การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

นางสาว ปิยะนุช เรืองศรีอรัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-17-5380-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CLENBUTERL

Miss Piyanush Ruangsriaran

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-5380-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล
โดย	นางสาว ปิยะนุช เรืองศรีอรัญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
	นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทน
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตศานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นางทรงจันทร์ ภู่ทอง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิยะนุช เรืองศรีอรัญ : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CLENBUTEROL) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, ทรงจันทร์ ภู่ทอง, 90 หน้า.
ISBN 974-17-5380-2

เคลนบูเทอรอลเป็นสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ชื่อทางเคมีคือ 4-amino-α-tert-butylaminomethyl-3,5-dichlorbenzyl alcohol hydrochloride สูตรทางเคมี คือ $C_{12}H_{18}C_{l2}N_2O.HCl$ ใช้เป็นยารักษาโรคหอบหืดและโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ เนื่องจากสารนี้มีผลทำให้ลดการสังเคราะห์ไขมันและเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน จึงถูกนำไปใช้ผสมในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญของสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อใช้เนื้อในการบริโภค จึงมีความเสี่ยงที่จะมีสารเคลนบูเทอรอลตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงได้มีการจำกัดปริมาณต่ำสุดที่ยอมรับได้ของเคลนบูเทอรอลที่ตกค้างในอาหารบริโภค

ในการวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล เพื่อนำแอนติบอดีไปผลิตเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจปริมาณเคลนบูเทอรอลโดยใช้หลักการ ELISA ในการเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลนั้นได้ทำการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมด 4 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล 7 โคลน คือ โคลนรหัส 3/9B 1/7C 1/11G 3/9A 3/6C 6/11D และ 6/11G จากการศึกษาสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดมีไอโซไทป์ เป็น IgG1 จากการหาค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่า มีค่า IC50 อยู่ระหว่าง 0.08-0.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มีค่า LOD อยู่ระหว่าง 5-198 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการหาค่า IC50 และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A ที่ทำให้บริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 4 และ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ระดับหนึ่ง ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา....2548....

ลายมือชื่อนิสิต.....ปิยะนุช เรืองศรีอรัญ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ธนาภัทร ปาลกะ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ทรงจันทร์ ภู่ทอง.....

4672334123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: CLENBUTEROL / β-AGONIST / MONOCLONAL ANTIBODY / ELISA

PIYANUSH RUANGSRIARAN : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CLENBUTEROL. THESIS ADVISOR : ASSTST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph. D. THESIS COADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph. D., SONGCHAN PUTHONG, M. Sc., 90 pp. ISBN 974-17-5380-2.

Clenbuterol, 4-amino-α-tert-butylaminomethyl-3,5-dichlorbenzyl alcohol hydrochloride, belongs to a group of β-agonists with chemical formular $C_{12}H_{18}C_{l2}N_2O.HCl$. It has been used for the treatment of asthma and other respiratory conditions. Due to its effect in reducing fat deposition and enhancing protein synthesis, it has been used in feed for animals as a growth promoter in meat production. Therefore, clenbuterol residues could potentially be existed in edible animal tissue, which possibly cause health hazard in humans. Therefore, maximum residue limit of clenbuterol in food was set.

In this research, the production of monoclonal antibodies against clenbuterol for the development of ELISA test kit was investigated. For preparation of hybridoma cells that secrete monoclonal antibodies against clenbuterol, somatic cell fusion was performed four times, yielding seven monoclones numbered as 3/9B, 1/7C, 1/11G, 3/9A, 3/6C, 6/11D and 6/11G. The properties of all monoclonal antibodies were characterized. The isotypes of monoclonal antibodies were all identified as IgG1. The IC50 of monoclonal antibodies ranged between 0.08-0.72 ug/ml and the LOD value ranged between 5-198 ng/ml. The IC50 value and the LOD value of the purified monoclonal antibody number 3/9A were 4 and 0.2 ng/ml, respectively. The monoclonal antibodies cross-reacted with some β-agonists. In conclusion, the specific monoclonal antibodies obtained from this study could be used to develop a generic test for β-agonists.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department…Biotechnology… Student's signature Piyanush Ruangsriaran

Field of study….Biotechnology… Advisor's signature Tanapat Palaga

Academic year …2005… Co-advisor's signature K. Komolpis

Co-advisor's signature Songchan Puthong

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส นางทรงจันทร์ ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็น และ คำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ และผู้บริหารของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ทุกท่านสำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ นักวิจัยโดยเฉพาะ ดร. นันทิกา ปานจันทร์ คุณอณุมาศ บัวเขียว และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งเพื่อน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในทุก ๆ เรื่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาผู้ให้กำเนิด พี่ชาย น้องสาว ทุกคนในครอบครัว และคุณกริช นาสิงห์ขันธ์ ที่ให้ความรัก ให้ความเข้าใจ ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฒ
บทที่
1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
2 ปริทรรศน์วรรณกรรม.....4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....4
2.1.1 สารบีตา-อะโกนิสต์.....4
2.1.2 สารเคลนบูเทอรอล.....8
2.1.3 แอนติบอดี.....14
2.1.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....15
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....22
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....24
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....24
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....25
3.2 การดำเนินงานวิจัย.....28
3.2 วิธีการวิจัย.....28
4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย.....39
4.1 การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการทำ Screening test.....39

หน้า

บทที่

4.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล.....43
4.3 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....44
4.4 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....51
4.5 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....58
4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....60
5 สรุปผลการวิจัย.....61
รายการอ้างอิง.....63
ภาคผนวก.....67
ภาคผนวก ก.....68
ภาคผนวก ข.....85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่ยอมรับให้มีได้ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรป.....13
2.2 ค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่ยอมรับให้มีได้ที่กำหนดโดยคณะกรรมการอาหาร ระหว่าง ประเทศ.....13
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....25
4.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารเคลนบูเทอรอลที่เชื่อม กับ BSA ที่ความเจือจางต่างๆ.....39
4.2 ระดับแอนติบอดีของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย CLB-KLH.....43
4.3 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของซีรัมหนู ที่ความเจือจางต่างๆ.....44
4.4 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของอาหาร เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล.....47
4.5 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของอาหาร เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล 49
4.6 สรุปผลการหลอมรวมเซลล์ อัตราส่วนเซลล์ไฮบริโดมาและหลุมที่ให้ผลบวกในการ คัดกรองภายหลังการหลอมรวมเซลล์.....50
4.7 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA.....51
4.8 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเจือจางต่างๆ.....53
4.9 ค่า IC50 และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ต่อเคลนบูเทอรอล.....55
4.10 ค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่ม บีตา-อะโกนิสต์.....55
4.11 เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลและ สารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์.....56
4.12 สรุปค่า IC50 และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A และ 6/11D 58

ตารางที่ หน้า

ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน.....68
ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A 83
ก.3 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/11D.....84

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะการบีบรัดและขยายตัวของหลอดลม....4
2.2 ผลของแคทีโคลามีนต่อการสร้างและสลายไขมัน....7
2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ชนิดต่างๆ....9
2.4 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน....15
2.5 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี....19
2.6 วิถีการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ไฮบริโดมา....21
4.1 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA โดยวิธี MALDI-TOF MS....41
4.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CLB-BSA โดยวิธี MALDI-TOF MS....42
4.3 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัมของหนูตัวที่ 3 โดยวิธี competitive indirect ELISA....46
4.4 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัมของหนูตัวที่ 4 ด้วยวิธี Indirect ELISA....48
4.5 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอล....54
4.6 การทดสอบ competitive indirect ELISA ระหว่างเคลนบูเทอรอลและสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A....57
4.7 การทดสอบ competitive indirect ELISA ระหว่างเคลนบูเทอรอลและสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/11D....57
4.9 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A หลังทำให้บริสุทธิ์ต่อสารเคลนบูเทอรอล....60
ก.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน....68
ก.2 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03....69
ก.3 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03....69
ก.4 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03....69

รูปที่ หน้า

ก.5 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....70
ก.6 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....70
ก.7 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....70
ก.8 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....71
ก.9 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารซัลบูทามอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....71
ก.10 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....71
ก.11 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....72
ก.12 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....72
ก.13 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....72
ก.14 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....73
ก.15 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารซัลบูทามอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....73
ก.16 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....73
ก.17 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....74
ก.18 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....74

รูปที่ หน้า

ก.19 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....74
ก.20 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....75
ก.21 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารซัลบูทามอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....75
ก.22 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....75
ก.23 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....76
ก.24 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....76
ก.25 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....76
ก.26 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....77
ก.27 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารซัลบูทามอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....77
ก.28 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....77
ก.29 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....78
ก.30 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....78
ก.31 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....78
ก.32 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วย โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....79

รูปที่ หน้า

ก.33 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารซัลบูทามอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....79
ก.34 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....79
ก.35 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....80
ก.36 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....80
ก.37 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....80
ก.38 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....81
ก.39 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารซัลบูทามอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....81
ก.40 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....81
ก.41 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....82
ก.42 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....82
ก.43 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วย
โปรแกรม Graphpad Prism 4.03.....82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญลักษณ์และคำย่อ

ATP	adenosine triphosphate
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic 3',5' adenosine monophosphate
CLB	clenbuterol
EIA	enzyme immuno assay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetal calf serum
HAT	Aminopiter, Hypoxanthine และ Thymidine
HRP	Horseradise peroxidase
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LOD	limiting of detection
M	molar
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MRLs	maximum residue limits
OPD	O-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
PEG	polyethylene glycol
ppb	part per billion
ppm	part per million
v	volume
w	weight
%	percent

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกและบริโภคเนื้อสุกรกันมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการแข่งขันในการผลิตเนื้อสุกรมากขึ้นด้วย และเนื่องจากผู้บริโภคนิยมบริโภคเนื้อสุกรที่มีลักษณะเนื้อแดงมาก แต่ไขมันน้อยจึงทำให้ผู้เลี้ยงสุกรบางรายหาวิธีการทำให้สุกรมีลักษณะตามที่ผู้บริโภคต้องการเพื่อที่จะส่งออกและขายเนื้อสุกรได้ในราคาสูง ในปัจจุบันวิธีการหนึ่งที่ผู้ผลิตนำมาใช้เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณเนื้อแดง คือ การใช้สารเคมีในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ (β-agonist) มาผสมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงสุกร ซึ่งสารที่นิยมใช้กัน ได้แก่ เคลนบูเทอรอล (clenbuterol) และ ซัลบูทามอล (salbutamol) ในประเทศไทยเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรรู้จักและเริ่มใช้สารบีตา-อะโกนิสต์ โดยเฉพาะเคลนบูเทอรอล มาตั้งแต่ พ.ศ. 2531 โดยใช้ชื่อการค้าต่าง ๆ กัน เช่น เลนดอน โดโซลบี แอมโปรฟีด บีดอล 2201 และ แมคโตเอส เป็นต้น (สุพล, 2534)

เคลนบูเทอรอล เป็นสารที่ใช้เป็นยารักษาโรคหอบหืดและหลอดลมตีบในคน เนื่องจากมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของหัวใจ กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง สามารถทำให้เส้นเลือดที่ผิวหนังเกิดการหดตัว ทำให้กล้ามเนื้อรอบหลอดลมคลายตัวจึงทำให้หลอดลมขยายใหญ่ขึ้น และทำให้ร่างกายมีเมแทบอลิซึม (metabolism) เปลี่ยนแปลงไป เมื่อผู้เลี้ยงนำไปผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงสุกรมีฤทธิ์ทำให้เกิดการเร่งเนื้อแดงได้ โดยไปมีผลต่อ β2-receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของกล้ามเนื้อโครงร่างและเซลล์ไขมัน ทำให้อัตราการสร้างโปรตีนสูงกว่าอัตราการสลายโปรตีนมีผลทำให้เซลล์ของกล้ามเนื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น และจะไปลดการสังเคราะห์ไขมันและเพิ่มการสลายไขมัน (Mill และ Lui, 1990; Peterla และ Scanes, 1990) จึงนิยมเรียกสารนี้ว่า “สารเร่งเนื้อแดง” การใช้สารดังกล่าวนี้จะใช้ติดต่อกันหลายวันในระยะขุนใกล้ส่งตลาด ซึ่งจะทำให้มีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ ในปริมาณสูง โดยปริมาณสารที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์โดยทั่วไปมีค่าประมาณ 2-8 ส่วนในล้านส่วน จึงจะทำให้ไขมันที่สันหลังบางลงและเหมาะต่อการนำไปจำหน่าย เมื่อผู้บริโภคได้รับพิษจากสารตกค้าง ผู้บริโภคอาจมีอาการใจสั่น กล้ามเนื้อสั่น ปวดกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ คลื่นไส้อาเจียน และอาจทำให้เสียชีวิตทันทีเนื่องจากการเต้นของหัวใจผิดปกติ จากผลกระทบที่มีต่อสุขภาพของผู้บริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสารเร่งเนื้อแดงตกค้างดังกล่าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกประกาศห้ามใช้สารกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์โดยเด็ดขาดตั้งแต่ วันที่ 3 ธันวาคม 2535 อีกทั้งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และกระทรวงพาณิชย์ก็ได้กำหนดมาตรการคุมเข้มการนำเข้าสารดังกล่าวเพื่อมิให้มีการนำไปใช้ทางที่ผิด แม้ว่าจะมีมาตรการป้องกัน

และห้ามใช้สารกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ในการเลี้ยงสัตว์ก็ตาม ปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายทั้งในและนอกประเทศก็ยังไม่หมดไป ยังมีผู้ลักลอบใช้อย่างผิดกฎหมาย ดังนั้นผู้ผลิตเนื้อสุกรแช่แข็งส่งออกจึงต้องทำการตรวจวัดหาปริมาณสารที่ตกค้างอยู่ก่อนที่จะส่งออกผลิตภัณฑ์อย่างสม่ำเสมอ

การตรวจหาสารตกค้างสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ก็เป็นวิธีหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย โดยใช้หลักการทำอันตรกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ สารบีตา-อะโกนิสต์ในตัวอย่างที่วิเคราะห์ กับ แอนติบอดีต่อสารบีตา-อะโกนิสต์ วิธี ELISA เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ให้ความถูกต้องสูง ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาสูงมาก จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบเฝ้าระวังซึ่งเป็นการตรวจเพื่อคัดตัวอย่างเบื้องต้น แต่ชุดตรวจ (ELISA test kit) ที่ใช้ในปัจจุบันมีราคาแพง เพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยมีราคาขายปลีกภายในประเทศประมาณ 15,000-20,000 บาทต่อชุด ดังนั้นการผลิตชุดตรวจเอง จะทำให้ต้นทุนในการตรวจสารนี้ลดลง ดังนั้นในการผลิตชุดตรวจจะต้องมีการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคลนบูเทอรอลก่อน

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยการฉีดเคลนบูเทอรอลที่ผสมกับ Freud's adjuvant เข้าในหนูทดลองเป็นระยะๆ เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีสารนี้ จากนั้นนำเซลล์จากม้ามของหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาของหนู (myeloma cells) เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติเด่นเหมือนเซลล์ทั้งสองชนิด คือ สามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดีและสามารถเจริญได้ไม่จำกัดในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเคลนบูเทอรอล แล้วจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกได้มาเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อให้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอล
2. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

3. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดี

4. ทำการแยกเซลล์ให้เป็นโมโนโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยวิธี limiting dilution

5. ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

5.1 การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich, USA)

5.2 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายเคลนบูเทอ-รอล เช่น ซัลบูทามอล บรอมบูเทอรอล เป็นต้น โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA

5.3 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

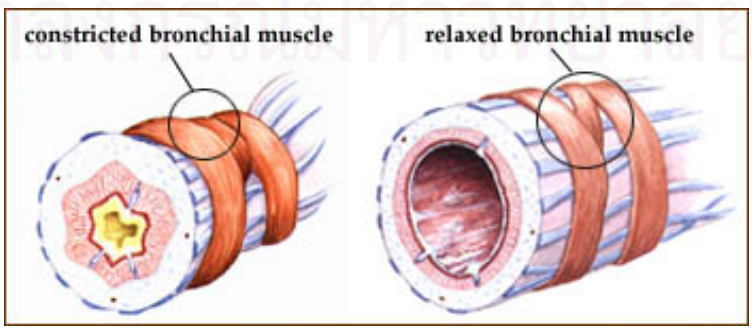
บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารบีตา-อะโกนิสต์ (β-agonist)

บีตา-อะโกนิสต์ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายคลึงกับแคทีโคลามีน(catecholamine) ที่สังเคราะห์ขึ้นในต่อมหมวกไตส่วนใน (adrenal medulla) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แคทีโคลามีนทำหน้าที่เป็นทั้งฮอร์โมนและเป็นสารสื่อสัญญาณประสาทของระบบประสาทซิมพาเตติก (sympathetic) ซึ่งตัวอย่างสารกลุ่มนี้ที่พบในร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ เอพิเนฟริน (epinephrine) นอร์เอพิเนฟริน (norepinephrine) และ โดพามีน (dopamine) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ควบคุมสรีระของเนื้อเยื่อหลายอย่าง เช่น เพิ่มการบีบตัวของหัวใจ ขยายหลอดลม (รูปที่ 2.1) กระตุ้นการทำงานของต่อมน้ำลาย การหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน การหด-ขยายตัวของหลอดเลือด การหดตัวของมดลูก เป็นต้น (National Research Council, 1994) นอกจากนี้มีรายงานว่า เอพิเนฟรินเป็นแคทีโคลามีนตัวสำคัญที่สุดที่หลั่งจากต่อมหมวกไตส่วนใน ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ฮอร์โมนตัวนี้สังเคราะห์และเก็บอยู่ที่ต่อมหมวกไตก่อนจะถูกหลั่งออกมาในกระแสเลือด เพื่อไปออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อทั่วร่างกายเหมือนฮอร์โมนทั่วไป ตัวอย่างของสารบีตา-อะโกนิสต์ ได้แก่ เคลนบูเทอรอล (clenbuterol) ซัลบูทามอล (salbutamol) ซัยมาเทอรอล (cimaterol) แรคโทพามีน (ractopamine) มาบูเทอรอล (mabuterol) ซิมบูเทอรอล (cimbuterol) เทอบูทาลีน (terbutaline) มาเพนเทอรอล (mapenterol) บรอมบูเทอรอล (brombuterol) และ บรอมคลอร์บู-เทอรอล (bromchlorbuterol) เป็นต้น



รูปที่ 2.1 ลักษณะการบีบรัดและขยายตัวของหลอดลม

ตัวรับสัญญาณแคทีโคลามีน

ตัวรับสัญญาณบนเนื้อเยื่อของเซลล์เรียกว่า ตัวรับอะดรีเนอจิก (adrenergic receptor) โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ แอลฟา (α) และบีตา (β) โดยตัวรับแต่ละชนิด จะมีสัดส่วนแตกต่างกันตามชนิดของอวัยวะ ซึ่งสามารถแบ่งตัวรับแอลฟาเป็นแอลฟา-1 และแอลฟา-2 และแบ่งตัวรับบีตาเป็นบีตา-1 และบีตา-2 โดยในมนุษย์มีการค้นพบบีตา-3 ด้วย ในสัตว์แต่ละชนิดจะตอบสนองต่อบีตา-อะโกนิสต์แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของสัตว์ซึ่งเป็นผลมาจาก β-receptor ที่มีอยู่ เช่น หัวใจจะหดตัวเมื่อถูกกระตุ้นจาก β_1 adrenergic receptors โดยหัวใจของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบไปด้วย β_1 และ β_2-receptors (นทีทิพย์, 2538) และมีรายงานว่า เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีตัวรับบีตา-อะโกนิสต์เพื่อกระตุ้นขบวนการสลายไขมันและยับยั้งขบวนการสร้างไขมันด้วย (National Research Council, 1994)

กลไกการทำงานของสารกลุ่มแคทีโคลามีน

แคทีโคลามีนกระตุ้นการสลายสารอาหารที่เก็บสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเพื่อนำสารอาหารเหล่านี้มาใช้สร้างพลังงานและความร้อนในเนื้อเยื่อนั้น ๆ หรือ เพื่อส่งไปยังอวัยวะที่ต้องการ เช่นในตับ แคทีโคลามีนกระตุ้นกระบวนการสลายไกลโคเจน และการสังเคราะห์กลูโคสจากสารต้นอื่น และยับยั้งการผลิตไกลโคเจนจากกลูโคสโดยออกฤทธิ์ผ่านทาง β-recepter และ cyclic 3',5' adenosine monophosphate (cAMP)

ในเนื้อเยื่อไขมัน แคทีโคลามีนกระตุ้นการสลายไขมัน โดยกระตุ้นให้เอนไซม์ไลเปส (lipase) เปลี่ยนไทรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยออกฤทธิ์ผ่านทาง β-receptor

ในกล้ามเนื้อ แคทีโคลามีนกระตุ้นการสลายไขมันผ่านทาง β-receptor และ cAMP ไกลโคเจนสลายตัวให้กลูโคสเช่นเดียวดับในตับ แต่แตกต่างกันที่เซลล์กล้ามเนื้อไม่มีเอนไซม์ glucose-6-phosphatase กลูโคสจึงถูกใช้และเปลี่ยนเป็นแลกเตต (lactate) ซึ่งแลกเตตจะถูกนำออกไปสร้างเป็นกลูโคสในตับโดยผ่านกระแสเลือด (นทีทิพย์, 2538)

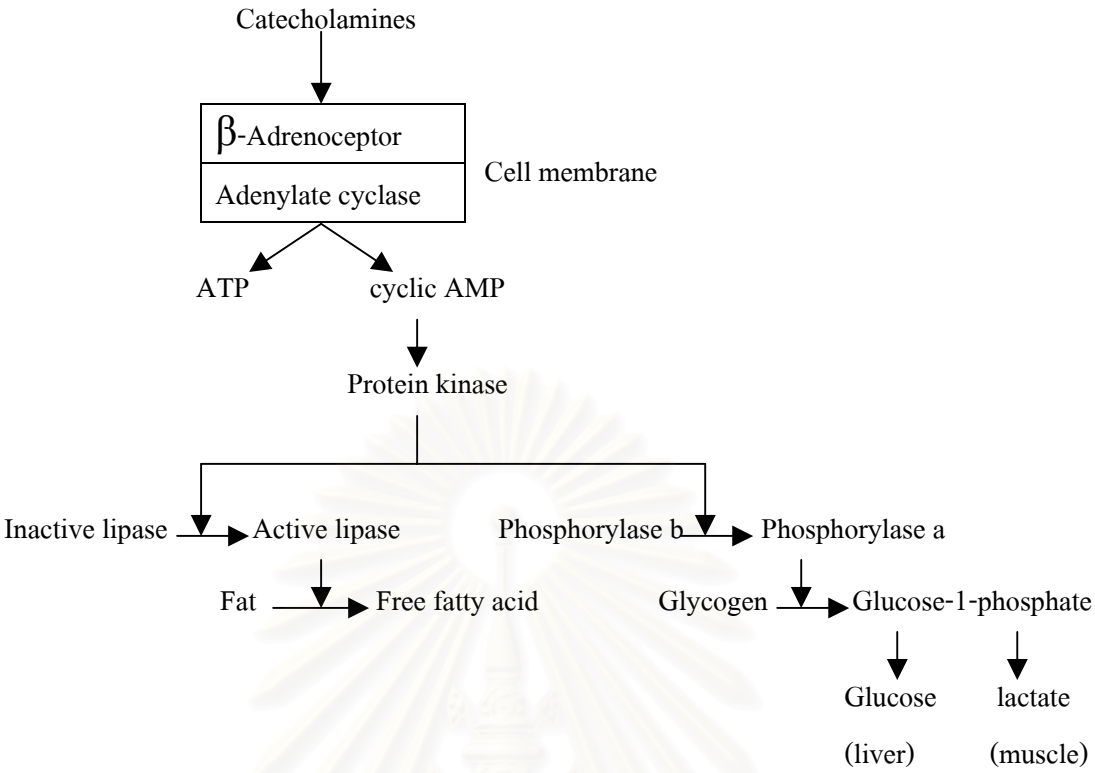
ผลของบีตา-อะโกนิสต์ต่อเนื้อเยื่อในไขมัน

ผลการศึกษาพบว่า แคทีโคลามีนในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ สามารถกระตุ้นการปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) จากเนื้อเยื่อไขมัน ในสภาพปกติไขมันจะถูกสะสมอยู่ในเซลล์ไขมัน ในเนื้อเยื่อไขมันในรูปไทรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ โดยในแต่ละโมเลกุลของไทรกลีเซอไรด์ประกอบไปด้วยกรดไขมัน 3 โมเลกุลและกลีเซอรอล 1 โมเลกุล ขบวนการสลายไขมันจะเป็นการสลายโมเลกุลของไทรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันอิสระ ซึ่งผลในการลดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ไขมันจะเป็นการลดขนาดของเซลล์และแสดงถึงการสะสมไขมันทั้งหมด ส่วนการสังเคราะห์ไขมัน (lipogenesis) จะเป็นการรวมตัวของโมเลกุลของไทรกลีเซอไรด์จากกรดไขมันและ

กลีเซอรอล บีตา-อะโกนิสต์จะออกฤทธิ์ที่บริเวณตัวรับบีตา-อะดรีเนอร์จิก โดยจะไปกระตุ้นการผลิต cAMP ทำให้เกิดการสลายไขมันส่งผลให้ลดการสะสมไขมันและเพิ่มการสะสมโปรตีน จากการที่ cAMP ไปเร่งการสลายไกลโคเจนทำให้กลูโคสในกระแสเลือดมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งร่างกายจะใช้พลังงานจากการสลายไกลโคเจนและไขมันมาใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน (Hanrahan และคณะ, 1986)

มนตรี และคณะ (2530) อธิบายกลไกการควบคุมเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนและการควบคุมเอนไซม์ไลเปส โดยฮอร์โมนในกลุ่มแคทีโคลามีน โดยยกตัวอย่างการทำงานฮอร์โมนเอพิเนฟรินสามารถทำให้ไกลโคเจนสลายตัวให้กลูโคสในขณะที่ร่างกายต้องการพลังงาน ฮอร์โมนเหล่านี้จะไม่เข้าเซลล์ แต่จะออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อเซลล์ส่งสัญญาณไปให้ G-protien เพื่อถ่ายทอดสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของ adenylate cyclase ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อเซลล์ เอนไซม์นี้จะสร้าง cAMP จาก ATP โดย cAMP จะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ protein kinase ทำงานโดยการเติมฟอสเฟตจาก ATP active protein kinase จะเติมฟอสเฟตให้แก่ inactive phosphorylase b kinase ทำให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (active form) และ active phosphorylase b kinase จะเติมฟอสเฟตให้ phosphorylase b ซึ่งไม่ทำงานเปลี่ยนรูปให้เป็น phosphorylase a ซึ่งทำงานได้ จึงสามารถสลายไกลโคเจนให้เป็น Glucose-1-phosphate ในขณะเดียวกัน active protein kinase จะเติมฟอสเฟตให้ active glycogen synthetase ทำให้ทำงานไม่ได้ การสร้างไกลโคเจนก็จะหยุดไป กลไกการทำงานของแคทีโคลามีนที่ควบคุมการสร้างและการสลายไกลโคเจน แสดงดังรูปที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 ผลของแคทีโคลามีนต่อการสร้างและสลายไขมัน (Harahan และคณะ, 1986)

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มการตอบสนองของบีตา-อะโกนิสต์ในสุกร</u>

ปัจจัยที่เพิ่มการตอบสนองของบีตา-อะโกนิสต์ ได้แก่ ปริมาณสาร พันธุ์ เพศ อายุ ปริมาณโภชนะในสูตรอาหาร ระยะเวลาที่สุกรได้รับสาร ปัจจัยเหล่านี้เป็นตัวกำหนดฤทธิ์ของบีตา-อะโกนิสต์ (Dunshea, 1991)

1. ปริมาณสารบีตา-อะโกนิสต์ มีรายงานว่า ระดับของซัลบูทามอลที่เหมาะสม คือ 8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

2. พันธุ์ พันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแรคโทพามีน

3. เพศ จากการศึกษาพบว่า เพศไม่มีความสัมพันธ์กับบีตา-อะโกนิสต์

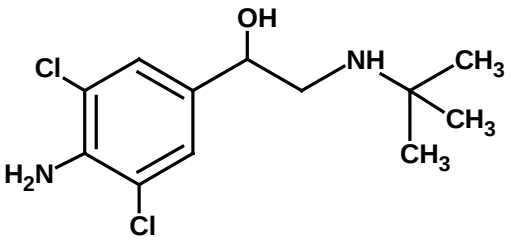
4. อายุของสัตว์ จากการใช้สารซัยมาเทอรอลผสมในอาหารสุกร พบว่า คุณภาพซากสุกรขุนจะดีขึ้น แต่การใช้สารนี้ไม่มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพซากสุกรเล็กและสุกรรุ่น การศึกษาส่วนมากจะศึกษาในช่วงขุนน้ำหนักประมาณ 50-110 กิโลกรัม ซึ่งช่วงนี้เป็นช่วงที่มีการสะสมไขมันสูง แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปถึงความสัมพันธ์ของอายุกับการออกฤทธิ์ของสารบีตา-อะโกนิสต์ ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซากได้

5. ปริมาณโภชนะในอาหารและระยะเวลาที่ให้สารบีตา-อะโกนิสต์ โดยมีรายงานว่า ระดับโภชนะในอาหารโดยเฉพาะโปรตีน และระดับกรดอะมิโน มีผลต่อการเพิ่มการตอบสนองของการใช้สารบีตา-อะโกนิสต์ โดยพบว่าหลังจากให้แรคโทพามีนแก่สุกรที่ได้รับสูตรอาหารที่มีระดับโปรตีน 13 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง 9-10 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเพิ่มโปรตีนในสูตรอาหารเป็น 17 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให่อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น 10-12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาการให้สารบีตา-อะโกนิสต์ พบว่าการตอบสนองในช่วง 3 สัปดาห์แรกที่ได้รับสาร จะทำให้สุกรมีน้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวันสูงกว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับสารบีตา-อะโกนิสต์เป็นเวลานาน (6 สัปดาห์) นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาดของสารที่ใช้และขนาดของสัตว์จะมีผลต่อคุณภาพซากหลังจากที่ใช้สารดังกล่าวนี้ด้วย (Buttery และคณะ, 1986)

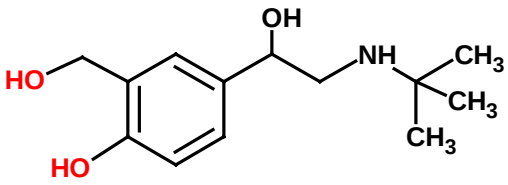
2.1.2 สารเคลนบูเทอรอล (Clenbuterol)

สารเคลนบูเทอรอล เป็นสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ชื่อทางเคมีคือ 4-amino-α-[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorbenzyl alcohol hydrochloride สูตรทางเคมี คือ $C_{12}H_{18}C_{l2}N_2O.HCl$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 313.7 ลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น สารนี้ใช้เป็นยารักษาโรคหอบหืดและหลอดลมตีบในคน นอกจากนี้ยังใช้รักษาคนที่มีภาวะคลอดก่อนกำหนด โดยช่วยให้กล้ามเนื้อมดลูกคลายตัว สารนี้มีผลทำให้เกิดการเร่งเนื้อแดงได้โดยไปมีผลต่อ β2-receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของกล้ามเนื้อโครงร่างและเซลล์ไขมัน สารตัวนี้จะไปลดการสังเคราะห์ไขมันและเพิ่มการสลายไขมัน และยังทำให้อัตราการสร้างโปรตีนสูงกว่าอัตราการสลายโปรตีน มีผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น (Mill และ Lui, 1990; Peterla และ Scanes, 1990) โครงสร้างทางเคมีของสารเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์แสดงดังรูปที่ 2.3

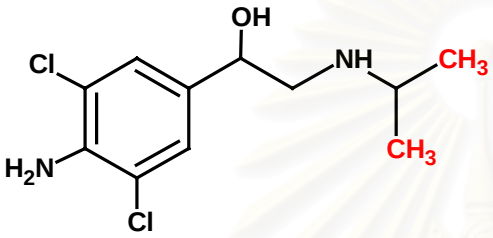
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



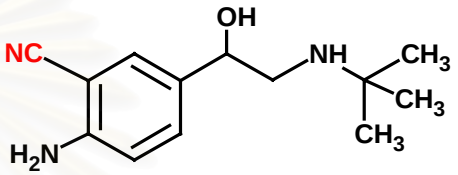
Clenbuterol



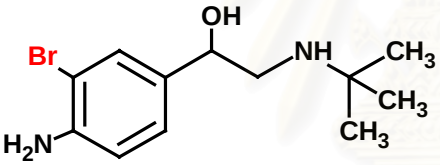
Salbutamol



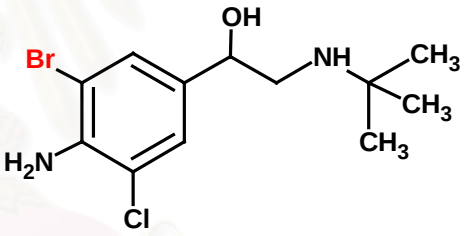
Clenproperol



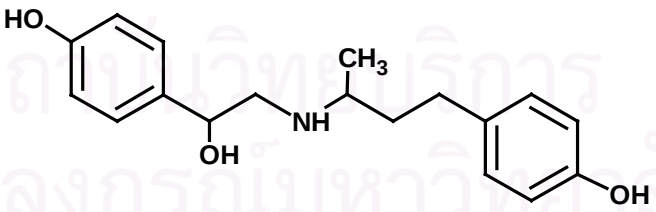
Cimbuterol



Brombuterol



Bromchlorbuterol



Ractopamine

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ชนิดต่างๆ

ผลของสารบีตา-อะโกนิสต์ชนิดต่าง ๆ ต่อสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาผลของสารเคลนบูเทอรอล โดยได้ทำการทดลองโดยให้สารเคลนบูเทอรอลแก่หนูหลาย ๆ ครั้งในปริมาณเท่ากัน พบว่า กล้ามเนื้อหัวใจของหนูมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่น้ำหนักตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากการทดลองสามารถชี้ให้เห็นว่า เคลนบูเทอรอล สามารถชักนำให้เกิดอาการหัวใจโตในหนูได้ ดังนั้น การที่มีการใช้สารบีตา-อะโกนิสต์ผสมในอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง ถ้ามีการตกค้างของสารในเนื้อสัตว์จะเกิดผลกระทบต่อมนุษย์ได้ (Cubria และคณะ, 1998) และมีการศึกษาผลของซัลบูทามอลที่มีต่อสัตว์ทดลอง พบว่า ในหนูแรท (rat) ที่ได้รับซัลบูทามอลจะเกิดความผิดปกติขึ้นหลายอย่าง เช่น ความผิดปกติในการเจริญของต่อมน้ำลาย ต่อมฮาเดอเรี่ยน (haderian gland) และยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของคอลลอยด์ที่บริเวณต่อมใต้สมอง (pituitary gland) และเกิดเนื้องอกที่กล้ามเนื้อเรียบของถุงหุ้มรังไข่ (mesovarium) นอกจากนี้หัวใจยังเกิดการอักเสบพร้อมกับมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น อีกทั้งมีการขยายของเส้นใยกล้ามเนื้อ (hypertrophy of muscle fiber) ส่วนในหนูไมซ์ (mice) ผลของซัลบูทามอลทำให้เกิดการผิดรูปร่างของเพดานปาก (Litbretto, 1994)

ผลการใช้บีตา-อะโกนิสต์ชนิดต่าง ๆ ต่อสมรรถภาพการผลิตของสุกร

การทดสอบเกี่ยวกับสารเคลนบูเทอรอล โดยให้เคลนบูเทอรอลสัตว์เลี้ยง (cattle) ที่เลี้ยงสำหรับบริโภคในปริมาณ 1-5 มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่า ขนาดของหัวใจ กล้ามเนื้อลาย กระดูก ปอดและไต จะใหญ่ขึ้น ส่วนเนื้อเยื่อไขมันจะลดลง และจากการใช้สารเคลนบูเทอรอลเสริมในอาหารสุกรที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารพบว่า อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันลดลงทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง แต่สามารถลดความหนาไขมันสันหลังและลดเปอร์เซ็นต์ไขมันในซากลงได้และยังเพิ่มพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันด้วย การใช้แรคโทพามีนขนาด 2.5-3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร การใช้ซัลบูทามอลขนาด 4 – 8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร จะให้ผลใกล้เคียงกับผลการใช้ซัยมาเทอรอล คือ ความหนาไขมันสันหลังลดลงและทำให้เปอร์เซ็นต์เนื้อแดงในซากเพิ่มขึ้น (Choo และคณะ, 1992)

Hanrahan และคณะ (1986) และ Moser และคณะ (1986) ได้รายงานผลของซัยมาเทอรอลต่อสมรรถภาพการผลิต และคุณภาพซากของสุกรที่ระดับการใช้ 0.5 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ผลพบว่าการปรับปรุงคุณภาพซากจะเป็นไปในทางเดียวกัน คืออัตราการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ซากเพิ่มขึ้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความหนาไขมันสันหลังและค่าเฉลี่ยความหนาไขมันในซากลดลง 10-11 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้ เคลนบูเทอรอลในอาหาร ที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ในแง่ของการปรับปรุงคุณภาพซากนั้นสอดคล้องกันคือพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันจะเพิ่มขึ้น 21 เปอร์เซ็นต์ ความหนาไขมันสันหลังลดลง 7-15 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน

ในซากลดลง 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในแง่อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง 6 เปอร์เซ็นต์ แต่ความแปรปรวนมีอยู่สูง (Harahan และคณะ, 1986)

Aldeola และคณะ (1992) และ Watkins และคณะ (1990) รายงานว่าการใช้แรคโทพามีน(Ractopamine) ที่ระดับ 20 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมอาหาร นั้นให้ผลสอดคล้องกันคือเปอร์เซ็นต์เนื้อแดงในซากเพิ่มขึ้น 6-10 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่หน้าตัดเนื้อสันเพิ่มขึ้น 6-16 เปอร์เซ็นต์ ความหนาไขมันสันหลังลดลง 10-13 เปอร์เซ็นต์ และความหนาไขมันในซากลดลง 12-17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้น 8-16 เปอร์เซ็นต์ และมีรายงานว่า การใช้ซัลบูตามอลในระดับ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ส่งผลให้เนื้อสุกรมีคุณภาพดีขึ้น คือลดการเกิด PSE (pale solf exudative, PSE, ซีดนิ่ม และ มีน้ำเยิ้ม) ในเนื้อ และซัลบูทามอลจะไม่ทำให้เนื้อมีสีเข้มกว่าปกติ มีรายงานว่าการใช้ซัลบูทามอลในระดับ 8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่สามารถปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน น้ำหนักซากที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพใช้อาหาร และความหนาไขมันในซากดีที่สุด (Warriss และคณะ, 1987) และมีการทดลองให้สุกรกินซัลบูทามอล ขนาด 250 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ มาวิเคราะห์ พบว่า มีการสะสมของซัลบูทามอลในเนื้อเยื่อตับและไตมากที่สุด และเมื่อนำปัสสาวะของสุกรที่ได้รับซัลบูทามอลมาตรวจวิเคราะห์ พบว่ามีความเข้มข้นสูงกว่าที่ตรวจพบในเลือด 52-158 เท่า (Chalermchaikit และคณะ, 1994)

<u>ผลข้างเคียงจากการบริโภคอาหารที่มีการตกค้างของสารบีตา-อะโกนิสต์</u>

กลุ่มเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ สำนักงานพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมปศุสัตว์ (2547) ได้รายงานกรณีตัวอย่างการเกิดพิษของบีตา-อะโกนิสต์ในประเทศต่างๆ เช่น

ประเทศฝรั่งเศส : ในปี พ.ศ.2533 เกิดพิษของสารกลุ่มบีตาอะโกนิสต์ ในประชาชนจำนวน 22 คน (8 ครอบครัว) ได้รับประทานตับวัว หลังจากนั้นประมาณ 1-3 ชั่วโมง มีอาการปวดศีรษะ กล้ามเนื้อสั่นพริ้ว มือสั่น จากการสอบสวนหาสาเหตุ พบว่า มีเคลนบูเทอรอล ในปริมาณ 0.375 – 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างตับที่นำมาวิเคราะห์

ประเทศสเปน : ในปี พ.ศ. 2532 ประชาชนจำนวน 135 คน (43 ครอบครัว) รับประทานตับวัวที่มีสารกลุ่มบีตาอะโกนิสต์ ตกค้างอยู่ แล้วมีอาการใจสั่น หัวใจเต้นรัว ปวดศีรษะ คลื่นไส้ และกล้ามเนื้อสั่นกระตุก จากการตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะผู้ป่วย 2 ราย พบเคลนบูเทอรอล ในปริมาณ 4 และ 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของปัสสาวะของผู้ป่วย และจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างตับวัว พบสารดังกล่าวในปริมาณ 0.16-0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตับวัว

ประเทศอิตาลี : ในปี พ.ศ. 2539 ประชาชนจำนวน 62 คน รับประทานเนื้อวัวแล้วมีอาการหัวใจเต้นเร็ว ใจสั่น กล้ามเนื้อสั่น และมีอาการทางประสาทและคลื่นไส้ จากการตรวจวิเคราะห์เนื้อวัว พบว่า มีเคลนบูเทอรอลตกค้างอยู่ 0.8-7.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อวัว

Wiley และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการได้รับสารซัลบูทามอลในการรักษาโดยทางการกินในขนาดประมาณ 0.2-8.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ในผู้ป่วย 78 ราย ที่เป็นเด็กอายุ 2-8 ปี พบว่า ซัลบูทามอลที่กินเข้าไปทำให้เกิดความเป็นพิษได้ คือ ทำให้มีอาการหัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ มีน้ำตาลในเลือดสูงเกินปกติ เกิดอาการกระวนกระวายใจ อาเจียน และพบว่า ค่าของเลือดมีระดับต่ำ (hypokalemia)

พันทิพา (2538) รายงานว่า สารบีตา-อะโกนิสต์เป็นสารที่ใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือควบคุมการทำงานทางสรีรวิทยาของร่างกายซึ่งมีโอกาสที่จะเป็นสารอันตรายตกค้างถึงผู้บริโภคได้มาก แต่ผู้ประกอบการยังใช้เนื่องจากผลตอบแทนที่ได้จะสูง ตัวอย่างของสารบีตา-อะโกนิสต์ที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมา ได้แก่ เคลนบูเทอรอล ซัลบูทามอล ซัยมาเทอรอล และ แรคโทพามีน สารที่นิยมใช้ในประเทศไทยคือ สารพวกเคลนบูเทอรอล (แลนดอล®) และซัลบูทามอล (ซัลบูทามอล ซัลเฟต®) ซึ่งทางกรมปศุสัตว์ได้พยายามออกมาตรการเพื่อป้องกันปัญหาแต่ไม่ได้รับความร่วมมือจากผู้ค้าสุกร โดยทั่วไปสารพวกนี้ จะมีคุณสมบัติต่อร่างกายสัตว์ทางด้านสรีรวิทยาคล้ายสารพวก Sex steroids

สหภาพยุโรป ได้มีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่ยอมรับให้มีได้ในผลิตผลเกษตร (Maximum Residue Limits; MRLs) ซึ่งวัตถุประสงค์หลักของการกำหนดค่านี้ขึ้นเพื่อเป็นหลักให้ยึดถือ ในการปฏิบัติให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและช่วยให้การดำเนินธุรกิจเป็นไปได้อย่างราบรื่น โดยมีมาตรฐานที่กำหนดขึ้นมาเป็นเครื่องช่วยในการตัดสินใจ ค่า MRLs ที่กำหนดแสดงดังตารางที่ 2.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่ยอมรับให้มีได้ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรป

ชนิดสัตว์	ชนิดอวัยวะสัตว์	MRLs (ไมโครกรัมของสาร ต่อ 1 กิโลกรัมของอวัยวะสัตว์)
วัว (Bovine)	กล้ามเนื้อ	0.1
	ตับ	0.5
	ไต	0.5
	น้ำนม	0.05
ม้า (Equidae)	กล้ามเนื้อ	0.1
	ตับ	0.5
	ไต	0.5

คณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commision) ได้มีการพิจารณาความปลอดภัยของเคลนบูเทอรอลตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ต่างๆ โดยได้กำหนดค่า MRLs แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่ยอมรับให้มีได้ที่กำหนดโดยคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ

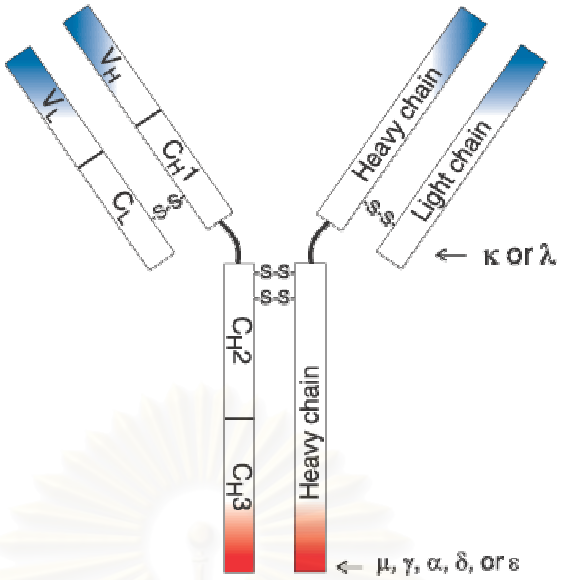
ชนิดยาตกค้าง	ชนิดสัตว์	ชนิดอวัยวะสัตว์	MRLs (ไมโครกรัมของสาร ต่อ 1 กิโลกรัมของอวัยวะสัตว์)
เคลนบูเทอรอล	สัตว์เลี้ยง (Cattle)	กล้ามเนื้อ	0.2
		ไขมัน	0.2
		ตับ	0.6
		ไต	0.6
		น้ำนม	0.05
	ม้า (Horse)	กล้ามเนื้อ	0.2
		ไขมัน	0.2
		ตับ	0.6
		ไต	0.6

2.1.3 แอนติบอดี (antibody)

แอนติบอดี คือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82 – 96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4 – 18 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ antigenic determinant หรือ เอพิโทปที่แปลกปลอม และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเอพิโทปนั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้ แอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในซีรัมส่วนแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) ถ้านำซีรัมของคนปกติมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จะแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ คือ อัลบูมิน และ โกลบูลินอีก 4 ส่วน คือ แอลฟา 1 (α_1) แอลฟา 2 (α_2) บีตา (β) และ แกมมา (γ) เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) หรือ Ig ซึ่งมี 5 ไอโซไทป์ คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน เป็นผลผลิตของเซลล์พลาสมาและลิมโฟไซต์ ไม่เพียงพบแต่ในซีรัมเท่านั้น ยังพบในส่วนน้ำอื่น ๆ ของร่างกาย และในเนื้อเยื่อ เช่น ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และนอกจากนี้ยังพบบนผิวของ บี ลิมโฟไซต์ด้วย

โครงสร้างพื้นฐานของอิมโมโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล (monomer) แสดงในรูปที่ 2.4 ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกัน และ light (L) chain 2 สายที่เหมือนกัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) แรงยึดนี้สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยสารเมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) ปลายข้างหนึ่งของสายพอลิเพปไทด์เรียก NH_2 หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเรียกว่า COOH หรือ carboxy terminal โดยทุกสายจะหันปลายข้าง NH_2 หรือ COOH ไปทางเดียวกัน โดยอาศัยความแตกต่าง H chain สามารถแบ่งอิมมูโนโกลบูลิน ได้เป็น 5 ไอโซไทป์ คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE ซึ่งมี H chain ชนิด γ α μ δ และ ε ตามลำดับ H chain ของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละไอโซไทป์มีความแตกต่างกันในน้ำหนักโมเลกุล ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต antigenic determinant คุณสมบัติทางชีวภาพ และการเคลื่อนที่เมื่อทำอิเล็กโทรฟอเรซิส เช่นเดียวกันสามารถแบ่ง L chain ออกได้เป็น 2 type คือ kappa (k) และ lamda (λ) (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

2.1.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งกำเนิดมาจาก บี ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่อเอพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น

ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งรวมกันเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) แต่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวเมื่อมีพยาธิสภาพเป็นโรคมะเร็งของบี ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์พลาสมา เช่น โรค multiple myeloma โดยที่เซลล์พลาสมาปกติหนึ่งเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เหล่านี้อย่างไม่หยุดยั้ง และสร้างแอนติบอดีชนิดเดียวกันจำนวนมากออกมาทำให้สามารถตรวจพบได้ในซีรัม (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว พอลิโคลนอลแอนติบอดี คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยแอนติเจน แอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน 4 ประการหลัก (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537) คือ

1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไม่ว่าจะผลิตจากวิธี somatic hybridization หรือโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมก็ตาม ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะ และต้องใช้ขบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน ให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในกระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัม การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี จึงมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิดหรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่คนละตัวกันก็อาจได้แอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งจะมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้คนหรือสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นทุก ๆ ครั้ง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดในด้านปริมาณและคุณภาพ เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen specificity)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเอพิโทปชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นเอพิโทปที่จำเพาะหรือเอพิโทปที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactive epitope) ก็ได้ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี ประกอบด้วยแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อเอพิโทปของตน ซึ่งทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อหลายเอพิโทปต่าง ๆ กันบนโมเลกุลของแอนติเจน

3. สัมพรรคภาพ (affinity) และ อะวิดิตี (avidity) ของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพ คือ ค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง (binding site) และ อะวิดิตี คือ ผลรวมแต่ละตำแหน่งของการจับกับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่ง สัมพรรคภาพและอะวิดิตี เป็นคุณสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือส่วนของบริเวณแปรผัน

(variable region) นั่นเอง สัมพรรคภาพเป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของบี ลิมโฟไซต์ จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่าง ๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพมากน้อยต่างกันได้

ดังนั้นหากต้องการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีสัมพรรคภาพดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้น นอกจากนี้ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีนั้น ๆ ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลิน ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพดีขึ้นกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากบี ลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีอะวิดิตีที่เป็นผลรวมของสัมพรรคภาพของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็มักอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

4. Effector function

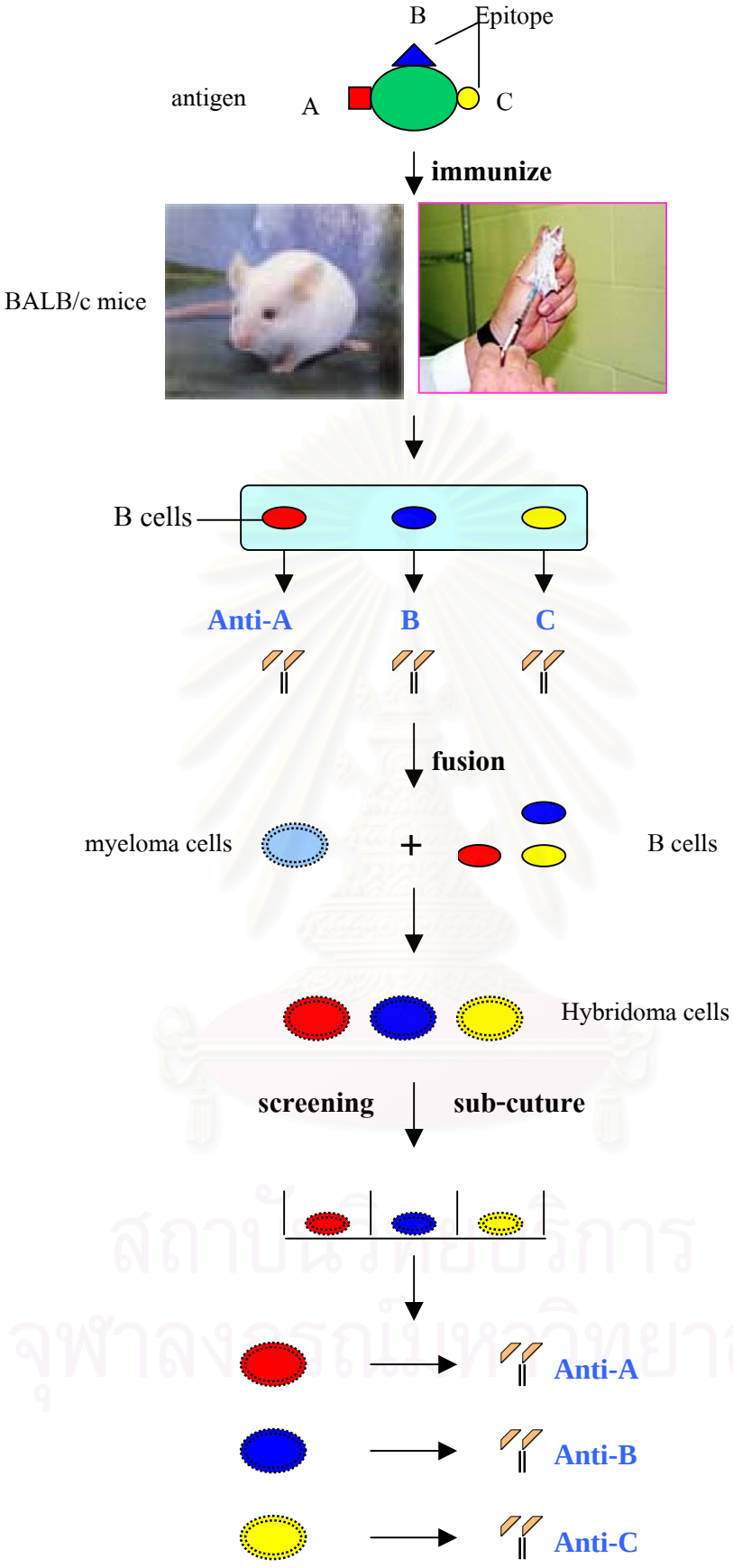
คือคุณสมบัติที่จะถูกกำหนดด้วยส่วนบริเวณคงที่ (constant region) ของ H chain เป็นคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซไทป์และสับคลาสของอิมมูโนโกลบูลินนั้น ๆ ซึ่งจะกำหนดคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ให้มีคุณสมบัติทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ แตกต่างกัน ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้านเนื่องจากอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี somatic hybridization

ในร่างกายมีเซลล์บี ลิมโฟไซต์หรือเซลล์พลาสมาที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการได้ แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวจะแบ่งตัวได้ไม่ดีและตายในเวลาอันสั้นทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลอดทดลองได้ ในขณะเดียวกัน มีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งซึ่งกำเนิดมาจากเซลล์พลาสมา เรียกว่า เซลล์ไมอีโลมา มีคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง คือ สามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไป เซลล์กลุ่มนี้อาจสูญเสียยีนอิมมูโนโกลบูลิน ไปทำให้ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ แต่จะสามารถสร้างแอนติบอดีได้ถ้าได้รับยีนอิมมูโนโกลบูลินจากเซลล์บี ลิมโฟไซต์ หรือ เซลล์พลาสมาอื่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี somatic hybridization มีหลักการที่จะนำคุณสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มารวมไว้ในเซลล์เดียวกัน โดยในปี ค.ศ. 1975 Köhler และ Milstein ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่คิดค้นวิธี

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการหลอมรวม (fusion) เซลล์มัยอีโลมา กับ บี ลิมโฟไซต์หรือเซลล์พลาสมาจากม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน เซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติพิเศษซึ่งได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 เซลล์ คือ มีความสามารถในการเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้ตลอดไปเหมือนเซลล์มัยอีโลมา และมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ได้จากเซลล์บี ลิมโฟไซต์ ดังนั้น จึงสามารถ
ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะได้ตลอดไปจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมดังกล่าว (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537) ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี แสดงดังรูปที่ 2.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



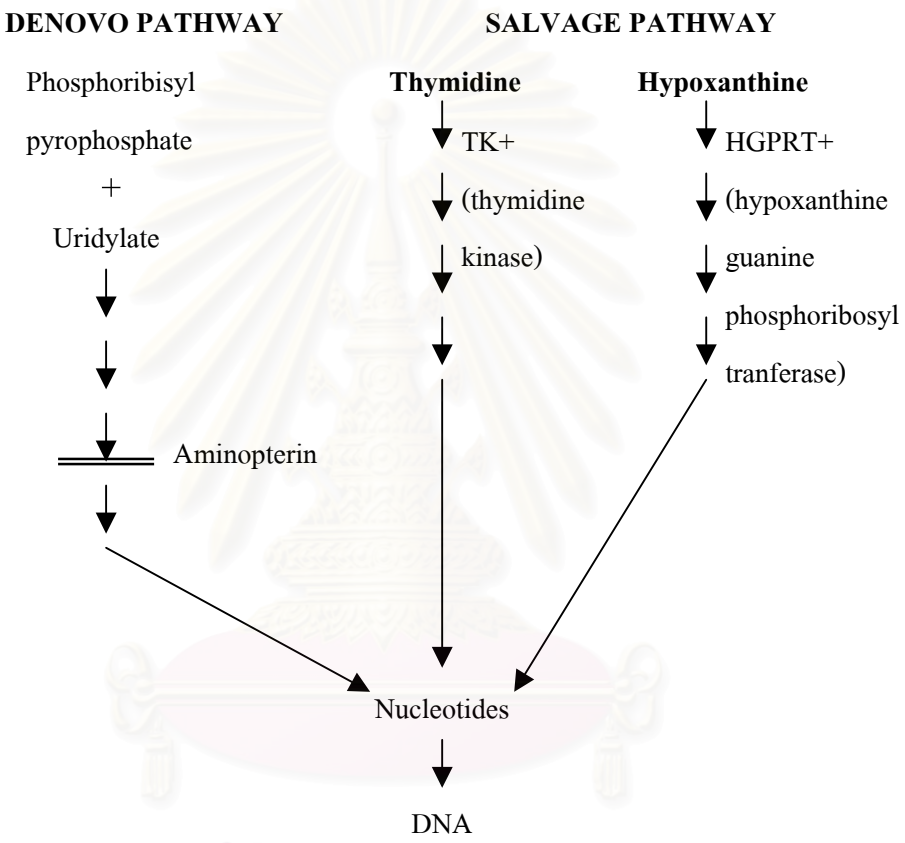
รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Köhler และ Milstein (1975) รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Somatic hybridization โดยเริ่มต้นการฉีดกระตุ้นหนู mice ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ และเมื่อตรวจสอบดู พบว่า หนูสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนในระดับที่สูง จึงนำม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของหนูมาทำการแยกเอาเซลล์บี ลิมโฟไซต์ เพื่อนำมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาของหนู mice โดยใช้ Sendai virus หรือสารพอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสื่อ โดยพบว่า พอลิเอทิลีนไกลคอล มีคุณสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์นุ่มและเหนียวหนืด เพื่อให้เซลล์สองเซลล์ที่เข้ามาติดกันสามารถหลอมรวมเป็นเซลล์เดียวกันได้ แต่เนื่องจากความเป็นพิษของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีต่อเซลล์จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการหลอมรวมเซลล์ ซึ่งพบว่าการใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 50% ที่ pH 8.0-8.2 โดยใช้เวลาในการเชื่อมเซลล์ 1-2 นาที จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และต่อจากขั้นตอนการหลอมเซลล์แล้วจำเป็นต้องหาวิธีการคัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมา เนื่องจากเซลล์ไมอีโลมาที่เป็นเซลล์มะเร็งที่เติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุมเซลล์ไฮบริโดมาโดยการใช้ selective media ซึ่งมีสาร aminopterin, hypoxanthine และ thymidine เรียกว่า HAT medium ซึ่งมีคุณสมบัติที่ทำให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นเจริญเติบโต (รูปที่ 6) โดยสาร aminopterin เป็นอะนาลอกของกรดฟอลิก (folic acid ananlog) สามารถจับกับเอนไซม์ folic acid reductase ทำให้ยับยั้งโคเอนไซม์ที่จะใช้ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทาง de novo biosynthesis เซลล์ที่จะรอดชีวิตใน HAT medium ได้จึงจะต้องมีการสร้างนิวคลีโอไทด์ผ่านทาง salvage pathway ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ 2 ตัวที่สำคัญ คือ thimidine kinase (TK) และ hypoxanthine guanine phosphoribisyl tranferase (HGPRT) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งไปจะไม่สามารถสร้างนิวคลีโอไทด์ได้ แต่ถ้านำเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ TK หรือ HGPRT ไปทำการหลอมรวมกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ก็จะให้เซลล์ลูกผสมหรือเซลล์ไฮบริโดมาสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ใน HAT medium

เซลล์ไมอีโลมาที่นำมาใช้ในการหลอมรวมกับเซลล์บี ลิมโฟไซต์ เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมานี้เป็นเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมา (plasmacytoma) ที่แยกได้จากหนู mice โดยนำมาทำให้มีคุณสมบัติขาดเอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไมอีโลมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร 6-thioguanine หรือ 8-azaguanine ซึ่งเป็น guanine base analogue และมีความเป็นพิษเมื่อเซลล์ไมอีโลมาใช้สารนี้ที่สามารถเข้าไปแทนที่เบสกัวนีนในการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์โดยใช้เอนไซม์ HGPRT ทำให้ได้สายนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติ ซึ่งจะทำให้เซลล์ไมอีโลมาตายในที่สุด แต่เซลล์ไมอีโลมาบางตัวสามารถปรับตัวให้มีชีวิตรอดได้โดยเกิดการกลายพันธุ์ สามารถใช้เอนไซม์ HGPRT ในการสร้างสายนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะนำเซลล์ไมอีโลมาที่มีคุณสมบัติ $HGPRT^-$ เหล่านี้มาหลอมรวมกับเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เป็นเซลล์ปกติ แล้วนำไปเลี้ยงใน HAT medium โดยเซลล์ที่จะมีชีวิตรอดคือ เซลล์ที่เกิดการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์มัยอีโลมา ($HGPRT^-$) และเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยอาศัยคุณสมบัติเด่นของเซลล์มะเร็งที่เจริญเติบโตได้ดีในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

และคุณสมบัติทางจีโนมของเซลล์ลิมโฟไซต์ในการสร้างแอนติบอดี โดยเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ไม่ได้เกิดการหลอมรวมตัวกับเซลล์มัยอีโลมาจะตายตามธรรมชาติภายในระยะเวลา 3-7 วัน



รูปที่ 2.6 วิถีการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ไฮบริโดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Degand และคณะ (1992) ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล เพื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ทดสอบหาเคลนบูเทอรอลในตัวอย่าง ด้วยวิธี enzyme immunoassay (EIA) โดยทำการเชื่อมสารเคลนบูเทอรอลกับ human serum albumin (HSA) ด้วยวิธีโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) เพื่อใช้เป็นอิมมูโนเจนสำหรับฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยนำเคลนบูเทอรอลมาละลายในน้ำกลั่น และปรับให้ได้ pH 1.5 ด้วย 1 N HCl จากนั้นละลายโซเดียมไนไตรต์ในน้ำกลั่น แล้วนำมาหยดลงในสารละลายเคลนบูเทอรอลโดยหยดในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้สาร diazotized clenbuterol ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใส จากนั้นนำสาร diazotized clenbuterol มาเติมลงในสาร HSA ที่ละลายอยู่ใน phosphate buffer , pH 7.5 แล้วนำสารละลาย (mixture) ที่ได้ มาตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปไดแอลิซิสด้วย PBS โดยเปลี่ยน PBS ทั้งหมด 6 ครั้ง เมื่อนำ CLB-HSA ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดีแล้ว แล้วนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีไปตรวจหาเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างปัสสาวะและตับของลูกวัว (veal calf) และแม่วัว (cow) ซึ่งได้รับอาหารที่มีเคลนบูเทอรอลผสมอยู่ พบว่า วิธี EIA มีค่า limit of detection เท่ากับ 0.15 และ 0.3 ppb ในตัวอย่างปัสสาวะและตับ ตามลำดับ

Roda และคณะ (2000) ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล เพื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ในพัฒนาการตรวจหาเคลนบูเทอรอล ด้วยวิธี chemiluminescent EIA โดยทำการเชื่อมสารเคลนบูเทอรอลกับ ovalbumin (OVA) ด้วยวิธีโซเดียมไนไตรต์เพื่อใช้เป็นอิมมูโนเจนสำหรับฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยนำสารเคลนบูเทอรอลมาละลายในกรด HCl แล้วนำไปวางไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงเติมโซเดียมไนไตรต์ลงไป จากนั้นเติม OVA ที่ละลายใน Carbonate buffer ลงไป นำสารละลาย ทั้งหมดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำสารเคลนบูเทอรอลที่เชื่อมกับ ovalbumin ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี gel filtration เมื่อนำ CLB-OVA ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดีแล้ว แล้วนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีไปตรวจหาเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างปัสสาวะวัว (veal calf) พบว่า วิธี chemiluminescent EIA มีค่า limit of detection เท่ากับ 0.08 ppb

Shelver และคณะ (2000) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแรคโตปามีน(ractopamine) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ได้ทำการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยครั้งแรกฉีดกระตุ้นด้วยสารผสมระหว่าง ractopamine-glutarate-Keyhole limpet hemocyanin (KLH) และ Freund's complete adjuvant ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ในครั้งต่อไปฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยสารผสมระหว่าง ractopamine-glutarate-KLH และ Freund's incomplete adjuvant ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ซึ่งฉีดกระตุ้นซ้ำ 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 30 วัน และประมาณ 10-14 วัน หลังจากฉีดกระตุ้นจะทำเจาะเลือดหนูเพื่อแยกเอาซีรัมมาตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA โดยเคลือบ plate ด้วย ractopamine-glutarate-BSA และฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยแรคโทปามีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม จากนั้นนำเซลล์ม้ามจากหนูมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา Sp2/0Ag14 เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาแล้วคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารแรคโทปามีน เมื่อทดสอบดูไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าเป็นชนิด IgG1κ จากการทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายกัน พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามต่ำ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพเพียงพอสามารถนำไปใช้ในการตรวจเพื่อคัดตัวอย่างเบื้องต้น (screening test) ได้

Abukhalaf และคณะ (2000) ได้ทำการตรวจวัดสารเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของหนูเปรียบเทียบกันระหว่างวิธี EIA และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่า ทั้งสองวิธีสามารถตรวจวัดปริมาณสารได้ใกล้เคียงกัน โดยในการตรวจวัดด้วย GC-MS พบว่า ค่าต่ำสุดที่เป็นตัวชี้วัดว่าตรวจ "พบหรือไม่พบ" (limit of detection; LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานเป็นตัวเลขได้อย่างมั่นใจว่าตรวจพบปริมาณเท่าไร (limit of quantification; LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.5 และ 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ในเลือด) และ 0.2 และ 0.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ในปัสสาวะ) ตามลำดับ แต่ถ้าต้องการตรวจสารที่มีปริมาณต่ำกว่าค่าเหล่านี้ควรตรวจวัดด้วย EIA เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 หนู mouse สายพันธ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
3.1.2 เซลล์ไมอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NSI)	ATCC No: TIB 18
3.1.3 อุปกรณ์ต่างๆ	
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
ขวดแก้ว	Boro (Germany)
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro (Thailand)
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE (England)
เครื่องมือนับเซลล์	Boeco (Germany)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
จานชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
ปิเปตต์แก้ว	HBG (Germany)
ปิเปตต์อัตโนมัต	Gilson (France)
ปั๊มลม	Iwaki (Japan)
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige (Thaialnd)
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII (Japan)
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
1. Aminopterine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
2. BCA protein assay kit	หาปริมาณโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. Bovine serum albumin	โปรตีนมาตรฐาน และใช้เชื่อมกับเคลนบูเทอรอล	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. Brombuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Witega, Germany
5. Bromchlorbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Witega, Germany
6. Chloramphenicol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
7. Cimbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Witega, Germany
8. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
9. Clenbuterol	ทอสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
10. Clenbuterol-KLH conjugate	ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง	บริษัท Abkem Iberia S.L., Spain
11. Clenproperol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Witega, Germany
12. D-glucose	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
13. Diethyl ether	สลบหนูทดลอง	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
14. Dimethyl sulfoxide	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	บริษัท Fluka, Switzerland

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
15. Disodium hydrogenphosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo erba, USA
16. Enrofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
17. Fetal bovine serum	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
18. Furazolidone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
19. Hydrogen peroxide	เตรียมสับสเตรต	บริษัท Fluka, Switzerland
20. Hypoxanthine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
21. L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
22. Methanol	ตัวทำละลาย	บริษัท BDH, England
23. Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
24. O-phenylenediamine	เตรียมสับเตรต	บริษัท Abkem Iberia S.L., Spain
25. Penicllin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
26. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	บริษัท Zymed, USA
27. Polyethylene glycol	สารสื่อในการหลอมรวมเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. RPMI 1640 medium	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
29. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	หน้าที่	ที่มา
30. Sodium bicarbonate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
31. Sodium cabonate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Merck, Germany
32. Sodium chloride	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
33. Sodium dihydrogen phosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo erba, USA
34. Sodium nitrite	เตรียม Clenbuterol-BSA conjugate	บริษัท Merck, Germany
35. Sodium pyruvate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
36. Streptomycin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
37. Sulfamethazine	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
38. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	บริษัท Merck, Germany
39. Tetracyclin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
40. Tween 20	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
41. นมพร่องมันเนย	ทดสอบ ELISA	บริษัท Mission health food, Thailand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย ด้วยเคลนบูเทอรอลที่เชื่อมกับกับคีโฮลลิมเพตฮีโมไซยานิน (Keyhole limpet hemocyanin; KLH) (CLB-KLH) ที่ผสมกับ Freud's adjuvant เข้าในหนูทดลองทุก 21 วัน เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีสารนี้ จากนั้นนำเซลล์จากม้ามของหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาของหนู เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติเด่นเหมือนเซลล์ทั้งสองชนิด คือ สามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดีและสามารถเจริญได้ไม่จำกัดในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเคลนบูเทอรอล แล้วนำเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกได้มาเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อให้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ ทดสอบไอโซไทป์ ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายเคลนบูเทอรอล และการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการทำ Screening test

3.4.1.1 การเชื่อมสารเคลนบูเทอรอลกับ BSA

เนื่องจากการฉีดกระตุ้นหนูในงานวิจัยนี้ ทำการฉีดกระตุ้นด้วย CLB-KLH ที่ได้จากการซื้อจากบริษัท Abkem Iberia S.L. ดังนั้น จึงทำการเชื่อมเคลนบูเทอรอลกับ BSA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมและคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอ ซึ่งทำตามวิธีของ Bacigalupo และ คณะ (1995) โดยนำสารเคลนบูเทอรอลมา 5 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 M HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารละลายจะกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนสารหลอมละลาย จึงเติมสารโซเดียมไนไตรต์ 60 มิลลิกรัม ลงไป เขย่าเบา ๆ จากนั้นนำ BSA มา 20 มิลลิกรัม ละลายใน 0.05 M Carbonate buffer (pH 9.6) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย BSA ไปเติมลงไปในสารละลายเคลนบูเทอรอล เขย่าเบาๆ นำสารละลายทั้งหมดไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นำสารละลายไปทำการไดแอลิซิสใน PBS โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง

3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนของ CLB-BSA โดยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

เพื่อหาปริมาณโปรตีนของ BSA หลังจากการเชื่อมกับเคลนบูเทอรอล (CLB-BSA) ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE โดยเตรียม Working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วนรีเอเจนต์ A:B = 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารตัวอย่าง (CLB-BSA) โดยทำการเจือจางด้วย PBS ซึ่งสารมาตรฐานเจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเจือจาง 10 20 และ 40 เท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.4.1.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ CLB-BSA

เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของ CLB-BSA โดยดูว่าน้ำหนักโมเลกุลของ BSA เพิ่มขึ้นหรือไม่ ถ้าน้ำหนักโมเลกุลของ BSA เพิ่มขึ้น แสดงว่า เคลนบูเทอรอลเชื่อมติดกับ BSA โดยได้ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ด้วยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) โดยวิเคราะห์ที่ หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

3.4.2.1 การฉีดกระตุ้นหนู

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย เคลนบูเทอรอลที่เชื่อมกับคีโฮลลิมเพตฮีโมไซยานิน (CLB-KLH) ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก จะใช้แอนติเจนปริมาณ 20 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ใน PBS 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยผสมให้มีลักษณะเป็น emulsion ก่อนฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู (intraperitoneal) สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ และทำการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 ในวันที่ 21 โดยผสมแอนติเจนปริมาณ 20 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ใน PBS 100 ไมโครลิตร กับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (v/v) เช่นกัน จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบดูระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดียังอยู่ในระดับต่ำอยู่ก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีการเดิมทุกๆ 21 วัน เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอ ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยแอนติเจนที่ผสมกับน้ำเกลือเข้าช่องท้องในปริมาณ 20 ไมโครกรัม ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน ถัดไป

3.4.2.2 การเตรียมซีรัม

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

3.4.2.3 การหาระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ในซีรั่มโดยวิธี Indirect ELISA

เตรียมสาร CLB-BSA ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเติมใน จานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมซีรัมจากหนูที่เจือจางระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 1:500 – 1:128,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-Rabbit

anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:2000 ใน 0.5%BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน citrate buffer หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

3.4.2.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัม โดยวิธี Competitive Indirect ELISA

นำซีรัมหนูมาทดสอบดูว่าหนูมีแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลหรือไม่ ถ้าหนูมีแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะจับกับเคลนบูเทอรอลที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่มีเคลนบูเทอรอล โดยเตรียมสารเคลนบูเทอรอลที่ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับซีรัมหนูที่เจือจางด้วย 0.5% BSA ใน PBS ความเจือจาง 1:4000 โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

3.4.3 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา โดยใช้สาร 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล (w/v) เป็นสื่อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 การเตรียมสารสื่อในการหลอมรวมเซลล์

นำพอลิเอทิลีนไกลคอลมาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาตร 2 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้ 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล (w/v) แล้วนำ 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล (w/v) ไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำไปใช้ในการหลอมรวมเซลล์

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ไมอีโลมา

นำเซลล์ไมอีโลมา NSI มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ไมอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล ประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไมอีโลมาที่เลี้ยงอยู่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ออกมาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 2-3 ครั้ง โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีโดยรอบสุดท้ายของการปั่นล้างเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหลอมรวมเซลล์

3.4.3.3 การเตรียมเซลล์ม้าม

นำหนู BALB/c ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย CLB-KLH มาทำการฆ่า โดยใช้ไดเอทิลอีเธอร์ แล้วเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด เมื่อได้เซลล์ม้ามแล้วนำไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำเซลล์ม้ามไปทำการเชื่อมกับเซลล์มัยอีโลมา

3.4.3.4 การหลอมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมา

ผสมเซลล์ม้ามปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเซลล์มัยอีโลมาปริมาตรเท่ากัน ในอัตราส่วน 1:1 รวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองผสมกัน ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วค่อยๆ หยด 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล (w/v) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับใช้ปลาย Pasteur pipette กวนเบาๆ และช้าๆ โดยควบคุมให้สารละลาย 50% พอลิเอทิลีนไกลคอลไหลให้หมดภายใน 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีกครั้งละ 10 มิลลิลิตร จนครบ 40 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ อีกครั้ง เพื่อล้าง 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล ออกให้หมด ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก โดยการเทส่วนใสทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FCS ลงไปประมาณ 40 มิลลิลิตร ก่อนนำเซลล์ไปหยอดในจานชนิด 96 หลุมปริมาณหลุมละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5%

3.4.3.5 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FCS ทุก 2-3 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 5-7 วัน คอยสังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสง ถ้าเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มหลุมแล้วต้องคอยเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FCS ประมาณ 2- 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20% FCS และต้องคอยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย โดยถ้าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อาหารเลี้ยงเซลล์จะมีสีเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าปกติ หรือเมื่อดูก้นหลุมจะเห็นหลุมที่เกิดการปนเปื้อนมีลักษณะขุ่นมัวมาก ต้องทำการกำจัดหลุมนั้นทิ้งโดยเร็ว ทำการตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาเป็นระยะๆ เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 50% ของหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

3.4.3.6 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลโดยวิธี Indirect ELISA

เพื่อตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลจึงทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน 2 ชนิด คือ CLB-BSA และ BSA เพื่อเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงหลังจากทำ ELISA แล้ว ถ้าเซลล์ในหลุมใดมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย CLB-BSA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย BSA ต่ำ ก็จะเลือกเซลล์ในหลุมนั้นไปทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวต่อไป ทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ต้องการมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

3.4.3.7 การโคลนเซลล์ (single cell cloning) และทำให้เจือจางโดยวิธี Limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลมานับเซลล์และทำให้เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20% FCS รวมอยู่ด้วย โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่าจนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปหยอดลงในจานชนิด 96 หลุมจำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม)

ปริมาณหลุมละ 0.2 มิลลิลิตร จะได้เซลล์ไฮบริโดมาปริมาณ 8 เซลล์ 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน

3.4.3.8 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาอย่างถาวร

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่อยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียลซึ่งเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี 10% FCS มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาเก็บเซลล์ที่มี 10% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ Pasteur pipette เป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาเก็บเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.9 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรแล้วกลับมาเลี้ยงใหม่

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว หรือตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาเก็บเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้างเป็นจำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายเซลล์ทุกๆ 2-3 วันเมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด

3.4.4 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการทดลองตามข้อแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม Isotyping specific antibody ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:1000 นำไปเติมในจานชนิด 96 หลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HPR-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:600 ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

3.4.4.2 การหาความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสม ด้วยวิธี indirect ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นมากเมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA จะทำให้เกิดสัญญาณรบกวน และ เป็นการสิ้นเปลืองแอนติบอดี จึงต้องหาความเจือจางที่เหมาะสมเพื่อนำความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป โดยทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วย CLB-BSA ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS ที่ความเจือจาง 1:5 – 1:640 และแล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

3.4.4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี competitive indirect ELISA โดยคิดเป็นค่า inhibition concentration (IC50) และ limit of detection (LOD)

IC50 คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสาร

LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

ก. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์

เพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะต่อเคลนบูเทอรอลหรือไม่ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารบีตา-อะโกนิสต์ชนิดอื่นหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี competitive Indirect ELISA ถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเคลนบูเทอรอล ก็จะทำปฏิกิริยากับเคลนบูเทอรอลที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้นำเคลนบูเทอรอลมาทำปฏิกิริยา และทำการทดสอบกับสารอื่นที่อยู่ในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ได้แก่ ซัลบูทามอล, ซิมบูเทอรอล, บรอมบูเทอรอล, บรอมคลอร์บูเทอรอล และ เคลนโพรพารอล โดยเตรียมสารเคลนบูเทอรอลและสารบีตา-อะโกนิสต์ทั้ง 6 สาร ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางใน PBS โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

ข. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์

เพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์หรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Competitive indirect ELISA สารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เอนโรฟลอร์กซาซิน นอร์ฟลอร์กซาซิน คลอแรมเฟนิคอล เพนิซิลลิน ฟูราโซลิโดน เตตราไซคลิน ซัลฟาเมทาซีน และ สเตรปโตมัยซิน เตรียมสารทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางใน PBS โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.3

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC50 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดเป็น 50% B/Bo

IC50 = 50% B/Bo

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

Bo คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

เมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติอบดีต่อสารเคลนบูเทอรอล และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{\text{IC50 ของเคลนบูเทอรอล}}{\text{IC50 ของสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

และหาค่า limit of detection (LOD) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลโดยสูตรคำนวณดังนี้

LOD = Bo - 3SD

เมื่อ Bo คือ ค่าดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ผสมเคลนบูเทอรอล

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.5 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% FCS เพื่อให้เซลล์ไฮบริโดมาผลิตและหลั่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกมา ซึ่งจะสะสมรวมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.5.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีน เอ

นำโปรตีน เอ 1.5 กรัม มาทำให้พองตัว (swell) โดยแช่ใน PBS 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเติมใส่คอลัมน์ จากนั้นทำคอลัมน์ให้สมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้เท่ากับ pH 8.1 โดยใช้บัฟเฟอร์ 1 M Tris, pH 9 ก่อนนำมาเติมลงในคอลัมน์โปรตีน เอโดยให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยการเติม 0.1 M citrate buffer, pH 3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมกับการใช้หลอดทดลองที่มี 4 M Tris ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีค่าดูดกลืนแสงมารวมกันก่อนนำไปไดแอลิซิสใน PBS โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง

3.4.5.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์และทำไดแอไลซิสแล้วไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้ (Johnson และ Thorpe, 1987)

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{ค่า extinction coefficient ที่ 280 นาโนเมตร}} \times 10 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

หมายเหตุ : ค่า extinction coefficient ของ IgG เท่ากับ 13.6

3.4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์และทำไดแอไลซิสแล้วมาทดสอบความไวด้วยวิธี competitive indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.3 ก.

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการทำ Screening test

เนื่องจากสารเคลนบูเทอรอลเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ที่เรียกว่า แฮปเทน (Hapten) ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลได้ ดังนั้นจึงต้องเชื่อมเคลนบูเทอรอลกับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ คือ KLH โดยได้รับสารเชื่อมต่อนี้มาจาก บริษัท Abkem Iberia S.L. เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง และได้ทำการเชื่อมเคลนบูเทอรอลกับ BSA โดยวิธีโซเดียมไนไตร์ ในห้องปฏิบัติการเอง สำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISA ต่อไป ทั้งนี้เพื่อลด background ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อ KLH เมื่อทำการเชื่อมแล้วพบว่า ได้สารละลายที่มีลักษณะ สีเหลืองใส

4.1.1 การวัดปริมาณโปรตีนของ CLB-BSA

เมื่อทำการเชื่อม CLB-BSA แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic Acid (BCA) Assay เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ เทียบกับค่าดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (กราฟมาตรฐาน BSA แสดงดังรูปผนวกที่ ก.1) ซึ่งผลการทดลองแสดง ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารเคลนบูเทอรอลที่เชื่อมกับ BSA ที่ความเจือจางต่างๆ

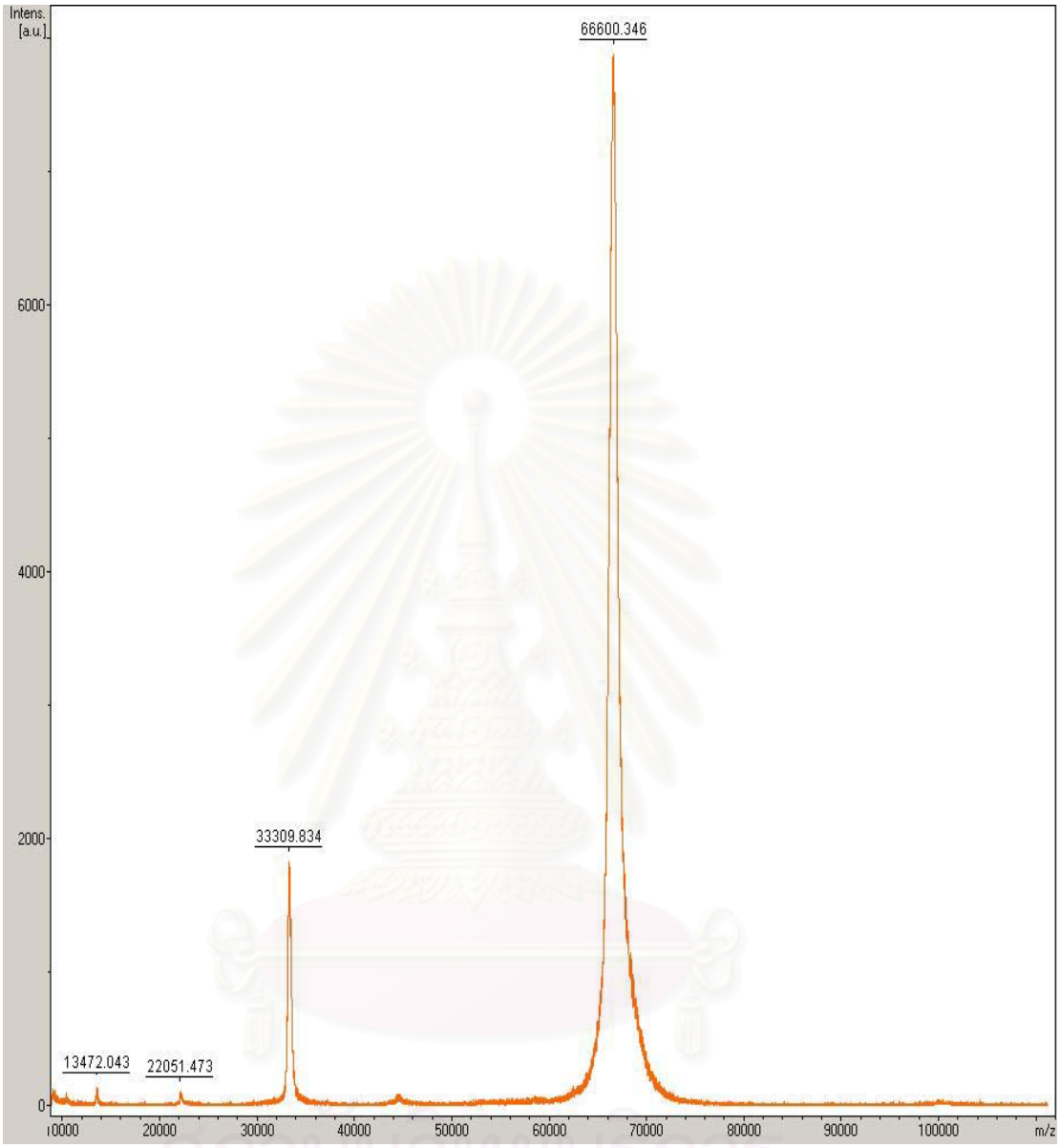
ความเจือจาง (เท่า)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
10	0.380	3.80
20	0.213	4.26
40	0.104	4.16
ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย		4.07

จากผลการทดลอง พบว่า สารเคลนบูเทอรอลที่เชื่อมกับ BSA ที่ความเจือจาง 1:10, 1:20 และ 1:40 มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.380, 0.213 และ 0.104 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA และคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 3.80, 4.26 และ 4.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณโปรตีนเฉลี่ย ได้เท่ากับ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

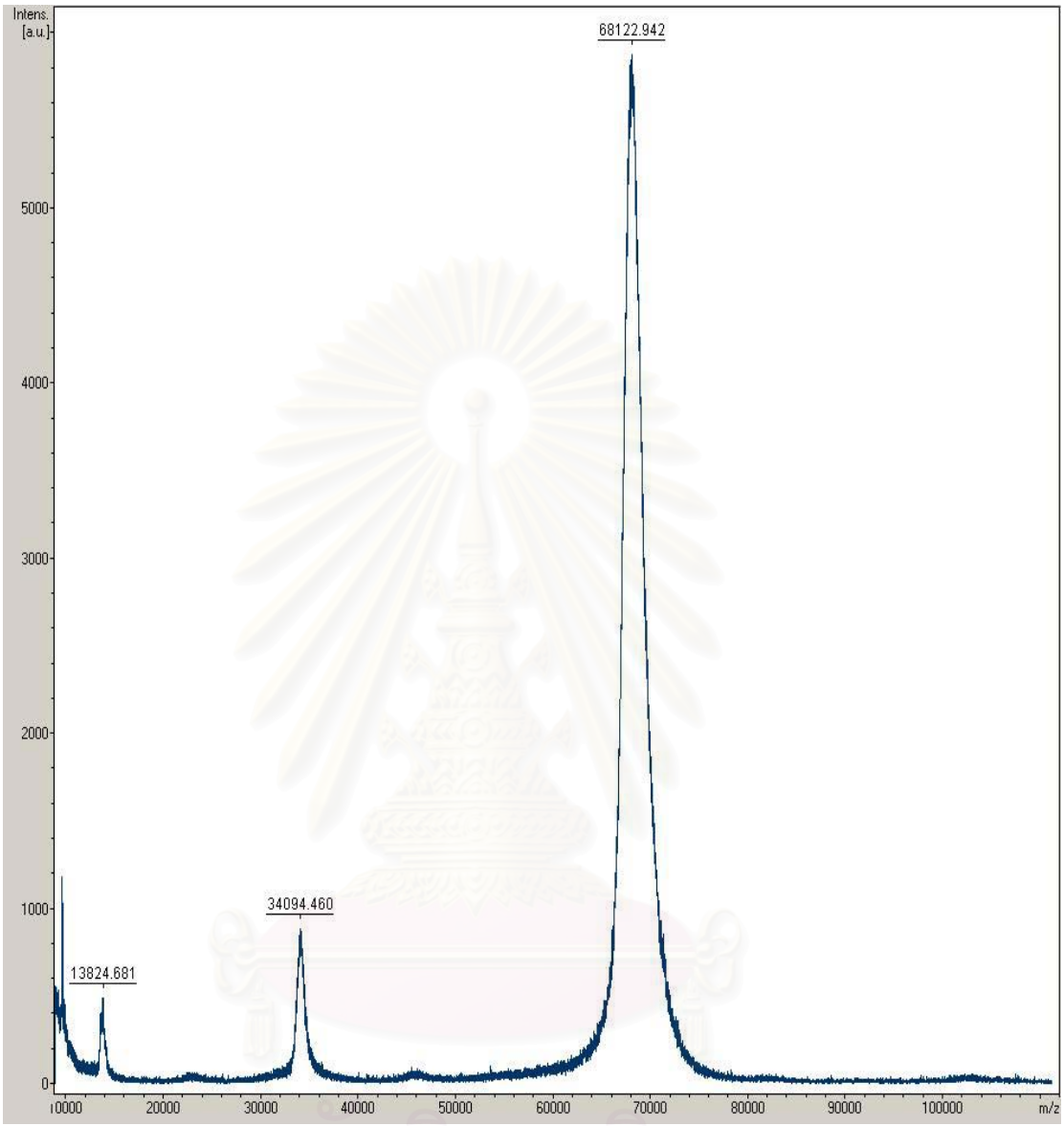
4.1.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ CLB-BSA

วิธีหนึ่งในการตรวจสอบผลของการเชื่อมต่อเคลนบูเทอรอลเข้ากับ BSA คือการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเชื่อมต่อที่ได้ เทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ไม่ได้ทำการเชื่อม ซึ่งสามารถวัดได้โดยอาศัยเทคนิค MALDI-TOF MS ผลการวิเคราะห์ พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ BSA มีค่าเท่ากับ 66,000.3 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ได้จากการเชื่อมต่อ มีค่าเท่ากับ 68,122.9 ดาลตัน (รูปที่ 4.1 และ 4.2) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของเคลนบูเทอรอล มีค่าเท่ากับ 313.7 ดาลตัน ดังนั้นจึงสามารถคิดเป็นอัตราส่วนโมเลกุลของเคลนบูเทอรอลที่ติดอยู่บน BSA 1 โมเลกุล เท่ากับ 4.8 โมเลกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA โดยวิธี MALDI-TOF MS



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CLB-BSA โดยวิธี MALDI-TOF MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย CLB-KLH ให้สร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล เพื่อนำซีรัมของหนูที่มีแอนติบอดีชนิดพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลไปใช้เป็นตัวควบคุมบวก ในขั้นตอนการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล และนำเซลล์ม้ามจากหนูตัวที่มีระดับแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลสูง ไปทำการหลอมรวมเซลล์ต่อไป ผลการทดสอบหาระดับแอนติบอดี และค่าดูดกลืนที่ 492 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA แสดงดังตารางที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ระดับแอนติบอดีของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย CLB-KLH

หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดี (antibody titer)	จำนวนครั้งที่ฉีดกระตุ้น
1	1:32,000	4
2	1:64,000	5
3	1:64,000	7
4	1:64,000	4

จากตารางที่ 4.2 แสดงระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว ที่ฉีดกระตุ้นด้วย CLB-KLH โดยหาระดับแอนติบอดีจากค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.2 (ตารางที่ 4.3) โดยได้ฉีดกระตุ้นหนูทั้งหมด 3 ชุด คือ

หนูชุดที่ 1 คือ หนูตัวที่ 1 และตัวที่ 2

หนูตัวที่ 1 ฉีดกระตุ้น 4 ครั้ง จึงนำเซลล์ม้ามของหนูไปทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1

หนูตัวที่ 2 ฉีดกระตุ้น 5 ครั้ง จึงนำเซลล์ม้ามของหนูไปทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2

หนูชุดที่ 2 คือ หนูตัวที่ 3

ฉีดกระตุ้น 7 ครั้ง จึงนำเซลล์ม้ามของหนูไปทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3

หนูชุดที่ 3 คือ หนูตัวที่ 4

ฉีดกระตุ้น 4 ครั้ง จึงนำเซลล์ม้ามของหนูไปทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4

ตารางที่ 4.3 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของซีรัมหนูที่ความเจือจางต่างๆ

ความเจือจาง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของหนูตัวที่			
	1	2	3	4
1:500	1.010	1.988	2.560	3.008
1:1,000	1.061	1.754	2.115	2.228
1:2,000	0.916	1.051	1.441	1.497
1:4,000	0.335	0.723	0.776	1.025
1:8,000	0.313	0.564	0.629	0.773
1:16,000	0.268	0.421	0.387	0.531
1:32,000	0.223	0.306	0.299	0.383
1:64,000	0.132	0.201	0.185	0.198
1:128,000	0.064	0.124	0.113	0.129
ซีรัมหนูก่อนกระตุ้น 1:2000	0.059	0.085	0.060	0.042

4.3 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.3.1 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 (Fusion 1)

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 1 กับเซลล์ไมอีโลมา แล้วทำการแบ่งเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 576 หลุม (6 จาน)โดยภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ นำจานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) พบว่า เซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่หลอมรวมตายหมดแล้ว และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม โดยพบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมามีประมาณ 60% ของหลุมทั้งหมดที่ทำการแบ่งเลี้ยง จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนโคโลนีเพิ่มจำนวนมากขึ้นประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยนำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อพบเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการจึงทำการย้ายเซลล์จากหลุมในจานชนิด 96

หลุม ไปใส่ลงในหลุมของจานชนิด 24 หลุม ซึ่งหลุมจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปทำการแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ เมื่อทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมในจานชนิด 24 หลุม พบว่า เซลล์ได้สูญเสียคุณสมบัติการผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลไป

4.3.2 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 (Fusion 2)

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามหนูตัวที่ 2 กับเซลล์ไมอีโลมา แล้วทำการแบ่งเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 576 หลุม (6 จาน) หลังจากนั้นประมาณ 3 วัน นำจานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่า เกิดการปนเปื้อน (contamination) ในบางหลุมจึงทำการกำจัดทิ้ง และภายหลังการเชื่อมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ พบว่า เซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่หลอมรวมตายหมดแล้ว แต่ในหลุมมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) จำนวนมาก และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม โดยพบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมามีประมาณ 15% ของหลุมทั้งหมดที่ทำการแบ่งเลี้ยง จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นและโตประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA แต่ไม่พบเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

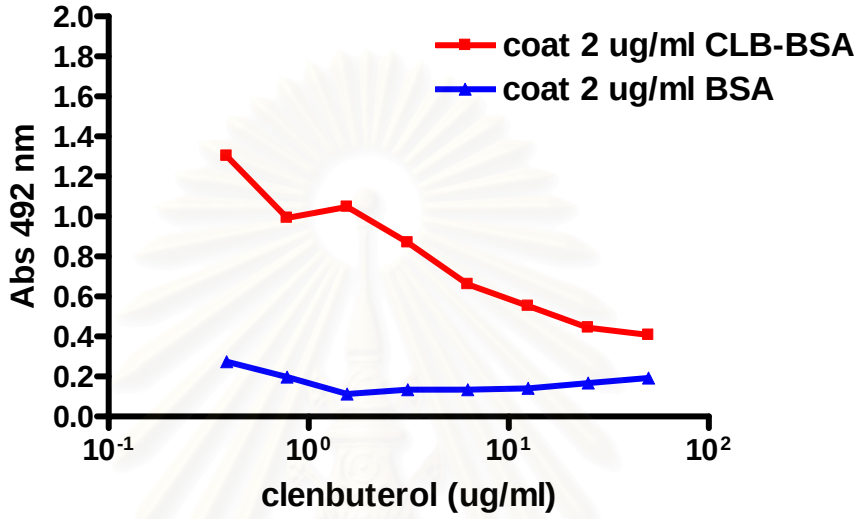
4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 (Fusion 3)

4.3.3.1 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัม โดยวิธี competitive indirect ELISA

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 และ 2 ซึ่งไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล อาจคาดเดาได้ว่าในซีรัมหนูไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคลนบูเทอรอล ดังนั้นก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ครั้งต่อไป จึงนำซีรัมของหนูตัวที่จะนำม้ามมาทำการหลอมรวมเซลล์มาทดสอบกับสารเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระ เพื่อให้ยืนยันว่ามีเซลล์ม้ามที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลจริง

จากการนำซีรัมหนูตัวที่ 3 ที่ความเจือจาง 1:1000 มาตรวจสอบดูว่าหนูมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระหรือไม่ ถ้าหนูมีแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะทำปฏิกิริยากับเคลนบูเทอรอลที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่ได้นำเคลนบูเทอรอลมาทำปฏิกิริยา จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.3) พบว่า

ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเคลนบูเทอรอลเพิ่มขึ้น แสดงว่า ในซีรัมของหนูตัวที่ 3 มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระ จึงนำม้ามมาทำการหลอมรวมเซลล์ และเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงเมื่อเคลือบจานชนิด 96 หลุม ด้วย CLB-BSA และ BSA พบว่า ในซีรัมมีแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ BSA ได้บางส่วน



รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัมของหนูตัวที่ 3 โดยวิธี competitive indirect ELISA

4.3.3.2 ผลการหลอมรวมเซลล์

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 3 กับเซลล์ไมอีโลมา(Fusion 3) ซึ่งหนูถูกฉีดกระตุ้นด้วย CLB-KLH แล้วทำการแบ่งเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 480 หลุม (5 จาน) โดยภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ นำจานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่า เซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมาที่ไม่หลอมรวมตายหมดแล้ว และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม โดยพบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมามีประมาณ 36% ของหลุมทั้งหมดที่ทำการแบ่งเลี้ยง จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นและโตประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาในหลุม 3/9B เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล จึงทำการโคลนเซลล์และเจือจางให้ได้โคลนเดี่ยวซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อ

ให้แน่ใจว่าเป็นโมโนโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ทำการตรวจสอบแต่ละครั้ง ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงของการโคลนเซลล์		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
3/9B	0.982	1.538	1.289
*ตัวควบคุมบวก	0.823	1.177	1.081
*ตัวควบคุมลบ	0.061	0.058	0.049

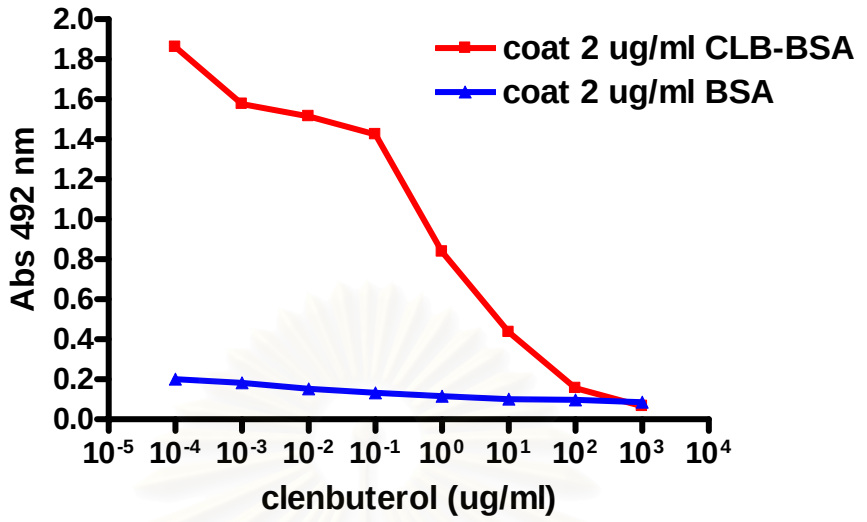
* : ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 ที่ความเจือจาง 1:2000 ใน PBS

ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูก่อนได้รับการกระตุ้น (preimmune) ที่ความเจือจาง 1:2000 ใน PBS

4.3.4 การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 (Fusion 4)

4.3.4.1 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัม โดยวิธี competitive indirect ELISA

จากการนำซีรัมหนูตัวที่ 4 ที่ความเจือจาง 1:4000 มาตรวจสอบดูว่าหนูมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระหรือไม่ ถ้าหนูมีแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะทำปฏิกิริยากับเคลนบูเทอรอลที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่ได้นำเคลนบูเทอรอลมาทำปฏิกิริยา จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.4) พบว่าค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเคลนบูเทอรอลเพิ่มขึ้น แสดงว่า ในซีรัมของหนูตัวที่ 3 มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคลนบูเทอรอลในรูปอิสระ จึงนำม้ามมาทำการหลอมรวมเซลล์ และเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงเมื่อเคลือบจานชนิด 96 หลุม ด้วย CLB-BSA และ BSA พบว่า ในซีรัมมีแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ BSA ได้บางส่วน



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลในซีรัมของหนูตัวที่ 4 ด้วยวิธี Indirect ELISA

4.3.4.2 ผลการหลอมรวมเซลล์

หลังจากทำการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 4 กับเซลล์ไมอีโลมา (Fusion 4) ซึ่งหนูถูกฉีดกระตุ้นด้วยเคลนบูเทอรอลที่ติดกับ KLH (CLB-KLH) แล้วทำการแบ่งเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 576 หลุม (5 plate) โดยภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ นำจานชนิด 96 หลุม มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่า เซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมาที่ไม่หลอมรวมตายหมดแล้ว และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม โดยพบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมามีประมาณ 94% ของหลุมทั้งหมดที่ทำการแบ่งเลี้ยง จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาต่อโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นและโตประมาณ 2/3 ของหลุม จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA พบเซลล์ไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติสามารถสร้างแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอลจำนวน 6 หลุม คือ เซลล์ในหลุม 1/7C, 1/11G, 3/9A, 3/6C, 6/11D และ 6/11G จึงทำการโคลนเซลล์และเจือจางให้ได้โคลนเดี่ยวซ้ำ 3 ครั้งจนแน่ใจว่าเป็นโมโนโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ทำการตรวจสอบแต่ละครั้ง ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเคลนบูเทอรอล

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงของการโคลนเซลล์		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1/7C	2.471	2.188	2.604
1/11G	2.712	2.081	1.695
3/9A	1.582	2.129	1.828
3/6C	2.335	2.889	2.312
6/11D	2.007	1.836	1.226
6/11G	1.279	1.212	1.521
*ตัวควบคุมบวก	1.378	1.021	1.485
*ตัวควบคุมลบ	0.059	0.074	0.064

* : ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่ความเจือจาง 1: 4000 ใน PBS

ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูก่อนได้รับการกระตุ้น (preimmune) ที่ความเจือจาง 1: 4000 ใน PBS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 สรุปผลการหลอมรวมเซลล์ อัตราส่วนเซลล์ไฮบริโดมาและหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง ภายหลังการหลอมรวมเซลล์

หนูตัวที่	การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่	จำนวนหลุมทั้งหมด	อัตราส่วนที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา		อัตราส่วนของหลุมที่ให้ผลบวก	
			จำนวนหลุมที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา	เปอร์เซ็นต์ (%)	จำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง	เปอร์เซ็นต์ (%)
1	1	480	288	60.0	0	0
2	2	480	72	15.0	0	0
3	3	480	175	36.5	1	0.21
4	4	576	541	93.9	6	1.04

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่คัดเลือกมาแล้ว คือ โมโนโคลนเบอร์ 3/9B 1/7C 1/11G 3/9A 3/6C 6/11D และ 6/11G พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดเป็นชนิด IgG1 ซึ่งผลการทดสอบไอโซไทป์ แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	Immunoglobulin isotype					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM
3/9B	**0.751**	0.103	0.190	0.331	0.087	0.277
1/7C	**1.317**	0.131	0.193	0.172	0.066	0.362
1/11G	**1.192**	0.141	0.301	0.225	0.079	0.260
3/9A	**1.119**	0.127	0.484	0.373	0.077	0.428
3/6C	**1.277**	0.138	0.206	0.260	0.107	0.275
6/11D	**0.884**	0.101	0.191	0.329	0.076	0.309
6/11G	**1.253**	0.127	0.192	0.179	0.076	0.371
ตัวควบคุมบวก (IgG3)	0.124	0.308	0.362	**1.921**	0.090	0.259

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงโดยตัวอักษรทึบ คือ ค่าที่ให้ผลบวก

4.4.2 การหาความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำไปทดสอบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม ด้วยวิธี indirect ELISA

ผลการทดสอบหาความเจือจางที่เหมาะสม (ตารางที่ 4.8) เพื่อนำความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเลือกความเจือจางที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ประมาณ 0.8-1.0 ดังนั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B, 1/7C, 1/11G, 3/9A, 3/6C, 6/11D และ 6/11G จึงเลือกที่ความเจือจาง 1:20, 1: 160, 1:80, 1:80, 1:160, 1:10 และ 1:20 เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่อไปตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเจือจางต่างๆ

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเจือจาง								
	ไม่เจือจาง	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
3/9B	2.793	2.337	1.633	**1.018**	0.561	0.259	0.159	0.106	0.124
1/7C	2.867	2.731	2.359	2.267	1.885	1.470	**1.016**	0.625	0.889
1/11G	2.909	2.753	2.027	2.207	1.339	**1.001**	0.621	0.407	0.536
3/9A	2.424	2.430	1.931	1.517	1.276	**0.986**	0.835	0.605	0.692
3/6C	2.632	2.539	2.186	2.253	1.817	1.457	**0.984**	0.560	0.643
6/11D	1.388	1.307	**0.808**	0.611	0.381	0.217	0.150	0.078	0.094
6/11G	1.794	1.459	1.124	**0.855**	0.604	0.404	0.259	0.177	0.200

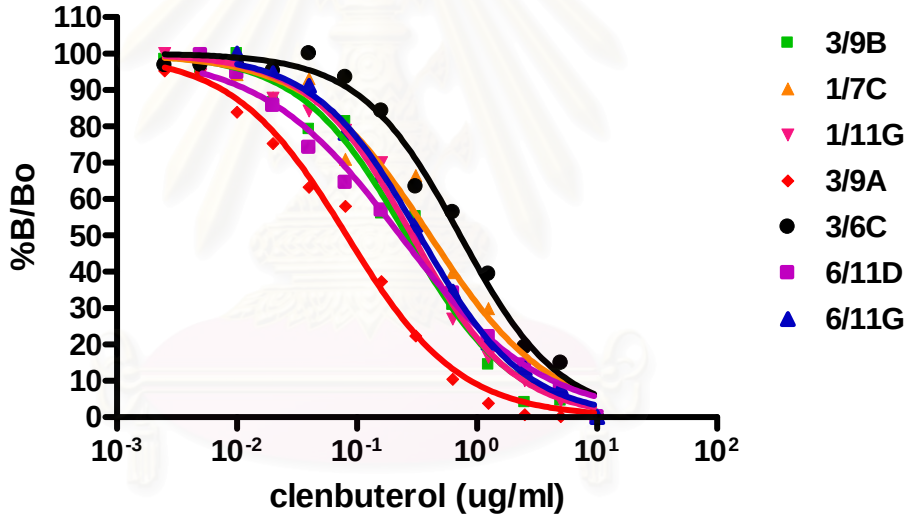
หมายเหตุ : ค่าที่แสดงโดยตัวอักษรทึบ คือ ค่าที่ให้ผลบวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.3 การทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี competitive indirect ELISA

4.4.3.1 การทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลและทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติอบดีต่อสารเคลนบูเทอรอล (รูปที่ 4.5) และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ต่างๆ แล้ว คำนวณเป็นค่า 50% inhibition concentration (IC50) และ เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม แสดงดังตารางที่ 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.5 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอล

ผลการทดสอบหาค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 โคลน ต่อสารเคลนบูเทอรอล พบว่า ค่า IC50 อยู่ในช่วง 0.08-0.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค่า LOD อยู่ในช่วง 5-198 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.9) โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A มีค่า IC50 เท่ากับ 0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่ามี ความไว (sensivity) สูงที่สุด และรองลงมา คือ โคลน 6/11D มีค่า IC50 เท่ากับ 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (กราฟหาค่า IC50 และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารต่างๆ แสดงดังรูปผนวกที่ ก.2-ก.43)

ตารางที่ 4.9 ค่า IC50 และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ต่อเคลนบูเทอรอล

รหัสเซลล์ไฮบริโดมาของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	IC50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
3/9B	0.26	13
1/7C	0.38	198
1/11G	0.28	42
3/9A	0.08	5
3/6C	0.72	172
6/11D	0.23	8
6/11G	0.46	45

ตารางที่ 4.10 ค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์

ชนิดสาร	รหัสเซลล์ไฮบริโดมาของโมโนโคลนอลแอนติบอดี						
	3/9B	**1/7C**	**1/11G**	**3/9A**	**3/6C**	**6/11D**	**6/11G**
เคลนบูเทอรอล	0.26	0.38	0.28	0.08	0.72	0.23	0.46
ซัลบูทามอล	0.39	1.05	0.49	1.08	0.80	0.49	0.43
ซิมบูเทอรอล	0.16	0.50	0.43	0.50	0.22	0.22	0.44
บรอมบูเทอรอล	0.13	0.45	0.21	0.07	0.46	0.50	0.34
บรอมคลอร์บูเทอรอล	0.12	0.33	0.26	0.10	0.55	0.28	0.28
เคลนโพรเพอรอล	0.52	1.01	0.76	0.42	0.77	0.97	0.60

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์

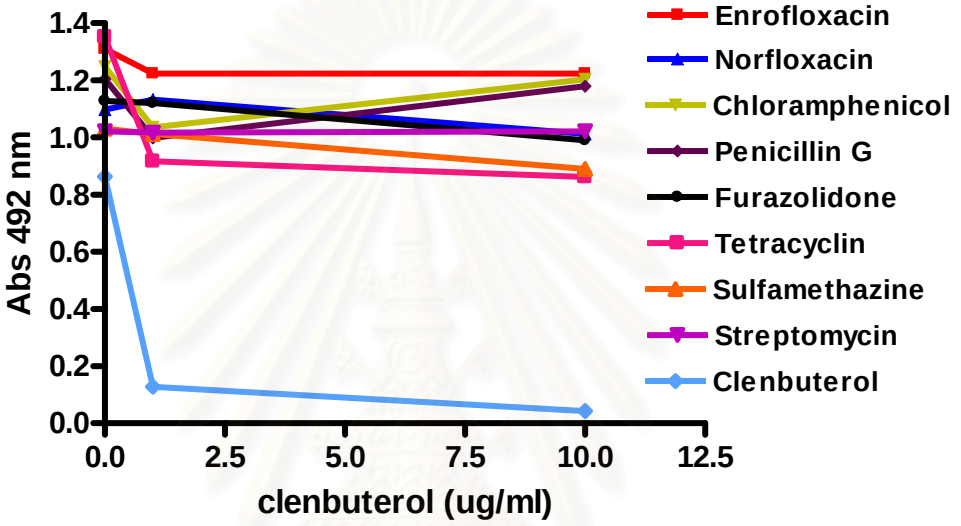
ชนิดสาร	รหัสเซลล์ไฮบริโดมาของโมโนโคลนอลแอนติบอดี						
	3/9B	**1/7C**	**1/11G**	**3/9A**	**3/6C**	**6/11D**	**6/11G**
เคลนบูเทอรอล	100	100	100	100	100	100	100
ซัลบูทามอล	66.66	36.19	57.14	7.41	90.0	46.94	86.05
ซิมบูเทอรอล	162.5	76.0	65.12	16.0	313.04	104.54	84.09
บรอมบูเทอรอล	200.0	84.44	133.33	114.29	156.52	46.0	108.82
บรอมคลอร์บูเทอรอล	216.66	115.15	107.69	80.0	130.9	82.14	132.14
เคลนโพรเพอรอล	50.0	37.62	36.84	19.05	93.51	23.17	61.66

และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-โกนิสต์ พบว่า ทุกโคลนเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่าง ๆ โดยมีปฏิกิริยาข้ามอยู่ในช่วง 7.41- 313 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.10) การที่ทุกโคลนสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ โครงสร้างหลักของสารในกลุ่มนี้มีความเหมือนกัน (รูปที่ 2.3) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีอาจจำเพาะต่อส่วนของโครงสร้างหลัก ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ ได้ ดังนั้น จึงเลือกโคลน 3/9A และ 6/11D เป็นตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบคุณสมบัติต่อไป เนื่องจากเป็นโคลนที่มีความไวสูงที่สุดและมีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ทุกสาร

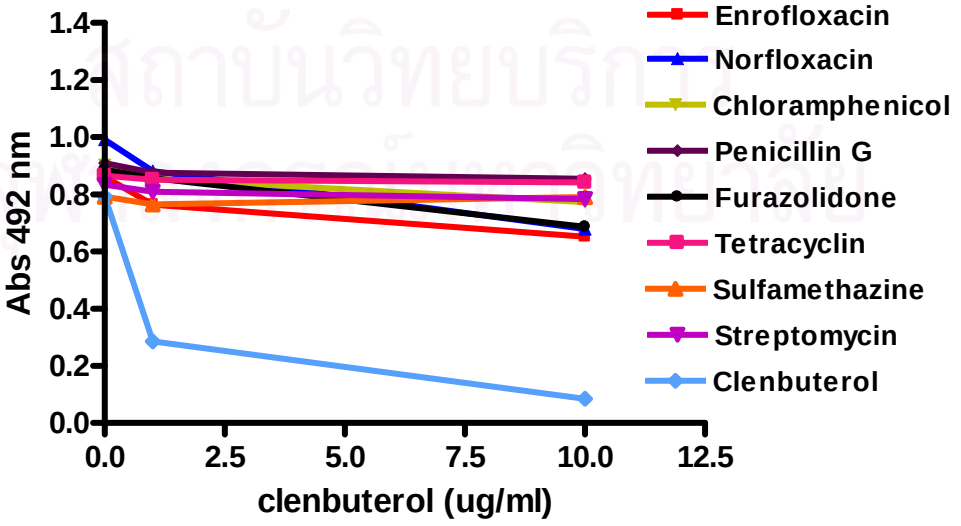
4.4.3.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A (รูปที่ 4.5) และ 6/11D (และรูปที่ 4.6) ต่อสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ต่างๆ แล้ว พบว่า เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่าง ๆ ต่ำ เพราะ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดูดกลืนแสงไม่

เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับที่ไม่ใส่สาร ในขณะที่เมื่อนำเคลนบูเทอรอลมาแย่งจับ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีหมด ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงถึงตัวควบคุมลบ และเมื่อคิดเป็นค่า IC50 และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 การทดสอบ competitive ELISA ระหว่างเคลนบูเทอรอลและสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A



รูปที่ 4.7 การทดสอบ competitive ELISA ระหว่างเคลนบูเทอรอลและสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/11D

ตารางที่ 4.12 สรุปค่า IC50 และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A และ 6/11D

ชนิดสาร	3/9A		6/11D	
	IC50	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม	IC50	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม
เคลนบูเทอรอล	0.08	100	0.23	100
ซัลบูทามอล	1.08	7.41	0.49	46.94
ซิมบูเทอรอล	0.50	16.0	0.22	104.54
บรอมบูเทอรอล	0.07	114.29	0.50	46.0
บรอมคลอร์บูเทอรอล	0.10	80.0	0.28	82.14
เคลนโพรเพอรอล	0.42	19.05	0.97	23.17
เอนโรฟลอร์กซาซิน	> 10	< 1	> 10	< 1
นอร์ฟลอร์กซาซิน	> 10	< 1	> 10	< 1
คลอแรมเฟนิคอล	> 10	< 1	> 10	< 1
เพนิซิลลิน	> 10	< 1	> 10	< 1
ฟูราโซลิโดน	> 10	< 1	> 10	< 1
เตตราไซคลิน	> 10	< 1	> 10	< 1
ซัลฟาเมทาซีน	> 10	< 1	> 10	< 1
สเตรปโตมัยซิน	> 10	< 1	> 10	< 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

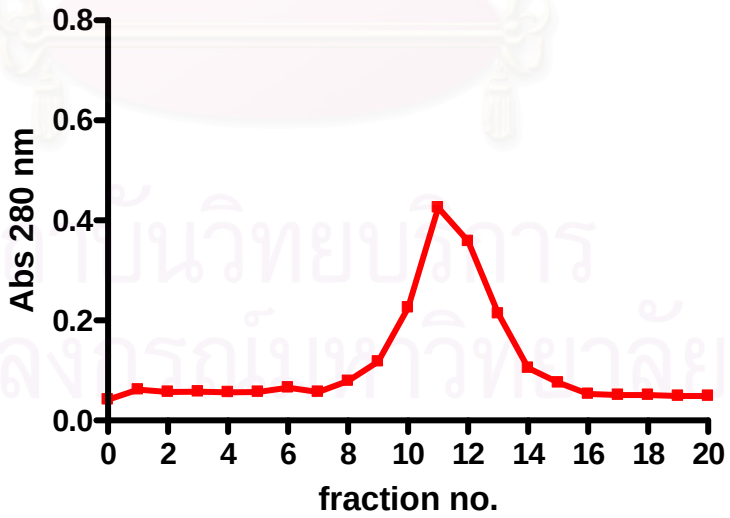
4.5 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A มีความไวสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเซลล์ไฮบริโดมาจากโคลนนี้มาเพิ่มจำนวนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้แอนติบอดีปริมาณมากสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

4.5.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีน เอ

จากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ โปรตีน เอ ซึ่งแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีน เอ ที่ pH 8 โดยที่โปรตีนและสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่จับกับโปรตีน เอ แต่ที่ค่า pH ต่ำลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อโปรตีน เอ จะลดลง ซึ่งที่ค่า pH 3 นั้นแอนติบอดีทั้งหมดจะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 พบว่า ในหลอดทดลองที่ 9 ถึงหลอดที่ 14 นั้นมีแอนติบอดีที่บริสุทธิ์อยู่ในความเข้มข้นสูงจึงได้นำแอนติบอดีมารวมกันและนำไปทำไดแอลิซิสด้วย PBS ทั้งหมด 5 ครั้ง



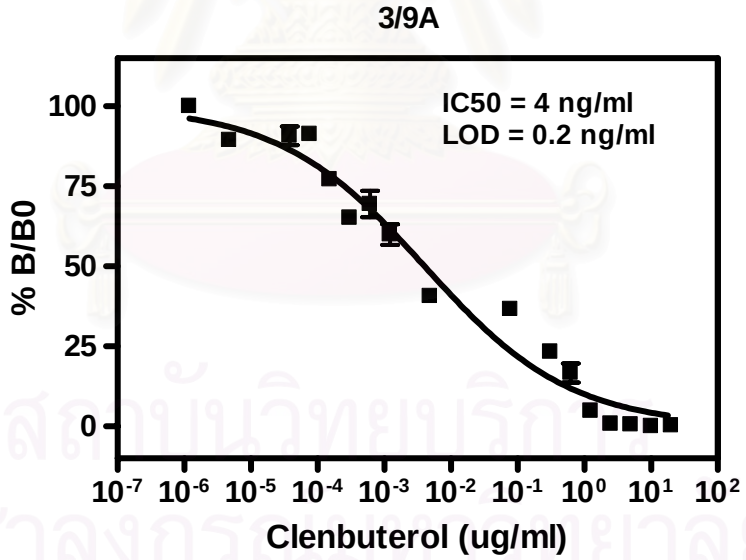
รูปที่ 4.8 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4.5.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

จากการนำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เพื่อหาความความเข้มข้นของแอนติบอดี พบว่า ค่าดูดกลืนแสงที่ความเจือจาง 1:2 เท่ากับ 0.639 เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการนำโมโนโคลแอนติบอดีโคลน 3/9A ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความไว พบว่ามีค่า IC50 เท่ากับ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD เท่ากับ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A หลังทำให้บริสุทธิ์ต่อสารเคลนบูเทอรอล

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

หลังจากทำการเชื่อมเคลนบูเทอรอลกับ BSA แล้ว เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีนของสารเคลนบูเทอรอลที่เชื่อมกับ BSA ได้เท่ากับ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ BSA ที่ได้ เท่ากับ 66,600.346 และน้ำหนักโมเลกุลของเคลนบูเทอรอลเชื่อมติดกับ BSA ที่ได้ เท่ากับ 68,122.942 เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนที่เชื่อมติดระหว่าง BSA กับ เคลนบูเทอรอล (BSA : CLB) เท่ากับ 1 : 4.8

หลังจากฉีดกระตุ้นหนูด้วย CLB-KLH แล้วนำเซลล์ม้ามของหนูมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา โดยภายหลังการหลอมรวมครั้งที่ 1 และ 2 ไม่ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ในครั้งที่ 3 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ โมโนโคลน 3/9B และในครั้งที่ 4 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 6 โคลน คือ โมโนโคลน 1/7C 1/11G 3/9A 3/6C 6/11D และ 6/11G

เมื่อศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยได้ตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดเป็นไอโซไทป์ IgG1 มีค่า IC50 อยู่ในช่วง 0.08-0.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD อยู่ในช่วง 5-198 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ พบว่า ทุกโคลนเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่าง ๆ โดยมีปฏิกิริยาข้ามอยู่ในช่วง 7.41- 313.04 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกโคลน 3/9A และ 6/11D เป็นตัวแทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบคุณสมบัติต่อไป เนื่องจากเป็นโคลนที่มีความไวสูงที่สุด โดยมีค่า LOD เท่ากับ 5 และ 8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ทุกสาร เมื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A และ 6/11D พบว่า เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารต่าง ๆ ต่ำ และคิดเป็น IC50 และ เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม ได้มากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A ซึ่งเป็นโคลนที่มีความไวสูงที่สุดมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีน เอ และหาความเข้มได้เท่ากับ 0.573 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปทดสอบความไวหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีค่า IC50 และค่า LOD เท่ากับ 4 และ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากค่า IC50 และค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่า ค่าที่ได้สูงกว่าค่า MRLs ซึ่งกำหนดโดยสหภาพยุโรป ดังนั้น ในการนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี ELISA จะต้องเพิ่มความไวให้แก่โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยอาจใช้วิธีเพิ่มสัญญาณของแอนติบอดีโดยใช้ biotin-strepavidin

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ ELISA ประเภท direct ELISA และ competitive ELISA ได้ และเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเคลนบูเทอรอลและมีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ จึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจเคลนบูเทอรอลและสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ที่ตกค้างในอาหารสำหรับบริโภคได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นทีทิพย์ กฤษณามระ. 2538. ฮอร์โมนกลไกการออกฤทธิ์ร่วม. ภาควิชาสรีระวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2538. หลักการอาหารสัตว์ เล่ม2. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ม.ร.ว ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ประหยัด โกมารทัต. ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม และ ภิญโญ พานิชพันธ์. 2530. ชีวเคมี. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ศ.ส. กรุงเทพฯ.

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

สุพล เลื่องยศลือชากุล. 2534. การใช้สารกลุ่ม phenethanolamine ปรับปรุงคุณภาพซากสุกร ประโยชน์ และอันตราย. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ 18 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยฯ: 173-187.

ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. 2547. สารเร่งเนื้อแดง Beta-agonist. กรมปศุสัตว์: กลุ่มเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ สำนักงานพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี.
http://www.dld.go.th/region2/betaagonist.html
http://www.dld.go.th/certify/hm_beta_agonist.pdf

ภาษาอังกฤษ

Abukhalaf I. K., von Deutsch D., Parks B. A., Wineski L., Paulsen D., Aboul-Enein H. Y. and Potter D. E. 2000. Comparative analytical quatitation of clenbuterol in biological matrices using GC-MS and EIA. Biomedical Chromatography. 14: 99-105.

Adeola O., Darko E. A., He P. and Young. L. G. 1990. Manipulation of porcine carcass composition by ractopamine. Journal of Animal Science. 68: 3633.

Buttery P. J., Lindsay D. B. and Haynes N. B. 1986. Control and manipulation of animal growth. Butterworth. London. U.K.

Chalermchaikit T., Leungyosluechakul S. and Saitanu K. 1994. Pharmacokinetics and Disposition of Salbutamol in Swine Tissue: A Preminary Study. Proceedings of the 13th IPVS Congress Bangkok. Thailand : 356.

Choo J. J., Horan M. A., Little R. A. and Rothwell N. J. 1992. Anabolic effects of clenbuterol in skeleton muscle are mediated by β_2-adrenoceptor activation. American Journal of Physiology Endrocrinology and Metabolism. 263: E50-E56.

Cubria J. C., Reguera R., Balana-Fouce R., Ordonez C. and Ordonez D. 1998. Polyamine-mediated heart hypertrophy induced by clenbuterol in the mouse. The Journal of pharmacy and pharmacology. 50, 1: 91-96.

Degand G., Bernes-Duyckaerts A. and Maghuin-Rogister G. 1992. Determination of Clenbuterol in Bovine Tissues and Urine by Enzyme Immunoassay. Journal of agricultural food chemistry. 40: 70-75.

Dunshea F. R. 1991. Factor affecting efficiency of β-agonist for pig. Pig news information. 12: 227-231.

Hanrahan J. P., Quirke J. F., Bomann W., Allen P., McEwan J. C., Fitzsimons J. M., Kotzian J. and Roche J. F. 1986. Beta-Agonists and Their Effects on Animal Growth and Carcass Quality. Meat Science. 22, 2 :161-162.

Johnstone A. and Thorpe R. 1987. Immunochemistry in practice. Blackwell scientific publications. London.

Köhler. G. and Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of Predefined specificity. Nature. 256: 495-497.

Litbretto S. E. A review of the toxicology of salbutamol (albuterol). 1994. Archives of toxicology. 68 :213-216.

Mill S.E. and Lui C.Y. 1990. Sensivity of lipolysis and lipogenesis to dibutyryl-cAMP and beta-adrenergic agonist in swine adipocytes in vitro. Journal of Animal Science. 68: 1017-1023.

Moser R. L., Dalrymple R.H., Cornelius S.G., Pettigrew J. E.and Allen C. E. 1986. Effect of cimaterol as a repartitioning agent in the diet for finishing pigs. Journal of Animal Science. 62: 21.

National Research Council. 1994. Metabolic Modifiers Effects on the Nutrient Requirement of Food Producing Animals. National Academy Press, Washington, D.C 81 p.

Peterla T.A. and Scanes C.G. 1990. Effect of beta-adrenergic agonist on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue in vitro. Journal of Animal Science. 68: 1024-1029

Roda A., Manetta A. C., Piazza F., Simoni P. and Lelli R. 2000. A rapid and sensitive 384-microtiter wells format chemiluminescent enzyme immunoassay for clenbuterol. Talanta. 52: 311-318.

Shelver W. L., Smith D. J. and Berry E. S. 2000. Production and Characterization of Monoclonal antibody against the beta-adrenergic agonist Ractopamine. Journal of Agricultural & Food Chemistry. 48: 4020-4026.

Warriss, P. D., Kestin S. C., Rolph T. P. and Brown S. N. 1990. The effects of the β-Adrenergic agonist salbutamol on meat quality in pigs. Journal of Animal Science. 68: 128-136.

Watkins, L. E., Jones D. J., Mowvey D. H., Anderson D. and Veenhuizen E. L. 1990. The effect of various level of ractopamine hydrochloride on the performance and carcass characteristics of finishing swine. Journal of Animal Science. 68: 3588-3540.

Wiley J. F., Spiller H. A., Krenzelok E. P. and Borys D. J. 1994. Unintentional albuterol ingestion in children. Pediatric Emergency Care. 10, 4: 193-196.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

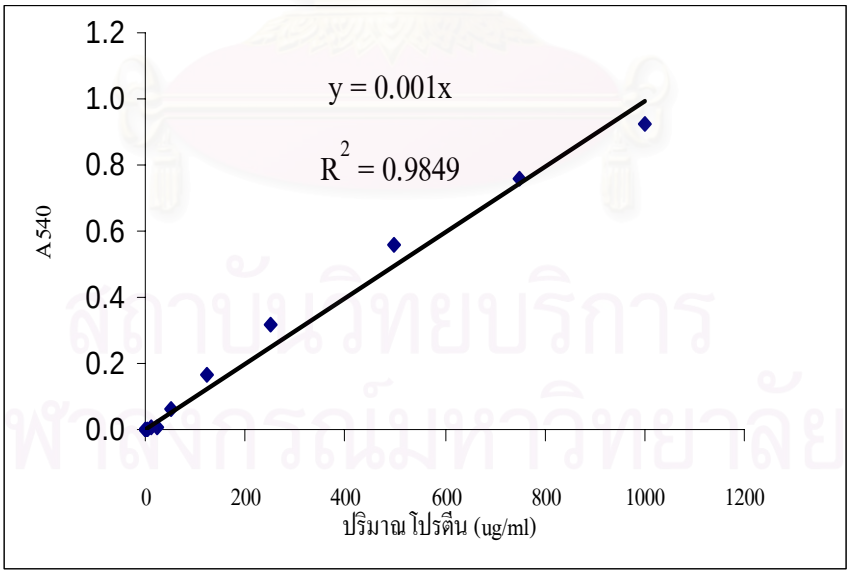
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

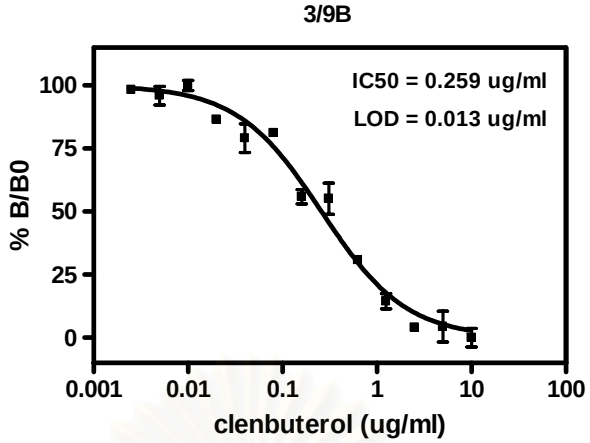
ตารางผนวกที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ปริมาณโปรตีน(ug/ml)	A_{540}
0	0
5	0.002
10	0.004
25	0.008
50	0.063
125	0.165
250	0.318
500	0.559
750	0.761
1000	0.921

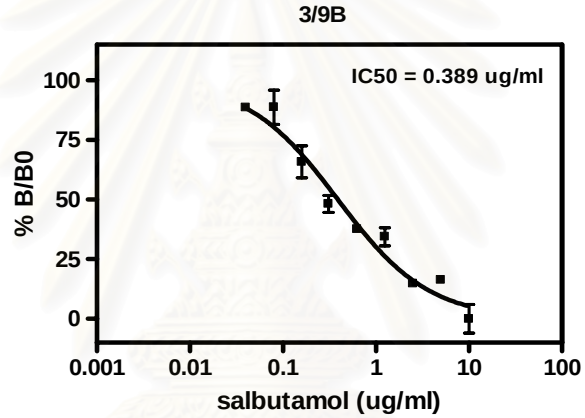


รูปผนวกที่ ก.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน

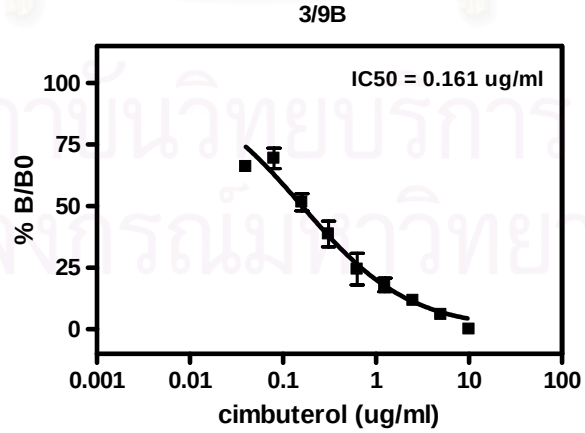
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



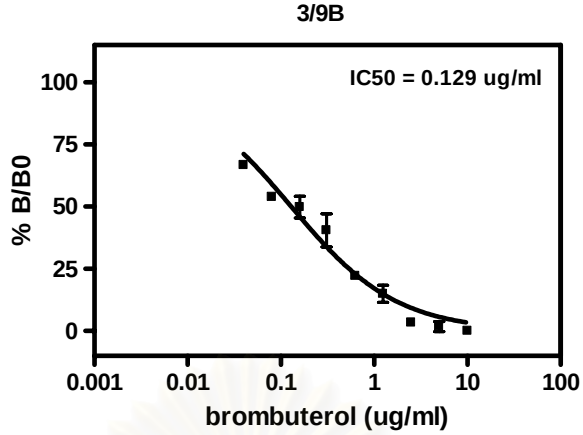
รูปผนวกที่ ก.2 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



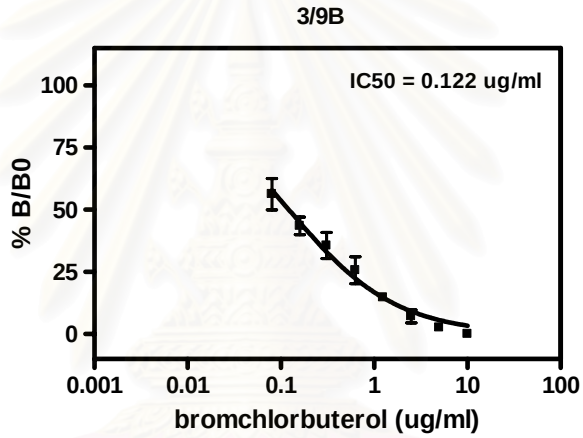
รูปผนวกที่ ก.3 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



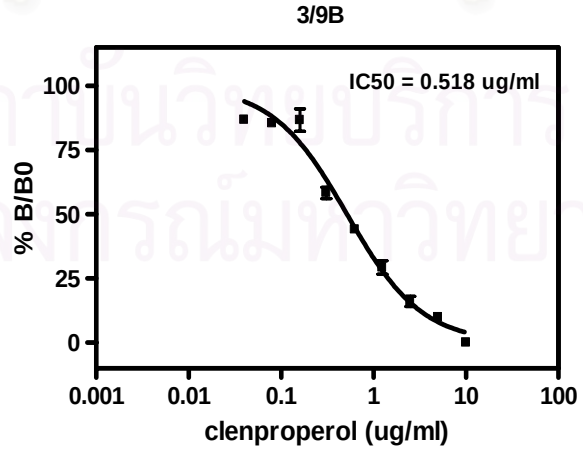
รูปผนวกที่ ก.4 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



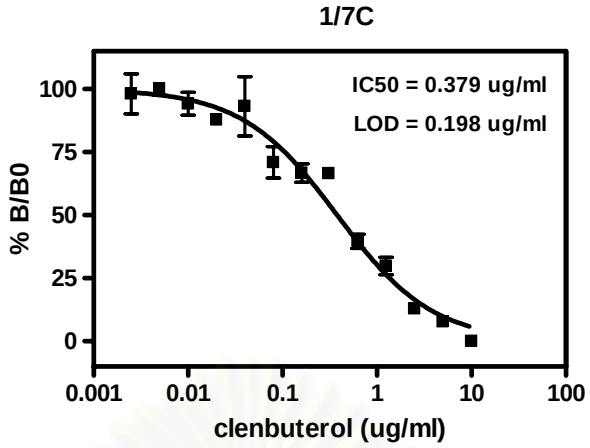
รูปผนวกที่ ก.5 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



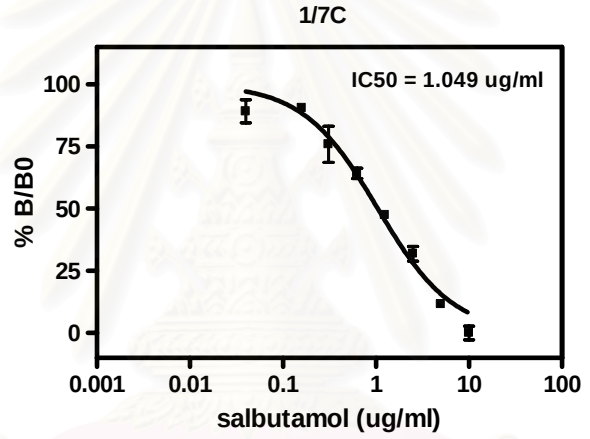
รูปผนวกที่ ก.6 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารบรอมคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



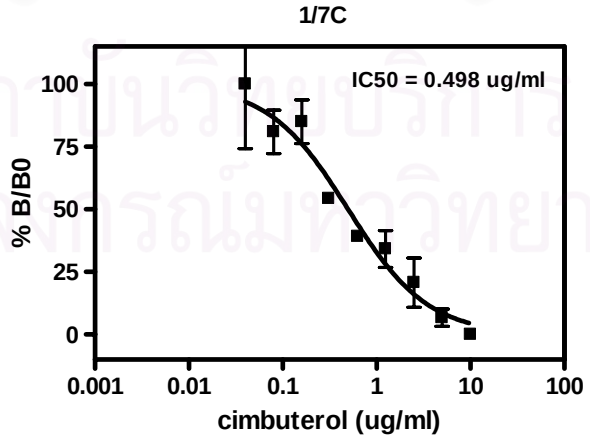
รูปผนวกที่ ก.7 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9B ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



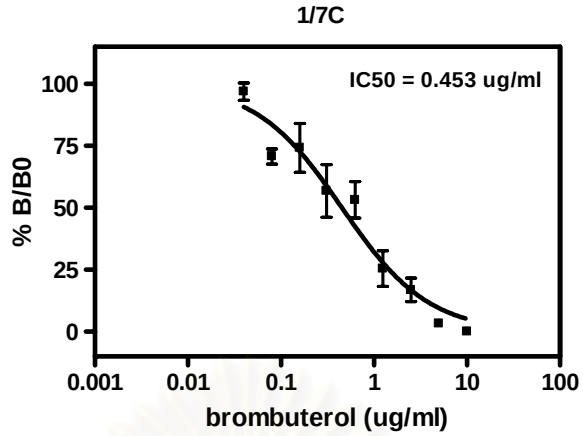
รูปผนวกที่ ก.8 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



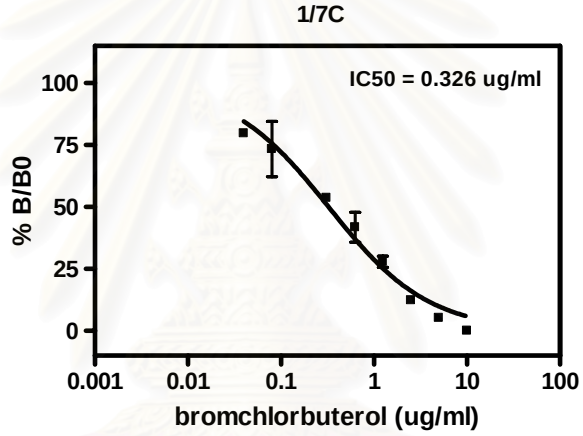
รูปผนวกที่ ก.9 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



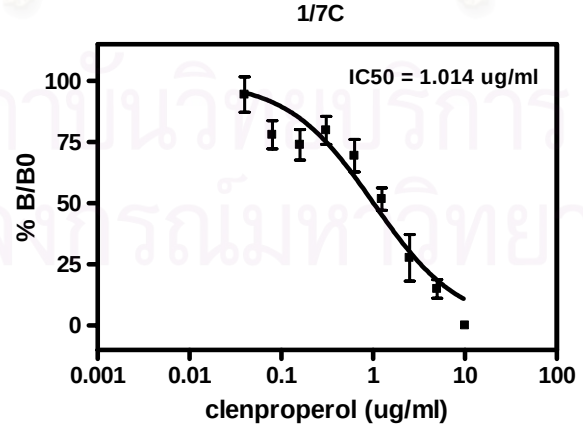
รูปผนวกที่ ก.10 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



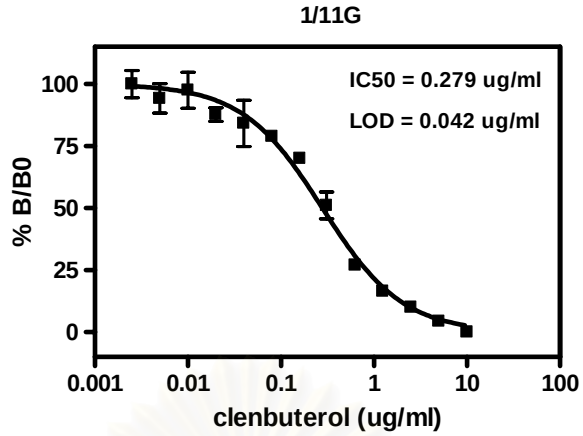
รูปผนวกที่ ก.11 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



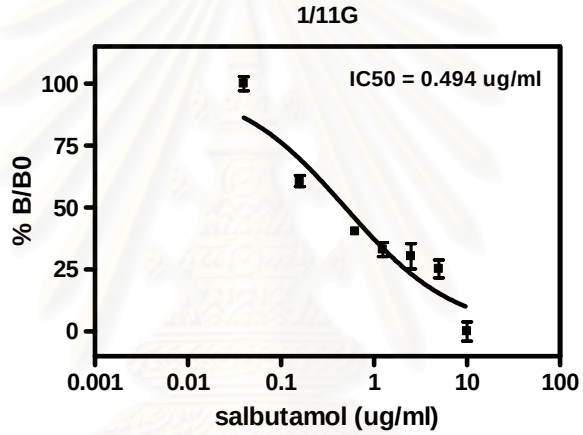
รูปผนวกที่ ก.12 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



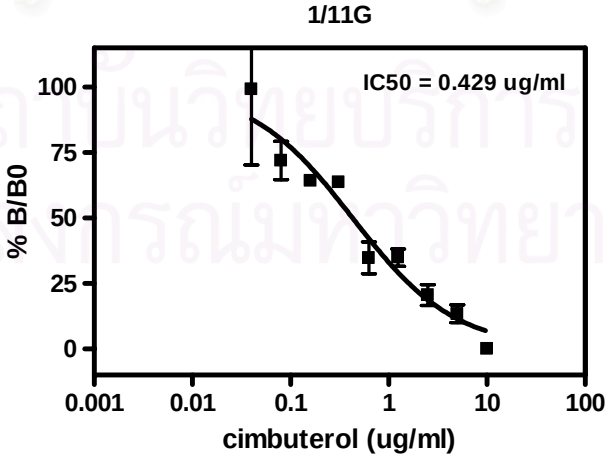
รูปผนวกที่ ก.13 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/7C ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



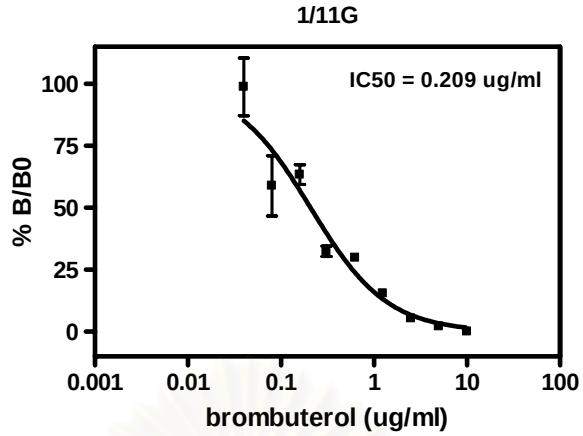
รูปผนวกที่ ก.14 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



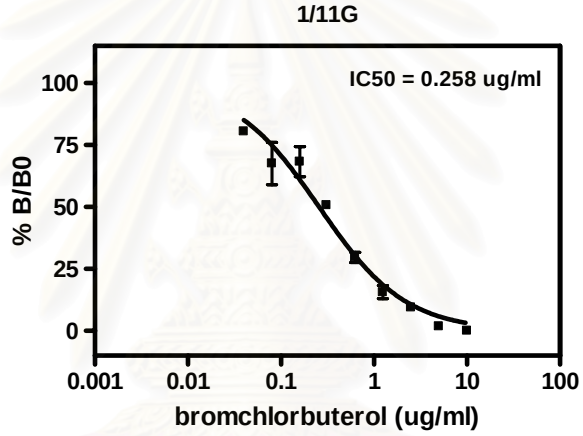
รูปผนวกที่ ก.15 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



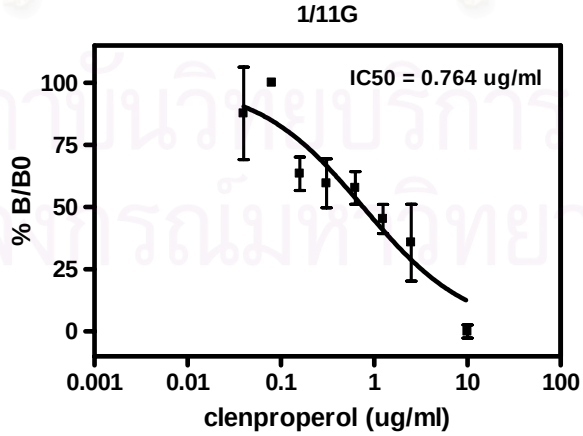
รูปผนวกที่ ก.16 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



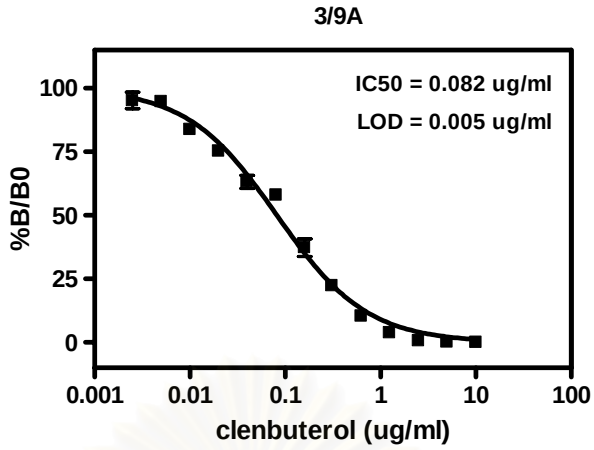
รูปผนวกที่ ก.17 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



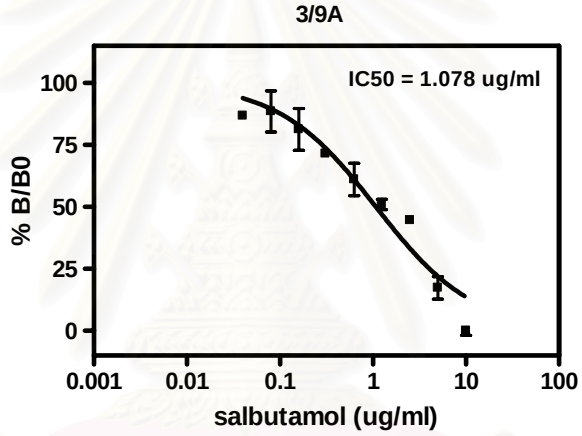
รูปผนวกที่ ก.18 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



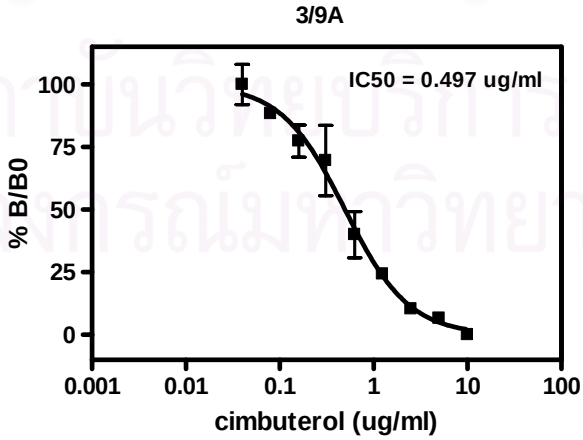
รูปผนวกที่ ก.19 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1/11G ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



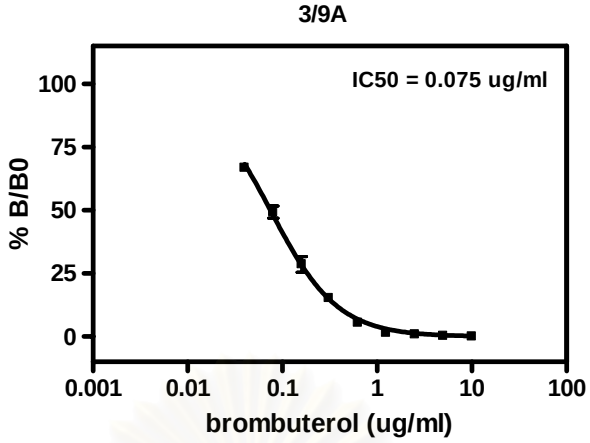
รูปผนวกที่ ก.20 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



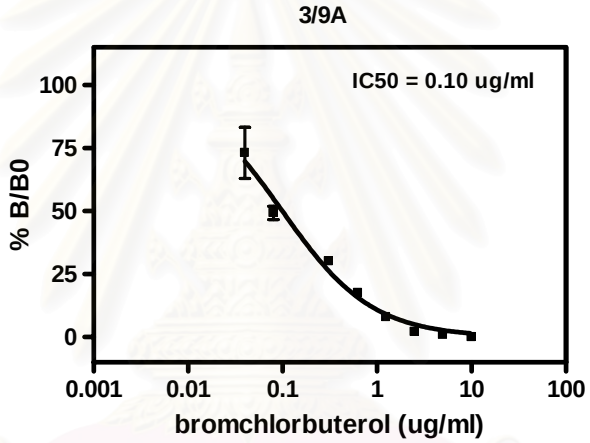
รูปผนวกที่ ก.21 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



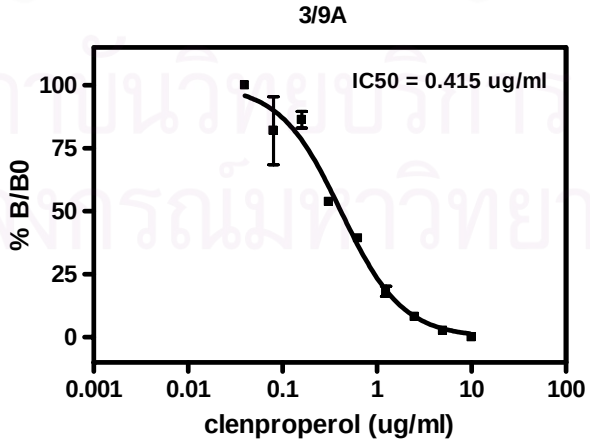
รูปผนวกที่ ก.22 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



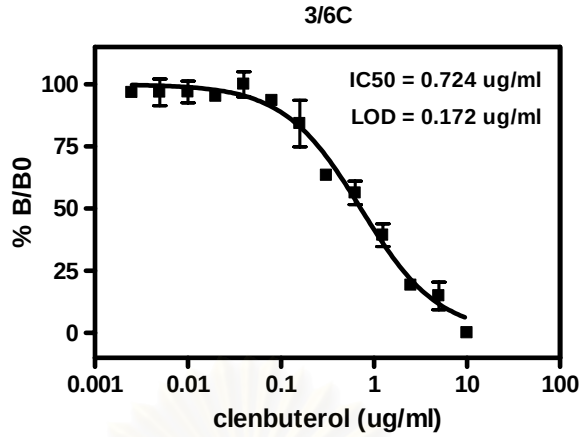
รูปผนวกที่ ก.23 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



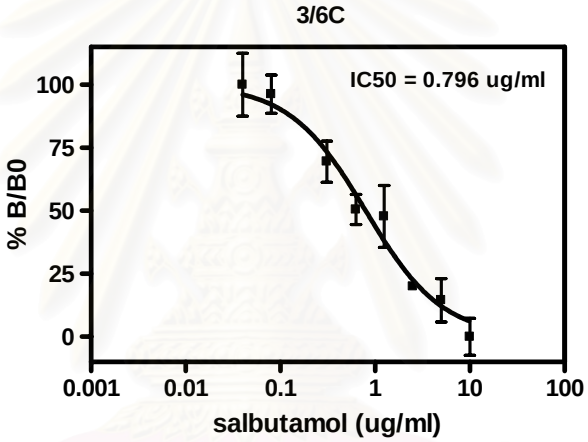
รูปผนวกที่ ก.24 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



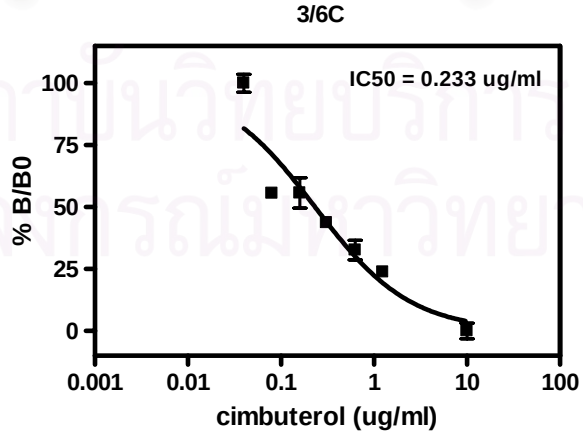
รูปผนวกที่ ก.25 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/9A ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



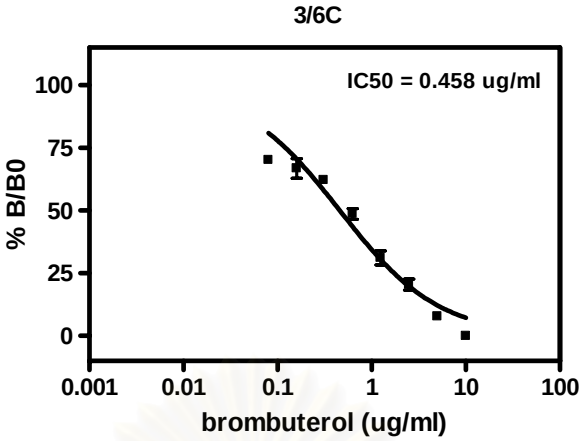
รูปผนวกที่ ก.26 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



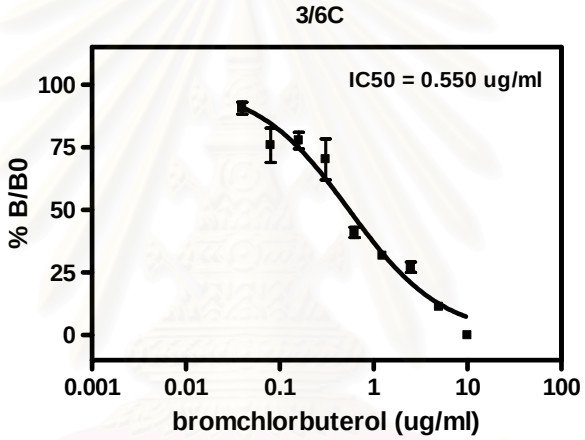
รูปผนวกที่ ก.27 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



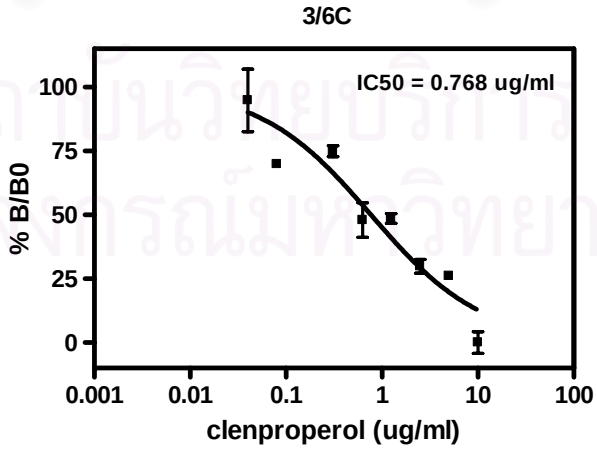
รูปผนวกที่ ก.28 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



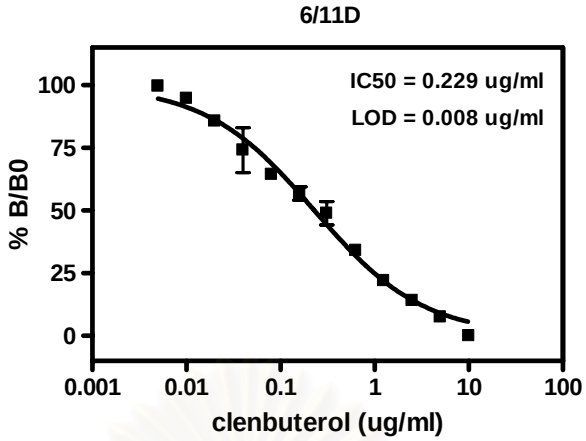
รูปผนวกที่ ก.29 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



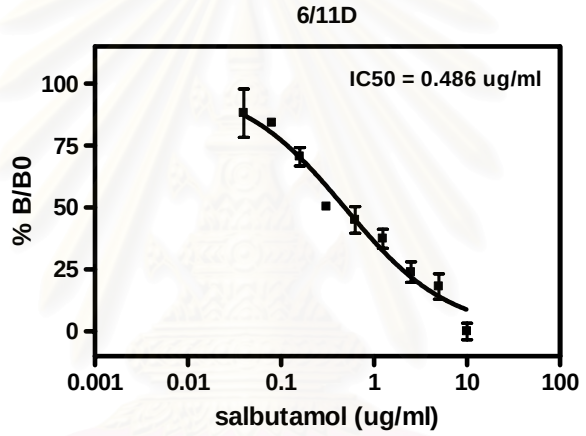
รูปผนวกที่ ก.30 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



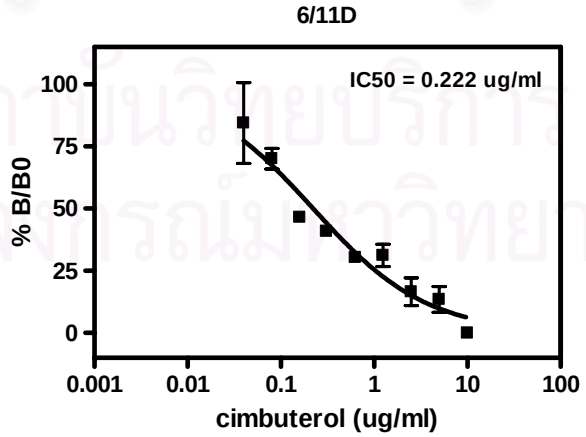
รูปผนวกที่ ก.31 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3/6C ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



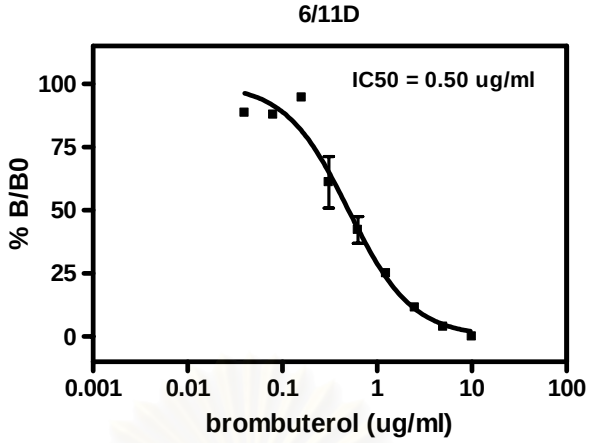
รูปผนวกที่ ก.32 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



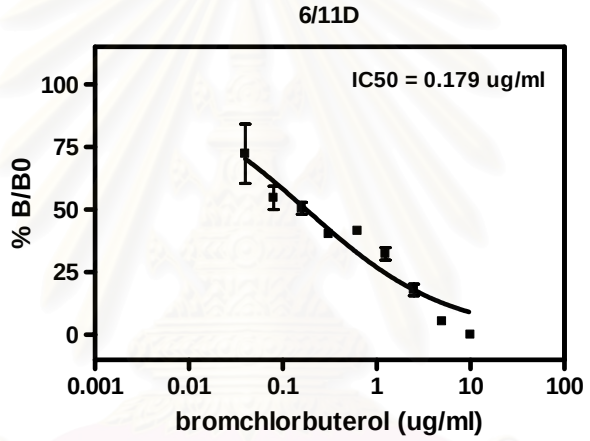
รูปผนวกที่ ก.33 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



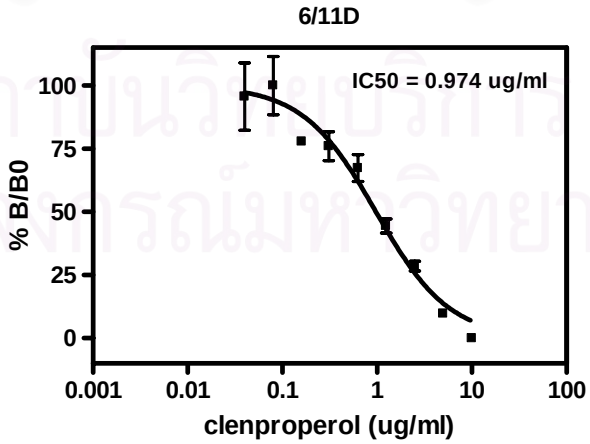
รูปผนวกที่ ก.34 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



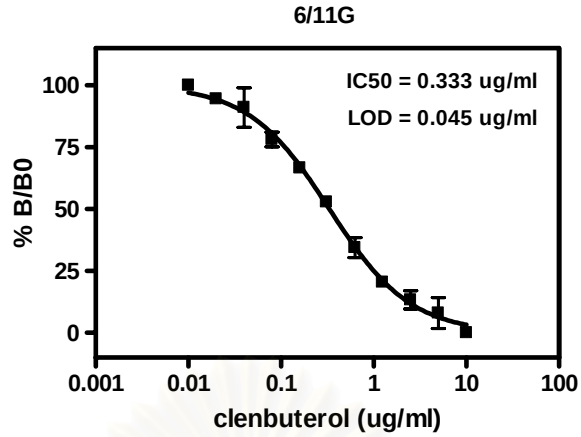
รูปผนวกที่ ก.35 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



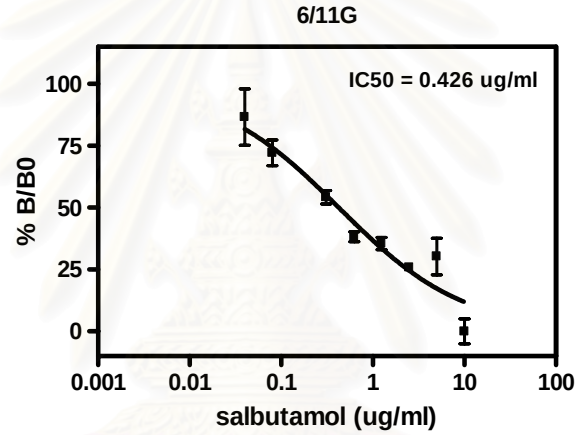
รูปผนวกที่ ก.36 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



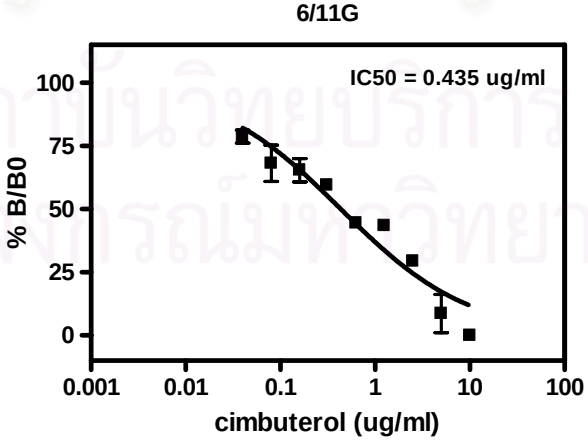
รูปผนวกที่ ก.37 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11D ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



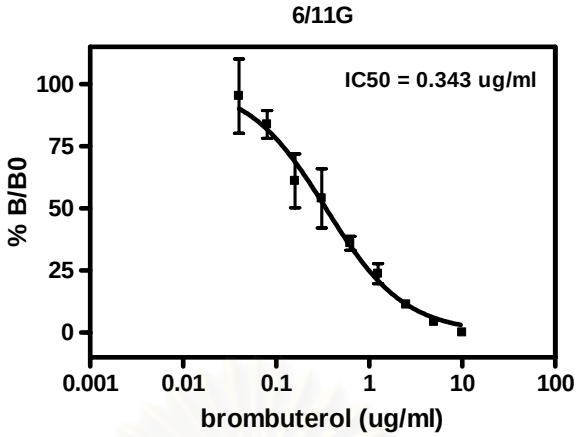
รูปผนวกที่ ก.38 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารเคลนบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



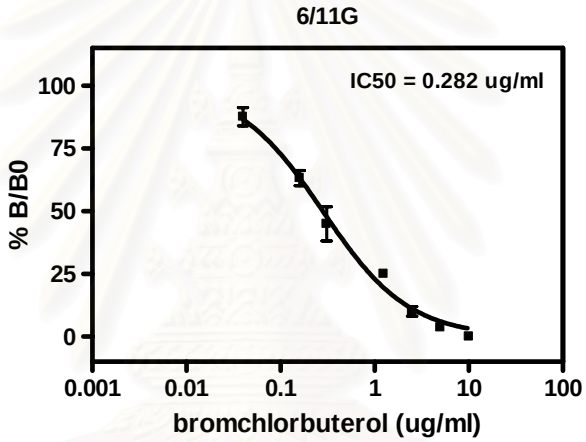
รูปผนวกที่ ก.39 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารซัลบูทามอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



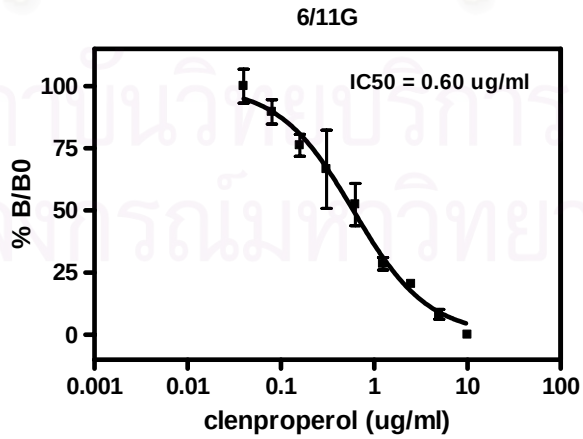
รูปผนวกที่ ก.40 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารซิมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปผนวกที่ ก.41 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารบรอมบูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปผนวกที่ ก.42 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารคลอร์บูเทอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปผนวกที่ ก.43 กราฟหาค่า IC50 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 6/11G ต่อสารเคลนโพรเพอรอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03

ตารางผนวกที่ ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3/9A

ชนิดสาร	ความเข้มข้นของสารที่ใช้แย่งจับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	0	1	10
เอนโรฟลอร์กซาซิน	1.310	1.223	1.223
นอร์ฟลอร์กซาซิน	1.097	1.132	1.012
คลอแรมเฟนิคอล	1.248	1.035	1.203
เพนิซิลลิน	1.205	0.998	1.179
ฟูราโซลิโดน	1.128	1.120	0.990
เตตราไซคลิน	1.352	0.916	0.862
ซัลฟาเมทาซีน	1.031	1.012	0.889
สเตรปโตมัยซิน	1.022	1.017	1.021
ตัวควบคุมบวก (เคลนบูเทอรอล)	0.863	0.128	0.043
ตัวควบคุมลบ (อาหาร RPMI 1640)	0.045	0.064	0.032

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ ก.3 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/11D

ชนิดสาร	ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	0	1	10
เอนโรฟลอร์กซาซิน	0.861	0.764	0.652
นอร์ฟลอร์กซาซิน	0.991	0.881	0.678
คลอแรมเฟนิคอล	0.902	0.855	0.773
เพนิซิลลิน	0.909	0.875	0.855
ฟูราโซลิโดน	0.886	0.857	0.687
เตตราไซคลิน	0.865	0.851	0.842
ซัลฟาเมทาซีน	0.791	0.765	0.790
สเตรปโตมัยซิน	0.833	0.809	0.784
ตัวควบคุมบวก (เคลนบูเทอรอล)	0.793	0.285	0.085
ตัวควบคุมลบ (อาหาร RPMI 1640)	0.045	0.064	0.032

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้การเชื่อมสารเคลนบูเทอรอลกับ BSA

0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer (Stock reagent)

   ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

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

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	19	ลิตร
0.01% Thimerosal	20	มิลลิลิตร

   ผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องกรองสารละลาย แล้วเก็บใส่ถังสีขาว

3. PBS-Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween 20	250	ไมโครลิตร
PBS	500	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. <u>5% นมพร่องมันเนย</u>

นมพร่องมันเนย ยี่ห้อ mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

5. <u>0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0</u>

Na_2HPO_4	11.9	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Citric acid	7	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

6. <u>Substrate OPD</u>

O-phenylenediamine	0.04	กรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. <u>2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)</u>

18 M H_2SO_4	69.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	430.5	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันจะเกิดความร้อน ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

1. Stock HAT 100X

Hypoxanthine	0.1361	กรัม.	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Aminopterin	0.0018	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidin	0.0388	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 um แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

2. Stock HT 100X

Hypoxanthine	0.1361	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidin	0.0388	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้ง 2 สารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

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

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนจะใช้ผสม 20% FCS

4. <u>อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT</u>

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. <u>อาหารเลี้ยงเซลล์ HT</u>

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม 50% PEG

นำ PEG(sigma) มาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดๆ ละ ประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการหลอมรวมเซลล์ให้นำออกมาอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวร

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	70	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	20	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

<u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

Bovine serum albumin	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

<u>BCA™ Reagent A และ BCA™ Reagent B</u> (BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE) ก่อนใช้ผสม Reagent A : B ในอัตราส่วน 50:1

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. <u>0.1 M citrate buffer, pH 3</u>

citric acid 0.1 M

Na_2HPO_4 0.1 M

ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. <u>0.1 M Phosphate buffer, pH 8</u>

ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. <u>1 M Tris HCl buffer, pH 9</u>

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

HCl 1 M

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ปิยะนุช เรืองศรีอรัญ เกิดเมื่อวันที่ 28 มีนาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัด ร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย