

# รายงานการวิจัย

## เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน

**PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST 3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE**

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คณะผู้วิจัย

นางสาวอุมมาพร พิมพิทักษ์	หัวหน้าโครงการ
นางทรงจันทร์ ภูทอง	ผู้ร่วมโครงการ
ผศ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส	ผู้ร่วมโครงการ
อ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร	ผู้ร่วมโครงการ
นายอนุมาศ บัวเขียว	ผู้ร่วมโครงการ
รศ.ดร.พลกฤษ์ แสงวณิช	ที่ปรึกษาโครงการ

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลเป็นระยะเวลา 2 ปี (ประจำปีงบประมาณ 2556 ถึง 2557)

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการ ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อภาษาไทย

ฟูราโซลิโดน (Furazolidone ,FZD) เป็นยาในกลุ่มสารไนโตรฟูแรนที่เกษตรกรนิยมใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารในสัตว์เพื่อการบริโภค ได้แก่ โค ,สุกร ,ไก่ ,ปลา และกุ้ง ยานี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมแทบอลิต์ คือ 3 – อะมิโน – 2 – ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone ,AOZ) ติดกับเนื้อเยื่อ อาจเป็นสารก่อมะเร็งและก่อให้เกิดกลายพันธุ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ หรือ สารอนุพันธ์ NPAOZ ซึ่งเป็นรูปสารสำหรับการตรวจหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์ โดยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยอนุพันธ์ CPAOZ ที่เชื่อมต่อกับ cBSA (CPAOZ-cBSA) และ AOZ ที่เชื่อมต่อกับ BSA (AOZ-BSA) จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า CPAOZ-cBSA เหมาะสมที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองมากกว่า AOZ-BSA เพราะสามารถผลิตไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีซึ่งมีความสามารถในการจับกับสาร NPAOZ ,CPAOZ และ FZD ในรูปอิสระได้ จากการคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ มีจำนวน 8 โคลน ได้แก่ เซลล์จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 มีความไวในการจับกับสาร NPAOZ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.17 ,4.87 ,6.38 ,3.87 ,10.49 ,10.27 ,11.46 และ 11.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ FZD และ CPAOZ ในรูปอิสระได้ จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนที่ได้โดยตรวจสอบไอโซไทป์ ทดสอบความไว ทดสอบความจำเพาะและการเกิดปฏิกิริยาข้าม พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และ 6/6E มีไอโซไทป์ เป็นชนิด IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>2b</sub> ตามลำดับ โคลนที่มีความไวสูงสุดต่อสาร NPAOZ คือ 181 และ 102 โดยสามารถจับกับ CPAOZ และ FZD ในรูปอิสระได้ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ และยาปฏิชีวนะตัวอื่นๆที่ใช้ทดสอบแอนติบอดีจากโคลน 181 และ 102 ที่บริสุทธิ์แล้ว ได้แอนติบอดีที่ได้จากโคลน 181 มีความไวต่อสารอิสระ CPAOZ NPAOZ และ FZD สูงสุดโดยให้ค่า  $IC_{50}$  เป็น 0.34 17.66 และ 0.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับมีค่า LOD เป็น 0.06 3.86 และ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ NPAOZ ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบสารตกค้างได้

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Furazolidone (FZD) is a nitrofurantoin drug which is widely used in prevention and treatment of animals such as cattle, swine, chicken, fish and shrimp, for consumption. When FZD enters the body, it is metabolized to 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) which attached to the tissue and is considered to be a carcinogen and mutagen.

In this research, monoclonal antibody against AOZ or its nitrophenyl derivative (NPAOZ) which is the stabilized form for residue detection was produced. Immunization of mice was performed by using both carboxyphenyl derivative conjugated to cationized bovine serum albumin (CPAOZ-cBSA) and AOZ-BSA as the antigens. The results indicated that CPAOZ-cBSA was better than AOZ-BSA because it could induce hybridomas which produce antibodies with binding ability to NPAOZ, CPAOZ and FZD. After screening, eight hybridomas which produce antibody against NPAOZ were selected. Four hybridoma clones were obtained from the originated well no. 8/12D and were assigned as no. 75, 79, 89 and 181 while the others (assigned as no. 96, 102, 109 and 112) were obtained from the well no. 6/6E. Their sensitivities to NPAOZ in the term of 50 percent inhibition concentration were 5.1, 4.9, 6.4, 3.9, 10.5, 10.3, 11.5 and 11.8 ng/ml, respectively. Antibody from each clone cross-reacted to FZD and CPAOZ. The isotype of antibody from well no. 8/12D and 6/6E was found to be IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2b</sub>, respectively. Monoclonal antibodies from clone no. 181 and 102 were highly specific for NPAOZ, CPAOZ and FZD, and did not cross react with other nitrofurans and other antibiotics tested. The purified antibody from clones 181 gave higher sensitivity to free antigen CPAOZ, NPAOZ and FZD with the IC<sub>50</sub> value of 0.34 17.66 and 0.13 ng/ml and the LOD value of 0.06 3.86 and 0.04 ng/ml, respectively. In conclusion monoclonal antibodies were generated which show specificity for NPAOZ and have a potential to be used in the development of immunoassay-based test kit for NPAOZ detection.

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฎ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	3
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2. วิธีดำเนินการวิจัย	6
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	6
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	6
2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	7

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับ	
เคลื่อนงาน 96 หลุม (AOZ-OVA และ CPAOZ-OVA)	10
2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร AOZ เป็น CPAOZ	10
2.2.2 การเชื่อมต่อ CPAOZ กับ cBSA และ AOZ กับ BSA	11
2.2.3 การเชื่อมต่อ AOZ และ CPAOZ กับ OVA	11
2.2.4 การหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี BCA	11
2.2.5 การวัดการเชื่อมตของสารกับ โปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS	11
2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร AOZ และ NPAOZ	12
2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง	12
2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA	12
2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ โดยวิธี Indirect	
competitive ELISA	13
2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร AOZ หรือ NPAOZ	13
2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)	13
2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์	13
2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี	
indirect ELISA	14
2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจาง	
ด้วยวิธี limiting dilution	14

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	14
2.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	14
2.5.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA	15
2.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA	15
2.5.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่ม ไนโตรฟูแรน	16
2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์	16
2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในสถานะเลี้ยงเซลล์	16
2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วย protein A หรือ protein G affinity chromatography	17
2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ	17
3. ผลการวิจัย	18
3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจน สำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA)	18
3.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ และ AOZ	21
3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	30
3.4 การศึกษาลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	34
3.4.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะ	35
3.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	41
3.4.3 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA	42

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	43
3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography	46
3.4.6 การหาปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography	49
3.4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์	49
4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	55
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	59
ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย	65



**สารบัญตาราง (List of Tables)**

	หน้า
ตารางที่ 1 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	6
ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	7
ตารางที่ 3 ค่า $R_r$ ของสารต่างๆ ในการสังเคราะห์ CPAOZ	19
ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติระหว่างสารกับ โปรตีน ที่ความเข้มข้น โปรตีน 1,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	20
ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 1 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA และ หนูชุดที่ 2 ซึ่งฉีด กระตุ้นด้วย AOZ-BSA	22
ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	23
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย AOZ-BSA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	25
ตารางที่ 8 แสดงค่า $IC_{50}$ ของการจับกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ	26
ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA เคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA ,AOZ-OVA ,CPAOZ-OVA ,BSA และ OVA ของหนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	27
ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีใน ซีรัมหนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA กับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	28

## สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 5 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	29
ตารางที่ 12 การหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้น	30
ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สำหรับใช้คัดเลือกลูกเซลล์ไฮบริโดมา ที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร CPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	31
ตารางที่ 14 การทดสอบแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	32
ตารางที่ 15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการทดสอบความสามารถ ของแอนติบอดีในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	34
ตารางที่ 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร ต่างๆของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA	36
ตารางที่ 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร ต่างๆของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA	37
ตารางที่ 18 แสดงค่าร้อยละการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ CPAOZ AOZ FZD สารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน	41

## สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 19 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	42
ตารางที่ 20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการหาความเข้มข้นของ แอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA	43
ตารางที่ 21 แสดงค่า $IC_{50}$ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA	46
ตารางที่ 22 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ในการทดสอบอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน หมายเลข 102 และ 181 ก่อนทำให้บริสุทธิ์	47
ตารางที่ 23 แสดงผลปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว	49
ตารางที่ 24 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ในการหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่เหมาะสมด้วยวิธี indirect ELISA	50
ตารางที่ 25 แสดงค่า $IC_{50}$ และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 102 และ 181 ที่จับกับตัวแข่งขัน ในรูปอิสระ ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELIS	54

**สารบัญภาพ (List of Illustration)**

	หน้า
รูปที่ 1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ	18
รูปที่ 2 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD โดยวิธี indirect competitive ELISA	44
รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA	45
รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA	45
รูปที่ 5 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา หมายเลข 102 ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Protein G Sepharose แสดงค่าดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร	48
รูปที่ 6 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา หมายเลข 181 ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Protein G Sepharose แสดงค่าดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร	48
รูปที่ 7 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี โคลนหมายเลข 102 ที่บริสุทธิ์ ต่อตัวแข่งขันในรูปอิสระได้แก่รูป (A) NPAOZ (B) CPAOZ (C) FZD	52
รูปที่ 8 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี โคลนหมายเลข 181 ที่บริสุทธิ์ ต่อตัวแข่งขันในรูปอิสระได้แก่รูป (A) NPAOZ (B) CPAOZ (C) FZD	53

## คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

AOZ	3-amino-2-oxazolidinone
NFZ	Nitrofurazone
NFT	Nitrofurantoin
FZD	Furazolidone
FTD	Furaltadone
SEM	Semicarbazide
AHD	1-Aminohydantoin
AMOZ	3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
MRPL	minimum required performance limit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
CPAOZ	3-{{[3-carboxyphenylmethylene]amino}}-2- Oxazolidinone
NPAOZ	2-nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone
CBA	3-Carboxybenzaldehyde
TLC	Thin Layer Chromatography
BCA	Bicinchoninic acid assay
TNBS	Trinitrobenzene sulphonic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
FCA	Freund's complete adjuvant
FICA	Freund's incomplete adjuvant
DMF	Dimethyl Sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide
OVA	Ovalbumin
CO <sub>2</sub>	Carbondioxide
FCS	Fetal calf serum
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HT	Hypoxanthine และ Thymidine

**คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)**

HRP	Horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50%
LOD	limit of detection
MW	Molecular weight
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with tween20
PEG	polyethylene glycol
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxide
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfuric acid
ppb	part per billion
ppm	part per million

## 1. บทนำ (Introduction)

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารไนโตรฟูแรนถูกใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Escherichia coli*, *Coccidia* และ *Salmonella spp.* โดยเกษตรกรนิยมใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ ผสมลงในอาหารสัตว์ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคดังกล่าวในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคเช่น โค หมู ไก่ ปลาและกุ้ง โดยพบว่ายาในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีอยู่ 4 ชนิดได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone ,NFZ) ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin ,NFT) ฟูราโซลิโดน (Furazolidone ,FZD) และ ฟูรัลทาโดน (Furaltadone ,FTD) ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิดนี้มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสาร เมแทบอไลต์ ได้แก่ เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide ,SEM), 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-Aminohydantoin , AHD), 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone ,AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone ,AMOZ) ตามลำดับ โดยจะถูกดูดซึมผ่านเยื่อเมือกของลำไส้ ของสัตว์ (Kumar และคณะ ,1994 ; Keffe และคณะ ,2004 ) สารในกลุ่มดังกล่าวมีรายงานว่ามีความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะถูกเมแทบอไลต์เร็วมาก ภายใน 2-3 ชั่วโมง หลังเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์สารฟูราโซลิโดนโดยตรงนั้นจึงทำได้ยาก ซึ่งสาร เมแทบอไลต์ ที่ได้ จะอยู่ในรูป AOZ ติดอยู่ที่เนื้อเยื่อ โดยจะคงอยู่นานหลายสัปดาห์ ในการใช้ยาและสารเหล่านี้จะใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ เช่น ในนม เนื้อ หรือ ไข่ เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค (Bryan ,1978) จากสาเหตุดังกล่าว จึงทำให้หลายประเทศหันมาเน้นเรื่องความปลอดภัยของอาหาร โดย ไนโตรฟูแรน เป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะที่มีการสั่งห้ามไม่ให้ใช้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป และ สหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1995 ได้ประกาศห้ามใช้สารฟูราโซลิโดนในสินค้าเกษตรและอาหาร โดยมีข้อกำหนดความสามารถในการตรวจหาสารปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Minimum Required Performance Limits ,MRPL) ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มอกช.9007-2548) เรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกำหนดให้สาร สารเมแทบอไลต์ (metabolite) ทั้ง 4 ตัวของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนต้องไม่พบในสินค้าเกษตรและอาหาร โดยกำหนดให้มีค่า MRPL อยู่ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ SEM และ AHD จึงได้มีการตรวจวิเคราะห์หาสาร ตกค้างของยาปฏิชีวนะดังกล่าวในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้วงปฏิบัติการ โดยวิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ,Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) (Leitner ,Zöllner and Lindner ,2001 ; Keffe และคณะ ,2004) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน ทำให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทำได้ไม่ครอบคลุมดังนั้นจึงมี

ความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการตรวจสอบที่ง่าย สะดวก ได้ผลเร็วแม่นยำและ ค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อใช้ในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะ ในอาหารสัตว์ก่อนการนำเข้าและส่งออก

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้าง ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการตรวจวัดปริมาณ แอนติเจน โดยการใช้ แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำ รวดเร็ว และ มีความแม่นยำสูง และเนื่องจากทีมผู้วิจัยได้มีการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับสาร AMOZ และมีการพัฒนาชุดตรวจสอบสารดังกล่าวได้สำเร็จแล้ว (Pimpitak และคณะ ,2009) ทางทีมวิจัยจึงมีความต้องการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดี และชุดตรวจสอบที่จำเพาะต่อสาร AOZ ซึ่งปัจจุบันมีความต้องการเป็นอย่างมากและยังไม่พบชุดตรวจสอบสาร AOZ โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ผลิตขึ้นเองในประเทศ ดังนั้น จึงควรมีการพัฒนาความสามารถในการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสาร AOZ ทำให้การตรวจโดยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยามีความจำเพาะสูงและสามารถควบคุมคุณภาพการผลิตได้ง่ายขึ้นเพื่อพัฒนาต่อในขั้นทำชุดตรวจ (ELISA test kit) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสารนี้ลดลง มีความสะดวกในการใช้งานได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งยังสามารถทำให้รู้ปริมาณของสารในระดับต่ำพร้อมทั้งยังสามารถตรวจได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงได้รับความนิยมสูงขึ้นมากจนทำให้การตรวจโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจหลักในปัจจุบัน

### 1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ หรือ NPAOZ
- ศึกษาลักษณะสมบัติของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- เปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร AOZ ให้อยู่ในรูป 3-(3-คาร์บอกซิฟีนิลเมธิลีนอะมิโน)-2-ออกซาโซลิดีโนน (CPAOZ) และเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เพื่อใช้เป็นแอนติเจน
- ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ สาร AOZ และ/หรือ NPAOZ
- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี
- คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้าง โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ และ/หรือ NPAOZ โดยวิธี ELISA
- ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้
- การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์



(isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich ,USA)

- การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และสารนอกกลุ่มด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

- การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง ทำรายงานฉบับสมบูรณ์

#### 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตและเป็นยาต้านจุลชีพ ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และออกฤทธิ์ต่อเชื้ออหิวา ไพรโทซัว รวมทั้งเชื้อราบางชนิด ซึ่งนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้ในการป้องกันรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ กระเพาะอาหารและโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของสัตว์โดยเกิดจาก แบคทีเรีย เช่น *Salmonella spp.* (โรค Salmonellosis) *Escherichia coli* (โรค Colibacillosis) โรคที่เกิดจาก *Coccidia* (โรค Coccidiosis) ข้อเท้าอักเสบจากการติดเชื้อ (infectious synovitis) โรคหงอนดำ (Blackhead) หรือ Histomoniasis ที่พบในสัตว์ได้แก่ สุกร แพะ แกะ โค กระบือ เป็ด ไก่ และ กุ้ง เป็นต้น โดยยาตั้งต้นกลุ่มไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดนี้จัดเป็นสารประกอบไนโตร (nitro compounds) มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อยาตั้งต้นทั้ง 4 ชนิดได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone ,NFZ) ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin ,NFT) ฟูราโซลิโดน (Furazolidone ,FZD) และ ฟูรัลทาโดน (Furaltadone, FTD) เข้าสู่ร่างกาย สิ่งมีชีวิตจะมีวิธีในการกำจัดสารเคมีเหล่านั้น โดยกระบวนการ เมแทบอลิซึม ซึ่งยาส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารที่ละลายได้และถูกกำจัดออกไปจากร่างกาย แต่ในบางกรณีสารเมแทบอลิต์ อาจไปจับกับโปรตีนในร่างกายสัตว์ เป็นผลให้ ขบวนการขับออกไปเป็นไปได้ช้า และมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหาร เพราะสามารถคงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นระยะเวลาอันยาวนานหลังจากการหยุดให้ยาไปแล้ว กระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้เกิดสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญ ได้แก่ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone , AMOZ) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone ,AOZ) เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide ,SEM) และ 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin ,AHD) (Leitner และ คณะ ,2001) เมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มียาสัตว์ตกค้าง ในรูปของ bound residues เหล่านี้ จะถูกกรดในกระเพาะอาหารย่อยและปลดปล่อยสารตกค้างออกมาจากโปรตีนที่เกาะอยู่ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Keefe และ Home ,1999) จากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ถ้าได้รับการบริโภคเป็นระยะเวลานาน โดยพบว่า ฟูราโซลิโดน มีผลยับยั้งหน้าที่เอนไซม์บางประเภท โดยข้อมูลจาก Irish Agriculture and Food Development Authority ตามโครงการศึกษา Project Armis No. 4036 ของสหภาพยุโรปในปี 1999 พบว่าเมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีสารเมแทบอลิต์จับกับโปรตีนในเนื้อเยื่อสุกรเข้าไปกรดในกระเพาะจะย่อย AOZ side-chain ออกมาและเปลี่ยนรูปไปเป็น  $\beta$ -hydroxyethylhydrazine ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อมะเร็ง โดยสารดังกล่าวมีการห้ามนำมาใช้ในสัตว์เพื่อการบริโภคและห้ามมีตกค้างไม่ว่าในปริมาณเท่าใดแม้ว่าจะอยู่ในรูปยาตั้งต้น หรือเมแทบอลิต์ ซึ่งส่งผลทำให้หลายๆ ประเทศ จำกัด

การใช้ โดยเฉพาะการใช้ผสมในอาหารสัตว์ที่ใช้สำหรับบริโภค สารกลุ่มนี้จึงถูกห้ามใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา แคนาดา ออสเตรีย ญี่ปุ่น สิงคโปร์ บังคลาเทศ และกลุ่มสหภาพยุโรป (Bryan, 1978) ส่งผลทำให้ประเทศต่างๆ ได้ออกกฎหมายควบคุมระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ของสารตกค้างกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ โดยปกติจะกำหนดเป็นขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุด ซึ่งเรียกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) โดยสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีการกำหนดค่า MRL อยู่ในระดับที่เรียกว่า zero tolerance level คือต้องไม่มีการตกค้างของสารกลุ่มนี้อยู่ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (European Commission, 2001) ทำให้หลายประเทศได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ และได้กำหนดค่าขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์สารไนโตรฟูแรน โดยห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถใช่วิธี ELISA ในการตรวจวิเคราะห์ ได้ตามความเหมาะสม และอาจยืนยันผลการตรวจวัดสารดังกล่าวด้วยเทคนิคอื่น เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS-MS) สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้เฟกอนทอะเบียนตำหรับยาที่ใช้สำหรับสัตว์ที่มีตัวยาในกลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน และฟูราโซลิโดน นอกจากนี้ยังห้ามนำเข้ายา เกสซ์เคมีภัณฑ์ และเกลือของ เกสซ์เคมีภัณฑ์เหล่านี้ และมีข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกำหนดให้สาร สารเมแทบอลิต์ (metabolite) ทั้ง 4 ตัวของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนต้องไม่พบในสินค้าเกษตรและอาหาร โดยกำหนดให้มีค่า MRPL อยู่ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ SEM และ AHD (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551) แต่อย่างไรก็ตามยังมีการลักลอบนำสารเหล่านี้เข้ามาภายในประเทศได้ในรูปของอาหารสัตว์ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้าเพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อน แต่การวัดปริมาณยาตกค้างดังกล่าวสามารถทำได้ในขีดจำกัด เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีราคาแพงมาก ดังนั้น ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ โดยใช้หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับตรวจวัดสารตกค้างโดยอาศัยหลักการการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้อันติบอดี ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเคมีกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน วิธี ELISA นี้เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็วทั้งนี้ทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้สนใจทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOZ เพื่อใช้พัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออกต่อไปได้

### 1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากได้มีมาตรการควบคุมและติดตามการใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรนนี้ ดังนั้น เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้า โดยพบว่า สารกลุ่มไนโตรฟูแรน ในรูปยาตั้งต้นได้แก่ ฟูรัลทาโดน ฟูราโซลิโดน ไนโตรฟูแรนโทอิน และ ไนโตรฟูราโซน จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ภายใน 2-3 ชั่วโมง เปลี่ยนไปอยู่ในรูปสาร เมแทบอลิต์ คือ AMOZ ,AOZ ,SEM และ AHD ตามลำดับ ปกติสารเมแทบอลิต์ ของไนโตรฟูแรน จะอยู่ในรูปสารเมแทบอลิต์ที่จับกับโปรตีนโดยการทำให้สารเมแทบอลิต์อยู่ในรูปอิสระโดยอาศัยการย่อยสลายพันธะด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) แต่สาร เมแทบอลิต์ ที่ได้จะมีขนาดโมเลกุลเล็กมากยากต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงต้องทำให้สาร เมแทบอลิต์ เหล่านี้อยู่ในรูปอนุพันธ์ เรียกกระบวนการนี้ว่า

derivatization ซึ่งสารที่นิยมใช้ให้เกิดอนุพันธ์ คือ 2-Nitrobenzaldehyde (NBA) โดยการตรวจวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ ของไนโตรฟูแรน ปัจจุบัน นิยมใช้เทคนิค Liquid chromatography (LC) และ Mass spectrometry (MS) โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS เพื่อยืนยันชนิดของสารและปริมาณ เนื่องจากมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณเล็กน้อย ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะใช้ตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อยสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี colour test ส่วนการตรวจยืนยันผลใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) และวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) (Cieri และ คณะ 1978 ,McCracken และ คณะ 1997) ข้อได้เปรียบของเทคนิค HPLC เมื่อเทียบกับเทคนิค TLC คือ จะใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ ได้ดี และให้ค่าความแม่นยำและเที่ยงตรงได้ดีกว่า จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์สารตกค้างที่ได้รับความนิยม แต่เนื่องจากเทคนิคต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและวิธีการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากกว่า ส่วนวิธี Mass Spectrometry (MS), Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) นี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเนื่องจากสามารถตรวจสอบเพื่อยืนยันระบุชื่อสารในระดับน้อยมากๆ ได้แม่นยำสูง และยังใช้สารตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นวิธีการนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดี แต่เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก และยังต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญการ โดยเฉพาะ ดังนั้นเทคนิคจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้ในงานประจำ (McCracken และคณะ ,1995) ปัจจุบันจึงมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออก ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว ดังได้มีการผลิตและศึกษาลักษณะพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่ออนุพันธ์ของ AOZ ด้วยวิธี ELISA โดยเปลี่ยน AOZ เป็น CPAOZ แล้วนำไปเชื่อมกับโปรตีนพาหะ HAS เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นกระต่ายที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาในการกระตุ้นต่างๆ พร้อมทั้งทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยวิธี competitive ELISA พบว่าการลดปริมาณแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นและเพิ่มระยะเวลาในการกระตุ้นจะส่งผลให้แอนติบอดีที่ได้มีความไวต่อสาร NPAOZ เพิ่มขึ้น และสามารถนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการตรวจหาสาร AOZ ในรูปอนุพันธ์ได้ (Cooper และคณะ ,2004) หลังจากนั้นได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ ที่เกิดจากการฉีดกระตุ้นสาร CPAOZ และ AOZ ที่ติดกับโปรตีนพาหะด้วยวิธีต่างๆ ผลที่ได้พบว่าไม่สามารถผลิตโมโนโคลนต่อ AOZ ได้ มีเพียงแต่ CPAOZ เท่านั้นที่สามารถผลิตโมโนโคลนต่อ NPAOZ ได้โดยสามารถตรวจหาสาร AOZ ที่ต้องเปลี่ยนไปอยู่ในรูป NPAOZ ได้ค่า  $IC_{50}$  (50 percent binding inhibition) อยู่ในช่วง 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเนื้อกึ่งไก่ วัว และ สุกร ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบวิธีทดสอบแบบ ELISA กับ LC-MS/MS ในเนื้อกึ่งและไก่ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0 - 32.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 0 - 10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Diblikova และ คณะ ,2005)

### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสาร NPAOZ และ/หรือ AOZ เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบ ตรวจหาปริมาณสารตกค้างในอาหาร

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

### 2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย  
ตารางที่ 1 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. สัตว์ทดลองใช้ หนู Mouse สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. เซลล์มัชอีโลมาP3/NSI/1-4A4-1 (NS-1)	ATCC No: TIB 18
3. เครื่องมือต่างๆ	
- เครื่อง Lyophilizer	Yamato (Japan)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE (England)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
- เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	BIO-TEK Instruments, Inc (USA)
- เครื่องมือนับเซลล์	Boeco (Germany)
- ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)
- ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige (Thailand)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII (Japan)
- ปีมล	Iwaki (Japan)
- ปิเปตต์อัตโนมัติ	Gilson (France)
- เครื่อง SCAI-DRY TRANSFER CELL	BIO-RAD
- เครื่อง Thermo mixer compact	Eppendorf

ตารางที่ 1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- เครื่อง Compact ROCKER CR300	Finemould Precision ind.co.
- ถัง PL-B Type 8x10 INCH	OKAMOTO
4. อุปกรณ์ต่างๆ	
- งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
- งานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
- ขวดแก้ว	Boro (Germany)
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
- กระบอกฉีดขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro (Thailand)
- ปิเปตต์แก้ว	HBG (Germany)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
1. AHD (1-Aminohydantoin)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
2. Aminopterin	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. AOZ (3-amino-2-oxazolidone)	ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. AMOZ (3-amino-5-morpholino methyl-2-oxazolidone)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
5. BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
6. Bovine serum albumin (BSA)	โปรตีนมาตรฐานและใช้เชื่อมกับ CPAOZ	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
10. Bovine serum albumin (BSA)		บริษัท Sigma-Aldrich, USA
12. Butanol	เตรียมสารละลาย นินไฮดริน	บริษัท Merck, Germany
13. Chloramphenicol (CAP)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
14. 3-carboxybenzaldehyde (CBA)	เปลี่ยนอนุพันธ์สารAMOZและทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
15. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
16. Clenbuteral	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
17.3-[(3-carboxyphenyl)-methylene] amino-2-oxazolidinone (CPAOZ)	เตรียมแอนติเจนและใช้ทดสอบความจำเพาะ	เตรียมที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ จุฬาฯ
18. CPAOZ-cBSA conjugate	ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง	เตรียมที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ จุฬาฯ
19. CPAOZ-OVA conjugate	เทคนิค ELISA	เตรียมที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพฯ จุฬาฯ
20. Coomassie Brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	บริษัท Pierce, USA
21. Copper sulfate	เตรียมสารละลายวัดปริมาณโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
22. Developer and replenisher	ล้างฟิล์ม X-ray	Kodak GBX, USA
23. D-glucose	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
24. Diethyl ether	สลบหนูทดลอง	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
25. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Fluka, Switzerland
26. Disodium hydrogenphosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo erba, USA
27. 1-ethy-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. Enrofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
29. Fetal bovine serum	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
30. Fixer and replenisher	ล้างฟิล์ม X-ray	Kodak GBX, USA
31. Flumequine	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
32. Folin-ciocalteu phenol reagent	เตรียมสารละลายวัดปริมาณโปรตีน	บริษัท Merck, Germany
33. Furaltadone (FTD)	ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
34. Furazolidone (FZD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
35. glycerol	เตรียม Sample buffer	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
36. glycine	เตรียม Running buffer	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
37. Hydrochloric acid (HCl)	เตรียม Tris buffer	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
38. Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	เตรียมสับสเตรต	บริษัท Fluka, Switzerland
39. Hypoxanthine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
40. L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
41. Methanol	ตัวทำละลาย	บริษัท BDH, England
42. Ninhydrin	เตรียมสารละลายใช้ในเทคนิค TLC	บริษัท Pierce, USA
43. Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
44. Nitrofurantoin (NFT)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
45. Nitrofurazone (NFZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
46. N-Hydroxysuccinimide (NHS)	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Fluka, china
47. 1-((2-nitrophenyl)methylene amino)-2,4imidazolidinone (NPAHD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
48. 5-methylmorpholine-3-((2-nitrophenyl)methylene)amino-2-oxazolidinone (NPAMOZ)	ทดสอบความจำเพาะของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
49. 3-((2-nitrophenyl)methylene)amino-2-Oxazolidinone (NPAOZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
50. 2-nitrobenzaldehyde-semicarbazone (NPSCA)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
51. O-phenylenediamine (OPD)	เตรียมสับสเตรต	บริษัท Abkem Iberia S.L., Spain
52. Ovalbumin (OVA)	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
53. Oxytetracycline	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
54. Penicillin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
55. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	บริษัท Zymed, USA
56. Picrylsulfonic acid	เตรียมสารละลายในการวัดประสิทธิภาพการเชื่อมติด	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
57. Polyethylene glycol (PEG)	สารสื่อในการหลอมรวมเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
58. Potassium tartate	เตรียมสารในการหาปริมาณโปรตีน	บริษัท Merck, Germany
59. Pyridine	สารกลางในการเปลี่ยนสาร AMOZ เป็น CPAMOZ	บริษัท Carlo Erba , USA
60. Pyruvic acid	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
61. RPMI 1640 medium	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
62. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
63. Semicarbazide (SCA)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
64. Sodium bicarbonate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
65. Sodium carbonate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Merck, Germany
66. Sodium chloride	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
67. Sodium dihydrogen phosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo erba, USA
68. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
69. Sodium pyruvate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
70. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	บริษัท Merck, Germany
71. N,N,N,N -Tetramethyl-Ethylene diamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Pierce, USA
72. Thymidin	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
73. Tris (hydroxymethyl) aminomethane	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
74. Tween 20	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
75. นมพร้อมมันเนย	ทดสอบ ELISA	บริษัท Mission health food, Thailand

## 2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับ

### เคลือบจาน 96 หลุม (AOZ-OVA และ CPAOZ-OVA)

#### 2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AOZ เป็น CPAOZ

โดยนำสาร AOZ มาทำปฏิกิริยากับสาร 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ด้วยวิธีการ reflux ซึ่งมี dry pyridine เป็นตัวกลางช่วยให้เกิดปฏิกิริยา และมี molecular sieve ช่วยดูดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นดึง pyridine ออกจากระบบด้วยแก๊สไนโตรเจน ทดสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยหลักการของเทคนิค ทินเลเซอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ดูแถบของสาร CPAOZ ด้วยแสงยูวี และดูแถบของสาร AOZ โดยย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน



### 2.2.2 การเชื่อมต่อ CPAOZ กับ cBSA และ AOZ กับ BSA

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ของยาไนโตรฟูแรน ฟุราโซลิโดน ในขั้นตอนทำการเตรียมอนุพันธุ์ของ AOZ ให้อยู่ในรูปของ CPAOZ ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นแฮปเทน (hapten) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและใช้ในการเคลือบจาน 96 หลุมที่ผลิตจากพลาสติกได้ ต้องมีการเชื่อมแฮปเทนกับสารโมเลกุลใหญ่เช่น โปรตีน จึงทำการเชื่อมต่อ CPAOZ กับโปรตีนพาหะ cBSA (BSA ที่ผ่านปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนหมู่เอมีน , cationized BSA) และ AOZ กับ BSA โดยใช้ NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำ CPAOZ หรือ AOZ ผสมกับ NHS และ EDC ละลายใน DMF เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA ใน 0.5 โมลาร์ carbonate buffer พีเอช 9.6 ลงไปที่ละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปไดอะไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร CPAOZ-ed-cBSA และ AOZ-BSA ด้วยวิธี TNBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

### 2.2.3 การเชื่อมต่อ AOZ และ CPAOZ กับ OVA

ทำการเชื่อมสาร AOZ และ CPAOZ กับ OVA ได้เป็น AOZ-ed-OVA และ CPAOZ-ed-OVA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมและคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ และ CPAOZ โดยนำสาร AOZ และ CPAOZ ละลายใน DMF เติม EDC หลังจากนั้นค่อยๆเติม OVA ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี พีเอช 7.4 กวนเบาๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร AOZ-ed-OVA และ CPAOZ-ed-OVA ด้วยวิธี TNBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA

### 2.2.4 การหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี BCA

ทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ชุดทดสอบ BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยเจือจางโปรตีน BSA มาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 0 ,0.1 ,0.2 ,0.4 ,0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS และเจือจางสารตัวอย่าง จากนั้นเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง

### 2.2.5 การวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS

ทำการวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอมีนอิสระบนโปรตีนด้วยวิธี TNBS โดยเตรียมสารละลายโปรตีนพาหะ ได้แก่ BSA และ OVA สารละลายของสารที่จะเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ ได้แก่

AOZ และ CPAOZ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (sodium bicarbonate buffer) พีเอช 8.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายโปรตีน และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ จากนั้นเติมสารละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เชื่อมติดกับสาร

เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ ลบ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนที่เชื่อมกับสารหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ คูณ 100

## 2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร AOZ และ NPAOZ

### 2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 (CPAOZ-cBSA) ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 4-6 ครั้ง ทุกๆ 2 อาทิตย์ โดยผสมแอนติเจน จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดีอยู่ในระดับต่ำก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีการเดิมทุกๆ 2 อาทิตย์ เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอ ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ด้วยแอนติเจนที่ผสมกับน้ำเกลือเข้าช่องท้องในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนูทดลองหนึ่งตัว ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน ถัดไป

### 2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจน (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-OVA ,BSA หรือ OVA) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS พีเอช 7.4 ที่มี tween 20 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (ซีรัมหนู หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase เชื่อมติดอยู่ (GAM-HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ละลายอยู่ใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium

citrate buffer, พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์  $H_2SO_4$  หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาแอนไซม์ แล้วนำจานทดสอบชนิด 96 หลุม ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

### 2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี Indirect competitive

#### ELISA

ทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู หรือในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถจับกับ NPAOZ หรือ

AOZ ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยเติมสารละลาย NPAOZ หรือสารที่ต้องการทดสอบอื่นๆ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานทดสอบ ELISA ที่เคลือบด้วย AOZ-OVA และผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนย และล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นเติมซีรัมหนูที่เจือจางแล้ว หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ให้ผลบวก (จากข้อ 2.3.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หรือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติมสารทดสอบในรูปอิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า หลุมที่ไม่เติมสาร แสดงว่า แอนติบอดีในซีรัมหนู หรืออาหารเลี้ยงเซลล์สามารถจับกับสารในรูปอิสระได้

## 2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร AOZ และ NPAOZ

### 2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)

โดยนำเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน CPAOZ-cBSA หรือ AOZ-BSA เพื่อสร้างแอนติบอดีที่ต้องการผสมกับเซลล์มัยอิโดมา ในอัตราส่วน 1:2 โดยที่เซลล์ทั้งสองจะถูกนำมาเลี้ยงให้อยู่ในระยะที่กำลังจะแบ่งตัว มารวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ หยด 50 เปอร์เซ็นต์ พอลิเอทิลีน ไกลคอล (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับหมุนหลอดซ้ำๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FCS เพื่อล้าง 50 เปอร์เซ็นต์ PEG ออกให้หมด ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก โดยการเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ก่อนนำเซลล์ไปหยอดในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์  $CO_2$

### 2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ทุก 3-4 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 6-7 วัน สังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและ โปร่งแสงขึ้นเป็นกลุ่ม เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มหลุมแล้วจะต้องเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะให้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS โดยจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ถ้ามีสีเหลืองให้ดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2)

### 2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี indirect ELISA

เพื่อตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ จึงทำการเคลือบ จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน 4 ชนิด คือ CPAOZ-OVA , AOZ-OVA , OVA และ BSA เพื่อเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ indirect ELISA (ตามข้อ 2.3.2) ถ้าเซลล์ในหลุมใดมีค่าดูดกลืนแสงของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย OVA และ BSA ต่ำ ก็จะเลือกเซลล์ในหลุมนั้น ไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม และทำการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วให้ค่าเหมือนเดิม และทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับสาร NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA ตามหัวข้อ 2.3.3 เลือกหลุมที่แอนติบอดีจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากนั้นจึงทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวต่อไป

### 2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution

หลังจากที่คัดเลือกจนได้เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่ต้องการแล้วเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่ละเซลล์มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียว ซึ่งวิธี limiting dilution ทำได้โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า จนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปหยอดลงในจานชนิด 96 หลุมจำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม) จะได้เซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 8 , 4 , 2 และ 1 เซลล์ ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO<sub>2</sub> 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเริ่มต้นเซลล์เพียงเซลล์เดียว

## 2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

### 2.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จะทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยนำ Isotyping specific antibody ชนิด IgG<sub>1</sub> , IgG<sub>2a</sub> , IgG<sub>2b</sub> , IgG<sub>3</sub> , IgA และ IgM มาทำการเจือจาง 1,000 เท่า ใน PBS นำไปเติมในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (พีเอช 7.4) ที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างส่วนที่ไม่จับออก เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดกับผนังที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมติดกับ HRP ซึ่งจำเพาะต่อ F<sub>ab</sub> (HRP-

Rabbit anti-mouse IgG [ $F_{ab}$  specific]) เจือจาง 2,000 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมนสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แอนติบอดีเป็นชนิดใดจะให้ค่าผลบวกตามชนิดของแอนติบอดีที่เคลือบหลุมไว้

### 2.5.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นมาก และไม่ทราบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่แน่นอน ดังนั้น เมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA อาจทำให้มีสัญญาณรบกวน ส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จได้ และยังเป็น การสิ้นเปลืองแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย จึงต้องหาความเข้มข้นและความเจือจางที่เหมาะสมทั้งของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใกล้เคียงกันกับสูงสุดเมื่อเจือจางสูงสุด หรือประมาณ 1.0 – 1.5 เพื่อนำความเข้มข้นและความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป โดยจะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติเจน AOZ-OVA ความเข้มข้นต่างๆ และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2)

### 2.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเมแทบอลิต์ AOZ ,NPAOZ หรือทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนเพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะและความไวต่อสาร AOZ ,NPAOZ ปริมาณเท่าใด และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.3) ถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสารทดสอบ ก็จะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้เติมนสารทดสอบ โดยจะคิดเป็นค่า inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) และ limit of detection (LOD) ซึ่งค่า  $IC_{50}$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสารแข่งขัน และค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า  $IC_{50}$  ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดเป็น 50% B/Bo

$$IC_{50} = 50\% B/Bo$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

Bo คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

และหาค่า limit of detection (LOD) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ โดยสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{LOD} = B_0 - 3\text{SD}$$

เมื่อ  $B_0$  คือ ค่าจุดกั้นแสงของโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่ไม่ผสมในโตรฟูแรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 2.5.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามโมนโคลอนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มในโตรฟูแรน

เพื่อทดสอบว่าโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่ได้ จะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มในโตรฟูแรนหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA กับสารอื่นที่อยู่ในกลุ่มในโตรฟูแรน ทั้งอยู่ในรูปยั้งตั้ง ได้แก่ FZD, NFZ และ NFT รูปสารเมแทบอลิต์ ได้แก่ AMOZ, SCA และ AHD รูปอนุพันธ์ของสาร ได้แก่ NP-AMOZ, NP-SCA และ NP-AHD ตามลำดับ สารนอกกลุ่มในโตรฟูแรน ที่นำมาทดสอบ คือ CBA ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์สาร AOZ เป็น CPAOZ สารในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล นอร์ฟลอกซาซิน เพนิซิลลินจี ฟูมิควิน และ ออกซีเตตราไซคลิน สารในกลุ่มบีตาอะโกนิสต์ ได้แก่ เคลนบูเทอรอล และ ซัลบูตามอล โดยเตรียมสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 0 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่เจือจางใน PBS โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 2.5.3

เมื่อทดสอบความจำเพาะของโมนโคลอนอลแอนติบอดีต่อสารในโตรฟูแรนที่ต้องการ และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของ NPAOZ} \times 100}{\text{IC}_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}}$$

## 2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

### 2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOZ และ NPAOZ มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์

เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวานขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกวานด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำหัตถวิธีต่อไป

#### 2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วย protein A หรือ protein G affinity chromatography

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOZ และ NPAOZ โดยจะใช้ protein A หรือ protein G sepharose ขึ้นอยู่กับไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่ได้ โดยนำโปรตีน A หรือ G sepharose แช่ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่คอลัมน์ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้เติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 โมลาร์ citrate buffer, พีเอช 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ พีเอช สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 7.4 โดยใช้ 1 โมลาร์ Tris buffer, พีเอช 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดอัลซิสด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

#### 2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำหัตถวิธีต่อ AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

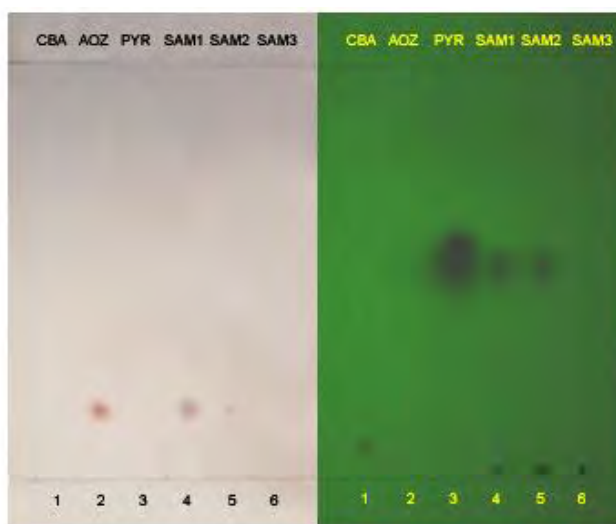
หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้ทำการทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความสามารถในการจับกับ AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม AOZ ที่เชื่อมต่อกับ OVA หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลาย BSA 1 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HRP-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของแอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ละลายใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer, พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาแอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

### 3. ผลการวิจัย (Results)

#### 3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับ

##### เคลือบจาน 96 หลุม (CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA)

สาร AOZ เป็นสารเมแทบอลิต์ของฟูราโซลิโดน ซึ่งเป็นยาในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็น แฮปเทน (Hapten) ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองได้ และไม่สามารถเคลือบติดบนจาน 96 หลุม ได้ ดังนั้นจึงต้องเชื่อมต่อกับสาร AOZ กับโปรตีนขนาดใหญ่ ได้แก่ BSA และ OVA เพื่อนำไปฉีดกระตุ้นหนู และเคลือบจาน 96 หลุม สำหรับทดสอบแอนติบอดีโดยวิธี ELISA เพื่อให้ AOZ สามารถจับกับโปรตีนได้ดียิ่งขึ้นจึงทำการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AOZ ให้เป็นสาร CPAOZ ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสาร NPAOZ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร AOZ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ผลการเปลี่ยน AOZ ให้เป็นอนุพันธ์ CPAOZ จากการวิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) แสดงดังรูปที่ 1 และนำมาคำนวณค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ( $R_f$ ) ได้ค่าดังตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่า  $R_f$  ที่ได้กับของ Copper และคณะ (2004)



ก)

ข)

#### รูปที่ 1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ

- ก) ย้อมด้วยสารนินไฮดริน ข) ต่อมภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยที่ช่องที่ 1 คือ 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ,2 คือ AOZ ,3 คือไพริดีน (pyridine) ,4 คือ ตัวอย่างก่อนทำรีฟลัก ,5 คือ ตัวอย่างหลังทำรีฟลัก และ 6 คือ ตัวอย่างทำรีฟลักและให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน



ตารางที่ 3 ค่า  $R_f$  ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ

สาร	ค่า $R_f$			
	การทดลองนี้		Copper และคณะ (2004)	
	ย้อมด้วยนินไฮดริน	ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต	ย้อมด้วยนินไฮดริน	ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต
CBA	-	0.08	-	0.11
AOZ	0.18	-	0.27	-
CPAOZ	-	-	-	0.03
ไพรีดีน	-	0.55	-	-
ตัวอย่างก่อนทำการไหลกลับด้วยไพรีดีน	-	0.03	-	-
	-	0.09		
	0.18	-		
	-	0.53		
ตัวอย่างหลังทำการไหลกลับด้วยไพรีดีน	-	0.03	-	-
	0.18	-		
	-	0.53		
ตัวอย่างหลังทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน	-	0.03	-	-
	0.18	-		

จากการคำนวณค่า  $R_f$  ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังจากการทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.03 และ 0.18 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $R_f$  ที่ได้ตั้งกล่าวกับค่า  $R_f$  ของสารต่างๆในปฏิกิริยาสรุปได้ว่า น่าจะเป็นสาร CPAOZ และ AOZ ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า  $R_f$  ของสาร CPAOZ ในการทดลองนี้กับของ Cooper และคณะ (2004) พบว่าให้ค่าเท่ากัน แสดงว่าสามารถทำการเตรียมสาร CPAOZ ได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม ยังสามารถตรวจพบ AOZ ในปริมาณน้อยได้ ทั้งนี้

เนื่องจากการสังเคราะห์นั้นได้ใช้สาร AOZ ปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยากับสาร CBA ทำให้พบสาร AOZ เหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยา

เมื่อทำการเชื่อมต่อสาร CPAOZ และ AOZ กับโปรตีนพาหะ ได้แก่ BSA ,cBSA และ OVA และนำไปตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (ตารางที่ 1 รูปที่ 1 ภาคผนวก) พบว่าสาร CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 2.14 ,9.70 ,8.40 และ 8.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำสารที่เตรียมได้มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนโดยวิธี TNBS โดยมีหลักการคือ สาร TNBS จะไปจับกับหมู่เอมีนอิสระแล้วเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีส้ม สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารจาก เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ ลบ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนที่เชื่อมกับสารหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ คูณ 100

ผลการทดสอบพบว่า โปรตีน BSA ,OVA ,CPAOZ-cBSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-BSA และ AOZ-OVA ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร เท่ากับ 0.878 ,0.585 ,0.824 ,0.530 ,0.825 และ 0.532 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่างสารและโปรตีนพาหะ ได้แก่ CPAOZ-cBSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-BSA และ AOZ-OVA เท่ากับ 11.29 ,9.40 ,6.04 และ 9.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่างสารกับโปรตีน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารโปรตีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด
BSA	0.878	-
cBSA	0.917	-
OVA	0.585	-
CPAOZ-cBSA	0.824	11.29
CPAOZ-OVA	0.530	9.40
AOZ-BSA	0.825	6.04
AOZ-OVA	0.532	9.06

### 3.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ หรือ AOZ

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยแบ่งหนูเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ฉีดกระตุ้นด้วยสาร CPAOZ-cBSA ชุดที่ 2 กระตุ้นด้วยสาร AOZ-BSA ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก ทุกๆ 2 อาทิตย์ จำนวน 4-6 ครั้ง โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FICA) จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมของหนู ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า เมื่อทำการทดสอบปริมาณแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA เปรียบเทียบกับ CPAOZ-cBSA ทำการเจือจางซีรัมหนูด้วย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) (เพื่อให้ BSA จับกับแอนติบอดีต่อ BSA ในซีรัม) เจือจางที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:1,024,000 เท่า ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู พบว่า ซีรัมหนูชุดที่ 1 ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA ทำปฏิกิริยาได้ดีกับ AOZ-BSA และ CPAOZ-cBSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดประมาณ 1.7 และให้ค่าไคเตอร์ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 ในระดับสูงคือ 1:1,024,000 และ 1:128,000 ตามลำดับ ส่วนซีรัมหนูชุดที่ 2 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AOZ-BSA ทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจน AOZ-BSA ได้ดีกว่า CPAOZ-cBSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดประมาณ 1.7 และ 1.3 ตามลำดับ และให้ค่าไคเตอร์ สูงกว่า 1:1,024,000 และ 1:4,000 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดี

ในซีรัมหนูโดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 1 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA และ หนูชุดที่ 2 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA

เจือจาง ซีรัมหนู ( $\times 10^3$ เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	เคลือบหลุมทดสอบด้วย CPAOZ-cBSA						เคลือบหลุมทดสอบด้วย AOZ-BSA					
	หนูชุดที่ 1			หนูชุดที่ 2			หนูชุดที่ 1			หนูชุดที่ 2		
	กระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA			กระตุ้นด้วย AOZ-BSA			กระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA			กระตุ้นด้วย AOZ-BSA		
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3
0.5	1.77	1.78	1.75	1.10	1.59	1.28	1.75	1.75	1.74	1.78	1.79	1.75
1	1.72	1.75	1.74	0.73	1.19	0.86	1.73	1.72	1.73	1.75	1.75	1.74
2	1.77	1.79	1.78	0.48	0.74	0.53	1.76	1.73	1.77	1.79	1.79	1.78
4	1.78	1.79	1.78	0.31	0.50	0.32	1.75	1.62	1.76	1.80	1.79	1.77
8	1.79	1.82	1.80	0.25	0.42	0.26	1.66	1.40	1.71	1.85	1.85	1.81
16	1.76	1.78	1.77	0.20	0.31	0.22	1.40	1.05	1.47	1.83	1.82	1.78
32	1.70	1.73	1.64	0.16	0.23	0.18	0.92	0.70	1.17	1.76	1.77	1.78
64	1.49	1.64	1.33	0.11	0.14	0.17	0.55	0.41	0.79	1.74	1.74	1.75
128	1.14	1.32	0.94	0.08	0.10	0.15	0.34	0.22	0.48	1.79	1.77	1.76
256	0.81	0.99	0.65	0.08	0.08	0.16	0.21	0.12	0.28	1.79	1.77	1.76
512	0.53	0.62	0.42	0.09	0.09	0.14	0.16	0.11	0.20	1.82	1.78	1.81
1,024	0.33	0.40	0.31	0.11	0.12	0.14	0.12	0.11	0.16	1.79	1.66	1.73

ทำการฉีดกระตุ้นหนูชุดที่ 3 จำนวน 3 ตัว ด้วย CPAOZ-cBSA หลังจากฉีดกระตุ้นจำนวน 4 ครั้ง ทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมที่ทดสอบด้วย AOZ-OVA ,BSA และ OVA เมื่อเจือจางซีรัมหนูด้วย BSA

ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:256,000 ได้ผลดังตารางที่ 6 หนูทั้ง 3 ตัว ผลิตแอนติบอดีในระดับสูง ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงประมาณ 1.8 และหนูตัวที่ 1, 2 และ 3 มีค่าไตเตอร์ 1:64,000, สูงกว่า 1:256,000 และ 1:128,000 ตามลำดับ แอนติบอดีในซีรัมหนูไม่จับกับหลุมที่เคลือบด้วย BSA และ OVA

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู

โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

เจือจาง ซีรัมหนู (X 10 <sup>3</sup> เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	เคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร				เคลือบหลุมด้วย BSA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร				เคลือบหลุมด้วย OVA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	NMS	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	NMS	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	NMS
0.5	1.71	1.82	1.82	0.15	0.28	0.34	0.63	0.16	0.23	0.28	0.42	0.18
1	1.60	1.81	1.80	0.13	0.19	0.22	0.41	0.12	0.15	0.19	0.27	0.18
2	1.41	1.75	1.69	0.11	0.15	0.16	0.26	0.10	0.13	0.14	0.20	0.15
4	1.15	1.76	1.60	0.09	0.11	0.12	0.17	0.09	0.11	0.10	0.15	0.14
8	0.84	1.69	1.34	0.09	0.13	0.12	0.15	0.11	0.11	0.09	0.10	0.12
16	0.58	1.61	1.04	0.09	0.15	0.10	0.13	0.12	0.10	0.08	0.09	0.13
32	0.37	1.44	0.68	0.08	0.14	0.08	0.10	0.10	0.10	0.08	0.10	0.14
64	0.25	1.16	0.44	0.08	0.13	0.09	0.10	0.09	0.12	0.07	0.10	0.15
128	0.17	0.86	0.26	0.08	0.15	0.09	0.08	0.11	0.09	0.08	0.08	0.13
256	0.14	0.57	0.17	0.09	0.18	0.10	0.11	0.12	0.10	0.07	0.09	0.12
1%BSA	0.13	0.11	0.12	0.17	0.26	0.19	0.17	0.19	0.15	0.12	0.12	0.17
PBS	0.08	0.07	0.07	0.08	0.10	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09

## NMS = ชิรั่มหนูปกติ

จากนั้น นำแอนติบอดีในชิรั่มหนูชุดที่ 3 ไปทดสอบการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA เจือจางแอนติบอดีในชิรั่มหนูด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยหนูตัวที่ 1 ,2 และ 3 เจือจางที่ 1:4,000 ,1:64,000 และ 1:16,000 ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ ที่ความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ดังตารางที่ 7 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  พบว่า แอนติบอดีในเลือดหนูทั้ง 3 ตัว มีความสามารถจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ดี โดยมีค่า  $IC_{50}$  ดังต่อไปนี้ หนูตัวที่ 1 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.78 และ 6.25 หนูตัวที่ 2 มีค่า  $IC_{50}$  0.012 และ 0.049 หนูตัวที่ 3 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.586 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีเพียงหนูตัวที่ 2 เท่านั้นที่แอนติบอดีในชิรั่มสามารถจับกับ AOZ ในรูปอิสระได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี

indirect competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย AOZ-BSA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย

CPAOZ-cBSA

ความเข้มข้นของ สาร  ( ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร								
	ซีรัมหนูตัวที่ 1			ซีรัมหนูตัวที่ 2			ซีรัมหนูตัวที่ 3		
	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	AOZ	CPAOZ	NPAOZ
0	1.45	1.49	1.41	1.43	1.43	1.41	1.62	1.61	1.54
0.003	1.44	1.46	1.44	1.39	1.06	1.29	1.59	1.57	1.57
0.006	1.41	1.41	1.43	1.35	0.91	1.31	1.57	1.58	1.56
0.012	1.44	1.40	1.41	1.38	0.76	1.18	1.61	1.52	1.51
0.024	1.41	1.33	1.38	1.28	0.62	0.87	1.55	1.45	1.48
0.049	1.40	1.26	1.34	1.30	0.46	0.77	1.52	1.38	1.42
0.098	1.38	1.17	1.28	1.28	0.37	0.59	1.55	1.24	1.32
0.196	1.37	1.05	1.21	1.31	0.31	0.53	1.51	1.03	1.10
0.391	1.42	0.91	1.27	1.39	0.21	0.78	1.61	0.95	1.25
0.781	1.44	0.69	1.13	1.32	0.14	0.51	1.58	0.67	1.18
1.563	1.29	0.51	1.01	1.22	0.11	0.36	1.56	0.50	1.07
3.125	1.32	0.36	0.87	1.09	0.09	0.24	1.56	0.37	0.88
6.25	1.39	0.26	0.70	0.94	0.09	0.17	1.53	0.30	0.71
12.5	1.37	0.20	0.52	0.82	0.07	0.12	1.52	0.28	0.55
25	1.39	0.18	0.37	0.73	0.09	0.10	1.49	0.27	0.44
50	1.44	0.18	0.28	0.69	0.11	0.11	1.55	0.23	0.36

ตารางที่ 8 แสดงค่า  $IC_{50}$  ของการจับกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

หนูตัวที่	$IC_{50}$ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)		
	สาร AOZ	สาร CPAOZ	สาร NPAOZ
1	> 50	0.781	6.250
2	25	0.024	0.049
3	> 50	0.586	6.250

ทำการฉีดกระตุ้นหนูชุดที่ 4 จำนวน 3 ตัว ด้วย AOZ-BSA หลังจากกระตุ้น 4 ครั้ง ทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดยใช้วิธี indirect ELISA แอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบหลุมได้แก่ AOZ-BSA ,AOZ-OVA ,CPAOZ-OVA ,BSA และ OVA ได้ผลดังตารางที่ 9 เมื่อเจือจางซีรัมหนูทั้ง 3 ตัว ด้วย สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:256,000 พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้ ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติเจน AOZ-BSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดประมาณ 2.7 และค่าไตเตอร์ เท่ากับ 1:256,000 จากนั้นนำซีรัมหนูไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารในรูปอิสระ



ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดยวิธี indirect ELISA เคลือบหลุมด้วย AOB-BSA ,AOZ-OVA ,CPAOZ-OVA ,BSA และ OVA ของหนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

เจือจาง ซีรัมหนู (X10 <sup>3</sup> เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร																			
	AOZ-BSA				AOZ-OVA				CPAOZ-OVA				BSA				OVA			
	1	2	3	NM	1	2	3	NM	1	2	3	NM	1	2	3	NM	1	2	3	NM
0.5	2.9	2.7	2.7	0.2	0.4	0.4	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5	0.2	1.0	1.6	1.5	0.1	0.3	0.3	0.5	0.2
1	2.6	2.7	2.4	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4	0.4	0.3	0.1	0.7	1.1	1.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1
2	2.5	2.7	2.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.4	0.8	0.7	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
4	2.3	2.5	2.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
8	2.1	2.5	1.9	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
16	1.6	2.3	1.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
32	1.3	2.1	0.9	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
64	0.8	1.6	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
128	0.6	1.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
256	0.3	0.7	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

เมื่อทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 4 ที่การเจือจาง 1:16,000 กับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ความเข้มข้นของสาร 0 – 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเคลือบหลุมด้วย AOB-BSA พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้ไม่จับกับสารทั้ง 4 ตัว ในรูปอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 10 ที่ความเข้มข้นของสารสูงสุด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC<sub>50</sub> สูงกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 4 ไม่จับกับ FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA กับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้น ของสาร (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	หนูตัวที่ 1				หนูตัวที่ 2				หนูตัวที่ 3			
	FZD	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	FZD	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	FZD	AOZ	CPAOZ	NPAOZ
0	0.88	0.91	0.88	0.91	1.75	1.75	1.75	1.75	0.58	0.59	0.52	0.55
0.00001	0.90	0.89	0.83	0.87	1.84	1.79	1.84	1.85	0.61	0.60	0.61	0.59
0.0001	0.99	0.95	0.93	0.90	1.77	1.82	1.82	1.79	0.62	0.63	0.59	0.58
0.001	0.94	0.89	0.87	0.90	1.79	1.82	1.80	1.81	0.63	0.60	0.60	0.59
0.01	0.85	0.84	0.85	0.82	1.74	1.78	1.74	1.76	0.57	0.57	0.56	0.56
0.1	0.86	0.84	0.82	0.81	1.81	1.79	1.80	1.81	0.60	0.60	0.58	0.60
1	0.90	0.92	0.92	0.87	1.81	1.74	1.77	1.42	0.60	0.61	0.59	0.60
10	0.88	0.97	0.99	0.98	1.80	1.79	1.86	1.88	0.65	0.60	0.61	0.60

เมื่อทำการฉีดกระตุ้นหนูชุดที่ 5 จำนวน 2 ตัวด้วยแอนติเจน CPAOZ-cBSA และทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี Indirect ELISA แอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบหลุม ได้แก่ CPAOZ-BSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-OVA ,BSA และ OVA โดยเจือจางซีรัมหนูด้วย สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:256,000 พบว่าแอนติบอดีในซีรัมหนูทั้ง 2 ตัว ไม่ทำปฏิกิริยากับ BSA แอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 1 และ 2 ทำปฏิกิริยากับ CPAOZ -cBSA ,CPAOZ-OVA ที่ระดับไตเตอร์สูงกว่า 1:1,024,000 ทำปฏิกิริยากับ AOZ-BSA ระดับไตเตอร์ 1:16,000 และ 1:2,000 ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา AOZ-OVA ที่ระดับไตเตอร์ 1:512,000 และ 1:1,024,000 ตามลำดับ และซีรัมของหนูทั้ง 2 ตัว ทำปฏิกิริยากับ OVA ที่ระดับไตเตอร์ 1:256,000 แสดงว่าแอนติบอดีในซีรัมบางส่วนทำปฏิกิริยากับ OVA ได้ผล แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 5 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

เจือจาง ซีรัมหนู (x 10 <sup>3</sup> เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร																	
	CPAOZ-cBSA			AOZ-BSA			CPAOZ-OVA			AOZ-OVA			BSA			OVA		
	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS
0.5	2.86	2.85	0.15	1.90	0.69	0.13	2.85	3.20	0.17	2.76	2.84	0.16	0.25	0.30	0.12	2.80	3.10	0.15
1	2.99	2.78	0.12	1.61	0.52	0.09	2.94	3.14	0.14	2.80	2.98	0.14	0.17	0.19	0.10	2.82	3.05	0.11
2	2.94	2.85	0.09	1.13	0.33	0.08	2.86	3.00	0.11	2.66	2.75	0.12	0.13	0.13	0.09	2.63	2.75	0.09
4	3.00	2.75	0.08	0.63	0.24	0.08	2.92	2.90	0.09	2.63	2.66	0.10	0.10	0.10	0.08	2.66	2.56	0.08
8	2.93	2.70	0.09	0.40	0.15	0.09	2.93	2.70	0.09	2.38	2.56	0.13	0.15	0.08	0.10	2.20	2.16	0.10
16	2.90	2.80	0.08	0.29	0.11	0.07	2.81	2.80	0.10	2.09	2.42	0.12	0.10	0.08	0.10	1.76	1.67	0.08
32	2.88	2.62	0.08	0.19	0.09	0.07	2.74	2.70	0.09	1.68	2.14	0.12	0.07	0.07	0.08	1.20	1.07	0.08
64	2.74	2.82	0.07	0.12	0.08	0.07	2.55	2.65	0.11	1.18	1.87	0.15	0.07	0.07	0.08	0.75	0.68	0.08
128	2.55	2.55	0.08	0.09	0.08	0.06	2.35	2.57	0.11	0.83	1.28	0.11	0.07	0.09	0.08	0.46	0.40	0.08
256	2.42	2.43	0.09	0.08	0.08	0.06	2.04	2.35	0.10	0.60	0.90	0.16	0.07	0.08	0.08	0.29	0.25	0.07
512	2.00	2.23	0.08	0.09	0.06	0.06	1.53	2.00	0.11	0.35	0.57	0.12	0.07	0.07	0.08	0.18	0.17	0.07
1,024	1.46	1.88	0.07	0.09	0.06	0.06	1.00	1.56	0.08	0.21	0.38	0.09	0.07	0.07	0.08	0.13	0.12	0.07

หลังการฉีดกระตุ้นหนูด้วย CPAOZ-cBSA หรือ AOZ-BSA ในหนูจำนวน 5 ชุด และตรวจหาระดับการผลิตแอนติบอดีในซีรัมหนูสรุปผลดังตารางที่ 12 หนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA แอนติบอดีในซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน CPAOZ-cBSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-OVA และ AOZ-BSA แต่หนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA แอนติบอดีที่ได้จับเฉพาะ AOZ-BSA

ตารางที่ 12 การหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้น

หนูชุดที่	แอนติเจน ที่ใช้กระตุ้น	ระดับแอนติบอดีในซีรัมหนู ทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ( x 10 <sup>3</sup> )					
		แอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุม					
		CPAOZ-cBSA	CPAOZ- OVA	AOZ-BSA	AOZ-OVA	BSA	OVA
1 (3 ตัว)	CPAOZ-cBSA	1,024	-	128	-	-	-
2 (3 ตัว)	AOZ-BSA	4	-	> 1,024	-	-	-
3 (3 ตัว)	CPAOZ-cBSA	-	-	-	64 - 256	NR	NR
4 (3 ตัว)	AOZ-BSA	-	NR	256	NR	NR	NR
5 (2 ตัว)	CPAOZ-cBSA	> 1,024	> 1,024	4 - 16	512 - 1,024	NR	NR

(-) = ไม่ได้ทำการทดสอบ , (NR) = แอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน

### 3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากทดสอบการผลิตแอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นแล้ว พบว่า มีปริมาณแอนติบอดีในระดับสูง จึงทำการหลอมรวม B-cell จากม้ามหนูกับ Myeloma cell และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีนั้น ผลการทดลอง พบว่า หนูชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ในการหลอมรวมเซลล์ไม่สามารถได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการได้

การหลอมรวมเซลล์ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งมีกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA นั้น ผลการหลอมรวมเซลล์ได้เซลล์ไฮบริโดมา มากกว่า 90% เมื่อทำการคัดเลือกเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA พบว่าทุกหลุมให้ผลบวก ซึ่งยากต่อการคัดเลือกแอนติบอดีที่ต้องการ แต่เมื่อเคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA ได้เซลล์ที่ให้ผลบวก 88 หลุม จากทั้งหมด 768 หลุม คิดเป็น 11.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำทั้ง 88 หลุมไปทดสอบกับสาร AOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า เซลล์ที่ยังคงผลิตแอนติบอดีและจับกับสาร CPAOZ ในรูปอิสระได้ มีจำนวน 53 หลุม และมีเพียง 9 หลุม ซึ่งจับกับสาร AOZ ได้บางส่วน ได้แก่ เซลล์หลุม 1/6C ,2/8A ,2/5E ,4/4B ,4/9C ,8/6E ,4/9A ,4/2E และ 7/11H ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร CPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	PBS	AOZ	CPAOZ		PBS	AOZ	CPAOZ		PBS	AOZ	CPAOZ
1/1A	1.14	1.08	0.41	1/1C	1.88	1.87	0.22	1/2B	0.90	0.83	0.08
1/5A	1.44	1.45	0.08	1/5C	1.85	1.84	0.16	1/5G	1.72	1.75	0.11
1/6C	0.70	0.47	0.07	1/8D	0.85	0.66	0.07	2/5E	1.29	0.75	0.06
2/7G	1.26	1.23	0.07	2/8A	1.61	1.18	0.07	2/10A	1.69	1.60	0.19
2/11G	0.83	0.72	0.08	2/2G	1.77	1.77	0.88	2/12H	0.76	0.61	0.08
3/1F	1.79	1.70	0.18	3/2F	0.81	0.69	0.07	3/4E	1.29	1.12	0.07
3/6A	1.87	1.79	0.09	3/6C	1.20	1.05	0.06	3/9B	1.30	1.26	0.09
3/9H	0.88	0.65	0.42	3/10D	1.74	1.58	0.07	3/11C	1.82	1.79	0.19
4/1G	0.89	0.68	0.08	4/1H	1.67	1.62	0.08	4/2E	1.50	1.17	0.07
4/4B	1.48	0.86	0.06	4/5E	1.31	1.21	0.07	4/5G	1.19	1.04	0.08
4/6D	1.95	1.89	0.78	4/7C	1.98	1.94	0.07	4/8E	1.65	1.65	0.08
4/9C	0.72	0.35	0.07	4/9A	1.01	0.80	0.06	4/10F	0.60	0.47	0.25
4/12B	1.96	1.94	0.15	6/1A	1.26	1.30	0.08	6/1C	1.80	1.68	0.10
6/5H	1.92	1.96	0.76	6/6H	1.14	1.09	0.12	6/8D	0.73	0.80	0.59
6/10B	1.74	1.66	0.09	7/4E	1.70	1.53	0.12	7/6H	1.88	1.80	0.53
7/7B	1.21	1.30	0.08	7/7D	0.92	0.85	0.08	7/7H	0.97	0.79	0.08
7/11A	1.38	1.19	0.11	7/11H	0.71	0.22	0.07	8/2F	1.77	1.70	0.12
8/6E	1.03	0.57	0.06	8/8H	1.88	1.80	0.40				

จากนั้นนำกลุ่มที่ให้ผลบวกและจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ มาทำ subclone ซ้ำ โดยวิธี Limiting dilution ซ้ำ ครั้งที่ 2 เหลือกลุ่มที่ยังคงให้ผลบวกและจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ จำนวน 20 กลุ่ม ได้แก่ 1/1A ,1/1C ,1/2B ,2/8A ,2/10A ,2/12G ,3/6A ,3/9B ,4/1H ,4/8E ,4/12B ,6/11A ,6/5H ,7/4E ,7/6H ,7/7B ,7/7D ,7/11A ,8/2F และ 8/8H และเมื่อทำ subclone ครั้งที่ 3

เหลือหลุมที่ยังคงให้ผลบวกและจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระอยู่ 7 หลุม ได้แก่ 1/2B ,1/1C ,2/2G ,4/1H ,6/1A ,7/6H และ 8/8H เซลล์แต่ละหลุมคัดเลือกหลุมที่คาดว่ามาจากต้นกำเนิดเซลล์เดียวกัน 5 – 10 โคลน ได้เซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด 52 โคลน ทดสอบแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 52 โคลน กับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISAพบว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ทุกโคลนจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ แต่ไม่จับกับ AOZ และบางโคลนจับกับ NPAOZ บางส่วน จึงทำการเลือกเก็บโคลนที่จับกับ NPAOZ และ CPAOZ จำนวน 22 โคลน (จากหลุมต้น 7 หลุม ได้แก่ 1/2B , 1/1C ,2/2G ,4/1H ,6/1A ,7/6H และ 8/8H) ดังแสดงในตารางที่ 14 ทำการเก็บแช่แข็งเซลล์ที่ได้ในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยง เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้นำไปทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และกลุ่มยาปฏิชีวนะอื่นต่อไป

ตารางที่ 14 การทดสอบแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			
	PBS	AOZ	CPAOZ	NPAOZ		PBS	AOZ	CPAOZ	NPAOZ
1/2B/7A/12B/4H	1.58	1.52	0.25	0.72	4/1H/4D/12C/10H	1.83	1.82	0.21	0.90
1/2B/7A/12B/5F	1.63	1.60	0.31	1.04	4/1H/4D/9E/2H	0.81	0.89	0.14	0.19
1/2B/7A/9D/11G	1.54	1.75	0.31	0.88	6/1A/5F/10A/6H	0.84	0.76	0.08	0.15
1/2B/7A/9D/12B	1.58	1.54	0.24	0.87	7/6H/3H/9B/1D	1.70	1.65	0.39	1.28
1/1C/4A/5C/5C	1.84	1.84	0.23	0.86	7/6H/3H/9C/12B	1.18	1.56	0.36	1.03
1/1C/4A/5C/3C	1.87	1.87	0.23	1.41	8/8H/9E/10G/4E	1.72	1.54	0.27	1.01
2/2G/4D/2D <sub>1</sub> /2F	1.73	1.69	0.35	1.62	8/8H/9E/10G/5A	1.72	1.69	0.34	1.23
2/2G/4D/2D <sub>1</sub> /6E	1.89	1.87	0.36	1.72	8/8H/9E/11B/8A	1.67	1.50	0.26	0.99
2/2G/4D/3G <sub>1</sub> /7G	1.84	1.84	0.33	1.77	8/8H/9E/11B/9E	1.66	1.39	0.22	0.84
2/2G/4D/3G <sub>1</sub> /11B	1.93	1.92	0.40	1.76	8/8H/9E/11B/11B	1.62	1.50	0.21	0.82
4/1H/4D/12C/10C	1.86	1.83	0.30	1.04	8/8H/9E/11B/12C	1.70	1.57	0.23	1.10

สำหรับการหลอมรวมเซลล์ของหนูชุดที่ 4 จำนวน 3 ตัว ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA หลังการหลอมรวมเซลล์และเลี้ยงเซลล์ไว้ประมาณ 10 – 14 วัน มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้น 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูไม่ทำปฏิกิริยากับหลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA ดังนั้นจึงทำการทดสอบแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี indirect ELISA โดยการเคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA เปรียบเทียบกับ CPAOZ-BSA พบว่า หลุมที่เคลือบด้วย AOZ-BSA ให้หลุมที่เป็นผลบวก 59 หลุม ส่วนหลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-BSA ให้ผลบวก 3 หลุม และหลุมที่ให้ผลบวกทั้ง AOZ-BSA และ CPAOZ-BSA จำนวน 33 หลุม แต่เมื่อทำการย้ายเซลล์ที่ให้ผลบวกลงในจาน 48 หลุม และเมื่อเซลล์มีจำนวนมากพอ นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบแอนติบอดี พบว่า เซลล์ที่ยังคงให้ผลบวกเหลือเพียง 30 หลุม และนำไปทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ในการจับกับ FZD ,AOZ ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระ พบว่าไม่มีแอนติบอดีตัวใดจับกับสารเหล่านี้ได้เลย

เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์ของหนูชุดที่ 5 จำนวน 2 ตัว ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วยภูมิคุ้มกันด้วย CPAOZ-cBSA มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA หลุมที่ให้ผลบวกมีจำนวน 146 หลุม จากนั้น ย้ายเซลล์ไฮบริโดมาลงในจาน 48 หลุม หลังจากเลี้ยงไว้ 2 – 3 วัน เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามีจำนวน 22 หลุม ที่แอนติบอดีสามารถจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ และจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จำนวน 18 หลุม ดังแสดงในตารางที่ 15 จากนั้น ทำการ subclone โดยวิธี limiting dilution เพื่อให้ได้โคลนเดี่ยว ในแต่ละครั้งจะทำการคัดเลือกโคลนที่จับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยนำโคลนที่ยังคงผลิตแอนติบอดีให้ผลบวกจากการทดสอบ indirect ELISA และทดสอบความสามารถในการจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA หลังจาก subclone 3 ครั้ง เลือกเก็บโคลนที่ยังคงให้ผลบวกไว้จำนวน 221 โคลน (ดังแสดงในภาคผนวก) จากเซลล์หลุมต้น 9 หลุม ได้แก่ 2/9A ,2/11E ,4/10G ,4/11H ,6/1D ,6/6E ,6/12E ,7/10F และ 8/12D ทำการเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ทดสอบคุณสมบัติต่อไป

ตารางที่ 15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	PBS	CPAOZ	NPAOZ		PBS	CPAOZ	NPAOZ
6/1D	1.94	0.28	1.17	4/3F	1.84	0.08	0.13
6/5E	1.92	0.10	0.28	5/5E	0.86	0.07	0.08
6/12B	1.30	0.23	0.36	2/11E	1.18	0.09	0.34
6/12E	1.92	0.24	1.45	4/4H	1.32	0.07	0.08
8/4C	2.11	0.11	0.14	7/10F	1.39	0.12	0.56
2/9A	0.99	0.09	0.11	4/10G	1.37	0.43	1.30
2/12C	1.81	0.15	0.28	5/5F	2.48	0.21	2.16
3/12A	2.42	0.11	0.11	8/12D	2.23	0.10	0.34
4/1H	2.55	0.11	0.11	4/11H	1.37	0.10	0.12
5/9F	1.34	0.08	0.08	6/6E	2.08	0.30	0.65
8/2D	1.76	0.12	0.96	8/10H	1.02	0.12	0.13

### 3.4 การศึกษาลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากได้ทำการเลือกเก็บโคลนไว้เป็นจำนวนมาก จากหนูชุดที่ 3 จำนวน 22 โคลน จาก 7 หลุมต้น และ หนูชุดที่ 5 จำนวน 221 โคลน จาก 9 หลุมต้น จึงทำการคัดเลือกโคลน โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้จากการเก็บแช่แข็งเซลล์ มาทดสอบแอนติบอดี เลือกโคลนที่ยังคงมีการผลิตแอนติบอดี และเลือกบางโคลนในแต่ละหลุมต้น เพราะโคลนที่มาจากหลุมต้นเดียวกันมีโอกาสที่จะมีคุณสมบัติเหมือนกันสูง โดยมีโคลนที่เลือกมาดังนี้ คือ หนูชุดที่ 3 เลือกโคลนจากหลุมต้น 1/2B ,2/2G ,4/1H และ 7/6H หมายเลข 3 ,4 ,6 ,8 ,17 ,19 ,21 ,26 ,28 ,32 ,37 และ 42 สำหรับหนูชุดที่ 5 เลือกโคลนจากหลุมต้น 6/12D ,6/1D ,2/9A ,8/12D ,6/6E ,4/11H ,7/10F ,4/10G และ 7/6H หมายเลข 2 ,4 ,10 ,72 ,73 ,43 ,50 ,62 ,66 ,75 ,79 ,89 ,181 ,96 ,102 ,112



,109 ,117 ,123 ,217 ,140 ,152 ,194 ,163 ,164 ,165 ,172 ,177 และ 207 รวมทั้งหมด 40 โคลน มาทดสอบคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนและยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

### 3.4.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะ

นำโคลนที่ทำการคัดเลือกมาทดสอบคุณสมบัติการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ หรือการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ในรูปยาตั้งต้น (parent drugs) รูปอนุพันธ์ รูปเมแทบอลิต์ ยาในกลุ่มปีตา-อะ โกนิสต์ ได้แก่ เกล็ดนูเทอรอล ,ซัลบูตามอล และยาปฏิชีวนะ โดยนำแอนติบอดีจากโคลนทั้ง 40 โคลน มาทดสอบสารต่างๆเหล่านี้ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA เคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA เนื่องจากสารส่วนใหญ่ละลายอยู่ใน DMF ขณะที่ทดสอบสาร DMF จะเจือจาง 50 เท่า จึงใช้เป็นตัวควบคุมลบ และ PBS ซึ่งไม่มีสารแย่งจับ ผลการทดสอบ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูชุดที่ 3 หมายเลข 3 ,4 ,6 ,8 ,17 ,19 ,21 ,26 ,28 ,32 ,37 และ 42 จำนวน 12 โคลน ทำปฏิกิริยากับ DMF ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง และจับกับสารเกือบทุกตัวยกเว้น AOZ ,AMOZ และ NPAMOZ ดังแสดงในตารางที่ 16 ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อเพราะไม่มีความจำเพาะ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูชุดที่ 5 ผลการทดสอบพบว่า โคลนจากหลุมต้น 2/9A ,4/11H ,7/10F ,4/10G และ 2/11E แอนติบอดีทำปฏิกิริยาจับกับ DMF ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง และจับกับสารเกือบทุกตัว ส่วนแอนติบอดีของโคลนจากหลุมต้น 6/12D และ 6/1D ไม่ทำปฏิกิริยากับ DMF และจับกับ FZD และ CPAOZ ในรูปอิสระ แต่ไม่จับกับ NPAOZ โคลนจากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากหลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 ทั้ง 8 โคลนนี้มีความจำเพาะในการจับกับ FZD ซึ่งเป็นยาตั้งต้น CPAOZ รูปอนุพันธ์ และ NPAOZ ในรูปเมแทบอลิต์ ดังแสดงในตารางที่ 17 โดยพบว่าสารละลาย DMF อัตราส่วน 1 : 50 ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ละลายสารอิสระที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาข้ามมีผลต่อค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากหลุม PBS เมื่อนำมาคำนวณกลับเป็นค่าร้อยละการจับกับสารอิสระทั้งในกลุ่มและนอกกลุ่มโดยลบผลของสารละลาย DMF พบว่า แอนติบอดีจากหลุมต้น 8/12D และ 6/6E ที่ได้ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม โดยจะจับกับสารอิสระทั้งสามรูปได้แก่ NPAOZ CPAOZ และ FZD จึงสามารถสรุปผลร้อยละของการจับกับสารอิสระได้ดังตารางที่ 18 ของทั้ง 8 โคลนและนำไปทำการศึกษานิดของแอนติบอดีในการหา Isotype และทดสอบความไวของแอนติบอดี เพื่อคัดเลือกโคลนที่ดีที่สุด เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	3	4	6	8	17	19	21	26	28	32	37	42
FZD	0.11	0.13	0.10	0.10	0.08	0.09	0.08	0.13	0.13	0.11	0.13	0.08
AOZ	0.84	0.95	0.80	0.79	0.39	0.44	0.83	0.48	0.94	1.54	1.57	1.37
NPAOZ	0.30	0.45	0.30	0.29	0.19	0.25	0.36	0.25	0.51	0.63	0.53	0.14
CPAOZ	0.12	0.12	0.11	0.10	0.08	0.10	0.09	0.13	0.11	0.11	0.13	0.09
FTD	0.17	0.20	0.15	0.15	0.09	0.09	0.11	0.14	0.13	0.43	0.49	0.51
AMoz	0.92	1.11	1.01	1.01	0.72	0.73	1.18	0.80	1.21	1.65	1.66	1.32
NPAMOZ	1.05	1.18	1.08	1.12	0.76	0.75	1.06	0.84	1.24	1.68	1.62	1.42
CPAMOZ	0.16	0.19	0.16	0.16	0.10	0.09	0.13	0.17	0.15	0.44	0.49	0.51
NFZ	0.16	0.17	0.14	0.13	0.10	0.10	0.10	0.18	0.15	0.27	0.31	0.54
SEM	0.13	0.17	0.13	0.13	0.10	0.09	0.11	0.09	0.11	0.39	0.46	0.56
NPSEM	0.16	0.18	0.15	0.16	0.15	0.09	0.12	0.16	0.14	0.43	0.47	0.54
CPSEM	0.20	0.19	0.15	0.16	0.10	0.11	0.13	0.15	0.13	0.40	0.44	0.54
NFT	0.12	0.15	0.12	0.12	0.08	0.08	0.11	0.11	0.10	0.29	0.29	0.28
AHD	0.15	0.17	0.11	0.09	0.10	0.08	0.10	0.15	0.15	0.29	0.27	0.35
NPAHD	0.16	0.15	0.11	0.13	0.10	0.09	0.11	0.14	0.15	0.32	0.33	0.40
3-Carboxy benzaldehyde	0.27	0.39	0.25	0.33	0.16	0.16	0.23	0.21	0.24	0.93	0.97	0.87
Salbutamol	0.13	0.18	0.14	0.12	0.11	0.08	0.11	0.15	0.16	0.37	0.37	0.40
Clenbuterol	0.17	0.16	0.15	0.13	0.10	0.09	0.11	0.14	0.18	0.30	0.37	0.45

ตารางที่ 16 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	3	4	6	8	17	19	21	26	28	32	37	42
Chloramphenicol	0.73	0.97	0.75	0.75	0.49	0.60	0.97	0.50	0.86	1.42	1.41	1.19
Ciprofloxacin	0.15	0.15	0.15	0.14	0.11	0.11	0.10	0.18	0.17	0.35	0.49	0.78
Oxytetracycline – HCl	0.21	0.15	0.11	0.13	0.12	0.08	0.11	0.16	0.15	0.38	0.36	0.42
Tetracycline - HCl	0.30	0.31	0.25	0.26	0.16	0.13	0.21	0.14	0.26	0.78	0.80	0.85
Doxycycline hydrate	0.20	0.17	0.15	0.15	0.14	0.09	0.11	0.18	0.18	0.34	0.31	0.33
DMF (1:50)	0.20	0.16	0.14	0.18	0.11	0.09	0.11	0.20	0.20	0.32	0.32	0.30
PBS	0.76	0.81	0.82	0.84	0.45	0.59	1.03	0.53	0.91	1.36	1.32	1.06

ตารางที่ 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร														
	2	4	10	72	73	43	50	62	66	75	79	89	181	96	102
FZD	0.21	0.18	0.23	0.19	0.19	0.18	0.16	0.14	0.15	0.16	0.16	0.17	0.16	0.74	0.70
AOZ	2.15	2.03	1.93	1.96	1.93	1.49	1.54	1.06	0.91	1.15	1.86	1.78	1.23	2.52	2.41
NPAOZ	1.61	1.44	0.78	0.72	0.45	0.20	0.19	0.15	0.14	0.22	0.43	0.37	0.23	0.48	0.41
CPAOZ	0.35	0.26	0.27	0.23	0.20	0.17	0.16	0.15	0.15	0.14	0.17	0.14	0.15	0.39	0.37
FTD	1.87	1.77	1.21	1.10	0.81	0.21	0.21	0.17	0.15	0.80	1.44	1.32	0.77	2.34	2.38
AMAZ	2.15	2.19	2.02	1.98	1.96	1.19	1.25	0.77	0.78	2.04	2.17	2.22	2.11	2.52	2.47

ตารางที่ 17 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร														
	2	4	10	72	73	43	50	62	66	75	79	89	181	96	102
NPAMOZ	2.18	2.16	2.00	1.99	1.93	1.54	1.59	1.10	0.05	2.12	2.22	2.23	2.22	2.34	2.27
CPAMOZ	1.79	1.77	1.25	1.04	0.76	0.21	0.21	0.17	0.15	0.78	1.47	1.33	0.81	2.20	2.22
NFZ	1.88	1.80	1.12	1.06	0.81	0.21	0.21	0.17	0.15	0.84	1.49	1.27	0.75	2.37	2.42
SEM	1.88	1.74	1.15	1.15	0.82	0.22	0.21	0.18	0.17	0.78	1.46	1.33	0.74	2.39	2.40
NPSEM	1.78	1.75	1.17	1.08	0.82	0.24	0.24	0.19	0.18	0.76	1.59	1.36	0.82	2.30	2.33
CPSEM	1.76	1.76	1.16	1.12	0.82	0.24	0.22	0.19	0.19	0.84	1.47	1.35	0.76	2.25	2.30
NFT	1.75	1.67	1.54	1.06	0.82	0.19	0.18	0.16	0.16	0.80	1.51	1.28	0.77	2.33	2.22
AHD	1.79	1.67	1.11	1.05	0.69	0.22	0.21	0.17	0.18	0.78	1.46	1.31	0.78	2.37	2.32
NPAHD	1.78	1.75	1.14	1.10	0.78	0.21	0.18	0.15	0.16	0.83	1.54	1.40	0.80	2.34	2.33
3-Carboxy benzaldehyde	2.01	1.97	1.72	1.68	1.54	0.37	0.39	0.25	0.22	1.76	2.08	1.91	1.78	2.49	2.44
Salbutamol	1.73	1.65	1.12	1.04	0.76	0.23	0.23	0.18	0.18	0.81	1.42	1.35	0.84	2.33	2.29
Clenbuterol	1.78	1.67	1.14	1.12	0.78	0.24	0.21	0.20	0.18	0.84	1.52	1.35	0.88	2.40	2.37
Chloramphenicol	1.81	1.69	1.19	1.11	0.82	0.24	0.23	0.19	0.17	0.79	1.50	1.37	0.79	2.32	2.34
Ciprofloxacin	2.07	2.07	2.03	1.93	1.93	1.66	1.58	1.36	1.28	2.13	2.07	2.22	2.13	2.53	2.52
Oxytetracycline – HCl	1.85	1.74	1.14	1.11	0.77	0.24	2.19	0.19	0.18	0.81	1.51	1.43	0.83	2.39	2.40
Tetracycline - HCl	1.92	1.94	1.47	1.45	1.10	0.27	0.28	0.21	0.19	1.49	1.82	1.79	1.42	2.29	2.24
Doxycycline hydrate	1.58	1.54	0.92	0.78	0.56	0.19	0.19	0.16	0.15	0.65	1.32	1.13	0.52	2.21	2.15
DMF (1:50)	1.86	1.73	1.16	1.14	0.86	0.26	0.24	0.19	0.16	0.84	1.52	1.37	0.77	2.43	2.39
PBS	2.11	2.11	2.01	2.00	1.93	1.71	1.69	1.42	1.30	2.17	2.22	2.38	2.16	2.51	2.47

ตารางที่ 17 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร													
	109	112	117	123	217	140	152	194	163	164	165	172	177	207
FZD	0.54	0.97	0.20	0.19	0.19	0.21	0.16	0.16	0.42	0.42	0.34	0.18	0.16	0.18
AOZ	2.43	2.50	1.67	1.65	1.06	0.51	0.56	0.63	1.15	1.22	1.09	1.47	1.03	1.50
NPAOZ	0.33	0.56	0.17	0.19	0.17	0.43	0.38	0.42	0.43	0.54	0.45	0.20	0.14	0.20
CPAOZ	0.26	0.45	0.17	0.17	0.17	0.19	0.16	0.16	0.33	0.40	0.37	0.16	0.14	0.19
FTD	2.21	2.35	0.22	0.20	0.18	0.59	0.58	0.59	0.43	0.55	0.51	0.19	0.14	0.20
AMAZ	2.42	2.49	1.23	1.25	0.93	1.63	1.49	1.46	1.26	1.25	1.18	0.71	0.41	0.70
NPAMAZ	2.21	2.36	1.62	1.69	1.42	0.87	0.85	0.88	1.19	1.35	1.21	1.48	1.27	1.41
CPAMAZ	2.14	2.32	0.22	0.22	0.20	0.54	0.58	0.63	0.47	0.50	0.42	0.20	0.16	0.20
NFZ	2.26	2.36	0.25	0.24	0.21	0.49	0.56	0.60	0.42	0.54	0.47	0.19	0.15	0.18
SEM	2.31	2.38	0.19	0.21	0.19	0.48	0.58	0.64	0.46	0.56	0.44	0.16	0.14	0.18
NPSEM	2.33	2.36	0.23	0.22	0.19	0.43	0.59	0.63	0.44	0.53	0.43	0.19	0.15	0.21
CPSEM	2.14	2.34	0.18	0.21	0.16	0.34	0.49	0.53	0.43	0.49	0.43	0.19	0.14	0.19
NFT	2.14	2.39	0.14	0.15	0.12	0.40	0.52	0.57	0.46	0.54	0.42	0.18	0.13	0.19
AHD	2.30	2.48	0.16	0.18	0.15	0.38	0.49	0.56	0.44	0.51	0.41	0.18	0.13	0.19
NPAHD	2.21	2.41	0.15	0.19	0.19	0.43	0.52	0.61	0.49	0.54	0.43	0.20	0.13	0.17
3-Carboxy benzaldehyde	2.44	2.57	0.27	0.31	0.26	0.97	1.07	1.11	1.09	1.15	1.07	0.36	0.18	0.29
Salbutamol	2.29	2.43	0.19	0.19	0.16	0.49	0.55	0.56	0.47	0.51	0.42	0.18	0.13	0.18
Clenbuterol	2.35	2.45	0.21	0.19	0.20	0.47	0.54	0.59	0.49	0.55	0.44	0.20	0.13	0.19

ตารางที่ 17 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร													
	109	112	117	123	217	140	152	194	163	164	165	172	177	207
Chloramphenicol	2.38	2.41	0.20	0.19	0.18	0.42	0.54	0.59	0.46	0.54	0.41	0.20	0.13	0.19
Ciprofloxacin	2.44	2.56	1.48	1.55	1.21	1.39	1.50	1.54	1.29	1.40	1.26	1.51	1.13	1.38
Oxytetracycline – HCl	2.37	2.48	0.20	0.25	0.19	0.42	0.56	0.59	0.56	0.58	0.48	0.19	0.13	0.18
Tetracycline - HCl	2.19	2.20	0.29	0.28	0.19	0.83	1.03	1.09	1.24	1.31	1.26	0.34	0.21	0.33
Doxycycline hydrate	2.10	2.15	0.21	0.19	0.16	0.39	0.49	0.55	0.58	0.61	0.53	0.20	0.16	0.22
DMF (1:50)	2.34	2.46	0.18	0.24	0.21	0.46	0.60	0.62	0.46	0.50	0.45	0.21	0.16	0.20
PBS	2.40	2.43	1.71	1.54	1.41	1.45	1.51	1.53	1.34	1.45	1.36	1.70	1.41	1.47

ตารางที่ 18 แสดงค่าร้อยละการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ CPAOZ AOZ FZD สารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

Competitors		% Capture of mAb							
		75	79	89	181	96	102	109	112
Nitrofurans	NPAOZ	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	CPAOZ	112.90	123.85	123.00	114.81	104.62	102.02	103.48	105.79
	AOZ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	FZD	109.68	124.77	120.00	112.96	86.67	85.35	89.55	78.42
	FTD	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AMAZ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	NPAMAZ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	CPAMAZ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	NFZ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	SEM	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	NPSEM	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	CPSEM	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	NFT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AHD	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	NPAHD	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Derivatising reagent	3-Carboxy benzaldehyde	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
β-agonists	Salbutamol	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	Clenbuterol	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Antibiotics	Chloramphenicol	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	Ciprofloxacin	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	Oxytetracycline – HCl	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	Tetracycline - HCl	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

### 3.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถจับได้เฉพาะกับ FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระ ได้แก่ โคลน 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลน 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 มาทดสอบชนิดของแอนติบอดีที่ได้ โดยชุดตรวจหาไอโซไทป์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 19 พบว่า แอนติบอดีจากหลุม 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 เป็นแอนติบอดีชนิด IgG<sub>1</sub> และแอนติบอดีจากหลุม 6/6F หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 เป็นแอนติบอดีชนิด IgG<sub>2b</sub>

ตารางที่ 19 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล

แอนติบอดี

โมโนโคลนอล แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร					
	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgA	IgM
75	3.95	0.38	0.10	0.11	0.11	1.09
79	3.96	0.48	0.10	0.11	0.11	1.24
89	3.98	1.64	0.29	0.24	0.27	2.55
181	3.78	0.39	0.11	0.11	0.11	1.06
96	0.13	0.29	3.05	0.22	0.12	0.38
102	0.12	0.26	3.16	0.21	0.11	0.034
109	0.13	0.26	3.04	0.21	0.11	0.34
112	0.13	0.32	3.13	0.22	0.11	0.43

3.4.3 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกัน และประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการจับกับแอนติเจนยังอาจแตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติบอดีแต่ละตัวที่เหมาะสมในการทำ ELISA เพื่อทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของแต่ละโคลน ดังนั้นจึงทำการเจือจางแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละโคลน โดยเจือจางที่ 5 ,10 ,20 ,40 ,80 ,160 ,320 ,640 และ 1280 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เจือจาง ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำปฏิกิริยา indirect ELISA ประมาณ 2.0 จึงทำการเลือกความเข้มข้นแอนติบอดีที่เจือจางแล้วได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.5 – 1.7 (หาค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่ได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงค่าสูงสุด) จากผลการทดสอบ แอนติบอดีหมายเลข 75 และ 181 เลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เจือจาง 40 เท่า แอนติบอดีหมายเลข 79 ,89 ,96 ,102 ,109 และ 112 เลือกเจือจาง 80 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 20



ตารางที่ 20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่

เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร									
	การเจือจางแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ (เท่า)									
หมายเลข	ไม่เจือจาง	5	10	20	40	80	160	320	640	1,280
75	2.07	2.00	1.93	1.74	1.63	1.33	1.05	0.72	0.50	0.40
79	2.00	1.98	1.99	1.91	1.88	1.72	1.58	1.28	1.08	0.78
89	1.94	1.98	1.95	1.98	1.81	1.68	1.46	1.20	0.92	0.65
181	1.92	1.82	1.80	1.69	1.51	1.31	1.01	0.71	0.50	0.36
96	2.19	2.17	2.09	2.06	1.92	1.64	1.43	1.23	1.01	0.82
102	2.21	2.10	2.05	1.94	1.84	1.68	1.56	1.42	1.18	0.94
109	2.25	2.10	2.02	1.90	1.78	1.60	1.42	1.21	0.98	0.73
112	2.38	2.19	2.01	2.01	1.90	1.74	1.55	1.39	1.19	0.98

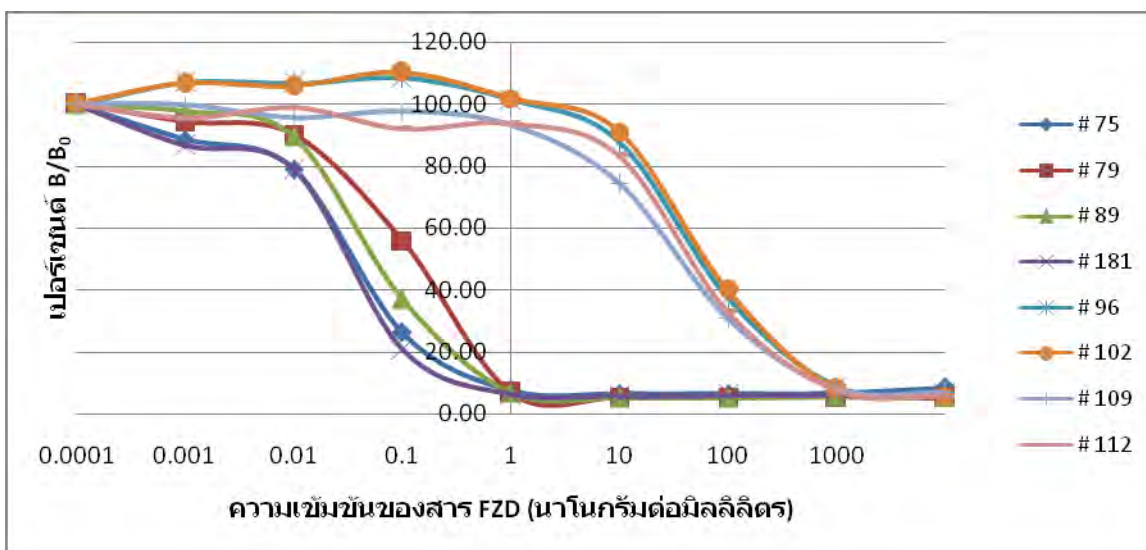
3.4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

เนื่องจากการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 75 ,79 ,89 ,181 ,96 ,102 ,109 และ 112 โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับ FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ จึงทำการทดสอบความไวในการจับสารทั้ง 3 ตัว โดยแปรความเข้มข้นเป็น 10,000 ,1,000 ,100 ,10 ,1 ,0.01 ,0.001 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 75 และ 181 เจือจาง 40 เท่า หมายเลข 79 ,89 ,96 ,102 ,104 และ 112 เจือจาง 80 เท่า โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังกราฟรูปที่ 2 ,3 และ 4 พบว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 สามารถจับกับสาร FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ได้ดีกว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 จากกราฟที่ได้นำไปคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 21 พบว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D สามารถจับได้ดีกับ FZD ,CPAOZ และ NPAOZ ตามลำดับ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E จับได้ดีกับ CPAOZ ,NPAOZ และ FZD

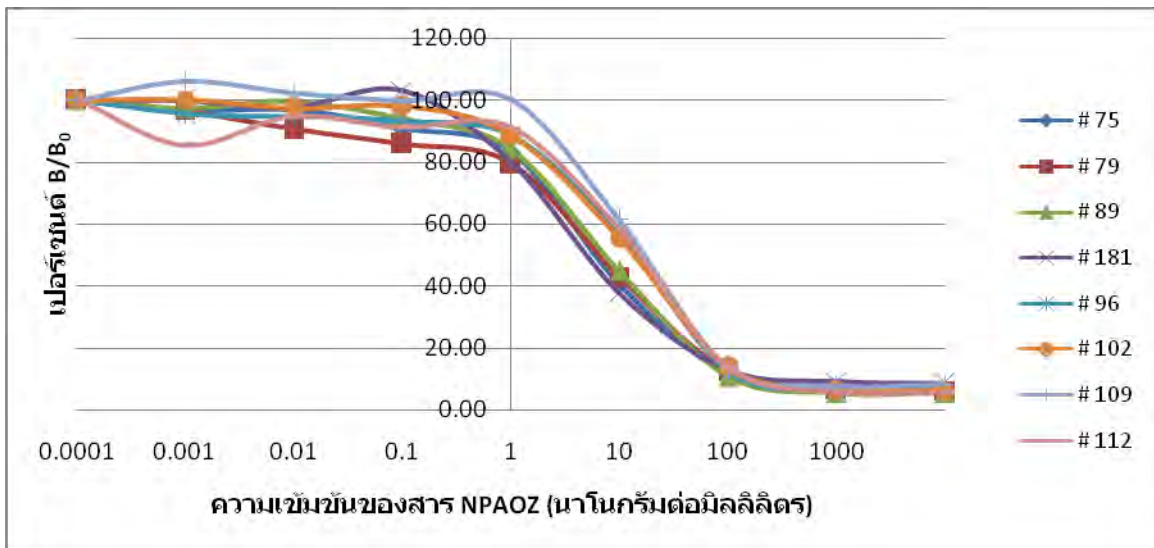
ตามลำดับ โคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D สามารถจับกับ NPAOZ ได้ดีกว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E โดยโคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.17 ,4.67 ,6.38 และ 3.87 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนโคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 10.49 ,10.27 ,11.46 และ 11.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD และ CPAOZ โดยนำค่า  $IC_{50}$  ที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม} = (IC_{50} \text{ ของสาร NPAOZ} / IC_{50} \text{ ของสารที่เกิดปฏิกิริยาข้าม}) \times 100$$

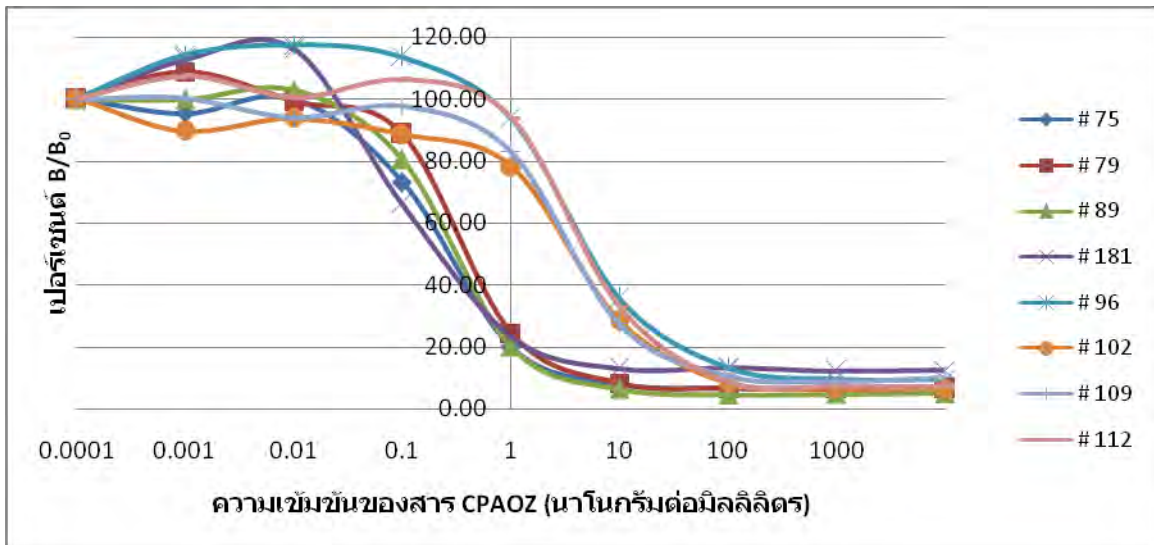
พบว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร FZD และ CPAOZ สูงกว่า โคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 และโคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีความไวในการจับกับสาร NPAOZ ,CPAOZ และ FZD สูงกว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E จึงทำการคัดเลือกโคลนหมายเลข 181 จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และ 102 จากเซลล์หลุมต้น 6/6E ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน คือ มี isotype และความไวแตกต่างกัน เพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์



รูปที่ 2 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD โดยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตารางที่ 21 แสดงค่า  $IC_{50}$  และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี indirect

competitive ELISA

หมายเลข	สารอิสระ				
	NPAOZ	FZD		CPAOZ	
	$IC_{50}$ (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)	$IC_{50}$ (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดปฏิกิริยาข้าม	$IC_{50}$ (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดปฏิกิริยาข้าม
75	5.17	0.03	$1.7 \times 10^4$	0.22	$2.4 \times 10^3$
79	4.67	0.10	$4.6 \times 10^3$	0.31	$1.5 \times 10^3$
89	6.38	0.06	$1.1 \times 10^4$	0.27	$2.3 \times 10^3$
181	3.87	0.03	$1.3 \times 10^4$	0.11	$3.5 \times 10^4$
96	10.49	40.68	25.8	3.36	$3.1 \times 10^2$
102	10.27	45.12	22.8	2.97	$3.5 \times 10^2$
109	11.46	28.69	39.9	3.25	$3.5 \times 10^2$
112	11.83	41.29	28.7	4.34	$2.7 \times 10^2$

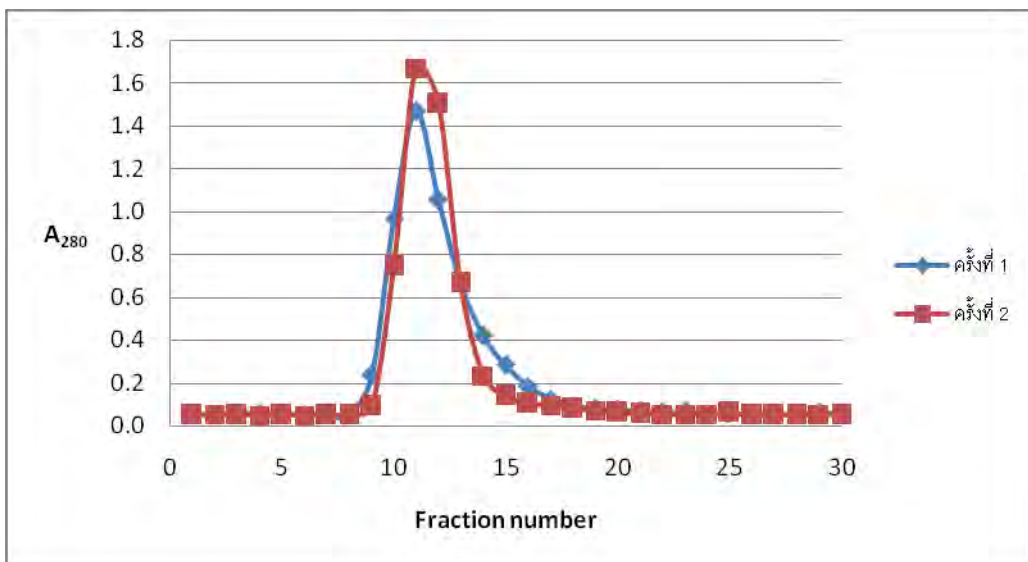
3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

เลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ ได้แก่ หมายเลข 102 และ 181 ทำการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 โคลน เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และแอนติบอดี โดยโคลนหมายเลข 102 ใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 1,100 มิลลิตร แบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน (ประมาณ 550 มิลลิตร) และโคลนหมายเลข 181 ใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ 2,200 มิลลิตร และได้ทำการทดสอบโคลนทั้ง 2 ก่อนว่าสามารถผลิตแอนติบอดีอยู่หรือไม่ โดยทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 22

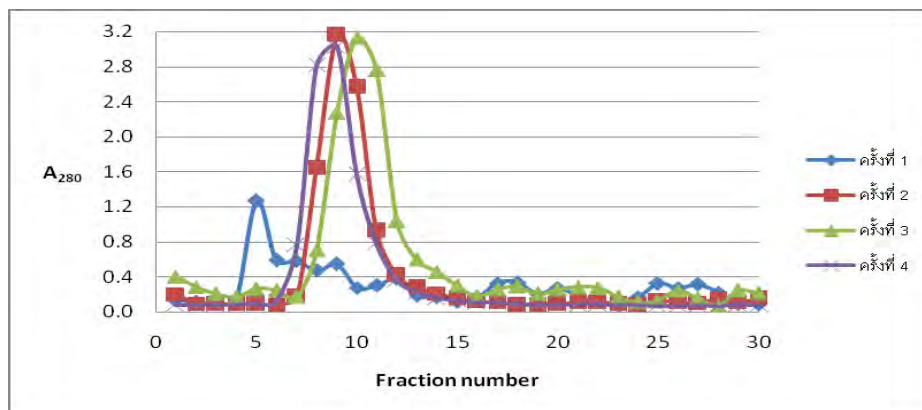
ตารางที่ 22 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ในการทดสอบอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลนหมายเลข 102 และ 181 ก่อนทำให้บริสุทธิ์

อัตราการเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	
	อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา หมายเลข 181	อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา หมายเลข 102
-	1.72	1.89
1:2	1.71	1.84
1:4	1.66	1.71
1:8	1.57	1.60
1:16	1.54	1.39
1:32	1.39	1.21
1:64	1.27	0.84
1:128	1.00	0.68
1:256	0.81	0.54
1:512	0.64	0.37
media	0.07	0.07

ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Protein G Sepharose ของเซลล์ไฮบริโดมา หมายเลข 102 และ 181 ดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ จากนั้นรวมส่วนใสของการทดลองทั้งหมดที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสูงเข้าด้วยกัน โดยโคลนหมายเลข 102 ได้ปริมาตร ครั้งที่ 1 = 10.5 มิลลิลิตร ,ครั้งที่ 2 = 10.5 มิลลิลิตร รวมเป็น 21 มิลลิลิตร และ โคลนหมายเลข 181 ครั้งที่ 1 = 8.5 มิลลิลิตร ,ครั้งที่ 2 = 17.5 มิลลิลิตร ,ครั้งที่ 3 = 13 มิลลิลิตร ,ครั้งที่ 4 = 17 มิลลิลิตร รวมเป็น 51 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA ต่อไป



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาหมายเลข 102 ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Protein G Sepharose แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



รูปที่ 6 โครมาโทแกรมการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาหมายเลข 181 ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Protein G Sepharose แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

### 3.4.6 การหาปริมาณ โปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

หาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีโดยวิธี BCA โดยใช้สารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน สำหรับทำกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 2 รูปที่ 2 ภาคผนวกและทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างเป็น 1:2 ,1:4 และ 1:8 เพื่อนำค่า  $A_{540}$  มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 ภาคผนวก โดยสามารถสรุปผลปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณโปรตีนทั้งหมดหลังจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 102 และ 181 ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 23 ผลที่ได้คือ โคลนหมายเลข 102และ181 มีปริมาณโปรตีนเป็น 2.20 และ 2.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด เป็น 46.20 และ 98.63 มิลลิกรัมตามลำดับ จึงได้ทำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลนไปทดสอบความไวในการจับกับสาร FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระต่อไป

ตารางที่ 23 แสดงผลปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว

หมายเลขโมโนโคลนอลแอนติบอดี	ปริมาตรรวม โมโนโคลนอลแอนติบอดี (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA	
		ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)
102	21	2.20	46.20
181	51	2.58	98.63

### 3.4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีมา 2 โคลน ได้แก่ 102 และ 181 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการ affinity chromatography โดยผ่านคอลัมน์ Protein G Sepharose แล้วจึงนำแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยทำการเจือจางแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ แอนติเจน AOZ-OVA ความเข้มข้น 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางแอนติบอดีที่ 1:2000 1:4000 1:8000 และ 1:16000 ทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ผลที่ได้ดังตารางที่ 24 พบว่า โคลน 102 และ 181 เลือกระดับความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม ได้เป็น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1:8000 ตามลำดับ

ตารางที่ 24 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรในการหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมด้วยวิธี indirect ELISA

รหัส โคลน	อัตราสาร เจือจาง	ความเข้มข้นของแอนติเจน : AOZ-OVA conc. (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
		2.5	2	1.5	1	0.5	0.25
102	1:2000	2.645	2.222	1.606	0.990	0.330	0.168
	1:4000	2.098	1.700	1.162	0.738	0.215	0.132
	1:8000	1.528	<b>1.255</b>	0.828	0.519	0.151	0.097
	1:16000	1.007	0.811	0.569	0.348	0.116	0.084
181	1:2000	2.601	2.310	1.990	1.598	0.838	0.482
	1:4000	2.159	1.889	1.588	1.295	0.629	0.317
	1:8000	1.532	<b>1.431</b>	1.183	0.879	0.428	0.215
	1:16000	1.011	0.928	0.772	0.587	0.265	0.153

แล้วจึงนำแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นดังกล่าวของโคลน 102 และ 181 มาทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารไนโตรฟูแรนฟูร์ลทาโคนทั้ง 3 รูป ได้แก่ NPAOZ CPAOZ และ FZD ที่อยู่ในรูปอิสระ ดังแสดงผลใน รูปที่ 7 และ 8 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 โดยสมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$IC_{50} = 50\% B/B_0$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ

$B_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน

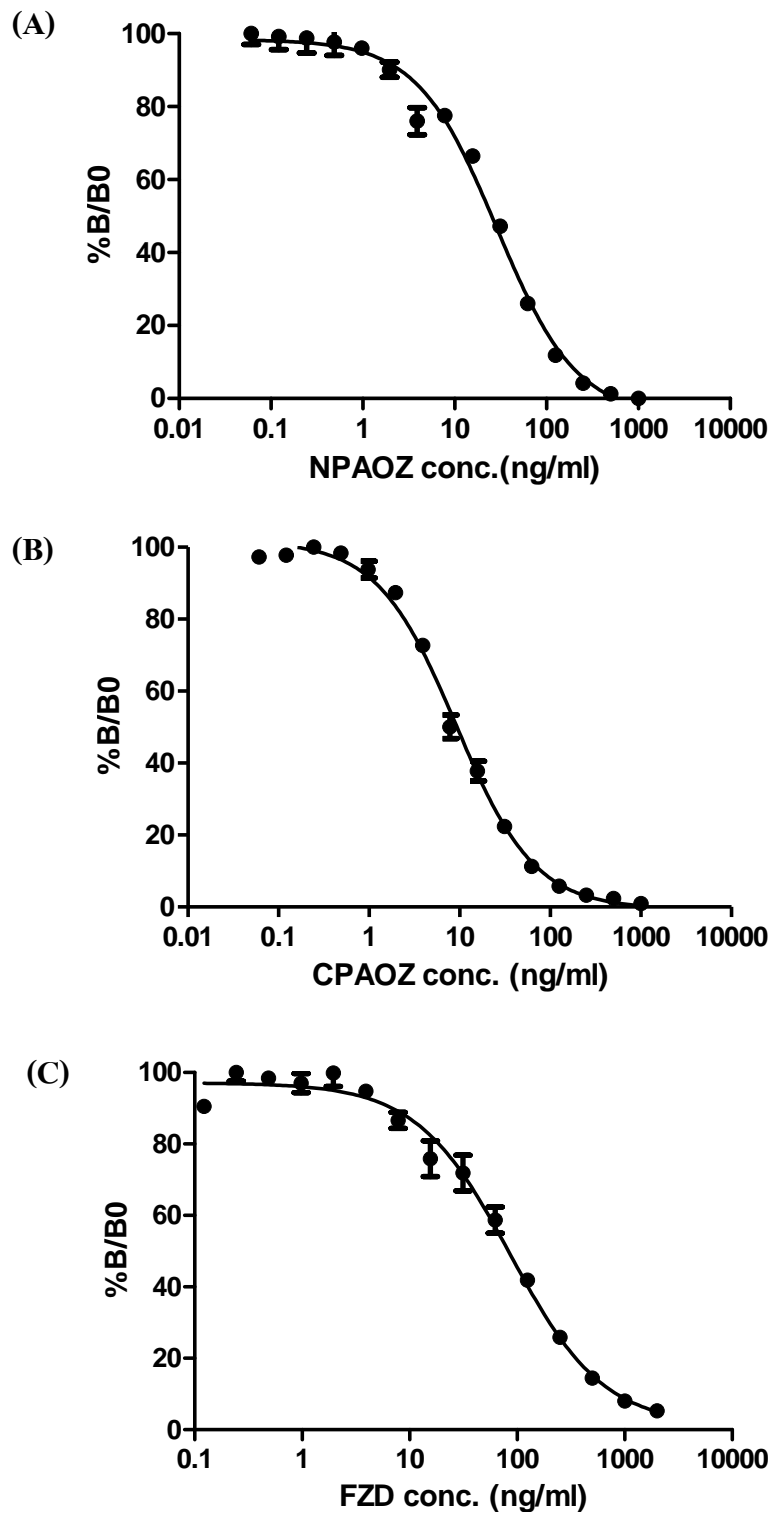
$$LOD = B_0 - 3SD$$



เมื่อ  $B_0$  คือ ค่าดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ผสมในโตรฟุแรน

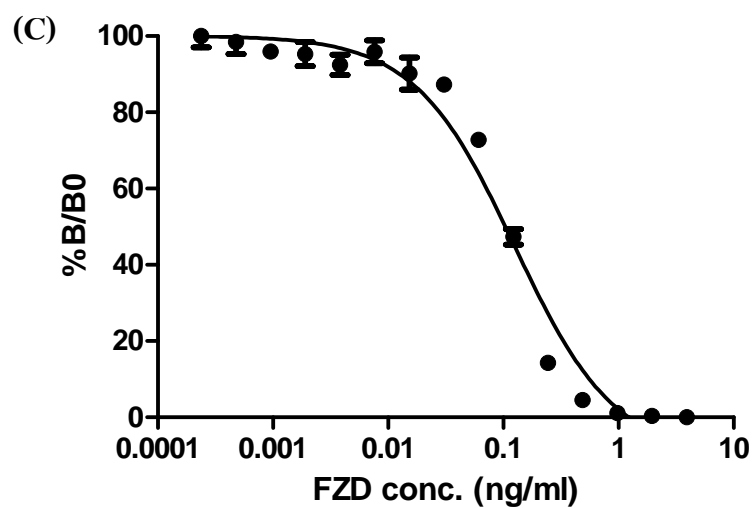
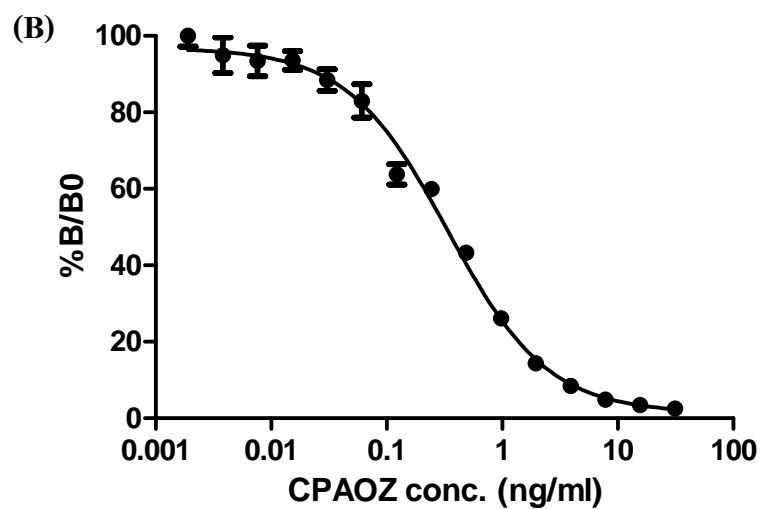
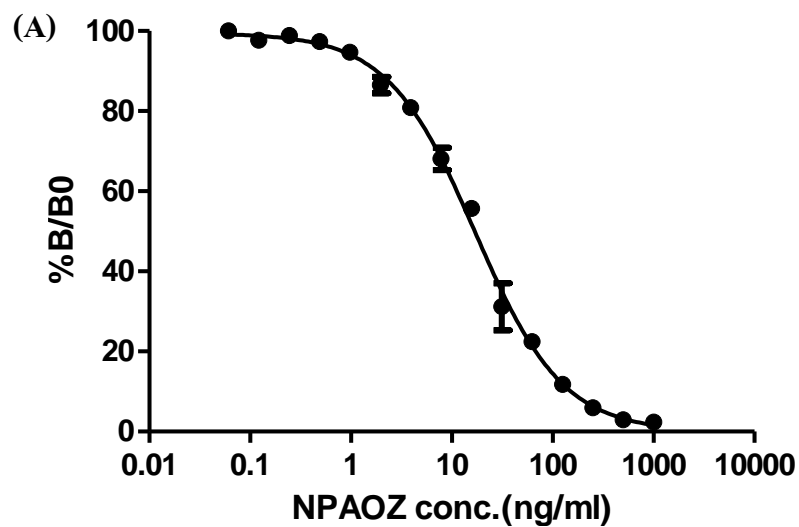
SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยแสดงเป็นค่า 50 เปอร์เซ็นต์ Inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) และ Limit of Detection (LOD) ของการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 102 และ 181 ที่ความเข้มข้น 1:8000 กับสารอิสระ NPAOZ ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^3$  -  $6 \times 10^{-2}$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร CPAOZ ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^3$  -  $6 \times 10^{-2}$  และ  $31.25$  -  $1.9 \times 10^{-3}$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ FZD ที่ความเข้มข้น  $2 \times 10^3$  -  $1.2 \times 10^{-1}$  และ 3.91-1.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับโคลน 102 และ 181 ตามลำดับโดยใช้แอนติเจน AOZ-OVA 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ได้ค่า IC<sub>50</sub> และ LOD แสดงดังตารางที่ 25 พบว่าโคลนหมายเลข 181 มีความไวต่อสารในรูปอิสระทั้ง 3 ตัว ดีกว่าโคลน 102 โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> ต่อ NPAOZ CPAOZ และ FZD เป็น 28.77, 9.11 และ 86.08 ได้ค่า LOD เป็น 2.17, 3.22 และ 3.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับโคลน 102 ได้ค่า IC<sub>50</sub> เป็น 17.66, 0.34 และ 0.13 มีค่า LOD เป็น 3.86, 0.06 และ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่า IC<sub>50</sub> และ LOD ที่ได้พบว่าโคลน 181 สามารถจับต่อสารอิสระ CPAOZ ได้ต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดคือ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> และ LOD ต่อสาร CPAOZ เป็น 0.34 และ 0.06 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 181 จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อทำเป็นชุดตรวจหาสารตกค้าง AOZ ได้ต่อไป



รูปที่ 7 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลอนอลแอนติบอดี โคลนหมายเลข 102 ที่บริสุทธิ์ ต่อตัวแข่งขันในรูปอิสระได้แก่รูป

(A) NPAOZ (B) CPAOZ (C) FZD



รูปที่ 8 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี โคลนหมายเลข181 ที่บริสุทธิ์ ต่อตัวแข่งขันในรูปอิสระได้แก่รูป

(A) NPAOZ (B) CPAOZ (C) FZD

ตารางที่ 25 แสดงค่า IC<sub>50</sub> และ LOD ของโมนโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 102 และ 181 ที่จับกับตัวแข่งขันในรูป  
อิสระ ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขันในรูปอิสระ (Competitors)	หมายเลขโมนโคลนอลแอนติบอดี			
	102		181	
	IC <sub>50</sub>	LOD	IC <sub>50</sub>	LOD
	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)
NPAOZ	28.770	2.168	17.660	3.856
CPAOZ	9.114	3.217	0.337	0.061
FZD	86.080	3.906	0.127	0.044

#### 4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจนในรูปแบบ AOZ-BSA กับ CPAOZ-cBSA พบว่า ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AOZ-BSA เมื่อทำการทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA แอนติบอดีที่ได้จะจับกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบจานทดสอบ ELISA คือ CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA แต่จะไม่จับกับ CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA และเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์จากม้ามกับมัยอิโลมาเซลล์ จะผลิตแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระอาจเนื่องมาจาก AOZ มีขนาดโมเลกุลเล็กมากเมื่อนำเชื่อมติดกับ โปรตีนพาหะซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่มากจึงอาจส่งผลให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ BSA มากกว่าทำให้เมื่อทดสอบ ELISA แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนเชื่อมติดกับ โปรตีนพาหะ BSA ที่อยู่บนจานทดสอบ ELISA ได้ดี และไม่จับกับสารอิสระที่ต้องการทดสอบ ต่างจากหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย CPAOZ-cBSA แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุม CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA หลังการหลอมรวมเซลล์จะได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับได้กับ FZD ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ โดยทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วยแอนติเจน AOZ-OVA แต่ถ้าเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ผลที่ได้คือแอนติบอดีที่ได้ไม่จับกับสาร FZD ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโครงสร้างของแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้น CPAOZ ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร FZD และ NPAOZ เมื่อใช้แอนติเจนที่เคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA แอนติบอดีจึงไปจับกับสารอิสระได้ดีกว่าแอนติเจนที่เคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA หลังจากทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่ที่ได้ทำปฏิกิริยากับสารที่ใช้ทดสอบเกือบทั้งหมด รวมทั้งสารละลาย DMF ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารที่ใช้ทดสอบ จึงทำการคัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DMF ได้แก่ โคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 ทั้งหมด จำนวน 8 โคลน เมื่อทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีไอโซไทป์เป็น IgG<sub>1</sub> และจากเซลล์หลุมต้น 6/6E มีไอโซไทป์เป็น IgG<sub>2b</sub> โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ตัว สามารถจับกับ FZD ,CPAOZ ,และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีความไวในการจับกับสาร FZD ,CPAOZ และ FZD ได้ดีกว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E เลือกโคลนที่มีความไวสูงสุดในแต่ละเซลล์หลุมต้นอย่างละ 1 โคลน ได้แก่ โคลนหมายเลข 181 จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และ โคลนหมายเลข 102 จากเซลล์หลุมต้น 6/6E ซึ่งมีความไวในการจับกับ NPAOZ สูงสุด คือมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.87 และ 10.27 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยวิธี affinity chromatography เพื่อใช้งานและทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี ผลที่ได้คือ โมโนโคลน 181 และ 102 ที่บริสุทธิ์จะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2.58 และ 2.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความไวต่อสารอิสระของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 181 และ 102 จะมีความไวต่อสารอิสระ CPAOZ NPAOZ และ FZD ซึ่งโคลน 181 จะมีความไวสูงสุดโดยให้ค่า IC<sub>50</sub> ต่อสารอิสระดังกล่าวเป็น 0.34 17.66 และ 0.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับมีค่าปริมาณของสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เป็น 0.06 3.86 และ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งมีความไวเพียงพอสำหรับใช้พัฒนาต่อในการทำชุดตรวจทดสอบสารตกค้าง AOZ ซึ่งค่ามาตรฐาน (MRLs) ที่กำหนดโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้กำหนดให้ค่า MRLs ของสารตกค้าง AOZ อยู่ที่ 1

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) สรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารตกค้าง AOZ ที่ตกค้างในอาหารเพื่อการบริโภคได้ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวและความจำเพาะต่อสารเมแทบอลิต์ในโตรฟูแรนฟูราโซลิโดน เพียงพอโดยสามารถตรวจวัดสารดังกล่าวในรูปอิสระได้ปริมาณต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนด

## บรรณานุกรม (Bibliography)

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ(มอกช.9007-2548).2551.เรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยของสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Angelini, N. M., Rampini, O. D., and Mugica, H. 1997. Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurantoin Residues in Bovine Muscle Tissues. *J. AOAC Int.* 80(3): 481-485.

Bryan, G. T. 1978. Nitrofurans: chemistry, metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Raven Press, New York : 3-9.

Conneely, A., Nugent, A., Keefe, M. O., Mulder, P.P.J., Rhijn, J.A. v., Kovacsics, L., Fodor, A., McCracken, R.J., and Kennedy, D.G. 2003. Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectro-metric detection. *Anal. Chim. Acta.* 483: 91-98.

Cooper, K. M., Caddell, A., Elliott, C.T., and Kennedy, D. G. 2004. Production and characterization of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurantoin furazolidone. *Anal. Chim. Acta.* 520: 79-86.

Cooper, K. M., and Kennedy, D. G. 2005. Nitrofurantoin antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs—a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurantoin abuse. *Analyst.* 130: 466-468.

Delatour, T., Gremaud, E., Mottier, P., Richoz, J., Vera, F. A., and Stadler, R. H. 2003. Preparation of Stable Isotope-Labeled 2-Nitrobenzaldehyde Derivatives of Four Metabolites of Nitrofurantoin Antibiotics and Their Comprehensive Characterization by UV, MS, and NMR Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6371-6379.

Diaz, T. G., Cabanillas, A. G., Valenzuela, M.I. A., Correa, C.A., and Salinas, F. 1997. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 764: 243-248.

Diblikova, I., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Franek, M. 2005. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurantoin metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation. *Anal. Chim. Acta.* 540: 285-292.

Franek, M., and Hruska, K. 2005. Antibody based methods for environmental and food analysis: a review. Vet. Med. 50(1): 1–10.

Keefe, M. O., Conneely, A., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Kovacsics, L., Andrea, F., Mulder, P.P.J., van Rhijn, J.A., Trigueros, G. 2004. Nitrofurantoin residues in pork The FoodBRAND retail survey. Anal. Chim. Acta. 520: 125-131.

Kumar, L., Toothill, J. R., and Ho, K. B. 1994. Determination of nitrofurantoin residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. J. AOAC Int. 77(3): 591-595.

Leitner, A., Zollner, P., and Lindner, W. 2001. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J.Chromatography. A. 939: 49-58.

Lipmto, J. M., Arriba, A. F., Tiptonf, K. F., and Unqeta, M. 1996. Inhibition of Bovine Lung SCAicarbazine Sensitive Amine Oxidase (SSAO) by Some Hydrazine Derivatives. Biochemical Pharmacology. 52:187-195.

Rupp, H. S., Munns, R. K., and Long, A. R. 1994. Simultaneous determination of nitrofurantoin, nitrofurazone, and furazolidone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue by liquid chromatography. J.AOAC Int. 77(2): 344-350.

Situ, C., and Elliott, C. T. 2005. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. Analytica Chimica Acta 529: 89-96.

Pimpitak, U., Puthong, S., Komolpis, K., Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

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



## ภาคผนวก (Appendix)

## โคลนที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากหนูชุดที่ 5

No.	Clone	No.	Clone	No.	Clone
1	6/12E/12A/12H/4D	30	2/9A/4A/7F/10D	59	2/9A/6E/12A/2F
2	6/12E/12A/12H/5E	31	2/9A/4A/8E/11D	60	2/9A/6E/12E/3G
3	6/12E/7B/3A/8D	32	2/9A/4A/8E/12C	61	2/9A/6E/12E/4G
4	6/12E/7B/3A/9D	33	2/9A/2G/1E/1G	62	2/9A/2G <sub>1</sub> /3A/5G <sub>1</sub>
5	6/1D/3H/2G/1E	34	2/9A/2G/1E/2G	63	2/9A/2G <sub>1</sub> /3A/6H
6	6/1D/3H/2G/2C	35	2/9A/2G/1E/3F	64	2/9A/9C/6H/7H
7	6/1D/3H/3F/4B	36	2/9A/2G/1F/4F	65	2/9A/9C/6H/8G
8	6/1D/3H/9F/6G	37	2/9A/2G/1F/5E	66	2/9A/11A/9A <sub>1</sub> /9H <sub>1</sub>
9	6/1D/3H/12B/8D	38	2/9A/2G/1F/6F	67	2/9A/11A/9A <sub>1</sub> /10F
10	6/1D/3H/12B/9E <sub>1</sub>	39	2/9A/4A/5E/7F	68	2/9A/11B/10H <sub>1</sub> /11H
11	6/1D/3H/12G/11D	40	2/9A/4A/5E/8F	69	2/9A/11B/10H <sub>1</sub> /12G
12	6/1D/3H/12G/12E	41	2/9A/4A/5E/9E	70	6/1D/1H/6F/5G
13	6/1D/11A/12A/1H	42	2/9A/4A/5G/10F	71	6/1D/2A/8F/7F
14	6/1D/11A/12D/4E	43	2/9A/4A/5G/11G <sub>1</sub>	72	6/1D/2A/8F/8H
15	6/1D/11A/12D/5F <sub>1</sub>	44	2/9A/4A/5G/11H <sub>1</sub>	73	6/1D/2H/11A/10D <sub>1</sub>
16	6/1D/11A/12D/6E	45	2/9A/4A/5G/12F	74	-
17	6/1D/5G/5A/3F	46	2/9A/5D/9H/1G	75	8/12D/2F/2G <sub>1</sub> /2F <sub>1</sub>
18	6/1D/5G/1D/2E	47	2/9A/5D/10A/2F	76	8/12D/3H/3G <sub>1</sub> /3F
19	6/1D/5G/1G/8E <sub>1</sub>	48	2/9A/5D/10C/3F	77	8/12D/3H/3G <sub>1</sub> /4E
20	6/1D/5G/1G/9E <sub>1</sub>	49	2/9A/5D/10F/4F	78	8/12D/3H/4G <sub>1</sub> /6G
21	2/9A/2G/2H/1F	50	2/9A/5D/10H/5F	79	8/12D/4A/6G <sub>1</sub> /7H
22	2/9A/2G/2H/2E	51	2/9A/5D/10H/6F	80	8/12D/4A/6G <sub>1</sub> /8H
23	2/9A/2G/3C/3E	52	2/9A/5D/11C/7G	81	8/12D/5F/7G/9H
24	2/9A/2G/3C/4D	53	2/9A/5D/11C/8F	82	8/12D/5F/7G/10H
25	2/9A/2G/4A/5E	54	2/9A/5D/12A/9H	83	8/12D/5F/8F/11H
26	2/9A/2G/4A/6F	55	2/9A/5D/12A/10H	84	8/12D/5F/8F/12H
27	2/9A/4A/6H/7E	56	2/9A/5D/12D/11H	85	8/12D/5F/9F/1G
28	2/9A/4A/6H/8D	57	2/9A/5D/12D/12G	86	8/12D/5F/9F/3G
29	2/9A/4A/7F/9E	58	2/9A/6E/12A/1G	87	8/12D/6D/10H/4G

## ภาคผนวก (ต่อ)

## โคลนที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากหนูชุดที่ 5

No.	Clone	No.	Clone	No.	Clone
88	8/12D/6D/10H/5G	117	4/11H/7C/1F/3H <sub>1</sub>	146	7/10F/1D/12F <sub>1</sub> /10H
89	8/12D/6D/11G/7F <sub>1</sub>	118	4/11H/7C/1F/4G	147	7/10F/1D/12F <sub>1</sub> /11H
90	8/12D/6D/11G/9F <sub>1</sub>	119	4/11H/7E/6G/5F	148	7/10F/1D/12F <sub>1</sub> /12H
91	8/12D/6D/12G/11H	120	4/11H/7E/6G/6H	149	7/10F/1C/1F/1F <sub>1</sub>
92	8/12D/6D/12G/12H	121	4/11H/7E/6G/7G	150	7/10F/1C/1F/2G
93	6/6E/8B/3H <sub>1</sub> /1G	122	4/11H/7E/6G/8G	151	7/10F/1C/1F/3H
94	6/6E/8B/3H <sub>1</sub> /2F	123	4/11H/8F/7E/9G <sub>1</sub>	152	7/10F/1C/1G <sub>1</sub> /4H
95	6/6E/8F/4F <sub>1</sub> /3H	124	4/11H/8F/7E/10H <sub>1</sub>	153	7/10F/1C/1G <sub>1</sub> /5H
96	6/6E/8F/4F <sub>1</sub> /4G <sub>1</sub>	125	4/11H/8F/7E/11G	154	7/10F/1C/1G <sub>1</sub> /6H
97	6/6E/8F/6G <sub>1</sub> /5H	126	4/11H/8F/7E/12H	155	7/10F/1C/2F <sub>1</sub> /7H
98	6/6E/8F/6G <sub>1</sub> /6H	127	4/11H/8F/8E/1F	156	7/10F/1C/2F <sub>1</sub> /8G
99	6/6E/9D/9H <sub>2</sub> /8H	128	4/11H/8F/8E/2G <sub>1</sub>	157	7/10F/1C/2F <sub>1</sub> /9H <sub>1</sub>
100	6/6E/9D/9H <sub>2</sub> /9H	129	4/11H/8F/8E/4G <sub>1</sub>	158	-
101	6/6E/10C/10F <sub>1</sub> /10H	130	4/11H/8F/9F/6H	159	7/10F/1C/4F <sub>1</sub> /11E
102	6/6E/10C/10F <sub>1</sub> /11G <sub>1</sub>	131	4/11H/8F/9F/7H	160	7/10F/1C/4F <sub>1</sub> /12H <sub>1</sub>
103	6/6E/10G/1F/1F	132	4/11H/8F/9F/8H	161	4/10G/7E/5F/6D <sub>1</sub>
104	6/6E/10G/1F/2H <sub>1</sub>	133	4/11H/12H/12E/9F	162	4/10G/7E/5F/7D <sub>1</sub>
105	6/6E/10H <sub>1</sub> /6G <sub>1</sub> /3H	134	4/11H/12H/12E/10E	163	4/10G/7E/5F/7G <sub>1</sub>
106	6/6E/10H <sub>1</sub> /6G <sub>1</sub> /4H	135	4/11H/12H/12E/11F	164	4/10G/7E/5F/8E <sub>1</sub>
107	6/6E/11B/8G <sub>1</sub> /5H	136	4/11H/12H/12E/12G <sub>1</sub>	165	4/10G/7E/5F/8H <sub>1</sub>
108	6/6E/11B/8G <sub>1</sub> /6F	137	4/11H/8F/9F/5H	166	4/10G/7E/6G/10F
109	6/6E/11B/9G <sub>1</sub> /7H	138	7/10F/1C/6F <sub>1</sub> /1G	167	2/11E/7G/1G/2B
110	6/6E/11B/9G <sub>1</sub> /8G	139	7/10F/1C/6F <sub>1</sub> /2H	168	2/11E/7G/1G/2G
111	6/6E/11E/11F/9H	140	7/10F/1C/6F <sub>1</sub> /3H <sub>1</sub>	169	2/11E/7G/1G/4A
112	6/6E/11E/11F/10H <sub>1</sub>	141	7/10F/1D/10E/4G	170	2/11E/7G/1G/4H
113	6/6E/8B/3G <sub>1</sub> /11H	142	7/10F/1D/10E/6G	171	2/11E/7G/2G <sub>1</sub> /6E
114	6/6E/8B/3G <sub>1</sub> /12H	143	7/10F/1D/11E/7G	172	2/11E/7G/2G <sub>1</sub> /7D <sub>1</sub>
115	4/11H/7C/1F/1H	144	7/10F/1D/11E/8F	173	2/11E/7G/2G <sub>1</sub> /7E <sub>1</sub>
116	4/11H/7C/1F/2G <sub>1</sub>	145	7/10F/1D/11E/9G	174	2/11E/7G/2G <sub>1</sub> /8E <sub>1</sub>

## ภาคผนวก (ต่อ)

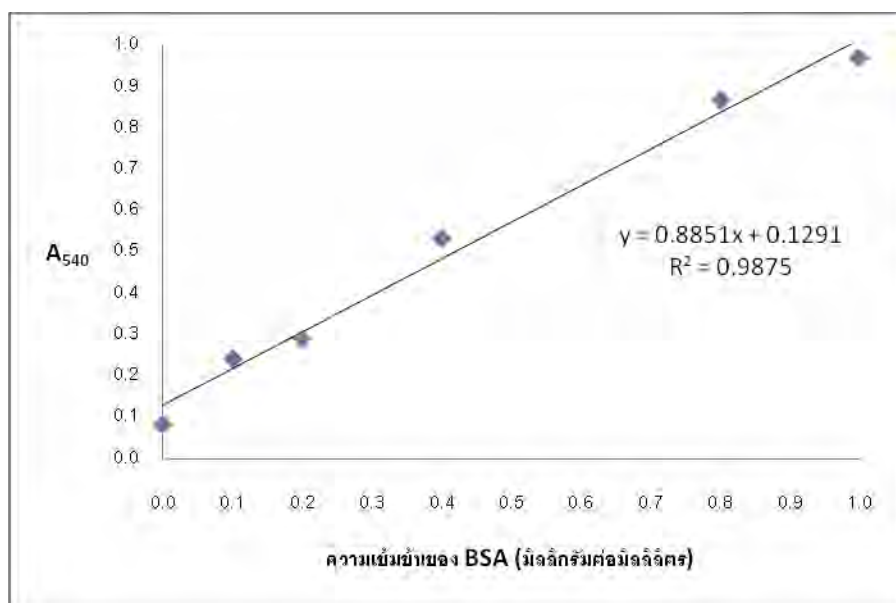
## โคลนที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากหนูชุดที่ 5

No.	Clone	No.	Clone	No.	Clone
175	2/11E/7G/3F/10F	191	7/10F/4D/1E/1H	208	2/11E/11F/11D/10H
176	2/11E/7G/3F/10H	192	7/10F/4D/2E/2G	209	2/11E/11F/12F/11G
177	2/11E/7G/3F/11B	193	7/10F/4F/3E/3H	210	2/11E/11F/12F/12H
178	2/11E/7G/3F/12D	194	7/10F/4F/4G <sub>1</sub> /4E	211	4/11H/8C/1F/1H
179	8/12D/2H/1F/1F	195	7/10F/4C/5D/5F	212	4/11H/8D/2H/2F
180	8/12D/2H/1F/3C	196	7/10F/4C/6C/6C <sub>1</sub>	213	4/11H/8E/3F <sub>1</sub> /3E
181	8/12D/2H/1F/4C	197	7/10F/5B/7D/7G	214	4/11H/9F/10E/4D
182	8/12D/2H/1F/4H	198	7/10F/5B/7G/8F	215	4/11H/9G/5F/5F
183	-	199	7/10F/5D/9F <sub>1</sub> /9G	216	4/11H/10F/6G <sub>1</sub> /6F
184	8/12D/5A/6G/6B	200	7/10F/5D/10G <sub>1</sub> /10H	217	4/11H/10G/7F <sub>1</sub> /7F <sub>1</sub>
185	8/12D/5A/6G/6C	201	7/10F/6A/11C/11D	218	4/11H/10G/8F/8C
186	8/12D/5A/6G/6H	202	7/10F/6C/12D <sub>1</sub> /12H	219	4/11H/10G/10G/10F
187	8/12D/5A/6G/8H	203	2/11E/9G/1F/1E	220	4/11H/10G/11F/11E
188	8/12D/5B/9G/9D	204	2/11E/9G/2F/2G	221	4/11H/10G/12F/12G
189	8/12D/5B/9G/10B	205	2/11E/9G/3E/3H		
190	-	206	2/11E/11C/9F/8G		

## ภาคผนวก (ต่อ)

ตารางที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานBSA

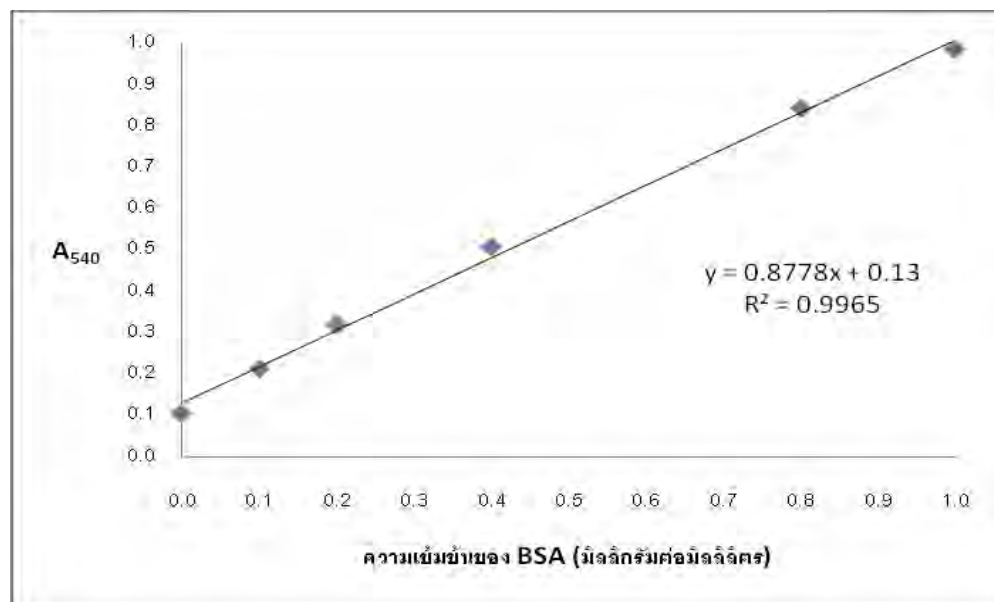
ปริมาณโปรตีน BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.085	0.083	0.084
0.1	0.188	0.292	0.240
0.2	0.278	0.306	0.292
0.4	0.551	0.516	0.534
0.8	0.836	0.897	0.867
1.0	1.000	0.942	0.971



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA

ตารางที่ 2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานBSA

ปริมาณโปรตีน BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.106	0.104	0.105
0.1	0.217	0.210	0.214
0.2	0.322	0.314	0.318
0.4	0.508	0.510	0.509
0.8	0.829	0.857	0.843
1.0	1.005	0.967	0.986



รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA

ตารางที่ 3 แสดงค่าปริมาณโปรตีนของโคลนหมายเลข 102 และ 181 ที่ได้จากวิธี BCA

clone	Dilution	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย
<b>102</b>	1:2	1.145	1.035	1.090	2.19	<b>2.20</b>
	1:4	0.623	0.629	0.626	2.26	
	1:8	0.366	0.367	0.367	2.16	
<b>181</b>	1:2	1.139	1.165	1.152	-	<b>2.58</b>
	1:4	0.710	0.688	0.699	2.58	

## ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

### 1. หัวหน้าโครงการ

1.1 ชื่อ-สกุล นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

Ms. Umaporn Pimpitak

1.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 911

1.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

1.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

E-mail [umaporn.p@chula.ac.th](mailto:umaporn.p@chula.ac.th)

### 1.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2549
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล	ปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542

### 1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การพัฒนาชุดตรวจแบบ ELISA การพัฒนาชุดตรวจโดยใช้หลักการ Immunochromatographic strip assay

### 1.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

1.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

1.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

**Pimpitak, U., Puthong, S., Komolphis, K., Petsom, A., and Palaga, T. (2009).**Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimps samples. Food Chemistry.116: 785-791.

Wongtangprasert, T., Natakuathung, W., **Pimpitak, U., Buakeaw, A., Palaga, T., Komolphis, K. and Khongchareonporn, N. (2014).** Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 15(2) : 165 – 172 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

Sangdokmai, A., **Pimpitak, U., Buakeaw, A., Palaga, T., and Komolphis, K. (2011).**Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

Tesvichian, S., Komolphis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., **Pimpitak, U., and Buakeaw, A.** Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

โครงการวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1) การพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

(แหล่งทุน-โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติคลังเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง(Project954-1023)สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

2)โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โปรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์



แอสเสย์” (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 55-56 (ผู้ร่วมโครงการ)

3) โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน”

(แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 56-57 (หัวหน้าโครงการ)

4) โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคมีคาร์บาไซด์”

(แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 56-57 (ผู้ร่วมโครงการ)

โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

โครงการ การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโค (80%)

(แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 57-58 (หัวหน้าโครงการ)

## 2. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1

2.1 ชื่อ-สกุล

นางทรงจันทร์ ภูทอง

Mrs.Songchan Puthong

2.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0

2.3 ตำแหน่งทางวิชาการ

นักวิจัย ระดับ ชำนาญการพิเศษ

2.4 หน่วยงาน

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์

02-218-8076

โทรสาร

02-253-3543

E-mail

[songchan.p@chula.ac.th](mailto:songchan.p@chula.ac.th)

## 2.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2539
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2529

## 2.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

การเตรียมและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการขยับยั้งเซลล์มะเร็ง

## 2.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

2.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับ โดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

2.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Roengsumran, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Nilaiwan, T., Ngamrojnavanich, N., Chaichantipyuth, C. and **Puthong, S.** (2001) Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* 56: 103 – 107.

2. Chaichantipyuth, C., Tiaworanon, S., Mekaroonreung, S., Ngamrojnavanich, N., Roengsumran, S., **Puthong, S.**, Petsom, A. and Ishikawa, T. (2001) Oxidized heptenes from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry* 58: 1311 – 1315.

3. Roengsumran, S., Musikul, K., Petsom, A., Vilaivan, T., Sangvanich, P., Pornpakakul, S., **Puthong, S.**, Chaichantipyuth, C., Jaiboon, N., Chaichit, N. (2002) Croblonhifolin, a new anticancer Clerodane from *Croton oblongifolius*. *Planta Medica* 68: 274 – 277.

4. Ngamrojnavanich, N., Tonsiengsom, S., Lertpratchya, P., Roengsumran, S., **Puthong, S.**, and Petsom, A. (2003) Diterpenoids from the Stem Barks of *Croton robustus*. Archives of Pharmacal Research 26(11): 898 – 901.
5. Roengsumran, S., Pornpakakul, S., Muangsin, N., Sangvanich, P., Nhujak, T., Singtothong, P., Chaichit, N., **Puthong, S.**, Petsom, A. (2004) New Halimane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Planta Med 70:1 - 3.
6. Chaichantipyuth, C., Taweechoitipatr, P., Petsom, A., **Puthong, S.**, Roengsumran, S., Watanabe, T. and Ishikawa, T. Chemical constituents of *Croton Oblongifolius*. 1000715 Proceeding 1004 JSPS-NRCT.
7. Tungpradabkul, S., Sandee, D., **Puthong, S.** and Laohathai, K. (2005) Construction of scFv derived from a tumor-associated monoclonal antibody having tumoricidal activity on human hepatocellular carcinoma. Molecular Immunology 42: 713 – 719.
8. Chaichatipyuth, C., Petsom, A., Taweechoitipatr, P., Muangsin, N., Chaichit, N. **Puthong, S.**, Roengsumran, S., Kawahata, M., Watanabe, T. and Ishikawa, T. (2005) New labdane-type diterpenoids from *Croton oblongifolius* and their cytotoxic activity. HETEROCYCLES 65(4): 809 – 822.
9. Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojnavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2006) Cytotoxic Activity of Four Xanthenes from *Emericella varicolor* an Endophytic Fungus Isolated from *Croton oblongifolius*. Archives of Pharmacal Research 29(2): 140 – 144.
10. Mattanavee, W., Suwanton, O., **Puthong, S.**, Bunaprasert, T., Hoven, P.V. and Supaphol, P. (2009) Immobilization of Biomolecules on the Surface of Electrospun Polycaprolactone Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. ACS APPLIED Materials & Interfaces 1(5): 1076 – 1085.
11. Pimpitak, U., **Puthong, S.**, Komolpis, K., Petsom, A. and Palaga, T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp. Food Chemistry 116: 785 – 791.
12. **Puthong, S.**, Rojpiulstitt, P. and Buakeaw, A. (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. Thammasat Int. J. Sc. Tech. 14(1): 95 – 104.
13. Umthong, S., **Puthong, S.** and Chanchao, C. (2009) *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand : Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. The American Journal of Chinese Medicine. 37(5): 855 – 865.

14. Roengsumran, S., Pata, P., Ruengraweewat, N., Tummatom, J., Pornpakakul, S., Sangvanich, P., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2009) New Cleistanthane Diterpenoids and 3,4-seco-Cleistanthane Diterpenoids from *Croton cblongifolius*. Chemistry of Natural Compounds. 45(5): 641 – 646.

15. Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., **Puthong, S.** and Palaga, T. (2010) Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 16: 567 – 571.

#### 1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน
2. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร
3. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์

### 3. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

#### 3.1 ชื่อ-สกุล

นายกิตตินันท์ โกมลภิส

Mr. Kittinan Komolpis

#### 3.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

#### 3.3 ตำแหน่งทางวิชาการ

อาจารย์

#### 3.4 หน่วยงาน

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

#### โทรศัพท์

02-218-8078

#### โทรสาร

02-253-3543

#### E-mail

[kittinan.k@chula.ac.th](mailto:kittinan.k@chula.ac.th)

### 3.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาเอก	Chemical Engineering	2545
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาโท	Chemical Engineering	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2532

### 3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

### 3.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : การผลิตกรดอะมิโนโดยยีสต์ที่ขึ้นกับกับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ได้รับการสนับสนุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549)

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลละตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2548 และ 2549)

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคลือบเทอร์โรล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay (ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2549-2551)

การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนที่ออสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน และ 3-อะมิโน-5-เมอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2550-2552)

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. **Komolpis, K.**, Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16: 567-571
2. Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K.**, Petsom, A., Palaga T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. *Food Chemistry* 116: 785-791
3. Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K.** and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14: 202-206
4. **Komolpis K.**, Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. *Biotechnology Progress*, 18:641-646.
5. Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*). *Biotechnology Progress*; 17:421-430.
6. Wu E., **Komolpis K.**, Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. *Biotechnology Techniques*, 13:567-569.
7. **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Wang H.Y. 1998. Chemical permeabilization and *in situ* removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds. *Biotec. Techniques*, 12:697-700.

### 3.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแคนโทอิน
2. การพัฒนาชุดตรวจสารแคลบูทาลอดด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์
3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร
4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพเรสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์

### 4. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 3

4.1 ชื่อ-สกุล                      ดร. นันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)

Dr. Nanthika Khongchareonporn (Panchan)

4.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 6399 00091 73 5

4.3 ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

4.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 โทรสาร 02-253-3543

E-mail [nanthika.k@chula.ac.th](mailto:nanthika.k@chula.ac.th)

#### 4.5 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2539	ตรี	วท.บ.	ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2542	โท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2547	เอก*	วท.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

#### 4.6 สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Immunology: Monoclonal Antibody Production, Protein Purification

#### 4.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

4.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

4.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพ็ชร์ทราย

การผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุด

ตรวจสอบด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ (ปีที่ 1)

#### 4.7.3 งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว

##### ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. 2011. Nutritional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Animal Feed Science*. 169:265-269
2. Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat S. 2011. Detection by using monoclonal antibodies of *Yersinia enterocolitica* in artificially contaminated pork. *Microbiology and Immunology*. 55: 605-615.
3. **Panchan N**, Sithigorngul P, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia*. 31: 29-35.
4. **Panchan N**, Bendena WG, Browser P, Lungchukiet P, Tobe SS, Sithigorngul W, Chaivisurhangkuru P, Rangsiruji A, Pewnim T and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 24(10):1563-1570.
5. Sithigorngul P, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 23: 1934-1952
6. Sithigorngul P, Pupurm J, Krungkasem C, Longyant S, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P and Sithigorngul W. 2002. Four novel PYFs: members of NPY /PP peptide superfamily from the the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 23: 1895-1906.
7. Sithigorngul P, Saraithongkum W, Longyant S, **Panchan N**, Sithigorngul W and Petsom A. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Peptide*. 22 : 191-197.
8. Sithigorngul P, **Panchan N**, Vilaivan T, Sithigorngul W and Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol B*. 124 : 73-80.



*Proceeding*

1. Noiprapai K, **Khongchareonporn N** and Rengpipat S. 2011. Production of monoclonal antibodies against *Vibrio parahaemolyticus*. The 23 Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand.
2. Nuntanidvorakul P, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1<sup>st</sup> ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.
3. Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.
4. Tesvichian S, Komolpis K, **Khongchareonporn N**, Puthong S, Pimpitak U and Buakeaw A. Development of tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 3th Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). 4-6 March 2010. Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand.
5. **Khongchareonporn N**, Komolpis K and Puthong S. Production and Characterization of monoclonal antibodies against oxytetracycline. The 1<sup>st</sup> CMU Graduate Research conference . 27th November 2009. Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.
- 6 . Kanchanabanca C, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9<sup>th</sup> National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.
7. Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. Production of monoclonal antibodies against *Yersinia enterocolitica*. 9<sup>th</sup> National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 120.
8. Kongkaviton P, **Khongchareonporn N** and Komolpis K. Production and characterization

of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138.

9. Saneewong S, **Khongchareonporn N** and Komolpis K. Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14<sup>th</sup>- 17<sup>th</sup>,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129.

#### Poster

1. Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaichareonpong C, Aranyakananda P,

Chunhabandit S and Petsom A. Proximate composition of farmed and wild sandworms (*Perinereis nantia* Savigny). 4th International Greek Biotechnology Forum. 2-3 February 2008. Zappeio, Megaro, Athens.

#### 4.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจสอบแรกโตปามีนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แห่ง

ทุน มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2555 การวิจัยคู่ลงไปแล้วประมาณร้อยละ 70

2.การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงคิมมูโนซอร์เบนทีเอสเสย์ (ELISA) แห่งทุน

งบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 การวิจัยคู่ลงไปแล้วประมาณร้อยละ 50

#### 5. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 4

5.1 ชื่อ-สกุล

นายอนุมาศ บัวเขียว

Mr. Anumart Buakeaw

5.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3

5.3 ตำแหน่งทางวิชาการ

นักวิจัย

5.4 หน่วยงาน

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

E-mail [anumart.b@chula.ac.th](mailto:anumart.b@chula.ac.th)

## 5.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2545
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2541

## 5.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

## 5.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

5.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

5.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

5.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Puthong, S., Rojpiulstitt, P. and **Buakeaw, A.** (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. *Thammasat Int. J. Sc. Tech.* 14(1): 95 – 104.

2. Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. *Fitoterapia.* 82 : 1047 -1051.

5.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิ

โนไฮแคนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสอบการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร
4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์