006 พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มควิโนโลน เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเช่น

เดียวกัน โดยเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ เอนโรฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และ ซิโพรฟลอกซาซิน คิดเป็น 133, 4, 100, 5 และ 50% ตามลำดับ (Huet และคณะ, 2006)



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง $\%(B/B_0)$ กับความเข้มข้นของสารเอนโรฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และ ซิโพรฟลอกซาซินในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 7/A3/B6 โดยวิธี indirect competitive ELISA

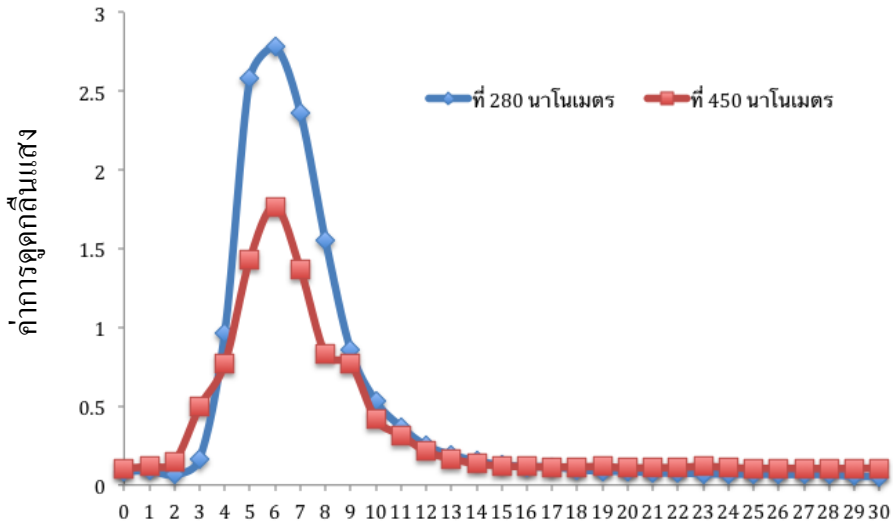


รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง $\%(B/B_0)$ กับความเข้มข้นของสารเอนโรฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน และ ซิโพรฟลอกซาซินในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 10/D5/A4 โดยวิธี indirect competitive ELISA

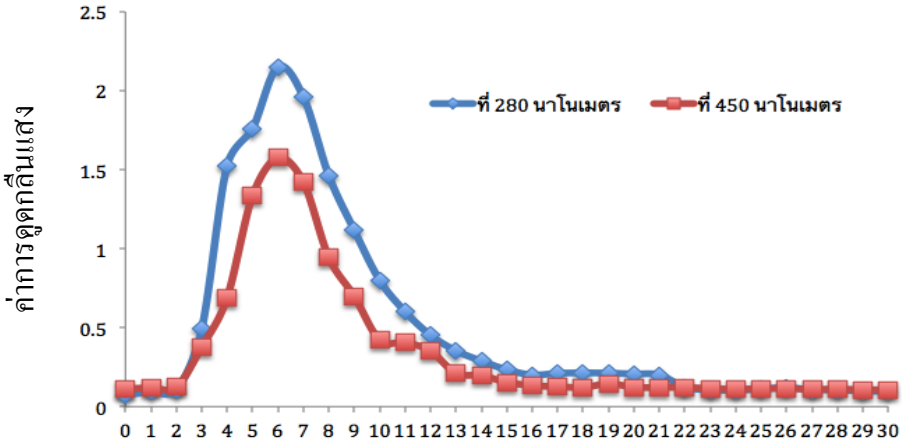
4.5 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.5.1 ผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำเซลล์ไฮบริโดมาทั้งสองโคลนมาเพิ่มจำนวนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ จนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) ซึ่งมีโปรตีนจีเซฟาโรส (Protein G sepharose) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ โดยโปรตีนจีสามารถพบได้บนผนังเซลล์ของ β-hemolytic *Streptococci* strain C และ G ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับส่วน Fc ของแอนติบอดีชนิด IgG เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 2 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a} ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีนจี แอนติบอดีจึงสามารถจับกับโปรตีนจีที่อยู่ในคอลัมน์ได้ และจะถูกชะออกมาเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 จากนั้นนำแต่ละแฟรคชัน (fraction) ที่เก็บได้ไปตรวจหาโปรตีน โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทำการตรวจสอบการมีแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ความเจือจางของแต่ละแฟรคชันในโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 เท่ากับ 1:100 และ 1:200 ตามลำดับ วัดค่าที่การดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ได้ผลดังรูปที่ 4.5-4.6 (ตารางที่ ก.4 และ ก.5 ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7/A3/B6 ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร และทำการชะแอนติบอดีด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10/D5/A4 ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร และทำการชะแอนติบอดีด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 2.7 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร

จากโครมาโทรโตแกรมในรูปที่ 4.5 และ รูปที่ 4.6 ของโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 พบว่าแฟรคชันที่ 4-11 และที่ 3-12 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 450 นาโนเมตรที่สูง ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเป็นช่วงที่แอนติบอดีถูกชะออกมา จึงทำการรวมแฟรคชันเหล่านั้นและนำไปทำการไดอะไลซิสเพื่อขจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะออกและเป็นการปรับสภาพให้แอนติบอดีอยู่ใน pH 7.4 ของ PBS

4.5.2 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของโคลน 7/A3/B6 มีโปรตีนปริมาณรวมเท่ากับ 2,045 และ 16.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและในกรณีโคลน 10/D5/A4 พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีโปรตีนปริมาณรวมเท่ากับ 2,225 และ 22.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ ก.6, ก.7 และ ก.8 และรูปที่ ก.3 ภาคผนวก ก) จากการทดสอบจะพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์ของอาหาร

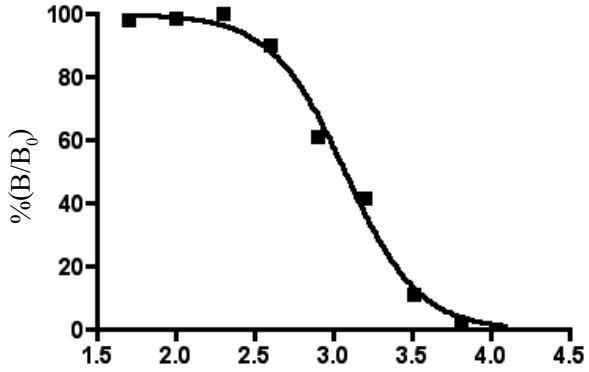
เลี้ยงเซลล์จะมีค่ามากกว่าหลังทำให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีการเติมซีรัม (Fetal calf) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงทำให้มีความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์สูง แต่หลังผ่านการกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี จะเหลือเพียงโปรตีนหรือแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนจีในคอลัมน์เท่านั้น ส่วนโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่มีความจำเพาะต่อโปรตีนจีในคอลัมน์จะถูกชะออกไป ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 2 โคลนให้บริสุทธิ์

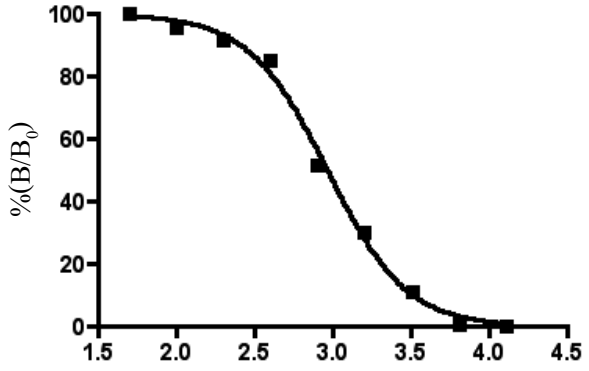
รหัสโคลน	การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA	
			ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)
7/A3/B6	ก่อน	500	4.09	2,045
	หลัง	8	2.08	16.6
10/D5/A4	ก่อน	500	4.45	2,225
	หลัง	10	2.26	22.6

4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจากทั้ง 2 โคลน กับแอนติเจน OXA-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งเลือกความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 เท่ากับ 8 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเคลือบก้นหลุมด้วยแอนติเจน OXA-OVA เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.9 และ ก.10 ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 2 โคลนจากการทำให้บริสุทธิ์มาทำการหาค่า IC_{50} และ LOD ด้วย วิธี indirect competitive ELISA โดยใช้กรดออกโซลินิคในรูปอิสระที่ระดับความเข้มข้น 5.0 x 10 – 1.28 x 10^4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.17 และ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 0.25 และ 0.18 ไมโครต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลในรูปที่ 4.7 และ 4.8 (ตารางที่ ก.11 ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง %(B/B_0) และปริมาณ OXA ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 7/A3/B6 หลังจากทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง %(B/B_0) และปริมาณ OXA ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย OXA-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคลน 10/D5/A4 หลังจากทำให้บริสุทธิ์

หากเปรียบเทียบค่าความไวของแอนติบอดี ที่ได้จากทั้งสองโคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ ได้ผลดังตารางที่ 4.13 จะพบว่ามีค่าความไวต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระใกล้เคียงกับค่าเดิม

ตารางที่ 4.13 การเปรียบเทียบค่าความไวของแอนติบอดีที่จากทั้ง 2 โคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ indirect competitive ELISA

รหัสโคลน	แอนติบอดี	IC_{50} (µg /ml)	LOD (µg /ml)
7/A3/B6	ก่อนทำให้บริสุทธิ์	1.33	0.27
	หลังทำให้บริสุทธิ์	1.17	0.25
10/D5/A4	ก่อนทำให้บริสุทธิ์	1.27	0.18
	หลังทำให้บริสุทธิ์	0.92	0.18

จากการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10/D5/A4 มีค่าความไวมากกว่าโคลน 7/A3/B6 ซึ่งให้ค่าปริมาณของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ต่ำกว่าค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ที่ประกาศ โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ คือ 0.2 ไมโครกรัมต่อกรัม (ppm) ยกเว้นในกรณีของน้ำนมจากวัวและไข่ไก่ที่มีตกค้างได้ไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง โดยการเชื่อมต่อกรดออกโซลินิคเข้ากับโปรตีนพาหะ BSA พบว่ามีปริมาณโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับกรดออกโซลินิคได้เท่ากับ 3.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าการใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมต่อกับกรดออกโซลินิคคิดเป็น 36 % เมื่อวัดโดยวิธี TNBS จากนั้นนำ OXA-BSA ที่เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับหนูทดลองทั้ง 7 กลุ่ม โดยใช้หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c ในหนูทดลองกลุ่มที่ 1-3 และสายพันธุ์ 4-7 เป็นหนูสายพันธุ์ ICR พบว่าซีรัมจากหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c ทั้ง 10 ตัว และสายพันธุ์ ICR ทั้ง 15 ตัวมีระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง 1:512,000 - 1:2,048,000 และ 1:512,000 - 1:4,096,000 ตามลำดับ และสามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับกรดออกโซลินิคได้ทุกตัว จากนั้นจึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์มัยอีโลมาชนิด P3X แต่จากการหลอมรวมทั้ง 25 ครั้ง พบว่าจำนวนเซลล์ที่ไฮบริโดมาเจริญจากหนูสายพันธุ์ BALB/c จะมีค่าอยู่ ในช่วง 23 - 48 % ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจำนวนเซลล์ที่ไฮบริโดมาเจริญจากหนูสายพันธุ์ ICR ที่อยู่ใน ช่วง 71 - 100 % แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ส่วนใหญ่ มักมีความไม่เสถียรจึงสูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค หรือไม่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระได้ โดยการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 25 ครั้ง พบว่าได้โคลนที่มีความสามารถในการจับกับกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ และมีความเสถียรต่อการผลิตในการหลอมรวมครั้งที่ 13 และ 14 เป็นจำนวนทั้งสิ้น 2 โคลน ได้แก่ 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 ตามลำดับ หลังจากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 2 โคลน พบว่าแอนติบอดีจากทั้งสองโคลนมีไอโซไทป์ชนิด IgG_{2a} และเมื่อทดสอบความไวต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบดีจากโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.33 และ 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 0.27 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการทดสอบกับปฏิกิริยาข้ามในกลุ่มควิโนโลน จำนวน 5 ชนิด คือ เอนโรฟลอกซาซิน (EFX) อีนอกซาซิน (ENX) นอร์ฟลอกซาซิน (NFX) โอฟลอกซาซิน (OFLX) และ ซิโพรฟลอกซาซิน (CPFX) และกับสารนอกกลุ่มอีก 4 ชนิด

คือ ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน เททราไซคลิน และคลอแรมเฟนิคอล โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 7/A3/B6 มีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มมากไปน้อยดังนี้ OFLX, NFX, ENX, CPFX และ EFX โดยมีค่า 11, 9, 9, 8 และ 7 % ตามลำดับ ส่วนแอนติบอดีจากโคลน 10/D5/A4 มีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มมากไปน้อยดังนี้ OFLX, ENX, NFX, CPFX และ EFX โดยมีค่า 7, 6, 5, 6 และ 7 % ตามลำดับ และแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 2 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มควิโนโลน (ปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 2 %) จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งสองโคลนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ โดยวิธีการใช้โปรตีนจีเซฟาโรสคอลัมน์ โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะมีปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดในโคลน 7/A3/B6 และ 10/D5/A4 เท่ากับ 16.6 และ 22.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความบริสุทธิ์แล้วทั้งสองโคลนมาทดสอบความไวต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ พบว่ามีค่าความไวที่ใกล้เคียงกับค่าเดิม กล่าวคือ โคลน 7/A3/B6 มีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 1.17 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และโคลน 10/D5/A4 มีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 0.92 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากงานวิจัยนี้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 10/D5/A4 มีความจำเพาะต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ โดยมีค่าความไวของแอนติบอดีที่ได้มีค่าที่ต่ำกว่าค่าที่สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติได้กำหนดไว้ว่าให้มีปริมาณกรดออกโซลินิคในอาหารและผลิตภัณฑ์จากสัตว์จำพวก วัว หมู ไก่และปลา ได้ไม่เกิน 200 นาโนกรัมต่อกรัม (ยกเว้นจากน้ำนมจากวัว และไข่ไก่ ที่กำหนดให้ไม่เกิน 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ 50 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ)

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนต่อไปอาจนำแอนติบอดีที่ได้มาศึกษาหาภาวะที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มควิโนโลน เช่น ปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม การสกัดสารออกจากตัวอย่าง เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความไวและความสะดวกในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง นอกจากนี้จากค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA พบว่าเมื่อนำไปเทียบกับชุดตรวจสอบ ELISA สำเร็จรูปที่ออกจำหน่ายโดยประเทศเยอรมัน ได้แก่ R-Biopharm Quinolone ELISA Test Kit ที่สามารถตรวจวัดกรดออกโซลินิคได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าแอนติบอดีจากงานวิจัยนี้มีค่าความไวสูงกว่า โดยอนาคตอาจเพิ่มความไวและความสะดวกในการใช้ชุดตรวจสอบ โดยการเปลี่ยนรูปแบบเป็น direct competitive ELISA ที่เป็นรูปแบบที่นิยมใช้ทั่วไปซึ่งอาจเชื่อมแอนติบอดีกับเอนไซม์ HRP หรือเพิ่มสัญญาณให้แอนติบอดีโดยการเชื่อมแอนติบอดีกับไบโอติน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กระทรวงสาธารณสุข.2550 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ.2550 เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [online]. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/quality/ยาต้านจุลชีพ.pdf [20 มีนาคม 2556]

ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: ฐานเศรษฐกิจ.

ณัฐพงศ์ ต้นสาลี, ชอุ่ม สุขช่วย และ ธีรยา สรรพวรพงษ์. 2547. การตกค้างของออกซี่เตตราซัยคลินและออกโซลินิกแอซิดในตะกอนดินบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ)*Peneaus monodon*) จังหวัดสุราษฎร์ธานี. สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง.

ธารารัชต์ ธารากุล. 2545. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน. กรุงเทพมหานคร: บางกอกบล็อก.

ปศุสัตว์, กรม. 2555 สรุปมูลค่าการนำเข้า/ส่งออกสินค้าปศุสัตว์ ประจำปี 2555 [online]. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/ict/yearly/yearly55/imex/imex1.xls [5 กุมภาพันธ์ 2556]

พรรัตน์ คงคาวิทูร. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

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

ภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล. การผลิตและการหาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย, 2554

มณฑิรา ถาวรยุติการต์, จิราพร เกษรจันทร์ และจุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์. 2550. การปนเปื้อนของยาคลอแรมฟีนิคอลออกซีเตตราซัยคลินและออกโซลินิค แอซิด ในสัตว์น้ำจากธรรมชาติบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งทะเลในจังหวัดสงขลาและพัทลุง. เอกสารวิชาการสำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง 28(3) : 1-23.

เรวัตร เปรมปิยะวัฒน์ และสุริยะ แพงดี. 2543. การตรวจหาออกโซลินิค แอซิด ตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงในจังหวัดตราดโดยวิธี HPLC. เอกสารวิชาการสำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง 12(4): 28-34.

สุดา ตัณฑวณิช, จุลีรัตน์ แสงสุวรรณ และ ลัดดาวัลย์ คำเจริญ. 2543. การตกค้างของยาออกโซลินิกแอซิด ในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล กรมประมง.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. 2537. อิมมูโนวิทยา. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2548 การพัฒนามาตรการในการควบคุมการผลิต นำเข้า และส่งออก : ข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร [online]. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/datakm/standard/standard_list_std.html [2 มกราคม 2556]

ภาษาอังกฤษ

Abcam. An explanation and description of the different structural elements of antibody [online]. Available from: http://www.abcam.cn/ps/cms/images/abstructure.jpg [2013, January 10]

Arkady, B. K. and Nicholas, R. C. (1998). The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibaterials. Journal of Biological Chemistry 273: 27668-27677.

Bahruddin, S., Rohaiza, M., Norita, M., Glen, D. L., Sariff, M. J. and Muhammad, I. S. (2002). Determination of oxolinic acid in feeds and cultured fish using capillary electrophoresis, Journal of Food Chemistry 78: 383-388.

Casparian, J.M., Luchi, M., Moffat, R.E. and Hinthorn, D. (2000). Quinolone and tendon ruptures. Southern Medical Journal. 93: 488-491.

Epivax, Inc. T helper epitopes are required for B cell activation [online]. Available from: http://www.epivax.com/wp-content/uploads/2010/06/B_Cell_T-Cell.png [2013, February 10]

European Commission Regulation, No 2377/90/2000/EC-Final of September 1998, Committee for veterinary medicinal products oxolinic acid, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology, 2000, pp 7.

Ferhan, N. and Hasan, A. (2012). Quinolone antibiotic residue in raw milk and chicken liver in Konya. Eurasian Journal of Veterinary Sciences 28(3): 154-158.

Huet, A.C., Charlier, C., Tittlemier, S.A., Singh, G., Benrejeb, S. and Delahaut, P. (2006). Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 2822-2827.

Holtzapple, C.K., Buckley, S.A. and Stanker, L. H. (2001). Determination of fluoroquinolone in serum using an on-line clean up column coupled to high performance immunoaffinity-recersed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography B 754: 1-9.

Johnston, L., Mackay, L. and Croft, M. (2002). Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 982: 97-109.

Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. Antimicrobial and Chemotherapy 54: 311-320.

McGraw Hill Science. Key process in a specific immune response [online]. Available from: http://content.answcdn.com/main/content/img/McGrawHill/Encyclopedia/images/CE118100FG0010.gif [2013, March 15]

Midlands Technical College. B-Cells and Humoral Immunity [online]. Available from: http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225chap17/Lecture3.htm [2013, March 10]

Norris, S. and Mandell, G.L. The quinolones history and overview. San Diego, Academic Press Inc, pp. 1–22, 1988.

Phoenix collage. Chapter15: The Specific Immune System [online]. Available from: http://www.pcmaricopa.edu/biology/rcotter/bio%20205/lessombuilders/chapter%2015%20LB/Ch15LessonBuilder_print.html [2013, January 16]

South China Biochip Research. Identification of the human immunoglobulin subtype table [online]. Available from: http://www.scbrc.org.cn/sitecn/xcpzx/670.html [2013, January 20]

Stubbings, G. and Bigwood, T. (2009). The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residue in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach, Analytica Chimica Acta 637: 68-78.

Wells, R. (1995). Oxolinic acid. FAO Food Nutrition 41(7): 69-88.

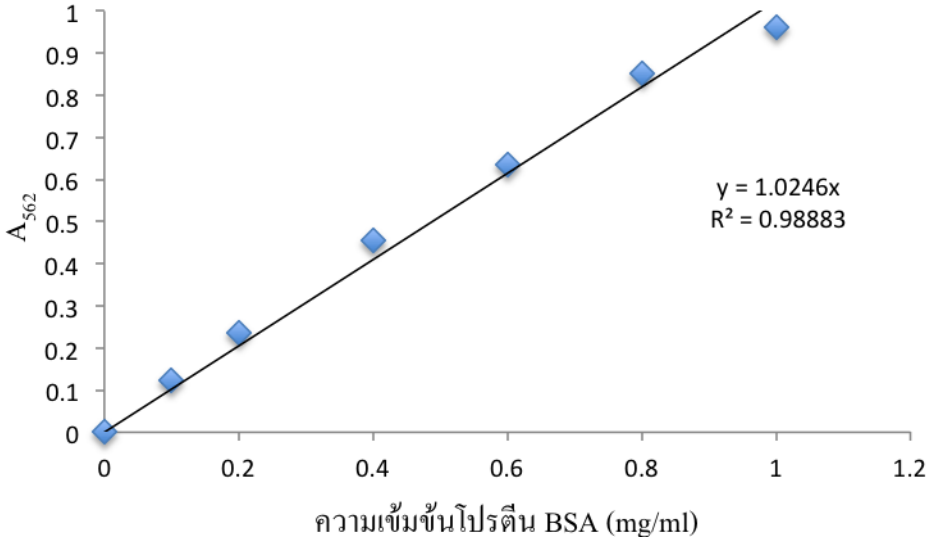
Wentland, M.P. Quinolone antimicrobial agents. Washington DC, American Society for Microbiology: XIII-XIV, 1993.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี BCA

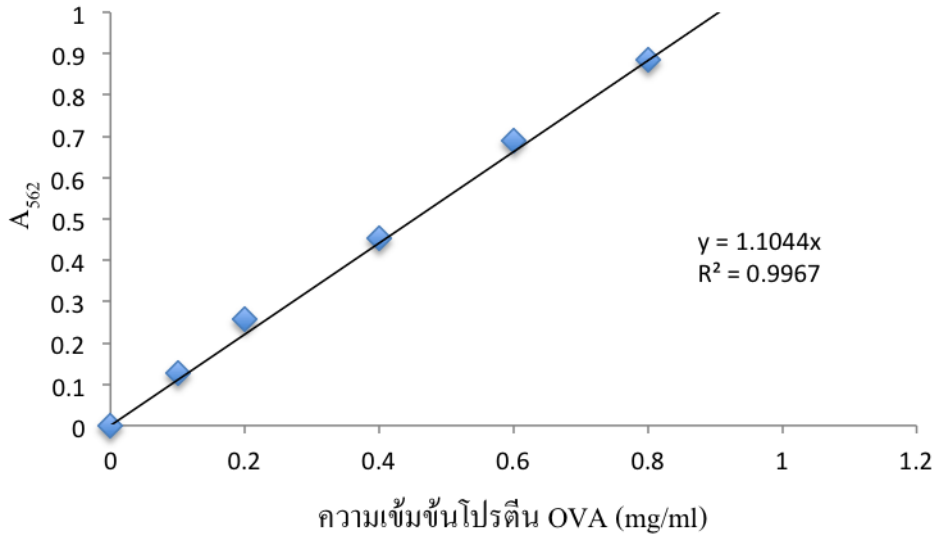
ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.123
0.2	0.237
0.4	0.456
0.6	0.635
0.8	0.852
1.0	0.961



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน OVA ด้วยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน OVA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.126
0.2	0.256
0.4	0.455
0.6	0.689
0.8	0.885
1.0	1.075



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน OVA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 450 นาโนดมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 2 โคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน OXA-OVA ความเข้มข้น 5 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น OXA (ng/ml)	A_{450}	
	7/A3/B6	10/D5/A4
0	1.033±0.011	1.036±0.027
100	1.036±0.008	0.924±0.014
200	0.930±0.011	0.899±0.029
400	0.927±0.017	0.844±0.062
800	0.739±0.005	0.771±0.029
1,600	0.473±0.008	0.550±0.009
3,200	0.374±0.015	0.347±0.016
6,400	0.234±0.015	0.237±0.019
12,800	0.121±0.006	0.149±0.006

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7/A3/B6 จากการทำให้บริสุทธิ์

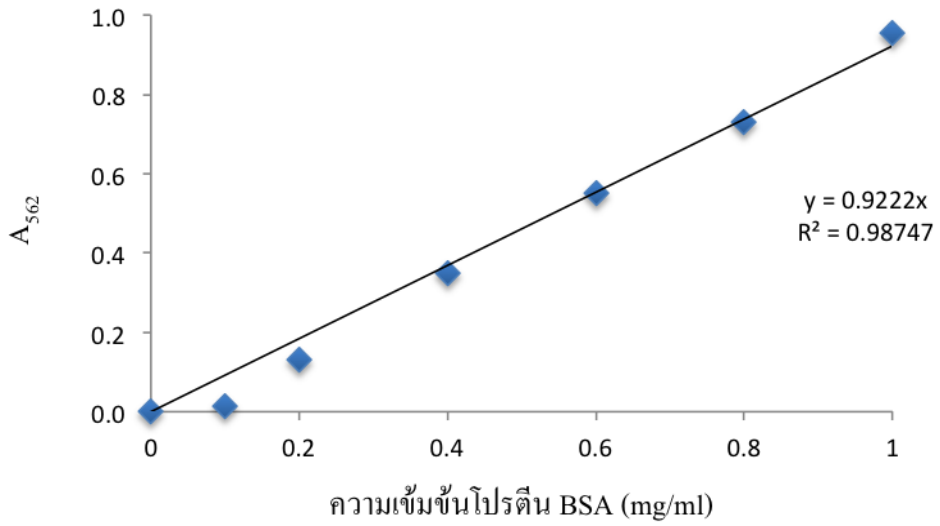
Fraction	A_{280}	A_{450}	Fraction	A_{280}	A_{450}
Unbound	0.084	0.107			
1	0.091	0.118	16	0.116	0.117
2	0.066	0.148	17	0.115	0.114
3	0.165	0.495	18	0.097	0.115
4	0.968	0.772	19	0.089	0.117
5	2.580	1.434	20	0.086	0.108
6	2.779	1.766	21	0.078	0.110
7	2.365	1.372	22	0.076	0.111
8	1.553	0.831	23	0.072	0.119
9	0.858	0.772	24	0.069	0.111
10	0.533	0.419	25	0.069	0.105
11	0.369	0.317	26	0.067	0.106
12	0.250	0.213	27	0.067	0.105
13	0.192	0.167	28	0.066	0.104
14	0.153	0.134	29	0.056	0.105
15	0.127	0.121	30	0.054	0.107

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10/D5/A4 จากการทำให้บริสุทธิ์

Fraction	A_{280}	A_{450}	Fraction	A_{280}	A_{450}
Unbound	0.075	0.112			
1	0.092	0.120	16	0.201	0.133
2	0.106	0.124	17	0.211	0.127
3	0.491	0.377	18	0.214	0.121
4	1.525	0.691	19	0.212	0.145
5	1.760	1.334	20	0.207	0.123
6	2.152	1.577	21	0.201	0.121
7	1.960	1.421	22	0.123	0.122
8	1.463	0.945	23	0.106	0.114
9	1.117	0.699	24	0.103	0.111
10	0.800	0.422	25	0.111	0.113
11	0.602	0.406	26	0.121	0.115
12	0.452	0.352	27	0.107	0.109
13	0.354	0.211	28	0.104	0.111
14	0.289	0.197	29	0.099	0.107
15	0.234	0.154	30	0.096	0.106

ตารางที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.015
0.2	0.132
0.4	0.348
0.6	0.551
0.8	0.731
1.0	0.956



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.7 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}		ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)	
	7/A3/B6	10/D5/A4	7/A3/B6	10/D5/A4
1:5	0.732	0.832	3.96	4.51
1:10	0.378	0.413	4.10	4.48
1:20	0.191	0.202	4.14	4.38
1:40	0.096	0.102	4.16	4.42
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย			4.09±0.09	4.45±0.06

ตารางที่ ก.8 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}		ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)	
	7/A3/B6	10/D5/A4	7/A3/B6	10/D5/A4
1:5	0.391	0.441	2.12	2.39
1:10	0.187	0.197	2.03	2.14
1:20	0.096	0.104	2.08	2.26
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย			2.08±0.05	2.26±0.13

ตารางที่ ก. 9 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 7/A3/B6 ที่เหมาะสมกับแอนติเจน OXA-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจาน ELISA โดยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี (µg/ml)	แอนติเจน OXA-OVA (µg/ml)				
	1	2	4	5	8
1	0.068	0.134	0.272	0.376	0.766
2	0.057	0.140	0.345	0.581	1.213
4	0.077	0.151	0.349	0.823	1.344
8	0.065	0.155	0.443	**1.021**	1.461
16	0.072	0.161	0.687	1.244	1.541
32	0.076	0.226	0.788	1.432	1.566

ตารางที่ ก. 10 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 10/D5/A4 ที่เหมาะสมกับแอนติเจน OXA-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจาน ELISA โดยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี (µg/ml)	แอนติเจน OXA-OVA (µg/ml)				
	1	2	4	5	8
1	0.172	0.197	0.292	0.659	0.771
2	0.194	0.221	0.334	0.838	1.169
4	0.203	0.321	0.514	**1.058**	1.451
8	0.273	0.332	0.734	1.243	1.677
16	0.303	0.476	1.080	1.347	1.916
32	0.424	0.718	1.628	1.923	2.094

ตารางที่ ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 2 โคลนต่อกรดออกโซลินิคในรูปอิสระหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ แอนติเจน OXA-OVA ความเข้มข้น 5 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น OXA (ng/ml)	A_{450}	
	7/A3/B6	10/D5/A4
0	1.095±0.009	1.028±0.007
100	1.113±0.006	1.101±0.033
200	1.118±0.023	1.057±0.009
400	1.133±0.010	1.017±0.004
800	1.034±0.009	0.954±0.007
1,600	0.736±0.011	0.626±0.006
3,200	0.534±0.009	0.413±0.007
6,400	0.221±0.008	0.224±0.008
12,800	0.124±0.006	0.120±0.004

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลาย สำหรับการเชื่อมโปรตีนพาหะ BSA กับ OXA

0.1 M Sodium carbonate buffer, pH 9.4

Na_2CO_3	3.18	กรัม
$NaHCO_3$	5.86	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.4 ด้วย 3 M HCl หรือ 3 M NaOH

ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ OXA กับโปรตีนพาหะด้วยวิธี TNBS

1) 0.1 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

$NaCO_3$	3.18	กรัม
$NaHCO_3$	5.86	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.5 ด้วย 3 M HCl หรือ 3 M NaOH

2) 0.05% TNBS (Picrylsulfonic acid)

5% TNBS (W/V)	0.01	มิลลิลิตร
0.1 M Sodium bicarbonate pH 8.5	0.9	มิลลิลิตร

3) 10% SDS (Sodium dodecyl sulphate)

SDS	1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4) 1N HCl

Conc. HCl	7.7	มิลลิลิตร

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 250 มิลลิลิตร

ข.3 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในวิธี ELISA

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

NaH_2PO_4	27.60	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Na_2HPO_4	71.63	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

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

PB stock	1	ลิตร
NaCl	175	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4) 5% นมผงพร่องมันเนย (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

5) 205 mM Citrate buffer pH 4.0

Potassium citrate	33.20	กรัม
Citric acid	21.54	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้ได้ pH 4.0

6) Substrate solution

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	3.0	กรัม
DMSO	300	ไมโครลิตร
0.2 M citrate buffer	10	มิลลิลิตร
H_2O_2	3.5	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7) 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

<u>หมายเหตุ</u> ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรด เนื่องจากจะเกิดความร้อนขึ้น

ข.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) Stock HAT 100X

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

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้เครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> Aminopterin ให้นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส จนกว่าจะละลาย เนื่องจากสาร Aminopterin ละลายในน้ำกลั่นยาก

2) Stock HT 100X

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

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	90	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร
อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส

ข.5 การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์

1) 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.77	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1.69	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2) 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7

Glycine-HCl	7.51	กรัม ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
HCl (37%)	2.42	มิลลิลิตร		

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 2.7 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3) 1M Tris Cl buffer, pH 9.0

Trizma base	121.14	กรัม ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
HCl (37%)	6.41	มิลลิลิตร		

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภาณุพันธ์ มั่งมี เกิดเมื่อวันที่ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 โดยเสนอผลงานเรื่องการผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อกรดออกโซลินิค ในการประชุมเสนอผลงานวิจัย Annual meeting of the Thai society for biotechnology (TSB) ครั้งที่ 24 เมื่อวันที่ 29-30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555