การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

นางสาว สุนิสา ด้วงสอาด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CHLORAMPHENICOL IN HOLLOW-FIBER BIOREACTOR

Mliss Sunisa Duangsa-ard

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 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์
โดย	นางสาวสุนิสา ด้วงสอาด
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นางทรงจันทร์ ภู่ทอง)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุนิสา ด้วงสอาด : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CHLORAMPHENICOL IN HOLLOW-FIBER BIOREACTOR) อ. ที่ปรึกษา : ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, ทรงจันทร์ ภู่ทอง, 91 หน้า.

คลอแรมเฟนิคอล (CAP) เป็นสารปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ และสามารถตกค้างอยู่ในเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารได้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการตรวจวัดปริมาณการตกค้างคลอแรมเฟนิคอลในอาหาร การตรวจวัดด้วยวิธีทาง ELISA เหมาะแก่การตรวจเบื้องต้นสำหรับตัวอย่างจำนวนมาก สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์จึงได้ผลิตโมโนโคลน (CAP 79) ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน CAP 79 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ โดยในการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการให้อากาศ พบว่าวิธีการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนให้ผลดีใกล้เคียงกับวิธีการให้อากาศในอาหารโดยการไหลสวนทางกันในฮอลโลว์ไฟเบอร์ เมื่อศึกษาปริมาตรและระยะเวลาการเก็บแอนติบอดี พบว่าต้องเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากส่วน extracapillary space (ECS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ครั้งแรกในวันที่ 7 และเว้นระยะการเก็บทุกๆ 3 วัน ในระยะ log phase (วันที่ 16) จึงเพิ่มปริมาตรการเก็บเป็น 20 มิลลิลิตร เพื่อลดจำนวนเซลล์ที่หนาแน่นเกินไป ทำให้ในระยะ stationary phase มีความหนาแน่นของเซลล์ 2.5-5.1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์มีชีวิต 20-40 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารในอาหารพบว่ามีปริมาณกลูโคสเหลืออยู่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนของเสียที่เกิดขึ้น ได้แก่ แลคเตท และแอมโมเนีย พบว่ามีอยู่ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3.6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณซีรัมจากลูกวัวที่ใช้เติมในอาหาร พบว่าที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์มีชีวิตมีปริมาณมากกว่าและมีอัตราการผลิตแอนติบอดีมากกว่าที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าเมื่อใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนชนิดเซลลูโลส เซลล์เจริญได้ดีและสามารถผลิตแอนติบอดีได้มากกว่าการใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนชนิดพอลิซัลโฟน โดยลักษณะการวางคอลัมน์ของฮอลโลว์ไฟเบอร์นั้นจะวางในแนวขนานกับพื้นเพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนมีพื้นที่ในการกระจายตัวตลอดความยาวของคอลัมน์ เมื่อใช้ภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเฉลี่ย 4.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ปริมาณแอนติบอดีทั้งหมด 1113.5 มิลลิกรัม ใน 49 วัน ซึ่งมีอัตราการผลิต 22.7 มิลลิกรัมต่อวัน

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา....2549....

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

4672456023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: HOLLOW FIBER BIOREACTOR / ANTIBODY PRODUCTION / HYBRIDOMA

SUNISA DUANGSA-ARD : PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CHLORAMPHENICOL IN HOLLOW-FIBER BIOREACTOR. THESIS ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph. D. THESIS COADVISOR : ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph. D., SONGCHAN PUTHONG, 91 pp.

Chloramphenicol (CAP) is an antibiotic substance widely used to treat bacterial infection in animals. It can be remained in meat or products from animals which directly affects consumers. Consequently, the monitoring of CAP residue in food is necessary. ELISA is a suitable method for preliminary determination of massive samples. The Institute of Biotechnology Genetic and Engineering, therefore, have produced monoclon (CAP 79) which produces a monoclonal antibody specific for CAP. The objective of this work is to study several important factors affecting the production of monoclonal antibody from CAP 79 in hollow-fiber bioreactor. Comparative study of aeration methods showed that the air diffusion through silicone tube method was as good as the aeration into the medium by the counter current method in hollow fiber. Study of antibody harvested volume and period suggested that 10 ml of medium must be harvested from extracapillary space (ECS) on day 7 and then every three days of cultivation. During log phase (on day 16), the harvested volume was increased to 20 ml in order to decrease the cell density, thus retaining the cell density of 2.5-5.1 x 10^7 cells/ml and the cell viability of 20-40% in stationary phase. Analysis of culture medium revealed that the concentration of glucose left in the medium was 3 mg/ml while the amounts of produced waste, lactate and ammonia were 1.2 mg/ml and 3.6 mM, respectively. In case of the amount of fetal calf serum (FCS) added into the medium, it was found that cell viability and antibody productivity at 10% FCS were higher than those at 5% FCS. Furthermore, higher cell growth and antibody production were achieved when hollow fiber with cellulose membrane was used as compared to hollow fiber with polysulfone membrane. Inaddition, Hollow fiber column should be placed horizontally so that cells could spread through out the length of the column. With the stated optimum condition, the antibody concentration of 4.1 mg/ml, the total amount of antibody of 1113.5 mg (22.7 mg/day productivity) was obtained in 49 days of cultivation.

Field of study....Biotechnology...

Academic year ...2006...

Student's signature Sunisa Duangsa-ard

Advisor's signature K. Komolpis

Co-advisor's signature Tanapat Palaga

Co-advisor's signature Songchan Puthong

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาแนะแนวทางการทำงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเขียนวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ และนักวิจัยที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ทุกท่านสำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาจุลชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์ และเงินทุนในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนทำให้การทดลองสำเร็จได้

ขอขอบคุณ ดร.นันทิกา คงเจริญพร คุณอณุมาศ บัวเขียว และ คุณชัชวาล อุดมโชคมงคลรวมทั้ง เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความช่วยเหลือทุกเรื่อง ตลอดจนให้กำลังใจ ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดาและทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรักความเข้าใจและเป็นกำลังใจมาตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฎ

สารบัญรูป.....ฎ

คำย่อและสัญลักษณ์.....ฒ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....2

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....4

2.1.1 คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol, CAP).....4

2.1.2 แอนติบอดี.....4

2.1.3 วิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้จำนวนมาก.....6

2.1.4 หลักการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์.....7

2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์.....9

2.1.6 กลไกการสังเคราะห์สารอาหาร.....11

2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์.....13

บทที่ หน้า

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย....16
3.1 เซลล์ไฮบริโดมาที่ใช้ในการวิจัย....16
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย....16
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย....18
3.4 ขั้นตอนการวิจัย....20
3.4.1 การเตรียมอาหาร....20
3.4.2 ศึกษาการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks....21
3.4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์....21
3.4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์....23
3.4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography....25
3.4.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE....25
3.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี....26
3.4.8 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส....27
3.4.9 การวิเคราะห์ปริมาณแลคเตท....28
3.4.10 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย....28
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล....30
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks....30
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์....32
4.2.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์....32
4.2.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 1....34
4.2.3 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 2....37
4.2.4 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 3....39

บทที่ หน้า

4.2.5 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4.....41
4.2.6 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4 (ครั้งที่ 2).....42
4.2.7 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5.....46
4.2.8 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และลดความเข้มข้นของ FCS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์.....48
4.2.9 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และลดความเข้มข้นของ FCS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ครั้งที่ 2).....51
4.2.10 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็น ชนิดโพลีซัลโฟน.....53
4.2.11 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตร ในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็น ชนิดโพลีซัลโฟนโดยวางคอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้น.....54
4.3 ผลการเปรียบเทียบเมตาบอลิก แอคติวิตี ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละวิธี.....58
4.3.1 Glucose Uptake Rate (GUR).....58
4.3.2 Lactate Production Rate (LPR).....58
4.3.3 LPR/GUR ratios.....61
4.3.4 Ammonia Production Rate (APR).....61
4.4 ผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography.....65
4.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....66
4.6 การประเมินราคาในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์.....68

บทที่ หน้า

5 สรุปผลการทดลอง.....69
รายการอ้างอิง.....71
ภาคผนวก.....75
ภาคผนวก ก.....76
ภาคผนวก ข.....83
ภาคผนวก ค.....88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....18

4.1 สรุปวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์กับปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้.....64

4.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) และค่า Relative mobility (Rf) ของแถบโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE.....67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ภาพถ่ายอิเล็กตรอนของฮอลโลว์ไฟเบอร์ และเซลล์ที่อยู่ภายนอกไฟเบอร์	7
2.2	แสดงการไหลผ่านเข้าออกของสารระหว่าง ECS กับ ICS	8
2.3	แสดงองค์ประกอบพื้นฐานของระบบฮอลโลว์ไฟเบอร์	9
2.4	แสดงวิถีของเมตาบอลิซึมในเซลล์ไฮบริโดมา	12
3.1	แสดงลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ โดยการให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์	22
3.2	แสดงลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน	22
4.1	การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ใน T-flasks ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์	31
4.2	แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์	33
4.3	แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 1	36
4.4	แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 2	38
4.5	แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 3	40

รูปที่ หน้า

4.6 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4.....43

4.7 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4 (ครั้งที่ 2) ……..45

4.8 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5.....47

4.9 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และลดปริมาณซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 50

4.10 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และลดปริมาณซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 (ครั้งที่ 2).....52

4.11 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดโพลีซัลโฟน และเติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 55

4.12 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดโพลีซัลโฟน และวาง

รูปที่ หน้า

คอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้น เติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาและ
ปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 57
4.13 กราฟเปรียบเทียบค่า GUR ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์.....59
4.14 กราฟปรียบเทียบค่า LPR ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์.....60
4.15 กราฟเปรียบเทียบ LPR/GUR ratios ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์.....62
4.16 กราฟเปรียบเทียบค่า APR ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์.....63
4.17 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย โปรตีน เอ.....65
4.18 แสดงผล SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี
affinity chromatography.....66
ก.1 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส CAP 79 ต่อสารคลอแรมเฟนิคอล
ที่ความเข้มข้น 0 – 140 นาโนกรัม/มิลลิลิตร.....76
ก.2 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNSA ที่ความเข้มข้น
0 – 1.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....77
ก.3 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแลกเตท ที่ความเข้มข้น
0 – 1.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....78
ก.4 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแอมโมเนีย ที่ความเข้มข้น 0 – 7 มิลลิโมลาร์.....79
ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa).....80
ก.6 แสดงการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น
5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร.....81
ก.7 แสดงการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น
1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร.....82

คำย่อและสัญลักษณ์

ATP	adenosine 5′ triphosphate
APR	ammonia production rate
BSA	bovine serum albumin
°C	degree celsius
CAP	chloramphenicol
DNSA	dinitro-salicylic acid
DO	dissolved oxygen
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ECS	extracapillary space
FCS	fetal calf serum
GUR	glucose uptake rate
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradise peroxidase
ICS	intracapillary space
IgG	immunoglobulin G
kDa	kilodalton
LPR	lactate production rate
mM	milli molar
M	molar
MWCO	molecular weight cut-off
N	normal
NAD/NADH	nicotinamide adenine dinucleotide oxidized/reduced forms
OD	optical density
OPD	O-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
R_f	relative mobility
SDS-PAGE	sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TCA	Tricarboxylic acid
tRNA	transfer ribonucleic acid
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol, CAP) เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางต่อแบคทีเรียทั้งพวกแกรมบวกและแกรมลบ มีกลไกในการออกฤทธิ์โดยเข้าไปจับกับไรโบโซม 50s ของแบคทีเรีย ทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่าง 50s และ tRNA ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ peptidyl transferase กับกรดอะมิโนจาก tRNA จึงไม่เกิดขึ้น เป็นผลทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน คลอแรมเฟนิคอลแพร่กระจายได้ดีตามเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย และยังสามารถแพร่กระจายเข้าไปในของเหลวในระบบประสาท นอกจากนี้ยังพบในน้ำดี น้ำนมแม่ และสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ลูกได้ในหญิงมีครรภ์ คลอแรมเฟนิคอลสามารถจับกับโปรตีนในเลือดได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ อวัยวะเป้าหมายที่มีความเสี่ยงต่อคลอแรมเฟนิคอลคือ ไขกระดูก ทำให้จำนวนเซลล์หรือองค์ประกอบในเลือดลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงพัฒนาไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ คลอแรมเฟนิคอลจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของไมโตคอนเดรีย ทำให้จำนวนของเรติคูโลไซต์ลดลง ตามด้วยการลดลงของปริมาณฮีโมโกลบิน การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆในเลือดจะเกิดขึ้นเมื่อมียาคลอแรมเฟนิคอลอยู่ในกระแสเลือดตั้งแต่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นต้นไป

คลอแรมเฟนิคอลถูกนำมาใช้ในการรักษาสัตว์ โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ แต่เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ และสามารถตกค้างอยู่ในสัตว์ที่นำมาบริโภคเป็นอาหารได้ ดังนั้นคลอแรมเฟนิคอลจึงถูกระงับการใช้ในสัตว์ที่จะนำมาบริโภคเป็นอาหาร

ในปัจจุบันประเทศต่างๆ ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกาได้กำหนดมาตรฐานที่เข้มงวดมากขึ้นเกี่ยวกับปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่สามารถตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งที่นำเข้าจากประเทศต่างๆ ดังนั้นผู้ผลิตอาหารแช่แข็งจึงต้องทำการตรวจวัดหาปริมาณสารคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างอยู่ก่อนที่จะส่งออกผลิตภัณฑ์ ซึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดคือ High performance liquid chromatography (HPLC) แต่เนื่องจากการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ และใช้เวลาในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก จึงได้มีการศึกษาการตรวจปริมาณสาร CAP ด้วยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเหมาะแก่การตรวจเบื้องต้นสำหรับตัวอย่างจำนวนมาก จากการศึกษาพบว่า การตรวจด้วยวิธี

ELISA นี้ ให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำใกล้เคียงกับวิธี HPLC อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตชุดตรวจสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจสอบ CAP ได้เอง ทำให้ต้องนำเข้าชุดตรวจสอบนี้จากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยพัฒนาการเตรียมชุดตรวจสอบนี้ขึ้น สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ได้ทำการเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CAP ในการเตรียมชุดตรวจสอบนั้น ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาณมากเพื่อใช้ในชุดทดสอบเป็นขั้นตอนหนึ่งซึ่งมีความสำคัญ ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตแอนติบอดีปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในเครื่อปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ให้ได้ปริมาณมาก สำหรับใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลได้ในปริมาณมากโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1.4.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

1.4.2.1 เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

1.4.2.2 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มต้น

1.4.2.3 การศึกษาลักษณะการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks

1.4.2.4 เ ต รี ย ม ภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

1.4.2.5 หาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ เช่น ปริมาตรและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว ปริมาณซีรัมจากลูกวัว (Fetal calf serum, FCS) วิธีการให้อากาศ และชนิดของไฟเบอร์

1.4.2.6 การเก็บเกี่ยวแอนติบอดีจากบริเวณช่องด้านนอกของไฟเบอร์ (Extraca - pillary space)

1.4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

1.4.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

1.4.5 วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีและสารอื่นๆในอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

1.4.5.1 วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเป็นแอนติบอดีมาตรฐาน

1.4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1.4.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณแลกเตท

1.4.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

1.4.6 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol, CAP)

คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol, CAP) เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางต่อแบคทีเรียทั้งพวกแกรมบวกและแกรมลบ มีกลไกในการออกฤทธิ์โดยเข้าไปจับกับไรโบโซม 50s ของแบคทีเรีย ทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่างไรโบโซม 50s และ tRNA ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ peptidyl transferase กับกรดอะมิโนจาก tRNA จึงไม่เกิดขึ้น เป็นผลทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน จึงจัดอยู่ในกลุ่มของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

คลอแรมเฟนิคอลยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโตคอนเดรียของเซลล์สัตว์ชั้นสูง เนื่องจากไรโบโซมในไมโตคอนเดรียของสัตว์ชั้นสูงมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับไรโบโซมของแบคทีเรีย

คลอแรมเฟนิคอลแพร่กระจายได้ดีตามเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย และยังสามารถแพร่กระจายเข้าไปในของเหลวในระบบประสาท นอกจากนี้ยังพบในน้ำดี น้ำนมแม่ และสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ลูกได้ในหญิงมีครรภ์ สามารถจับกับโปรตีนในเลือดได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

อวัยวะเป้าหมายที่มีความเสี่ยงต่อคลอแรมเฟนิคอลคือ ไขกระดูก ทำให้จำนวนเซลล์หรือองค์ประกอบในเลือดลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงพัฒนาไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆในเลือดจะเกิดขึ้นเมื่อมียาคลอแรมเฟนิคอลอยู่ในกระแสเลือดตั้งแต่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไป (Reynard, 1992)

2.1.2 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดี เป็น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82 – 96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4 – 18 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ antigenic determinant หรือ เอพิโทปที่แปลกปลอม และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเอพิโทปนั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออก

จากร่างกายได้ 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 แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน เป็นผลผลิตของเซลล์พลาสมาและลิมโฟไซต์ ไม่เพียงพบแต่ในซีรัมเท่านั้น ยังพบในส่วนน้ำอื่น ๆ ของร่างกาย และในเนื้อเยื่อ เช่น ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และนอกจากนี้ยังพบบนผิวของ บี ลิมโฟไซต์(B-lymphocyte)ด้วย (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

โครงสร้างของอิมโมโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล (monomer) ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกัน แต่ละอันมีมวลโมเลกุลประมาณ 55,000 ดาลตัน และ light (L) chain 2 สายที่เหมือนกัน แต่ละอันมีมวลโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน (Harlow และ Lane, 1988) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) แรงยึดนี้สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยเมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) เมื่ออาศัยความแตกต่าง 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)

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

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

โมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในหลายๆ ด้าน อย่างเช่น นำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค รักษาโรค และในงานวิจัย (Nelson และคณะ, 2000)

2.1.3 วิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้จำนวนมาก

1. การผลิตในสัตว์เช่น หนูโดยวิธีการ ascites production

วิธีการคือทำให้หนูเกิดท้องมาน (ascites) โดยฉีดเซลล์ลูกผสมเข้าช่องท้องหนู หลังจากกระตุ้นด้วย pristane ประมาณ 7-14 วัน เซลล์ลูกผสมจะเจริญในช่องท้องและมีน้ำในช่องท้องซึ่งประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวนมาก (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย และใช้ต้นทุนต่ำกว่า ได้แอนติบอดีเข้มข้นสูงในระดับมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนข้อเสียคือ การผลิตแอนติบอดีปริมาณมากต้องใช้หนูเป็นจำนวนมาก ต้องระมัดระวังการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียจากสัตว์ และมีการปนเปื้อนของแอนติบอดีจากหนู 20 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีปัญหาเรื่องจริยธรรมในการใช้สัตว์อีกด้วย (Vetterlein, 1989)

2. การผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ perfusion ซึ่งเป็นระบบที่ใช้ในกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยระบบนี้ต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ซึ่งมีอัตราการไหลของสารอาหารอย่างต่อเนื่องและคงที่ แต่ในระบบ perfusion เซลล์จะถูกแยกจากอาหาร และอาหารจะถูกเติมอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการควบคุมอัตราการไหลของอาหารให้คงที่ ทำให้เซลล์ในระบบนี้เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นสูง ระบบ perfusion แบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้ (Mizrahi, 1989)

1) Homogeneous

เซลล์จะแขวนลอยอย่างอิสระ เช่นใน stirred reactor ต้องใช้ตัวกรอง เช่น rotating filter ในการแยกเซลล์กับสารอาหาร โดยอาจใส่ตัวกรองภายในถังหรือกรองเซลล์ภายนอกถัง ข้อเสียคือ เกิดแรงเฉือนซึ่งอาจไปทำลายเซลล์ได้

2) Semihomogeneous

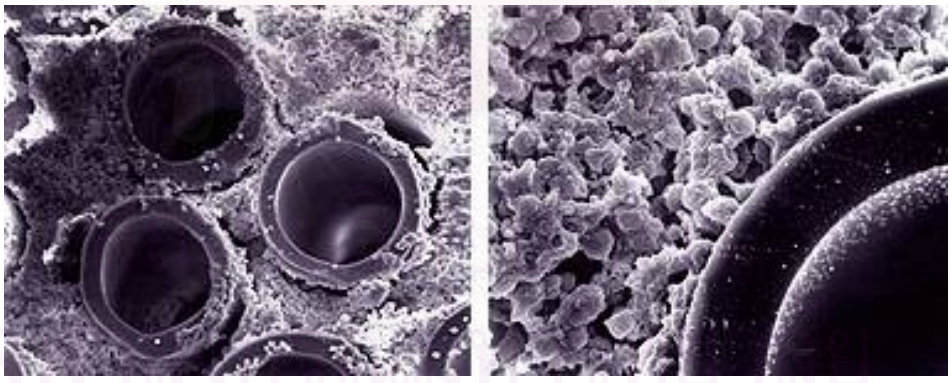
ตัวอย่างของระบบนี้ ได้แก่ การตรึงเซลล์ใน microencapsulation เช่น agarose และนำไปเพาะเลี้ยงใน stirred tank, fluidized bed หรือ air life fermenter ในระบบนี้สารอาหาร เช่น กลูโคส, growth factor สามารถซึมผ่านเม็ดบีทได้ แต่แอนติบอดีไม่สามารถเข้าไปได้ ข้อเสียคือ เซลล์ที่ถูกตรึงอาจขาดออกซิเจนได้

3) Nonhomogeneous

ตัวอย่างระบบนี้ ได้แก่ การเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์ ซึ่งมีไฟเบอร์เป็น semipermeable membrane ข้อดีคือ ทำให้เก็บแยกแอนติบอดีออกมาได้ง่าย แอนติบอดีที่ได้มีความเข้มข้นสูง ส่วนข้อเสียคือ ยากในการ scale up และการควบคุมภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่น ความเป็นกรดด่าง, ปริมาณออกซิเจน และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2.1.4 หลักการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

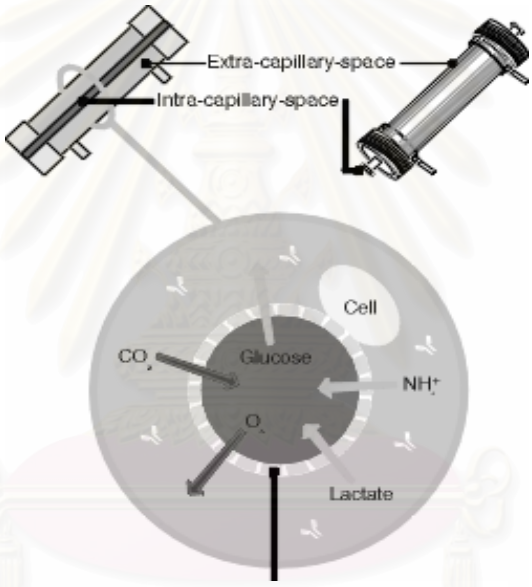
เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์นั้นเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่ดีสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยระบบนี้จะมีการแยกส่วนของเซลล์กับส่วนของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยผนังฮอลโลว์ไฟเบอร์ ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้จำนวนมาก (>10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในบริเวณช่องด้านนอกของไฟเบอร์ หรือ extracapillary space ดังรูปที่ 2.1 แอนติบอดีที่เซลล์ผลิตขึ้นมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ไม่สามารถซึมผ่านไฟเบอร์ได้ ดังนั้นจึงได้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูง 1 ถึง 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเคยมีรายงานพบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงถึง 17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Shi และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.1 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนของฮอลโลว์ไฟเบอร์ และเซลล์ที่อยู่ภายนอกไฟเบอร์

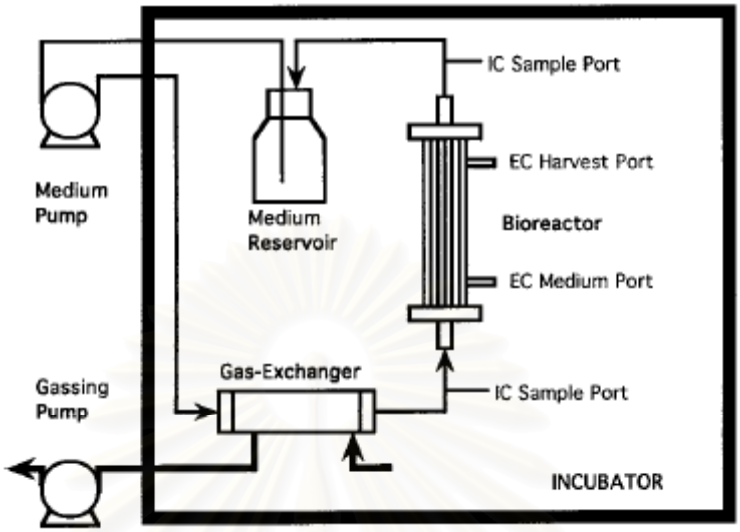
ระบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ เลี้ยงเซลล์ในส่วนของ Extracapillary space (ECS) และให้อาหารไหลผ่านทาง Intracapillary space (ICS) เมมเบรนของฮอลโลว์ไฟเบอร์ สามารถแยกเซลล์และอาหาร อาหารซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านเมมเบรนได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารู

ของเมมเบรนจะถูกกักไว้ ดังนั้นสารอาหารอย่างเช่น กลูโคส และ O_2 สามารถผ่านรูเมมเบรนไปสู่เซลล์ได้ตลอดทั้งไฟเบอร์ และของเสียอย่างเช่น แลกเทต และ CO_2 สามารถผ่านเข้าสู่ไฟเบอร์ได้ดังรูปที่ 2.2 และถูกทำให้เจือจางลงในขวดบรรจุอาหาร growth factor ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่อยู่ในซีรัม (หรือในอาหารที่ไม่ต้องเติมซีรัมอย่างเช่น transferring และ albumin) ถูกเติมให้เซลล์ในส่วน ECS เซลล์จะผลิตแอนติบอดีออกมาและสะสมอยู่ในส่วน ECS (Gramer และ Poeschl, 1998) เนื่องจากแอนติบอดีมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 150,000 ดาลตัน (Harlow และ Lane, 1988) ซึ่งไม่สามารถผ่านรูของเมมเบรน แอนติบอดีที่ได้จึงมีความเข้มข้นสูงกว่าการเลี้ยงเซลล์ในขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือ stirred reactor



รูปที่ 2.2 แสดงการไหลผ่านเข้าออกของสารระหว่าง ECS กับ ICS

องค์ประกอบพื้นฐานของระบบฮอลโลว์ไฟเบอร์แสดงดังรูปที่ 2.3 ประกอบด้วย ขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ (medium reservoir) คอลัมน์ฮอลโลว์ไฟเบอร์สำหรับเลี้ยงเซลล์ (bioreactor) และเครื่องแลกเปลี่ยนแก๊ส (gas-exchanger) ติดตั้งอยู่ภายในตู้บ่ม (incubator) ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ปั๊มถูกติดตั้งภายนอกตู้บ่มเพราะว่าความร้อนจากปั๊มจะทำให้อุณหภูมิในตู้บ่มเพิ่มขึ้น เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงภายนอกไฟเบอร์ในส่วน ECS อาหารถูกหมุนเวียนด้วยปั๊มจากขวดบรรจุอาหารผ่านเครื่องแลกเปลี่ยนแก๊ส อยู่ภายในไฟเบอร์ใน ICS และไหลกลับเข้าสู่ขวดบรรจุอาหาร อากาศถูกปั๊มเข้าสู่ตู้บ่มอย่างต่อเนื่องผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนแก๊ส เพื่อนำแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่อาหารและเป็นบัฟเฟอร์ควบคุม pH ในอาหาร



รูปที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบพื้นฐานของระบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ (Gramer และ Poeschl, 1998)

2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์

<u>สิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์</u>

1. ความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์คือ ค่าที่ใกล้ความเป็นกลางที่ pH 7.2-7.4 เซลล์สัตว์จะทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่อยู่ในช่วงระหว่าง pH 6.6-7.8

เซลล์ส่วนมากเจริญได้ดีที่ pH 7.4 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์จะแตกต่างกันเล็กน้อยในเซลล์แต่ละชนิด ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะใช้ phenol red เป็น indicator ซึ่งให้สีม่วงที่ pH 7.8 สีชมพูเข้มที่ pH 7.6 สีแดงที่ pH 7.4 สีส้มที่ pH 7.0 สีเหลืองที่ pH 6.5 และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวที่ pH ต่ำกว่า 6.5 (Freshney, 2005)

2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเซลล์สัตว์ คือ 37ºC เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายวันที่อุณหภูมิ 4ºC แต่เซลล์ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิปกติ 2ºC ได้ และจะตายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 40ºC ขึ้นไป (Freshney,2005)

3. แก๊สออกซิเจน

Miller และคณะ (1987) ได้ศึกษาถึงผลของ dissolved oxygen (DO จาก 0.1-100 เปอร์เซ็นต์ saturation in air) ของเซลล์ไฮบริโดมาของหนู โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าค่า DO ที่เหมาะสำหรับการผลิตแอนติบอดีคือ 50 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากค่า DO ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์

Shi และคณะ (1998) ได้ทดสอบความสามารถของตัวพาออกซิเจน ในการเพิ่มอัตราการเจริญ และระดับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ โดยเติมสารตัวพาออกซิเจนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าเมื่อใช้สารตัวพาออกซิเจน ได้แก่ Erythrogen-1™, perfluorocarbon emulsion, gluteraldehyde-conjugated bovine haemoglobin Formula-1™ และ polyethylene glycol modified bovine haemoglobin เซลล์ผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มควบคุม 104, 78, 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน natural bovine haemoglobin พบว่าผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ำกว่ากลุ่มควบคุม วัดประสิทธิภาพการใช้ออกซิเจนของเซลล์โดยวัดระดับกลูโคส และแลคเทต เพื่อหาอัตรส่วนระหว่างอัตราการสร้างแลคเทต (Lactate production rate ; LPR) ต่ออัตราการใช้กลูโคส (Glucose consumption rate ; GUR) พบว่าค่า LPR/GUR ที่ได้แปรผกผันกับปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิต

4. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ถูกใช้ร่วมกับ โซเดียมคาร์บอเนต เพื่อช่วยปรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีการเปลี่ยนได้อยู่ตลอดเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโต เนื่อง จากเซลล์มีการผลิตของเสีย ได้แก่ แลคเทต และแอมโมเนีย หรือเกิดจากการตายของเซลล์ที่สะสมในอาหารซึ่งจะทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเลี้ยงเซลล์จึงต้องเลี้ยงในตู้บ่มที่ควบคุมปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ไว้ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแก๊สคาร์บอนได ออกไซด์ละลายในอาหารเพื่อสร้างภาวะสมดุลกับ ไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) ทำให้มีภาวะเป็นกลางและมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารมีการเปลี่ยนแปลงน้อย ดังสมการที่ (1)

$$H_2O + CO_2 \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \qquad (1)$$

การที่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศเพิ่มขึ้น จะทำให้ HCO_3^- เพิ่มขึ้น เมื่อ HCO_3^- เพิ่มขึ้นสมการจะเกิดย้อนกลับไปทางด้านซ้ายจนกระทั้งเข้าสู่ภาวะสมดุลที่ pH 7.4 (Freshney, 2005)

อาหารและส่วนประกอบในอาหาร

เซลล์ไฮบริโดมาสามารถเจริญได้ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์หลายชนิด แต่ที่นิยมมากที่สุด 2 ชนิด ได้แก่ Dulbecco's modified Eagle's (DME) และ RPMI 1640 ซึ่งอาหารเหล่านี้จะต้องเติม fetal calf serum (FCS) ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และอาจใช้ calf serum หรือ horse serum ซึ่งมีราคาถูกกว่าแทนก็ได้ (Harlow และ Lane,1988) เนื่องจากซีรัมประกอบด้วย growth factors ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของโปรตีน ฮอร์โมน ไขมัน แร่ธาตุต่างๆ และตัวยับยั้ง แต่ในซีรัมมีคอมพลีเมนต์ต่างๆ ที่ต้องกำจัดออกโดยนำซีรัมไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที (heat activated) ในปัจจุบันมีการเลี้ยงเซลล์ในอาหารชนิดที่ไม่เติมซีรัม (serum free media) สามารถเลือกใช้ให้เหมาะกับการเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด (Freshney, 2005)

2.1.6 กลไกการสังเคราะห์สารอาหาร

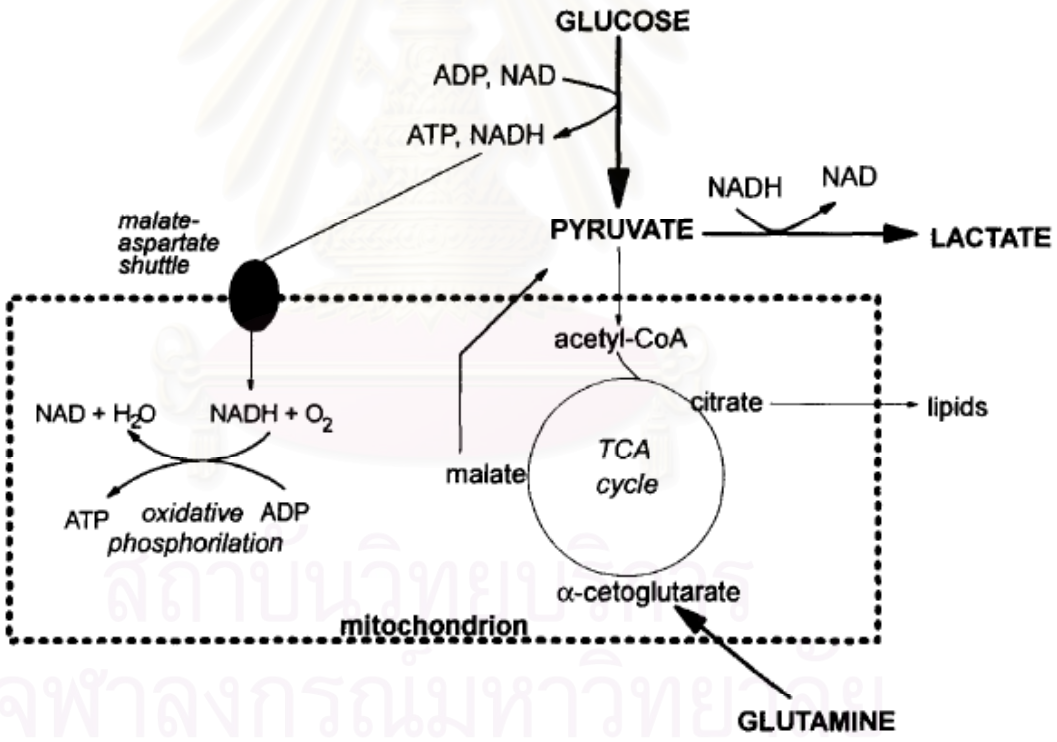
กลูโคสและกลูตามีน เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และเป็นแหล่งพลังงาน ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ กลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น ไพรูเวต โดยวิถีไกลโคลิซิส ซึ่งไพรูเวตอาจเปลี่ยนไปเป็นแลคเทต หรืออะซิโตอะซีเทตและอาจจะเข้าสู่วัฏจักรของกรดซิตริกและถูกออกซิไดส์ในรูปของ คาร์บอนได-ออกไซด์และน้ำ การสะสมของกรดแลกติกในอาหาร แสดงให้เห็นว่า วัฏจักรของกรดซิตริกอาจจะไม่ได้เกิดขึ้นทั้งหมดในสิ่งมีชีวิต (Freshney, 2005)

การขนส่งกลูโคส และกลูตามีน ภายในเซลล์โดยวิถีไกลโคลิซิส และกลูตามิโนลิซิสเกิดขึ้นในอัตราสูง นำไปสู่การเกิดสารเมตาบอไลต์จำนวนมาก อย่างเช่น แลกเทต และแอมโมเนีย การผลิตแลคเทตของเซลล์ไฮบริโดมา ไม่เหมือนกับเซลล์ทั่วไป ไพรูเวตเข้าสู่ Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) น้อยมาก ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน และไพรูเวตจำนวนมากเปลี่ยนไปเป็นแลกเทต แสดงถึงการใช้กลูโคสอย่างไม่มีประสิทธิภาพ การที่ไพรูเวตจำนวนมากเปลี่ยนไปเป็นแลกเทตแทนที่จะถูกออกซิไดส์ใน TCA cycle ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน ในเซลล์ไฮบริโดมายังไม่เป็นที่แน่

ชัด แลกเทตจำนวนมากที่เกิดขึ้น สามารถไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ เพิ่ม osmolarity ในอาหาร หรือลด pH ในอาหาร(Sanfeliu และคณะ, 1997)

การเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นแลกเทต มีความจำเป็นสำหรับการอยู่รอดของเซลล์ เป็นหนทางในการรีออกซิไดส์ NADH จำนวนมากที่เกิดการเกิดไกลโคลิซิสในอัตราสูงในเซลล์ไฮบริโดมา

ในระหว่างการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวต(ไกลโคลิซิส) NAD 2 โมเลกุล ถูกรีดิวส์ไปเป็น NADH ซึ่งต้องรีออกซิไดส์ เซลล์มี 2 ระบบในการรีออกซิไดส์ดังรูปที่ 2.4 ระบบแรก เป็นระบบที่ใช้ในเซลล์ปกติภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่ง NADH จะถูกส่งจากไซโตซอลเข้าสู่ไมโตคอนเดรียด้วยระบบ malate-aspartate shuttle เกิดรีออกซิไดส์ของ NADH ในไมโตคอนเดรีย ได้ ATP จำนวนมาก (38 ATP) ในระบบที่ 2 เป็นระบบที่ใช้ในเซลล์ปกติในภาวะที่ขาดออกซิเจน เกิดออกซิเดชั่นของ NADH ในไซโตซอล ทำให้ได้แลกเทต ส่งผลให้ลดการเกิด ATP ต่อโมลของกลูโคส (2 ATP)



รูปที่ 2.4 แสดงวิถีของเมตาบอลิซึมในเซลล์ไฮบริโดมา (Sanfeliu และคณะ, 1997)

Fitzpatrick และคณะ (1993) ได้ศึกษาเมตาบอลิซึมของเซลล์สัตว์ พบว่าวิถีเมตาบอลิซึมของกลูโคส และกลูตามีน เกี่ยวข้องกับความต้องการพลังงานของเซลล์ การเปลี่ยนความเข้มข้นของซับสเตรตระหว่างการเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่

สำคัญ ซึ่งวิเคราะห์โดยเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแบบ batch ให้มีความหนาแน่นสูงสุด 1- 2x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 3-4 วัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ถึงระยะ stationary ค่าอัตราจำเพาะของการใช้กลูโคสและกลูตามีน ไม่คงที่ระหว่างการเพาะเลี้ยง และมีค่าสูงสุดที่กึ่งกลางระยะ exponential มีค่า 2.4 และ 4.3 นาโนโมล/นาที/10^6เซลล์ ตามลำดับ กลูโคส (96 เปอร์เซ็นต์) ถูกเมตาบอไลซ์ในสัดส่วนที่สูงโดยไกลโคลิซิส และบางส่วนในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (3.3 เปอร์เซ็นต์) และ TCA cycle (0.21 เปอร์เซ็นต์)

กลูตามีน เป็นตัวสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ อย่างไรก็ตาม ช่วงกลางระยะ exponential การสร้างพลังงานจากแคแทบอลิซึม ของซับสเตรตทั้งสองดีพอๆ กันระหว่างกลูตามีน (55 เปอร์เซ็นต์) และกลูโคส (45 เปอร์เซ็นต์)

แอมโมเนียและ แลคเทต เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของ กลูตามีน และกลูโคส เมื่อถูกสะสม พบว่าจะทำให้การเจริญของเซลล์ลดน้อยลง และมีผลต่อเมตาบอลิซึม และการผลิตแอนติบอดีในเซลล์ไฮบริโดมา เคยมีรายงานพบว่า แลคเทต ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา และเมตาบอลิซึมของเซลล์ และลดอัตราการผลิต เนื่องจากไปเปลี่ยนออสโมลาริตี ในอาหาร (Ozturk และคณะ, 1992)

Cruz และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงผลของ แอมโมเนีย และ แลคเทต ต่อการเจริญ เมตาบอลิซึม และอัตราการผลิตของเซลล์ BHK ซึ่งผลิต recombinant human IgG พบว่าการเจริญของเซลล์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 1.1 มิลลิโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงที่มีการกวน และ 3.5 มิลลิโมลาร์ในการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และความเข้มข้นของแลคเทต 28 มิลลิโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบ การเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียจาก 0-20 มิลลิโมลาร์ ทำให้ specific productivity ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณแลคเทตที่เพิ่มขึ้นจาก 0-60 มิลลิโมลาร์ ทำให้ specific productivity ลดลง 40 เปอร์เซ็นต์

2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

Altshuler และคณะ (1985) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตแอนติบอดีในฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นโพลีซัลโฟน (polysulfone) ซึ่งมี molecular weight cut-off (MWCO) ของเมมเบรน เท่ากับ 10,000, 50,000 และ 100,000 ดาลตัน และใช้อาหาร RPMI 1640 ที่เติม FCS 20 เปอร์เซ็นต์จากนั้นค่อยๆลดปริมาณ FCS จนเหลือปริมาณต่ำสุดที่ 6.9 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 16 วัน เปลี่ยนอาหารใน reservoir ทุกๆ 4 วัน สามารถผลิตแอนติบอดีได้เข้มข้น 80, 510

และ 740 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่ใน reservoir ของฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนขนาด 100,000 ดาลตัน พบแอนติบอดีเข้มข้น 260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่ม MWCO ของเมมเบรนทำให้ได้แอนติบอดีเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งการใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มี MWCO 10,000 ดาลตัน ได้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า การใช้ MWCO ขนาด 50,000 และ 100,000 ดาลตันมาก

Gorter และคณะ (1993) ได้ศึกษาถึงการผลิต bi-specific monoclonal antibodies (MAb) ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ เปรียบเทียบกับการผลิตใน T-flasks และวิธีการผลิตในหนู ภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 36.3-36.4 ºC และ pH 7.26 อาหารในส่วน ECS เติม FCS 1 เปอร์เซ็นต์ และ serum replacement factors (SF-X; Costar Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้เซลล์เริ่มต้น 3-5 x 10^8 เซลล์ วัดการเจริญของเซลล์จากค่า glucose consumption ในส่วนของ ICS 2-3 ครั้งต่อสัปดาห์ เพื่อควบคุมปริมาณกลูโคสให้สูงกว่า 2.25 กรัมต่อลิตร โดยเพิ่มอัตราการไหลของอาหารใหม่ในส่วนของ IC เริ่มเก็บแอนติบอดีในวันที่ 6 หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 38 วัน ได้แอนติบอดีทั้งหมด 375 มิลลิกรัม จากอาหารปริมาตร 2.9 ลิตร แอนติบอดีมีความเข้มข้นเฉลี่ย 134±30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านโปรตีน เอ ได้แอนติบอดี 79 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตในหนูจะต้องใช้หนูถึง 200 ตัว และถ้าผลิตในขวดเลี้ยงเซลล์ (T-flasks) ต้องใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 38 ลิตร

Lowry และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ ได้แก่ molecular weight cut-off, พื้นที่ผิวไฟเบอร์, ชนิดของไฟเบอร์ และค่า ultrafiltration rate หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 25 วัน พบว่าปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีคือชนิดของไฟเบอร์ และค่า ultrafiltration rateโดยเรียงลำดับชนิดของไฟเบอร์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ 1.Polymethyl - methacrylate 2.Cellulose 3.Cuprammonium Rayon 4.Cellulose acetate นอกจากนี้การเพิ่มค่า molecular weight cutoff ในไฟเบอร์ชนิด Cellulose acetate ทำให้สามารถผลิตแอนติบอดีได้มากขึ้นเนื่องจากการเพิ่มค่า molecular weight cut-off มีผลทำให้ค่า ultrafiltration rate สูงขึ้น

Jackson และคณะ (1996) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ กับการผลิตในช่องท้องหนู (murine ascites) 20 ตัว โดยใช้ cell line 2B11 3C9 และ RMK ในการศึกษาพบว่าการผลิตแอนติบอดีโดยใช้ฮอลโลว์ไฟ

เบอร์ได้แอนติบอดี 168, 565 และ 1023 มิลลิกรัมตามลำดับ และจากช่องท้องหนูได้ 455, 466 และ 997 มิลลิกรัมตามลำดับ ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ อยู่ในช่วง 0.71-11.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ได้จากช่องท้องหนูอยู่ในช่วง 4.07-8.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงระบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ สามารถใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีแทนการผลิตจากหนูได้

Czirbik และคณะ (1996) ได้ศึกษาถึงปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีผลต่อการผลิตแอนติบอดีในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ ได้แก่ ชนิดของฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มี molecular weight cut-off (MWCO) 10,000 และ 30,000 ดาลตัน อัตราการหมุนเวียนอาหาร วิธีการเก็บแอนติบอดีและเซลล์ และอัตราการใช้กลูโคส พบว่าฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มี MWCO 30,000 ดาลตัน สามารถใช้ผลิตแอนติบอดีได้ดีกว่าชนิดที่มี MWCO 10,000 ดาลตัน เพราะว่าฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่ามีระยะ lag phase ในการผลิตแอนติบอดี และการเจริญของเซลล์ยาวนาน คือเมื่อใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มี MWCO 10,000 ดาลตัน จะใช้เวลา 26 ถึง 33 วัน และเมื่อใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มี MWCO 30,000 ดาลตัน จะใช้เวลา 11 ถึง 20 วัน จากการศึกษาอัตราการป้อนอาหาร เมื่อให้อัตราการป้อนอาหารสูง (5.0 ลิตร/วัน สำหรับ 30,000 ดาลตัน และ 8.4 ลิตร/วัน สำหรับ 10,000 ดาลตัน) จะผลิตแอนติบอดีได้น้อยกว่าการป้อนอาหารในอัตราเร็วที่ต่ำกว่า (3.5 และ 7.2 ลิตร/วัน ตามลำดับ)

การนำเซลล์ที่มากเกินออกไปเป็นระยะ ๆ สามารถเพิ่มการผลิตแอนติบอดี และยืดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้นานขึ้น การเก็บแอนติบอดีอย่างต่อเนื่องทุกวัน (50-200 มิลลิลิตรต่อวัน) ได้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าการเก็บเป็นครั้งคราวโดยเก็บ 2-3 ครั้งต่อสัปดาห์ (50-250 มิลลิลิตร) เมื่อเปลี่ยนการเก็บอย่างต่อเนื่องมาเป็นแบบครั้งคราว ความเข้มข้นของแอนติบอดีเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 413 เป็น 3387 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากงานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการผลิตแอนติบอดีในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ ซึ่งได้แก่ ชนิดของฮอลโลว์ไฟเบอร์ ขนาด MWCO ของเมมเบรน การให้อากาศ อัตราการหมุนเวียนอาหารและอัตราการป้อนอาหาร ปริมาณ FCS วิธีการเก็บแอนติบอดีและเซลล์ ดังนั้นการผลิตแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากจึงต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ เพื่อให้เกิดภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนติบอดีซึ่งอาจแตกต่างกันในเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละชนิด

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ไฮบริโดมาที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) ระหว่างเซลล์ ลิมโฟไซต์จากม้ามหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย CAP-BSA กับเซลล์ไมอีโลมา (P3/NSI/1-4A4-1 (NS-I), ATCC No : TIB 18) ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยี ชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแอนติบอดีพบว่า เป็นชนิด IgG_{2b}

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร	Terumo
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon
ขวดเลี้ยงเซลล์ (T-flasks)	Nunc
ขนาด 25, 75 และ 175 cm^2	
ขวดแก้ว	Boro
ขวดใส่อาหารขนาด 5 ลิตร	Duran
เข็มฉีดยา (18G)	Nipro
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE minor 35
เครื่องวัดพี เอช	Mettler Toledo
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	Titertek
เครื่อง compact ROCKER CR300	Finemould Precision
เครื่อง microtiterplate reader	Titertek
เครื่อง thermo mixer compact	Eppendorf
จานชนิด 96 หลุม	Nunc
ชุดเตรียมเจล MiniproteanII Dual Slab Cell	Bio-Rad

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato
ตู้ถ่ายเชื้อ	Cambrige
ท่อเหล็กสำหรับต่อสายยาง	
ปิเปตต์	Eppendorf
ปิเปตต์อัตโนมัติ	Socorex
ปั๊มลม	Iwaki
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc
Connector for cartridge	Terumo
Dialysis connector	Gambro dasco
Heamocytometer	Boeco
Hollow fiber dialyzer / CL*C12NL	Terumo
Membrane material : Cellulose	
Surface area : 1.2 m^2	
Volume (ECS + ICS) : 79 ml	
Molecular weight cut-off : 50 kDa (90%) , 65 kDa (95%)	
Hemoconcentrator / CX*HC11S	Terumo
Membrane material : Polysulfone	
Surface area : 1.1 m^2	
Volume (ECS + ICS) : 67 ml	
Molecular weight cut-off : 66 kDa (99.4%)	
Hydrophilic filter 0.2 μm/Midisart 2000	Sartorious
Hydrophilic filter 0.2 μm PTFE Membrane	PALL Life Sciences
Marprene tube (tube bore 6.4 mm., thick 2.4 mm.)	Watson-marlow
Peristaltic pump	Watson-marlow
Silicone tube (tube bore 6.4 mm., thick 1.6 mm.)	Watson-marlow
Silicone tube / Platinum Cured (tube bore 6.4, thick 1.6 mm.)	Watson-marlow
Three-way stopcock	Terumo

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	การใช้	ที่มา
1. 40 % Acrylamide / Bis Solution, 29 : 1 (3.3 % C)	เทคนิค SDS-PAGE	Bio-Rad
2. Ammonium chloride	เตรียมแอมโมเนียมาตรฐาน	Fluka, Switzerland
3. APS (Ammonium persulfate)	เทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich,USA
4. BCA protein assay kit	หาปริมาณโปรตีน	Sigma-Aldrich, USA
5. Bovine serum albumin	เตรียมโปรตีนมาตรฐาน	Sigma-Aldrich, USA
6. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
7. D-glucose	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
8. Dimethyl sulfoxide(DMSO)	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	Fluka, Switzerland
9. 3,5-Dinitrosalicylic acid	หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส	Sigma-Aldrich,USA
10. Disodium hydrogenphosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, USA
11. Fetal bovine serum	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Invitromex, USA
12. Hydrogen peroxide (H_2O_2)	เตรียมสับสเตรต	Fluka, Switzerland
13. L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
14. Lithium L-lactate	เตรียมแลกเทตมาตรฐาน	Sigma-Aldrich,Germany

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	การใช้	ที่มา
15. Methanol	เตรียม Destaining	BDH, England
16. O-phenylenediamine	เตรียมสับเตรต	Sigma-Aldrich, USA
17. Penicillin G	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
18. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	Zymed, USA
19. Phenol	หาปริมาณแอมโมเนีย	MERCK, Germany
20. Potassium sodiumtartate	หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส	Carlo Erba
21. RPMI 1640 medium	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Invitromex, USA
22. Sodium bicarbonate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, Germany
23. Sodium chloride	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
24. Sodium dihydrogen phosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, USA
25. Sodium hydroxide	หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส	Mallinckrodt
26. Sodium hypochlorite	หาปริมาณแอมโมเนีย	The Clorox company,USA
27. Sodium nitroprusside dihydrate	หาปริมาณแอมโมเนีย	Fluka Chemical, Switzerland
28. Sodium pyruvate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	การใช้	ที่มา
29. Streptomycin	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
30. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	Merck, Germany
31. TEMED	เทคนิค SDS-PAGE	Bio Basic Inc.
32. Tris (hydroxymethyl) aminomehane	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
33. นมพร่องมันเนย	ทดสอบ ELISA	Mission health food, Thailand

3.4 ขั้นตอนการวิจัย

3.4.1 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้อาหาร RPMI 1640 10.4 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัม, กลูโคส 2 กรัม, L-กลูตามีน 0.1 กรัม, โซเดียมไพรูเวต 0.11 กรัม และยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน จี 1,000,000 ยูนิต เสร็ปโตมัยซิน 100 มิลลิกรัม ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ลิตร และปรับค่า pH ให้ได้ 7.1-7.2 ด้วย 3 M HCl แล้วนำไปกรองผ่านเครื่องกรองที่มีเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดขนาด 5 ลิตร ปริมาตรขวดละ 2 ลิตร สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพฮอลโลว์ไฟเบอร์ และ แบ่งใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 90 มิลลิลิตร สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ใน T- flasks และในส่วนของ Extracapillary space ของฮอลโลว์ไฟเบอร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนใช้เติม Fetal calf serum (FCS) ให้ได้เปอร์เซ็นต์ที่ต้องการ

3.4.2 ศึกษาการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks ขนาด 175 cm^2 เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ทุกวันวันละ 5 มิลลิลิตร นำไปนับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี กลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย

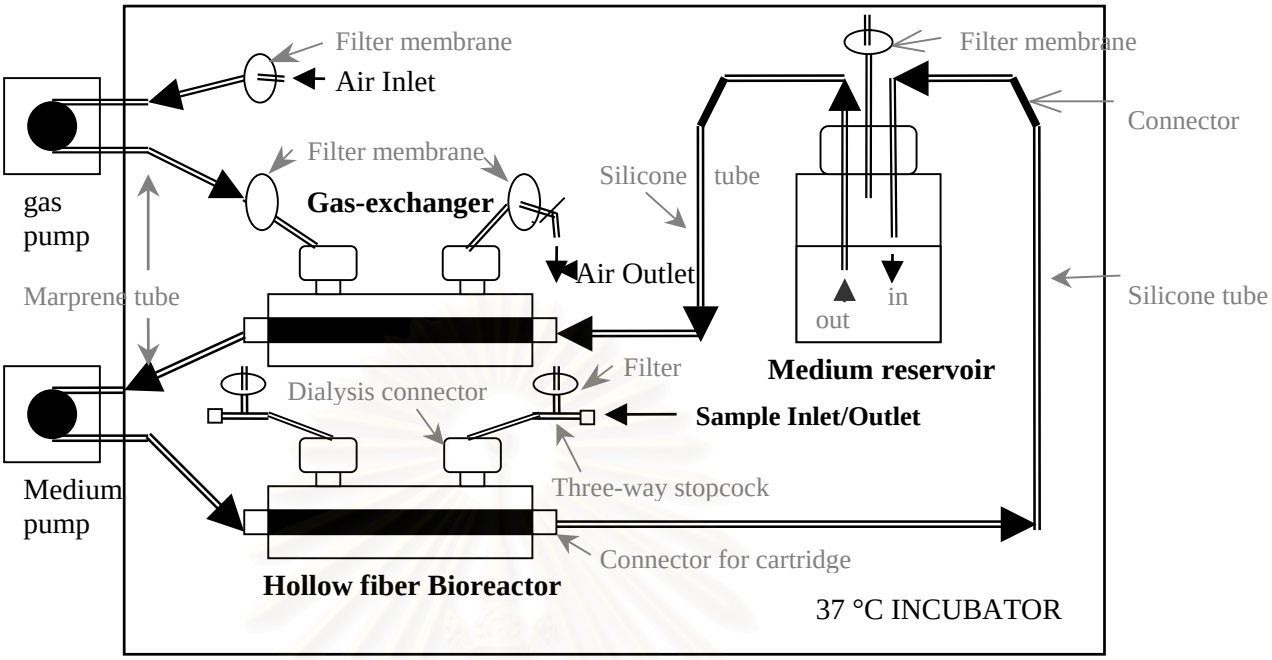
3.4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์-ไฟเบอร์

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มต้น

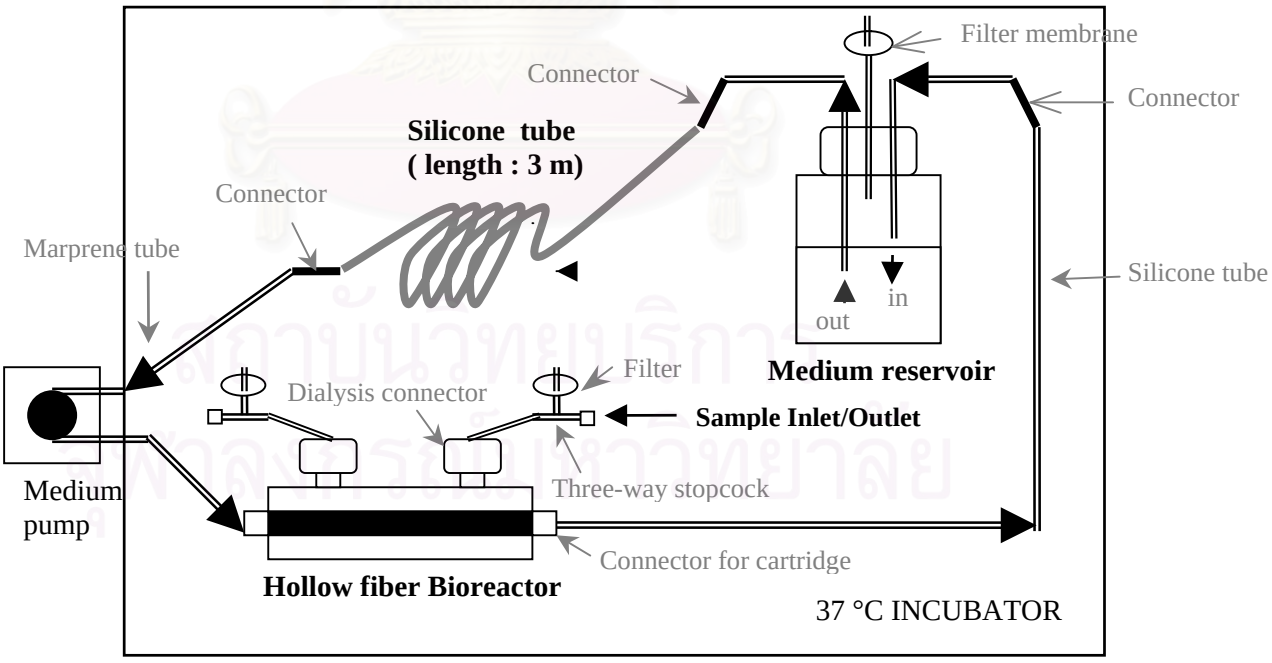
นำเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้มาจากการหลอมรวมเซลล์ ระหว่างเซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามหนูกับเซลล์ ไมอีโลมา ซึ่งไฮบริโดมาที่ได้ ผลิตแอนติบอดีชนิด IgG_{2b} ต่อสารคลอแรมเฟนิคอลในรูปที่เชื่อมต่อกับ BSA มาเลี้ยงใน T-flasks ขนาด 175 cm^2 โดยใส่อาหาร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ ได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $3x10^8$ เซลล์

3.4.3.2 การต่อระบบและภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง

นำอุปกรณ์ทั้งหมดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาประกอบเข้ากันในตู้ถ่ายเชื้อ ซึ่งมีลักษณะการต่อระบบ 2 วิธี ได้แก่ วิธีแรกเป็นการต่อระบบเพื่อให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์อันที่หนึ่งด้วยอัตราการไหลของอากาศ 30 rpm จากนั้นอาหารจึงไหลไปสู่ฮอลโลว์ไฟเบอร์อันที่สองที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ ดังรูปที่ 3.1 ส่วนวิธีที่สองเป็นการต่อระบบเพื่อให้อากาศแพร่เข้าสู่ผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหารแทนการใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ ดังรูปที่ 3.2 จากนั้นนำระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ มาติดตั้งในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37°C ทั้งสองระบบควบคุมให้มีอัตราการไหลของอาหาร 50 มิลลิลิตรต่อนาที ก่อนใส่เซลล์เริ่มต้นทำการล้างระบบเป็นเวลา 1 สัปดาห์ด้วยอาหารที่ไม่เติมซีรัม และการใส่เซลล์เริ่มต้น ต้องยกระบบทั้งหมดนำมาทำในตู้ปลอดเชื้อ หลังจากใส่เซลล์ลงใน ECS เขย่าคอลัมน์วันละ 1 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวทั่วคอลัมน์



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์โดยการให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์



รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน

3.4.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

ในการวิจัยนี้จะครอบคลุมการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการผลิต ได้แก่

1.ปริมาณและระยะเวลาการเก็บแอนติบอดี โดยมีวิธีเก็บแอนติบอดีดังนี้

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ (2 คอลัมน์)

วันที่เก็บ	7	14	21	28	32	36
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	15	15	15	40	40	40

1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน แบบที่ 1

วันที่เก็บ	7	14	18	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	5	10	20	20

1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน แบบที่ 2

วันที่เก็บ	7	14	21	28
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	10

1.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน แบบที่ 3

วันที่เก็บ	7	14	17
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	5	5	15

1.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน แบบที่ 4 ซึ่งเก็บอาหารครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	10	10	10

1.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคน แบบที่ 5 ซึ่งเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วัน ของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	20	20	20

ก่อนเก็บแอนติบอดี เขย่าคอลัมน์ฮอลโลว์ไฟเบอร์เพื่อให้เซลล์ที่อยู่ใน ECS กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในอาหาร หลังจากนั้นใช้กระบอกฉีดยา ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารใหม่ซึ่งมีปริมาณซีรัมตามความเข้มข้นที่ต้องการ ฉีดลงในท่อด้านซ้ายพร้อมกับใช้กระบอกฉีดยา เปล่า ขนาด 50 มิลลิลิตร ดูดอาหารออกมาจากท่อด้านขวา ผสมให้เข้ากันโดยฉีดอาหารสลับไปมาในกระบอกฉีดยา ทั้งสองข้างจำนวน 3 รอบแล้วจึงเก็บแอนติบอดีออกมาจากท่อด้านขวาให้ได้ตามปริมาตรที่ต้องการ

การเก็บครั้งต่อไปทำเหมือนเดิม แต่เก็บแอนติบอดีจากท่อด้านซ้าย โดยใช้กระบอกฉีดยา ที่บรรจุอาหารใหม่ฉีดลงในท่อด้านขวาแทน และใช้กระบอกฉีดยาเปล่า ดูดอาหารออกมาจากท่อด้านซ้าย ทำการเก็บสลับด้านกันเช่นนี้ตลอดการทดลอง

2. ปริมาณ FCS ที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ในส่วน Extra capillary space (ECS) ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ซึ่งทุกครั้งในการเก็บแอนติบอดี ต้องเติมอาหารใหม่ให้มีความเข้มข้นของซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์

3. รูปแบบการให้อากาศลงในอาหาร ได้แก่

วิธีที่ 1 การให้อากาศด้วยฮอลโลว์ไฟเบอร์โดยใช้ปั๊มดูดอากาศผ่านเมมเบรนภายในฮอลโลว์ไฟเบอร์ซึ่งมีพื้นที่ผิวมากไปสู่อาหารที่ไหลอยู่ภายใน capillary

วิธีที่ 2 การให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนที่มีความยาว 3 เมตร ซึมเข้าไปสู่อาหาร

4. ชนิดฮอลโลว์ไฟเบอร์ ระหว่างฮอลโลว์ไฟเบอร์ชนิดเส้นใยเซลลูโลส และ ฮอลโลว์ไฟเบอร์ชนิดเส้นใยพอลิซัลโฟน

ในการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์จากส่วน ECS แต่ละครั้งซึ่งจะมีทั้งเซลล์ไฮบริโดมาและแอนติบอดี แบ่งอาหารส่วนหนึ่งมานับจำนวนเซลล์ ด้วย Haemacytometer โดยเจือจางเซลล์ด้วยสีย้อม trypan blue และหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลือปั่นแยกเซลล์ออก ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดี กลูโคส แลคเทต และแอมโมเนีย

3.4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

นำโปรตีน เอ มาทำให้พองตัว (swell) โดยแช่ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเติมใส่คอลัมน์ จากนั้นทำคอลัมน์ให้สมดุลโดยเติม 0.1 M Phosphate buffer, pH 8.0 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้เท่ากับ pH 8.1 โดยใช้ 1 M Tris buffer, pH 9.0 ก่อนนำมาเติมลงในคอลัมน์โปรตีน เอ โดยให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยการเติม 0.1 M Phosphate buffer, pH 8.0 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการชะแอนติบอดี (IgG_{2b}) ออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยการเติม 0.1 M Citrate buffer, pH 3.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมกับการใช้หลอดทดลองที่มี 1 M Tris buffer, pH 9.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โปรตีน เอ โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันก่อนนำไปไดแอลิซิสใน PBS เป็นเวลา 2 วัน ทำการเปลี่ยนสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายไปหาปริมาณแอนติบอดี

3.4.6 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์โปรตีน เอ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Laemmli (1970) โดยเตรียมส่วนของ separating gel ซึ่งประกอบด้วยอะคริลาไมด์เจล 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ให้มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตร และ stacking gel ซึ่งประกอบด้วยอะคริลาไมด์เจล 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งมีวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข

นำสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ผสมกับ sample buffer อัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นนำมาต้มที่ 99 °C เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้เย็นจึงใส่ตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของเจล เริ่มแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่ก่อนถึงขอบเจลประมาณ 1 เซนติเมตร (90 นาที) หยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue เป็นเวลา 30 นาที ที่

อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปแช่ใน Destaining solution โดยแช่ค้างคืนไว้ และเปลี่ยน Destaining solution จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนสีฟ้า

สร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) ระหว่างค่า relative mobility (Rf) กับ logarithm ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Prestained Protein, Fermentas) ที่ประกอบด้วย β-galactosidase (117 kDa), Bovine serum albumin (85 kDa), Ovalbumin (49 kDa), Carbonic anhydrase (34 kDa), β-galactoglobulin (25 kDa) และ Lysozyme (19 kDa) จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

3.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี

3.4.7.1 วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง UV

หาปริมาณแอนติบอดีตามวิธีของ (Johnstone และ Thrope, 1987) โดยนำสารละลายที่ผ่านขั้นตอนไดแอลิซิสแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณ หาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี (IgG)(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{extinction coefficient ของ IgG}}$$

<u>หมายเหตุ</u> ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่า 1.35

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และนำไปใช้สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA ต่อไป

3.4.7.2 วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 3.4.5 เป็นแอนติบอดีมาตรฐาน

เตรียมสาร CAP-BSA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเติมใน จานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีอยู่ ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ และแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-Rabbit anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:10000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย ซับสเตรต OPD (O-phenylenediamine) หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader จากนั้นหาความเข้มข้นของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ ก.1 ในภาคผนวก ก

3.4.8 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

หลักการคือ เมื่อสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid) ทำปฏิกิริยากับกลูโคส เกิด Sodium 3-amino-5-nitrosalicylate ที่มีสีน้ำตาลแดง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกซึ่งมีวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารตัวอย่างและสารละลายกลูโคสมาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำ

เดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Bernfeld , 1955)

สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ ก. 2 ในภาคผนวก ก คำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.4.9 การวิเคราะห์ปริมาณแลคเทต

ปฏิกิริยาเกิดโดยเอนไซม์ lactate oxidase เปลี่ยน แลกเทต ไปเป็น ไพรูเวท และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากนั้นเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปทำให้ chromogen precursor เกิดเป็นสีฟ้าเข้ม

หาปริมาณแลกเทตโดยดัดแปลงวิธีการทดสอบจากชุดตรวจสอบของบริษัท sigma โดยเติมอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์และสารละลายลิเทียมแลคเทตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในจานชนิด 96 หลุม จากนั้นเติม lactate reagent solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมแลกเทตกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ ก.3 ในภาคผนวก ก คำนวณหาความเข้มข้นของแลคเทตในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.10 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

มีหลักการคือ แอมโมเนียในสารละลายที่เป็นด่างจะทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮโปคลอไรท์และฟีนอล โดยมีโซเดียมไนโตรปรัสไซด์เป็นตัวเร่งปฏิริยา ได้สารประกอบเชิงซ้อน indophenol blue ที่มีสีน้ำเงิน (Aminot และคณะ, 1997) ค่าแอมโมเนียที่วิเคราะห์ได้จะรวมทั้งในรูปที่มีประจุ และไม่มีประจุ ($NH_4^+ + NH_3$)

หาปริมาณแอมโมเนียโดยดัดแปลงวิธีการทดสอบจาก Fawcett และ Scott (Fawcett และ Scott, 1960) โดยเติมอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์และสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์มาตรฐานที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ลงในจานชนิด 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมฟีเนท จำนวน 55 ไมโครลิตร โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 85 ไมโครลิตร และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 85 ไมโครลิตร ซึ่งสารต่างๆ มีวิธีเตรียมในภาคผนวก ข บ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ ก.4 ในภาคผนวก ก คำนวณหาความเข้มข้นของแอมโมเนียในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

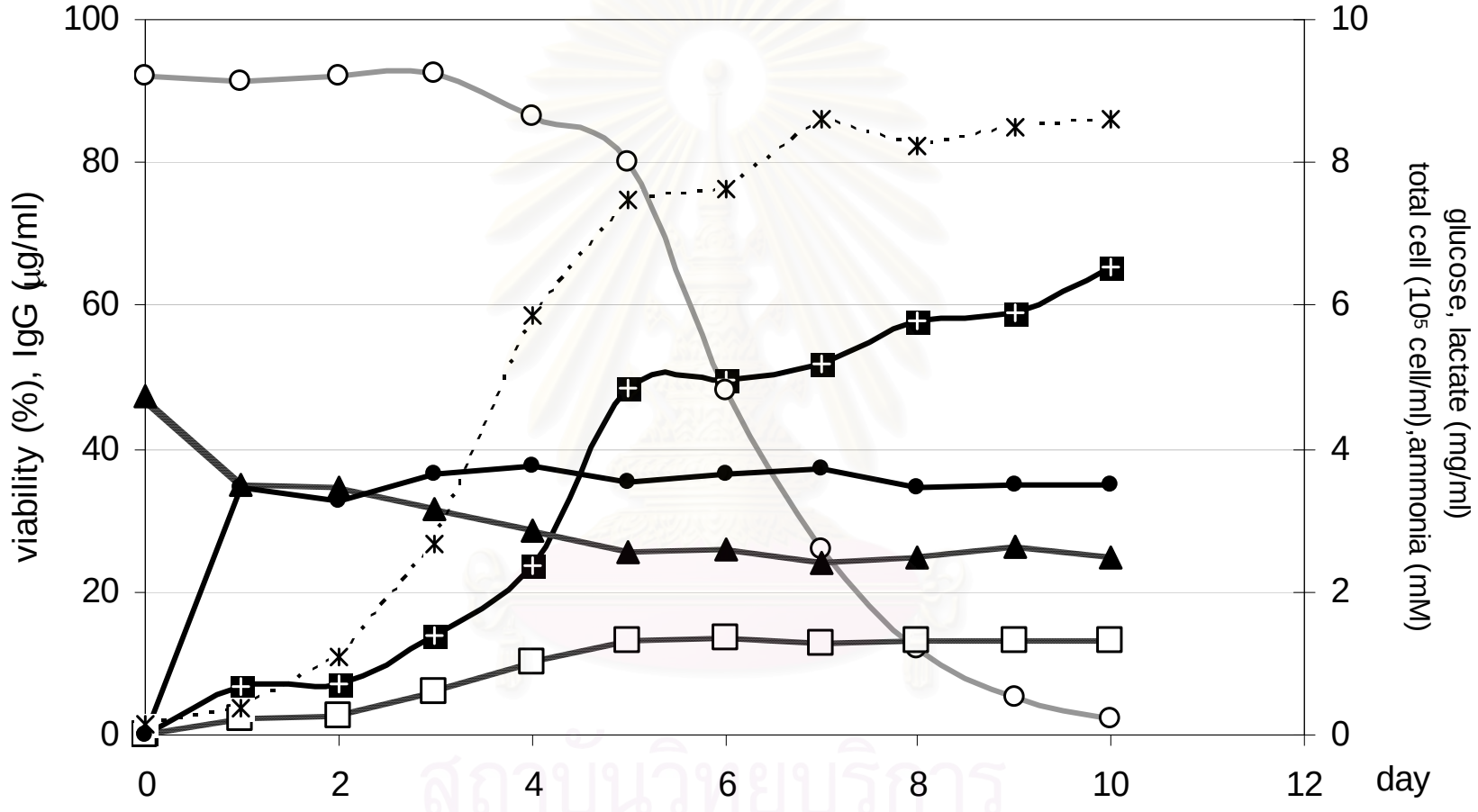
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแบบแบชใน T-flasks ขนาด 175 ตารางเซนติเมตร ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และบรรจุอาหารปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ทุกวันวันละ 5 มิลลิลิตร นำไปนับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี กลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 ซึ่งพบว่าเซลล์เจริญอยู่ในระยะ lag phase เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ log (exponential) phase เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 5 จึงเข้าสู่ระยะ stationary phase และตายอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าเซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้ตั้งแต่ระยะ lag phase และมีปริมาณแอนติบอดีที่สะสมเพิ่มขึ้นมากในระยะ log phase ซึ่งเซลล์มีการเจริญมาก ในช่วงที่เซลล์ตาย ปริมาณแอนติบอดีที่สะสมเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และมีความเข้มข้นประมาณ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคงที่ประมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5 ส่วนปริมาณแลกเทตค่อยๆ เพิ่มขึ้นและคงที่ประมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ประมาณ 3.6 มิลลิโมลาร์ ตลอดระยะการเจริญ (10 วัน) ที่ระดับความเข้มข้นนี้อาจจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

สำหรับการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคงที่ที่ประมาณ 87 เปอร์เซ็นต์ ใน 4 วันแรกและลดลงอย่างรวดเร็วคือ 48 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 และ 10 ตามลำดับ การที่เซลล์มีชีวิตมีปริมาณลดลงอาจเนื่องมาจากปริมาณสารอาหารต่างๆ อย่างเช่น growth factors ลดลง ถึงแม้ว่าจะมีกลูโคสเหลืออยู่มากพอ หรืออาจเป็นเพราะขาดออกซิเจนเนื่องจากเซลล์มีปริมาณมากขึ้น ทำให้เซลล์ที่เจริญอยู่ด้านใน ไม่ได้รับออกซิเจนจึงตายไป นอกจากนี้ได้ทำการทดลองที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 5 x 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 1 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันดังรูปที่ ก.6 และ ก.7 ในภาคผนวก ก



รูปที่ 4.1 การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ใน T-flasks ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ (—■— IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , —○— viability, ---✳--- total cell)

4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

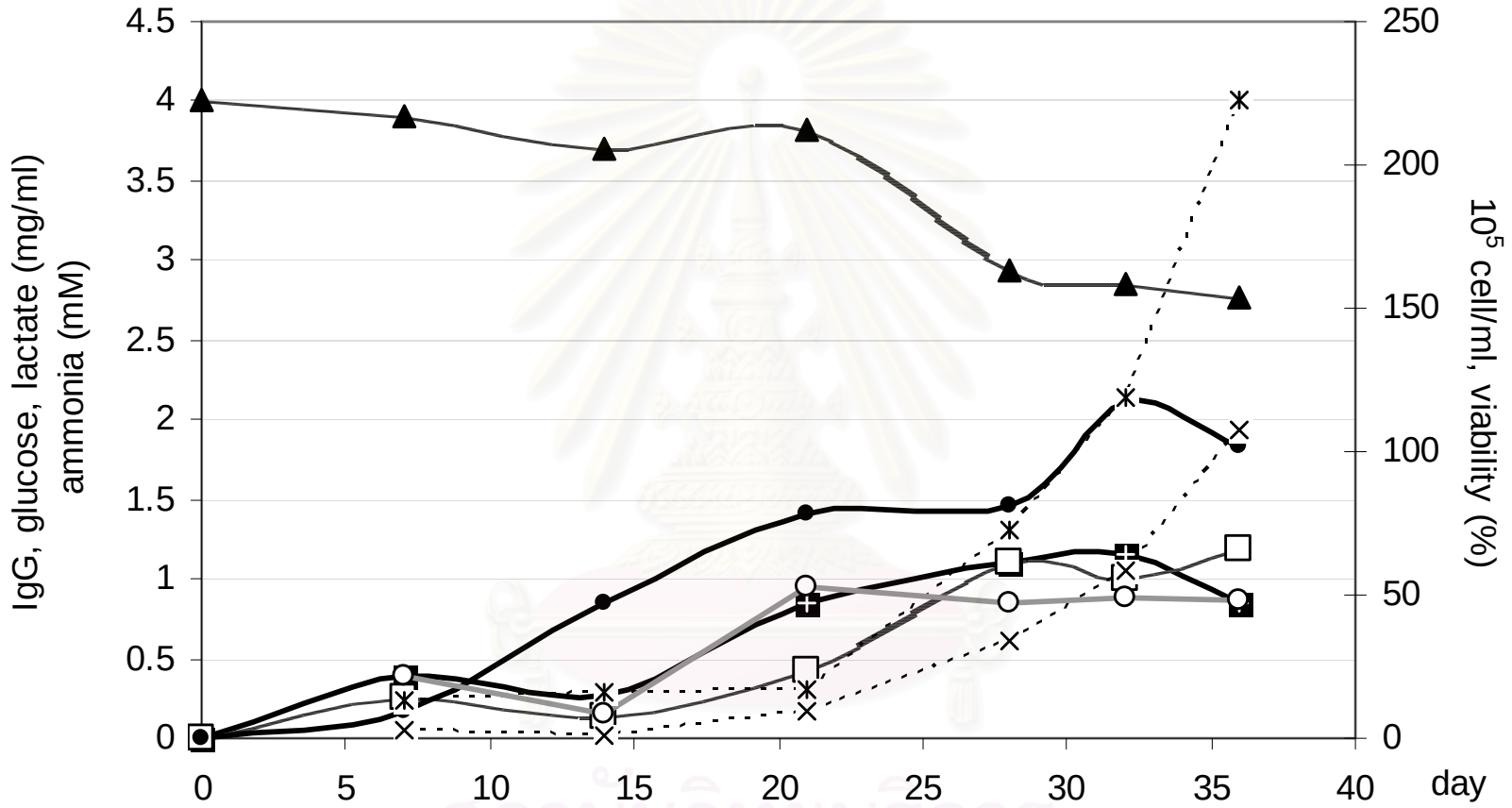
การเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้ภาวะตามหัวข้อ 3.4.3 โดยนำอุปกรณ์ทั้งหมดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาประกอบเข้ากันในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นนำระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ มาติดตั้งในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 3.1 และ 3.2 ปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37°C อัตราการไหลของอาหาร 50 มิลลิลิตรต่อนาที ก่อนเลี้ยงเซลล์ ล้างระบบเป็นเวลา 1 สัปดาห์ด้วยอาหารที่ไม่เติม FCS ใส่เซลล์เริ่มต้นจำนวน $3x10^8$ เซลล์ ลงในส่วนของ ECS โดยยกระบบทั้งหมดนำมาทำในตู้ปลอดเชื้อ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ เขย่าคอลัมน์วันละ 1 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวทั่วคอลัมน์

4.2.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์

ในการทดลองนี้จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.1 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งจะทำการเติมอากาศลงในอาหารโดยการป้อนอากาศเข้าสู่ส่วน ECS และอาหารเข้าสู่ส่วน ICS ในลักษณะสวนทางกันภายในฮอลโลว์ไฟเบอร์อันที่หนึ่ง อากาศจะซึมผ่านเซลลูโลสเมมเบรนเข้าสู่อาหาร หลังจากนั้นอาหารจะเข้าสู่ ICS ของฮอลโลว์ไฟเบอร์อันที่สอง ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ในส่วนของ ECS โดยมีระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปดังนี้

วันที่เก็บ	7	14	21	28	32	36
ปริมาตรที่เก็บ (ml)	15	15	15	40	40	40

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 ซึ่งพบว่าเซลล์เจริญอยู่ในระยะ lag phase เป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ log (exponential) phase เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณสูงสุดถึง 2.2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่ามีการผลิตเพิ่มขึ้นในช่วง log phase ตั้งแต่วันที่ 21 และมีความเข้มข้นสูงสุดถึง 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.2 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS

(IgG , glucose , lactate , ammonia , viable cell , total cell , viability)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคงที่ประมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 28 ส่วนปริมาณแลกเทต ค่อยๆ เพิ่มขึ้นและคงที่ประมาณ 1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตแอนติบอดี (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และมีปริมาณสูงสุด 2.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งระดับความเข้มข้นนี้ไม่น่าจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)
ในการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีที่ชีวิต พบว่ามีปริมาณต่ำในระยะ lag phase จากนั้นมีจำนวนมากขึ้นใน วันที่ 21 จนมีปริมาณคงที่ประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูง หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 36 วัน เกิดการปนเปื้อน

4.2.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 1

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS โดยมีระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปดังนี้

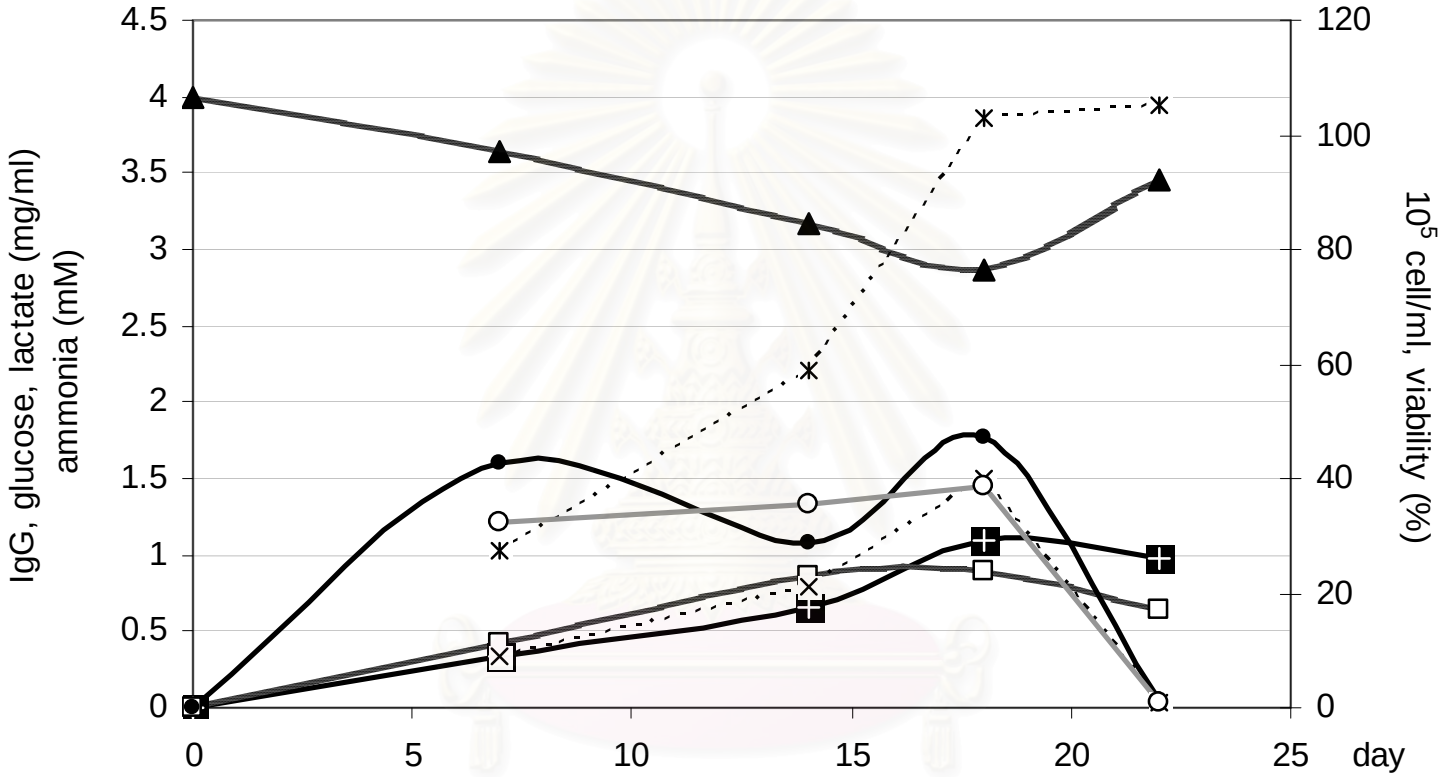
วันที่เก็บ	7	14	18	22
ปริมาตรที่เก็บ (ml)	5	10	20	20

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 ซึ่งพบว่าเซลล์มีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณสูงสุด 1.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีสูงสุดประมาณ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 18

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคงที่ประมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 18 และในวันที่ 22 มีปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารมากขึ้นเนื่องจาก เซลล์มีชีวิตมีจำนวนลดลงจนเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณแลกเทต ค่อยๆ เพิ่มขึ้นและคงที่ประมาณ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14 ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ประมาณ 1.6 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่น่าจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าค่อนข้างคงที่ประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีการให้อากาศผ่านทางผนังของสายยางซิลิโคนที่มีความยาว 3 เมตรนี้จึงไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอนติบอดี สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป หลังจากเลี้ยงเซลล์จนถึงวันที่ 22 จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่เซลล์ตายอาจเป็นเพราะระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยว และการเติมอาหารใหม่ไม่เหมาะสม หรืออาจเป็นเพราะขาดออกซิเจนเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้น ทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนไม่ทั่วถึงจึงตายไป ในการทดลองครั้งต่อไปจึงเว้นระยะเวลาในการเก็บ และการเติมอาหารใหม่ให้นานขึ้นเป็นทุกๆ 7 วัน เพื่อให้เซลล์มีเวลาในการเพิ่มปริมาณมากขึ้น ดังข้อ 4.2.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 1

(IgG , glucose , lactate , ammonia , viable cell , total cell , viability)

4.2.3 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 2

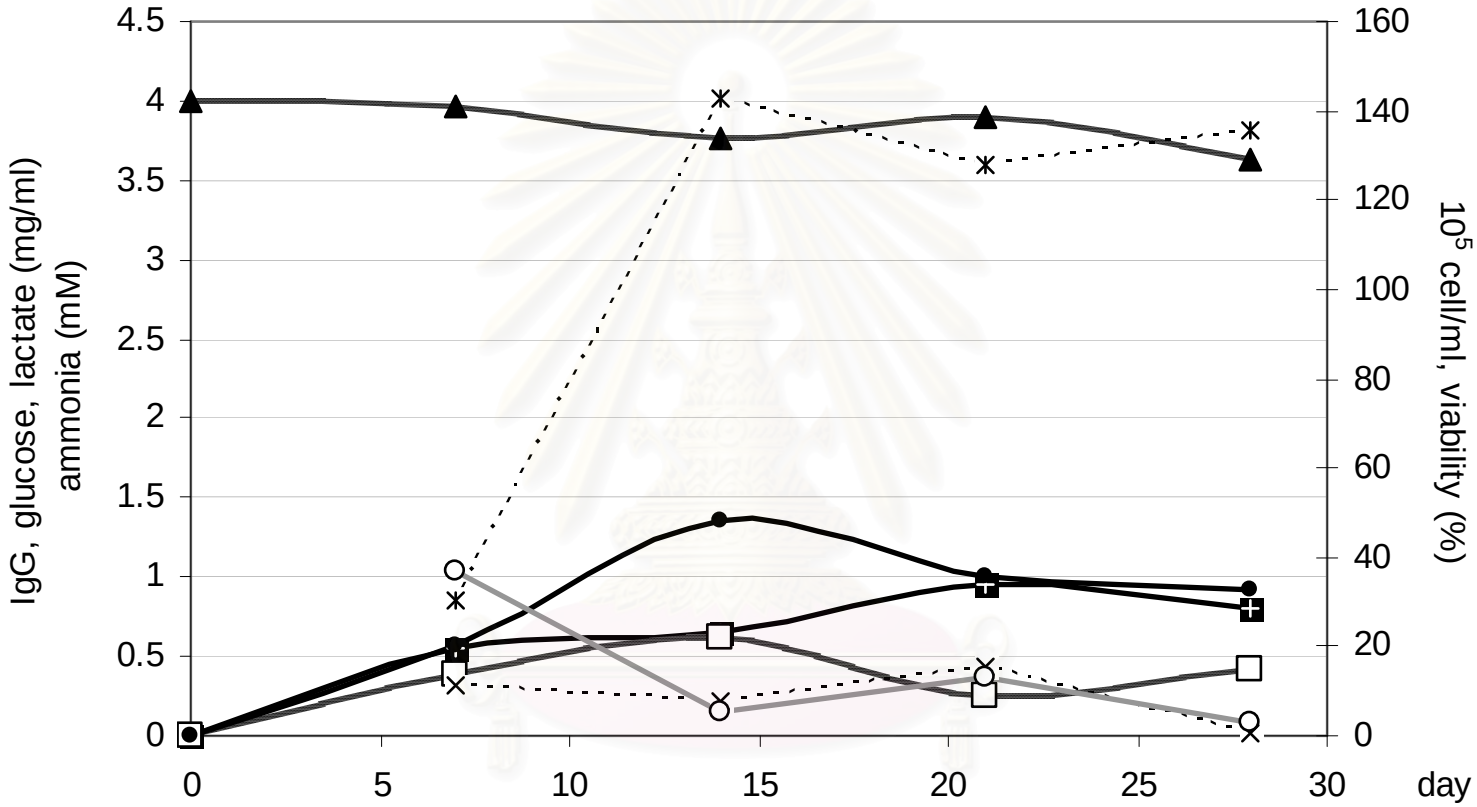
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS โดยมีระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป ดังนี้

วันที่เก็บ	7	14	21	28
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	10

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 ซึ่งพบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 14 ปริมาณเซลล์คงที่ประมาณ 1.3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนคงที่ประมาณ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 21

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคงที่ประมาณ 3.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณแลกเทตเกิดขึ้นเล็กน้อย มีค่าสูงสุดเพียง 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 จนมีค่าสูงสุด 1.35 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่น่าจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ หรือการผลิตแอนติบอดีได้ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุด 36.8 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมาก จนเหลือเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 28 สาเหตุที่เซลล์ตายอาจเป็นเพราะการเว้นระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวและเติมอาหารใหม่ทุกๆ 7 วันนั้นนานเกินไปทำให้ ปริมาณสารอาหารต่างๆ อย่างเช่น growth factors ที่อยู่ในซีรัมลดลง ไม่เพียงพอต่อเซลล์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีกลูโคสเหลืออยู่มากพอ หรือเกิดการสะสมสารต่างๆ มากขึ้นจึงเกิดการอุดตันบริเวณเมมเบรนมาก ทำให้การผ่านเข้าออกของสารอาหารและแก๊สต่าง ๆ ลดลง หรืออาจเป็นเพราะขาดออกซิเจนเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่นมาก



รูปที่ 4.4 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 2

(---■--- IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , --×-- viable cell , ---✳--- total cell , —○— viability

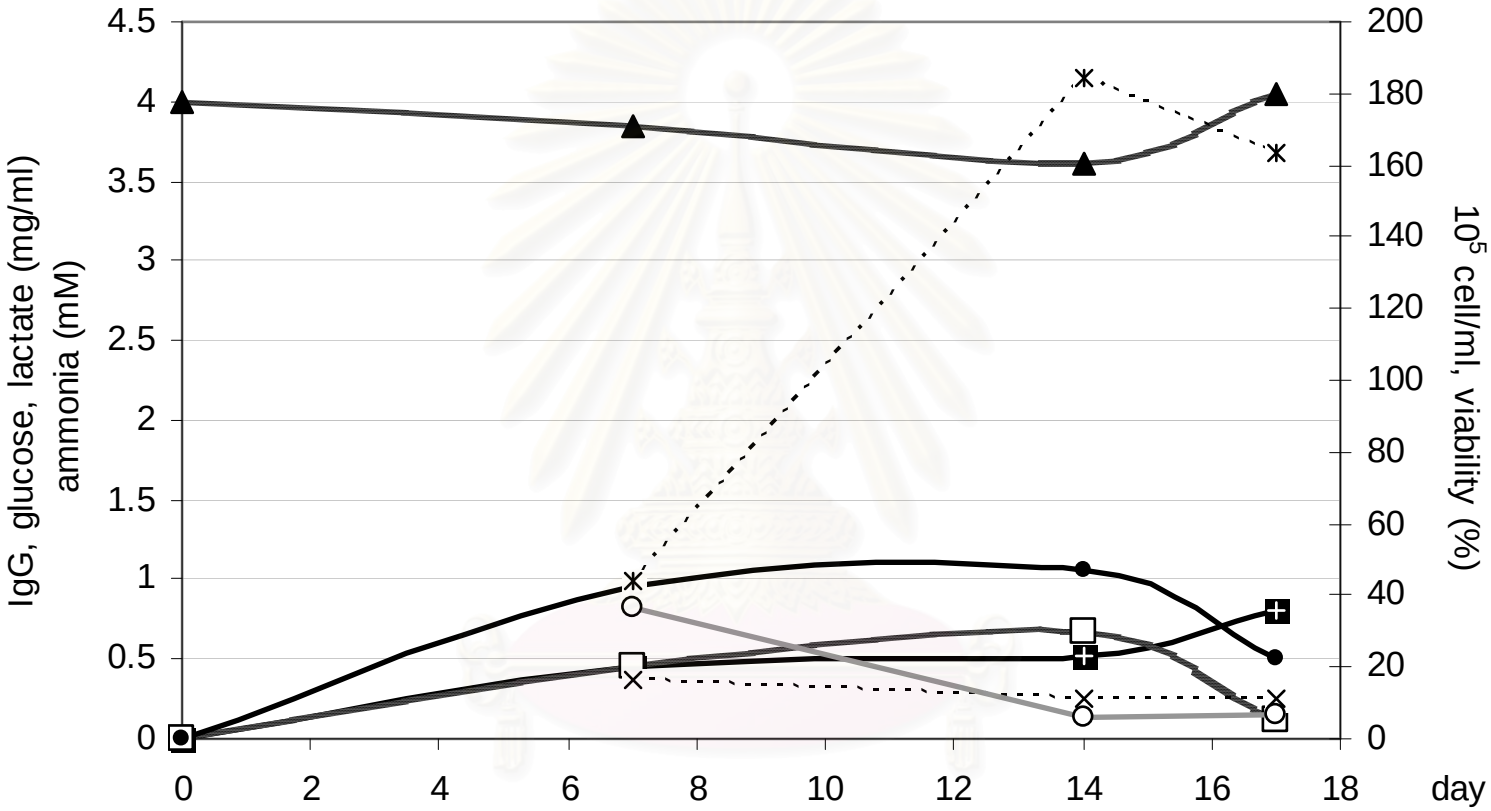
ขึ้น ทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนไม่ทั่วถึงจึงตายไป ในการทดลองครั้งต่อไปในข้อ 4.2.4 จึงเพิ่มความถี่ในการเก็บให้เร็วขึ้น พร้อมทั้งลดปริมาตรในการเก็บให้น้อยลง

4.2.4 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 3

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS โดยมีระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป ดังนี้

วันที่เก็บ	7	14	17
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	5	5	15

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5 ซึ่งพบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 14 มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1.8×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีค่อยๆ เพิ่มขึ้นสูงสุด 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 17 จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสยังคงมีค่าสูงมากตลอดการทดลอง ในวันที่ 17 มีปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเซลล์ไม่มีการใช้กลูโคสเลย ส่วนปริมาณแลกเทต ปริมาณแลกเทตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดการทดลอง มีค่าสูงสุดเพียง 0.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 14 ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 จนมีค่าสูงสุด 1.0 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่มีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991) จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงน้อยมากจาก 4 เหลือ 3.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณแลกเทตมีความเข้มข้นสูงสุด 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณที่น้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992)



รูปที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 3

(IgG , glucose , lactate , ammonia , viable cell , total cell , viability)

ปริมาณแอมโมเนียมีค่าสูงสุด 1 มิลลิโมลาร์ ยังมีปริมาณน้อยจึงไม่มีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ และการผลิตแอนติบอดี (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุด 36.7 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 หลังจากนั้น มีค่าต่ำลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 6 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการทดลอง จึงหยุดการเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 17 สาเหตุที่เซลล์ตายจำนวนมาก อาจเป็นเพราะการเว้นระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวนานเกินไป และปริมาตรที่เก็บเพียงครั้งละ 5 มิลลิลิตร กับปริมาตรอาหารที่เติมลงไปใหม่นั้นน้อยเกินไปทำให้ปริมาณซีรัมที่เหลืออยู่ไม่เพียงพอต่อเซลล์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีกลูโคสเหลืออยู่มากพอ ในการทดลองครั้งต่อ ไปในข้อ 4.2.5 จึงเพิ่มความถี่ในการเก็บให้เร็วขึ้น และเพิ่มปริมาตรในการเก็บเป็นครั้งละ 10 มิลลิลิตร

4.2.5 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS โดยมีระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป ดังนี้

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	10	10	10

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6 ซึ่งพบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 10 มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1.1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าการผลิตแอนติบอดีสูงในระยะ stationary phase และมีค่าคงที่ประมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อ

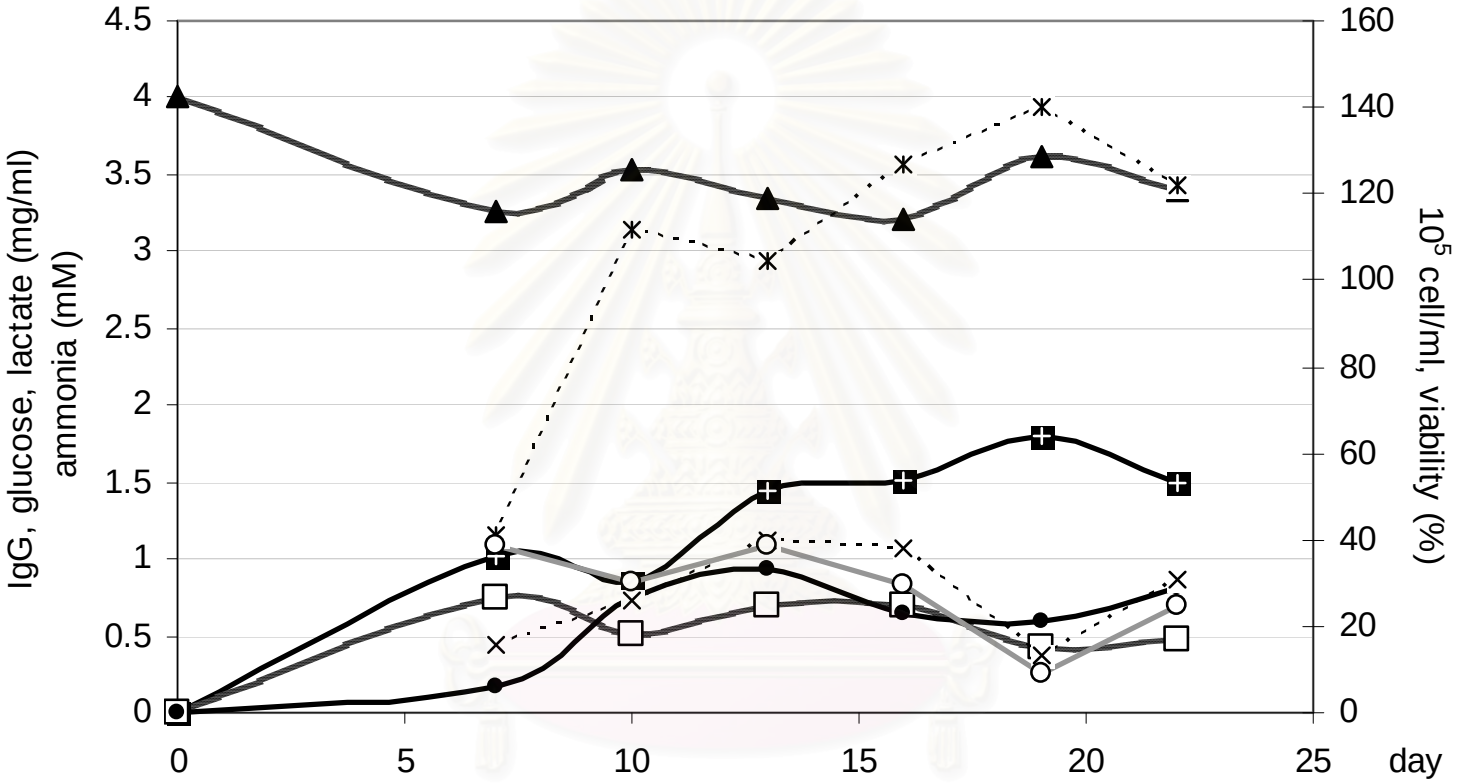
มิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอยู่ในช่วง 3.2-3.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณแลกเทตมีค่าค่อนข้างคงที่ประมาณ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่าสูงสุด 0.9 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 13 หลัง จากนั้นมีค่าต่ำลงเล็กน้อย ที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่มีผลในการไปยับยั้งการเจริญของเซลล์และการผลิตแอนติบอดี (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าคงที่ 30-38 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 16 วันแรก หลังจากนั้น มีค่าต่ำลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 9 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 19 เนื่องจากสายยางซิลิโคนพับ ทำให้การแลกเปลี่ยนอาหารขัดข้องเซลล์จึงตายไปบางส่วน และในวันที่ 22 เกิดการปนเปื้อน จากการทดลองพบว่าวิธีการเก็บแบบที่ 4 นี้ ทำให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตสูง และได้ปริมาณแอนติบอดีมากกว่าวิธีการเก็บแบบที่ 1-3 จึงทำการทดลองซ้ำในข้อ 4.2.6 โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4 คือ เก็บแอนติบอดีครั้งแรกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงและเก็บครั้งต่อไปทุกๆ 3 วัน โดยเก็บครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง

4.2.6 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4 (ครั้งที่ 2)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS ซึ่งเก็บอาหารครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ ดังนี้

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	10	10	10



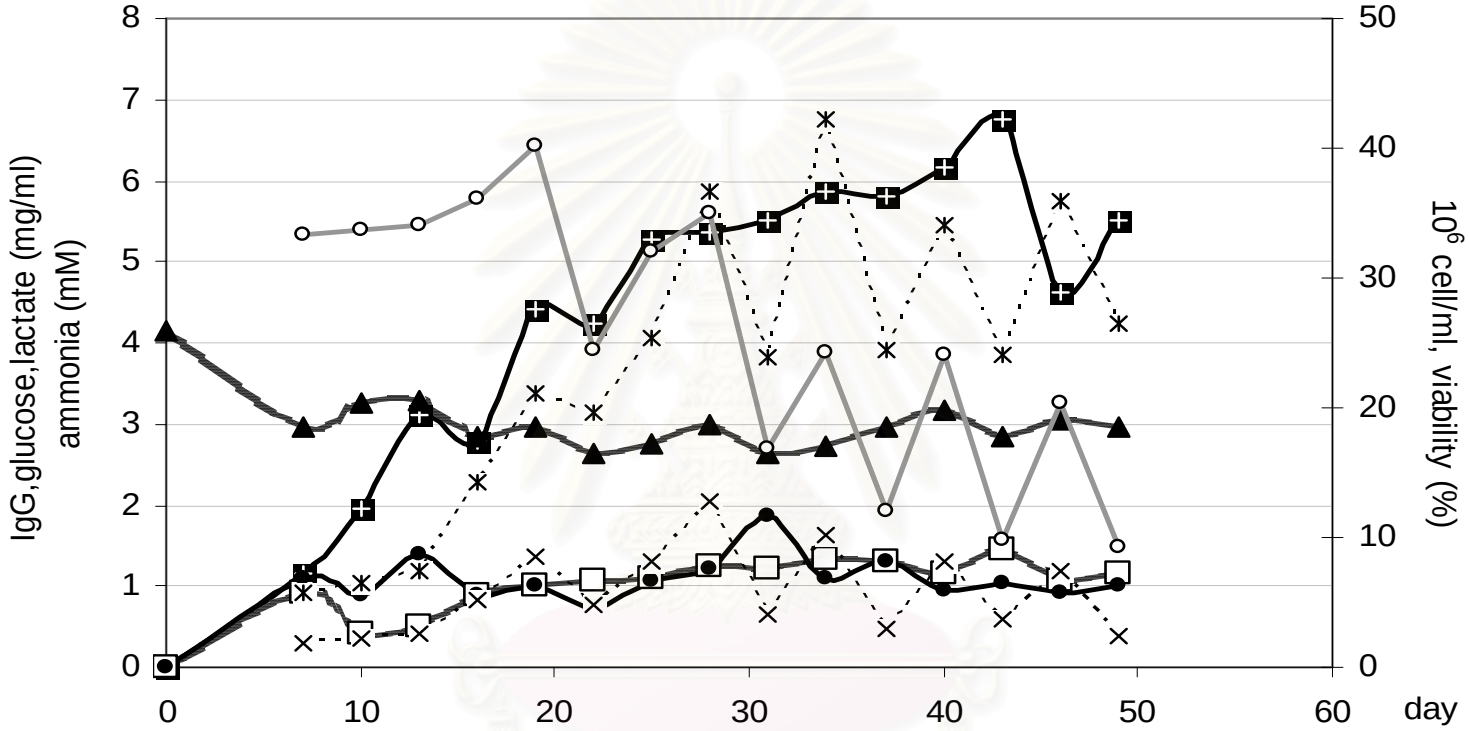
รูปที่ 4.6 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4

(IgG , glucose , lactate , ammonia , viable cell , total cell , viability)

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.7 ซึ่งพบว่าเซลล์เจริญอยู่ในระยะ lag phase เป็นเวลา 13 วัน หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ log phase เมื่อถึงระยะ stationary phase ในวันที่ 25 มีจำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 2.3-4.2 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะ log phase และการผลิตคงที่ในระยะ stationary phase ได้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5.3-6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอยู่ในช่วง 2.6-3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 16 ส่วนปริมาณแลกเทต ค่อยๆ เพิ่มขึ้นและคงที่ประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และค่อนข้างคงที่ประมาณ 1.2 มิลลิโมลาร์ ที่ระดับความเข้มข้นนี้อาจจะมีไม่ผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิต พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตคงที่ที่ประมาณ 34 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 16 วันแรก หลังจากนั้นค่อยๆลดลง วันสุดท้ายเหลือค่าต่ำสุดประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ การที่เซลล์มีชีวิตมีปริมาณลดลงอาจเนื่องมาจาก เมื่อปริมาณเซลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นทำให้มีโปรตีนและของเสียต่างๆ ไปอุดตันบริเวณเมมเบรนทำให้ไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนอาหารและอากาศ รวมทั้งปริมาณเซลล์ที่หนาแน่นทับถมกันอยู่ทำให้ได้รับแก๊สออกซิเจนไม่ทั่วถึง เซลล์จึงตายมากขึ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 49 วัน ด้วยวิธีการนี้สามารถเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่ามีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีการรายงานผลไว้ก่อนหน้านี้คือ (ได้แอนติบอดีอยู่ในช่วง 0.71-11.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Jackson, 1995) และปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดเท่ากับ 690.5 มิลลิกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 14 มิลลิกรัมต่อวัน



รูปที่ 4.7 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4 คือเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 (ครั้งที่ 2)

(—■— IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , --×-- viable cell , ---✳--- total cell , —○— viability)

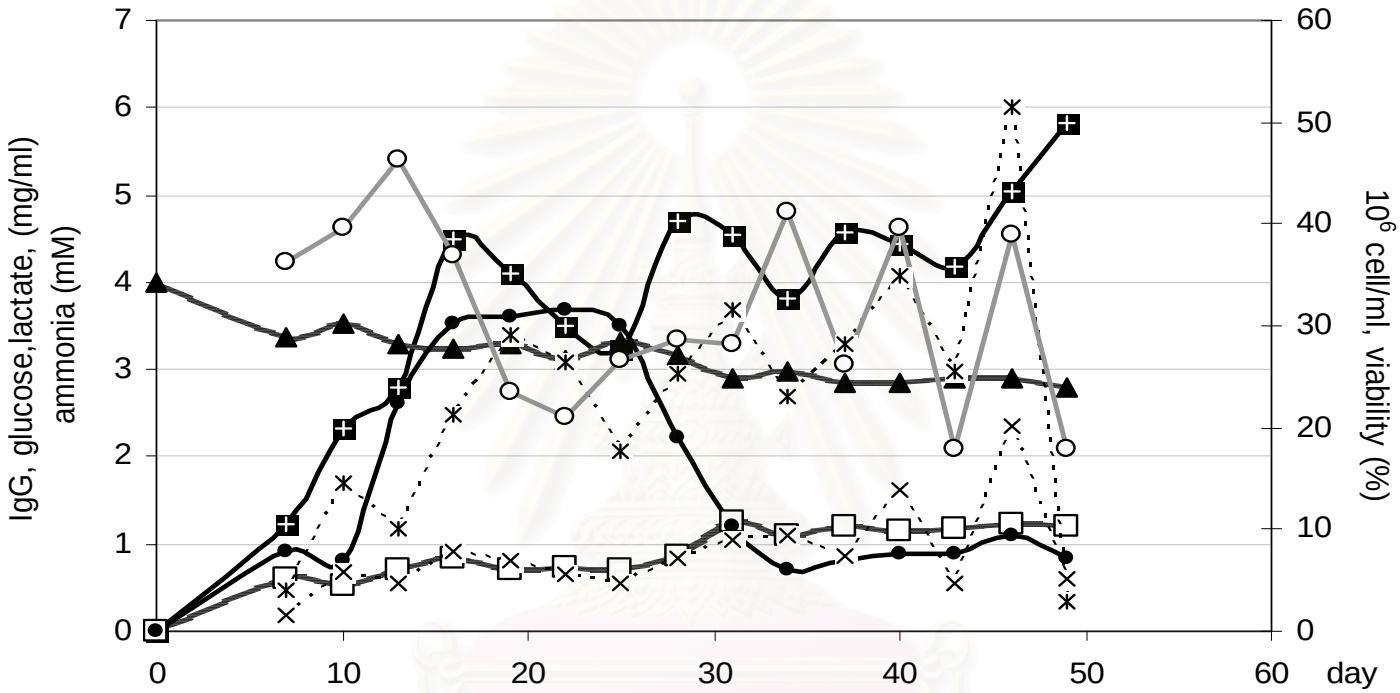
4.2.7 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะ log phase จึงเป็นการนำเซลล์ตายออกมาและลดจำนวนเซลล์เป็นที่หนาแน่นมากเกินไป ซึ่งเซลล์เหล่านี้อาจทับถมกันทำให้มีการแลกเปลี่ยนแก๊สและอาหารต่างๆ ได้ไม่ดี หลังจากนั้นนำอาหารที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ ดังนี้

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	20	20	20

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 ซึ่งพบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 19 มีจำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 1.7-5.1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะ log phase จนถึงวันที่ 16 หลังจากเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้แอนติบอดีค่อนข้างคงที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4.5-5.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงจาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคงที่อยู่ในช่วง 3.1-3.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรใน 31 วันแรก หลังจากนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ประมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตลอดการทดลอง ส่วนปริมาณแลกเทตค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นคงที่ประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงในช่วงวันที่ 13 ถึงวันที่ 28 มีค่าสูงสุดถึง 3.6 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นค่อยๆลดลงมีค่าคงที่ที่ประมาณ 0.9 มิลลิโมลาร์

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิต พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นใน 13 วันแรกสูงถึง 46 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 13 ถึงวันที่ 22 ให้ค่าต่ำสุด 21



รูปที่ 4.8 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS โดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 คือเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7

(IgG , glucose , lactate , ammonia , viable cell , total cell , viability)

เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเซลล์มีชีวิตมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้อีก การที่เซลล์มีชีวิตมีปริมาณลดลงนั้นตรงกับช่วงที่แอมโมเนียมีปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งแอมโมเนียที่มีค่ามากกว่า 2.5 มิลลิโมลาร์จะมีผลไปยั้งยั้งการเจริญของเซลล์ได้ (Chen และคณะ, 1992)

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 49 วัน สามารถเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีได้ปริมาตร 270 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่ามีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 4.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดเท่ากับ 1113.5 มิลลิกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 22.7 มิลลิกรัมต่อวัน (37 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีการรายงานอัตราการผลิตแอนติบอดี พบว่าให้อัตราการผลิตสูงพอๆ กันคือได้ปริมาณแอนติบอดีเกิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาหาร (Shi และคณะ,1999)

4.2.8 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และลดความเข้มข้นของซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และลดปริมาณซีรัมที่เติมลงในอาหารในส่วนของ ECS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ ดังนี้

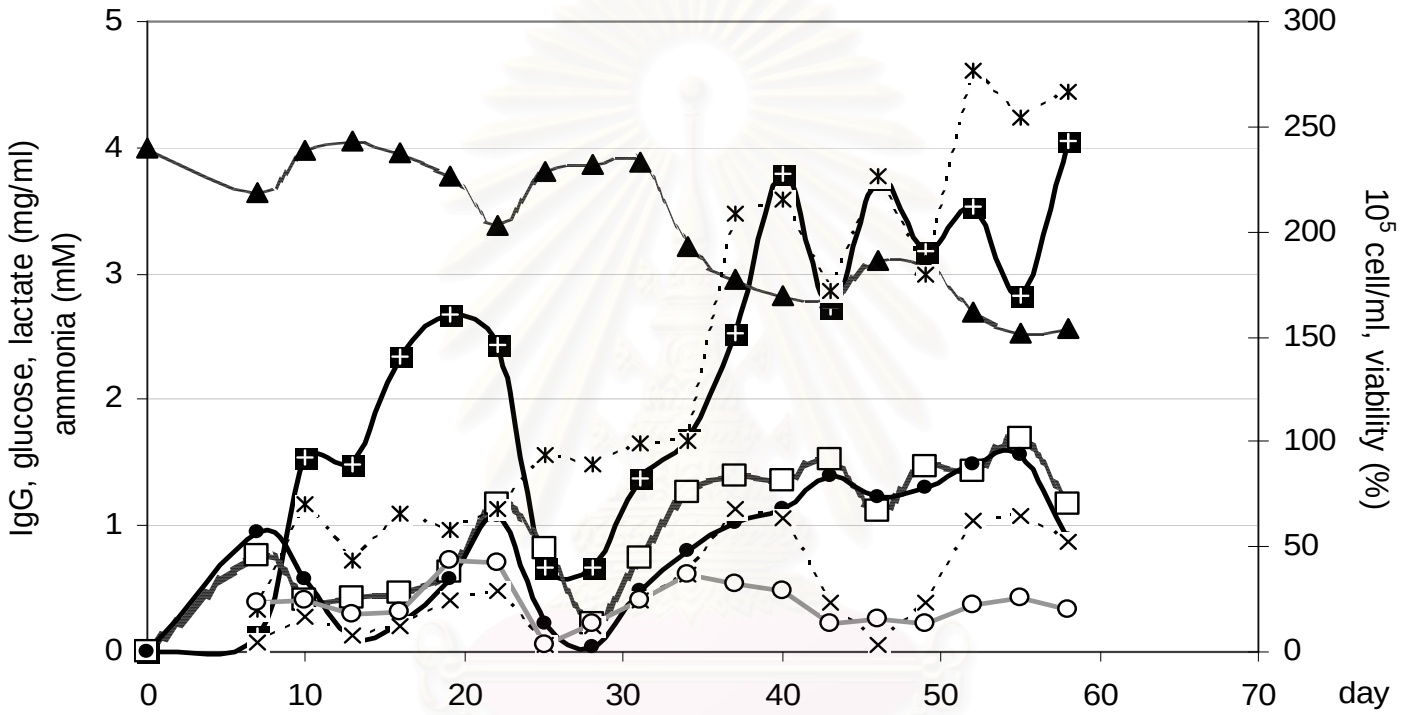
วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	20	20	20

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9 ซึ่งพบว่าเซลล์อยู่ในระยะ lag phase เป็นเวลา 19 วัน และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 37 มีปริมาณอยู่ในช่วง 1.7-2.7 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงถึง 2.6 มิลลิกกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 19 และลดลงเหลือ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 25 หลังจากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆอยู่ในช่วงประมาณ 2.5-3.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 37 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 12 และวันที่ 23 ปั๊มหยุดทำงาน ทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดจำนวนลง เหลือ

เพียง 3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่า ปริมาณกลูโคสลดลงเล็กน้อยจาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหลืออยู่ในช่วง 3.6-3.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรใน 31 วันแรก หลังจากนั้นปริมาณกลูโคสลดลงเหลือ 2.5-3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณแลกเทตค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 31 วันแรกเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นคงที่ที่ประมาณ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งยังมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียในวันที่ 13 และวันที่ 28 มีค่าลดต่ำลง เหลือเพียง 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นมีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ จนสูงสุดถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่ระดับความเข้มข้นนี้ยังไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 58 วัน สามารถเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีได้ปริมาตร 330 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่ามีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 2.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดเท่ากับ 796.29 มิลลิกรัม และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 17.7 มิลลิกรัมต่อวันเนื่องจากปั๊มเสียจึงทำการทดลองซ้ำอีกครั้งในข้อ 4.2.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และลดปริมาณซีรัมที่เติมลงในอาหารในส่วนของ ECS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 คือเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7

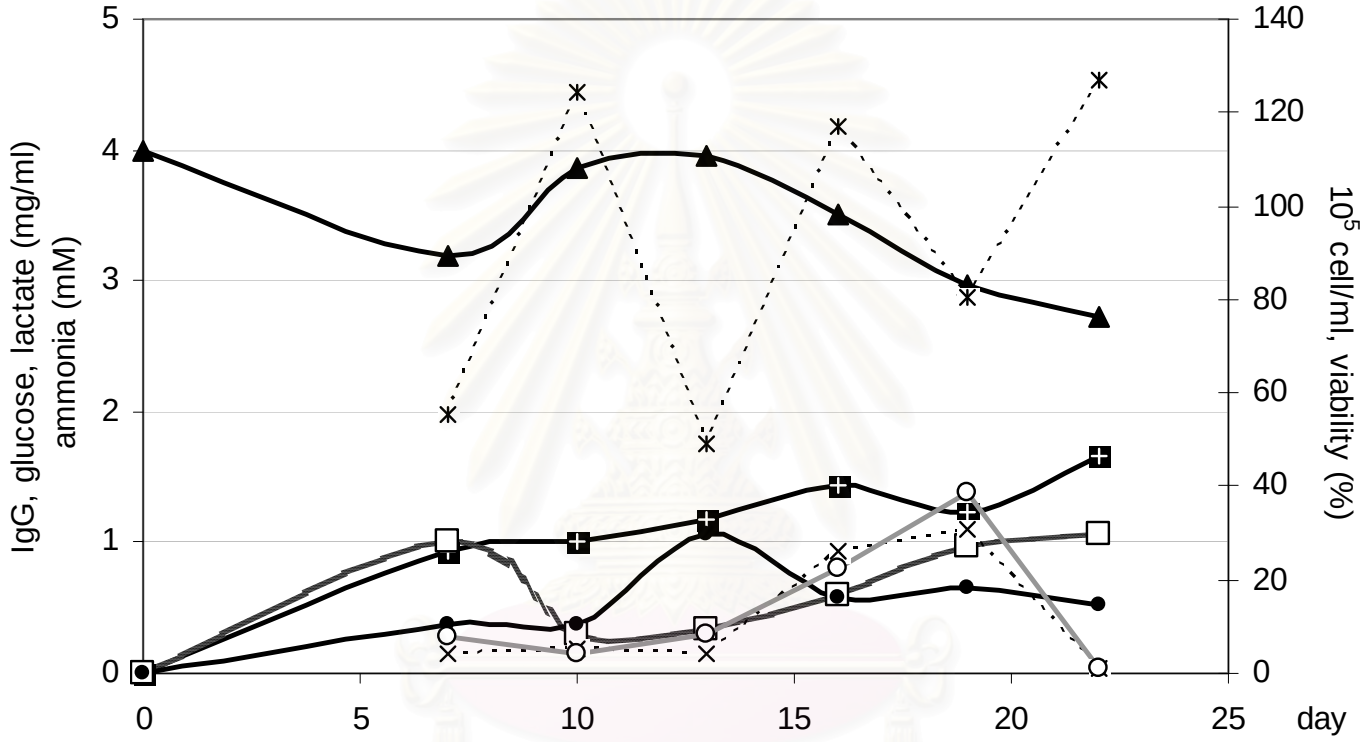
(—■— IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , --×-- viable cell , ---✳--- total cell , —○— viability)

4.2.9 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และลดความเข้มข้นของซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ครั้งที่ 2)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทำการทดลองเหมือนข้อ 4.2.8 คือ ต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และเติมซีรัมลงในอาหารในส่วนของ ECS ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ ดังนี้

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	20	20	20

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.10 ซึ่งพบว่าเซลล์อยู่ในระยะ lag phase 12 วัน เมื่อเข้าสู่ระยะ log phase เซลล์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 1.2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์มีชีวิตมีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ เช่นกัน หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 22 วัน ปั๊มหยุดทำงานทำให้เซลล์ตายหมด เมื่อตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่าปริมาณแอนติบอดีค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุด 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสค่อยๆ ลดลงเหลือต่ำสุด 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 22 ส่วนปริมาณแลกเทตมีค่าสูงสุด 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 22 เช่นกัน ซึ่งมีปริมาณน้อยจึงไม่น่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ปริมาณแอมโมเนียสูงสุด 1 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 13 ที่ระดับความเข้มข้นนี้ไม่มีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ และการผลิตแอนติบอดี (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 22 วัน สามารถเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่ามีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดเท่ากับ 117.8 มิลลิกรัม มีอัตราการผลิตเท่ากับ 5.35 มิลลิกรัมต่อวัน



รูปที่ 4.10 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส และลดปริมาณซีรัมที่เติมลงในอาหารในส่วนของ ECS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 คือเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 (ครั้งที่ 2)

(—■— IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , --×-- viable cell , ---∗--- total cell , —○— viability)

4.2.10 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทำการทดลองเหมือนข้อ 4.2.7 คือ ต่อระบบดังรูปที่ 3.2 แต่ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ ดังนี้

วันที่เก็บ	7	10	13	16	19	22
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10	20	20	20

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.11 ซึ่งพบว่าปริมาณเซลล์ค่อนข้างน้อย และเจริญไม่คงที่ อยู่ในช่วง 1.6×10^5 – 6.1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่า ปริมาณแอนติบอดีน้อยมากประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดต่ำลงใน 7 วันแรก หลังจากนั้น ปริมาณกลูโคสยังคงเหลืออยู่มากจากเดิม 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหลือประมาณ 3.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตลอดการทดลอง ส่วนปริมาณแลกเทตที่เกิดขึ้นน้อย มีค่าสูงสุดประมาณ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ส่วนปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นน้อยมาก มีค่าสูงสุด 0.8 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 28 จึงไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เช่นกัน (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิต พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตมีปริมาณมากมากสลับกับน้อย เนื่องจากเซลล์เจริญได้ดีเพียงด้านเดียว การที่เซลล์มีปริมาณน้อยมากและเจริญอยู่ในด้านที่อาหารไหลออกจากคอลัมน์เพียงด้านเดียว อาจเนื่องมาจากเมมเบรนชนิดพอลิซัลโฟนมีความสามารถแลกเปลี่ยนสารอาหารต่างๆ และแก๊สได้ไม่ดี จึงทำให้เซลล์ไม่เจริญและตายไป

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 วัน สามารถเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีได้ปริมาตร 130 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่า

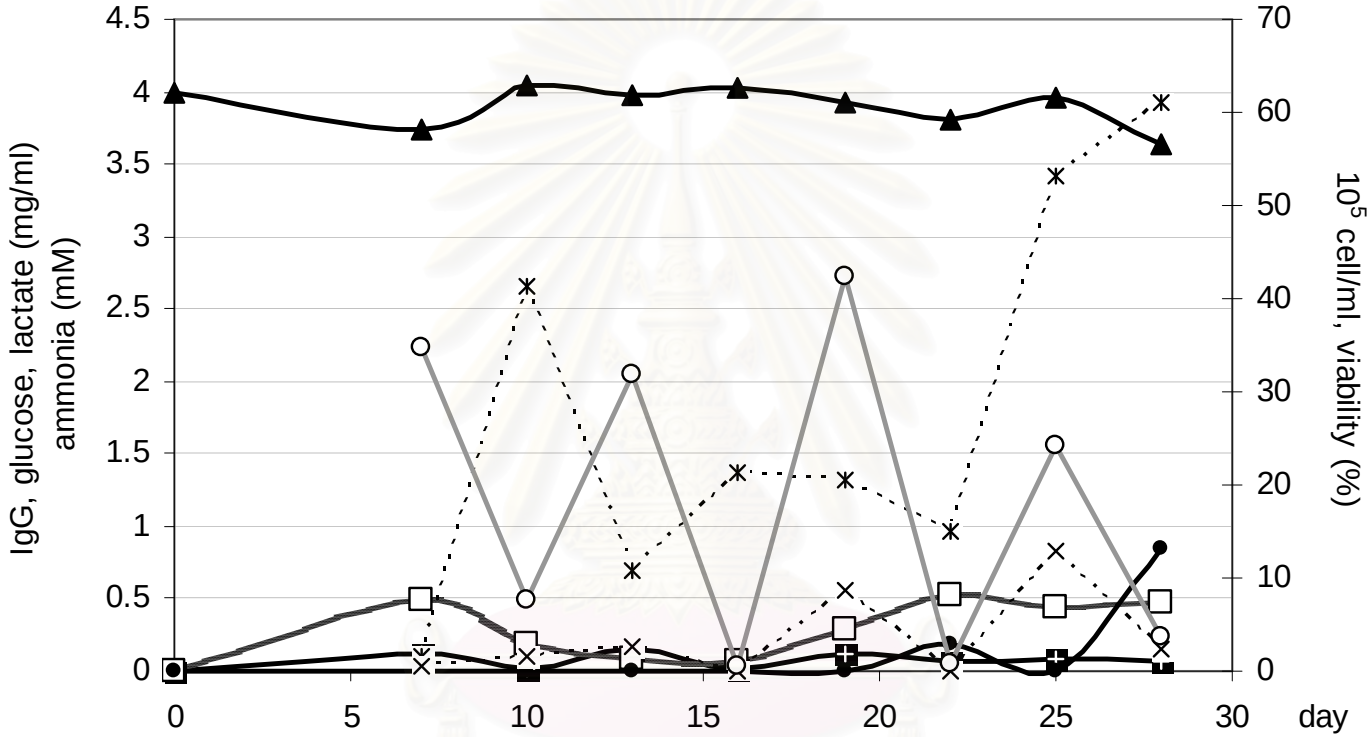
แอนติบอดีมีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดเพียง 9.75 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีการใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟนพบว่าได้ปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นกัน (Altshuler, 1985)

4.2.11 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 และใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟนโดยวางคอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้น

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทำการทดลองเหมือนข้อ 4.2.10 คือ ต่อระบบดังรูปที่ 3.2 โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน แต่วางคอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้น และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งมีเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ ทำการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนเข้าสู่อาหารในส่วน ICS เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ แอนติบอดี และสารต่างๆ ดังนี้

วันที่เก็บ	7	10	13
ปริมาตรที่เก็บ (มล.)	10	10	10

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เก็บอาหารจากส่วนของ ECS มาตรวจนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และนำอาหารจากส่วนของ ICS มาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.12 ซึ่งพบว่าเซลล์เจริญอยู่ในด้านที่อาหารไหลเข้าสู่คอลัมน์ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 13 วัน เซลล์ตายหมด เมื่อทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี พบว่ามีเพียง 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส แลกเทต และแอมโมเนีย พบว่าปริมาณกลูโคสลดลงใน 7 วันแรก หลังจากนั้นไม่ค่อยมีการใช้กลูโคส



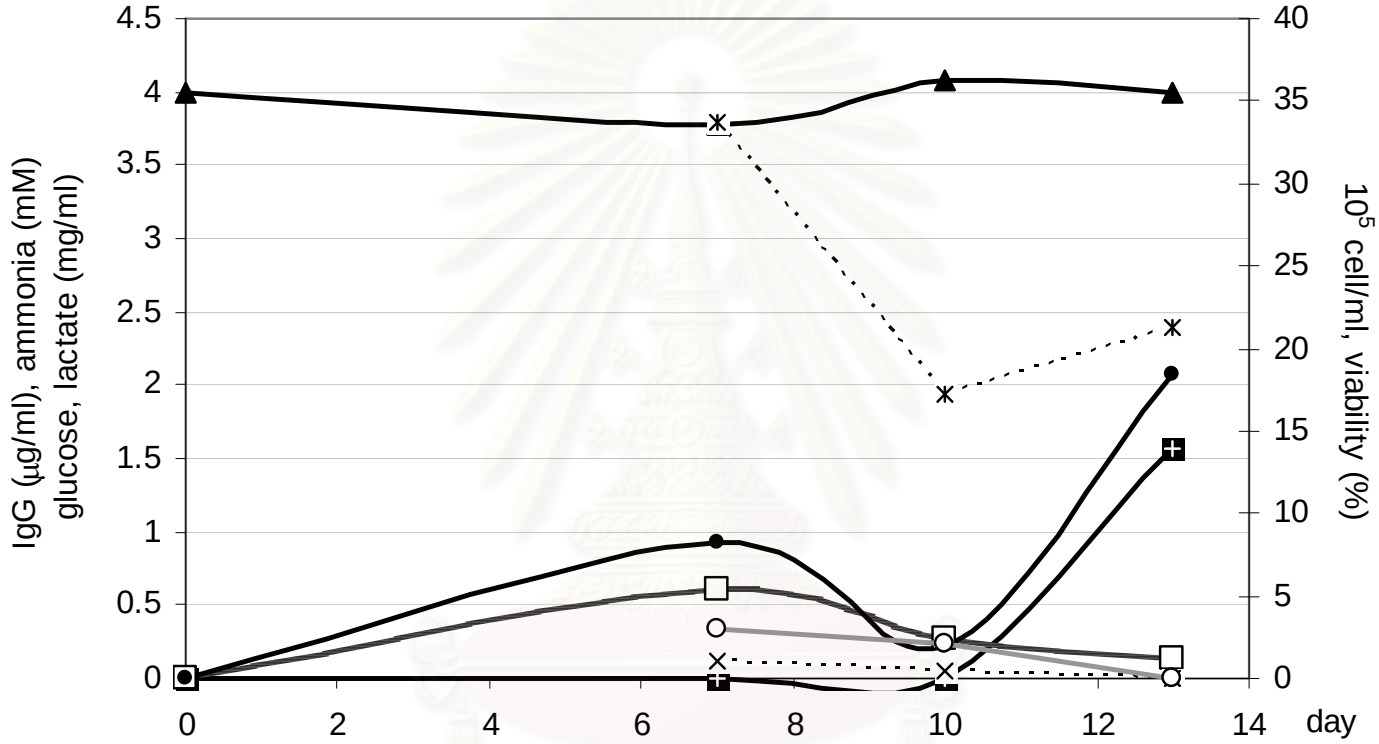
รูปที่ 4.11 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน และมีการเติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 คือเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7

(—■— IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , --×-- viable cell , ---✳--- total cell , —○— viability)

ส่วนปริมาณแลกเทตเกิดขึ้นเพียง 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เฉพาะใน 7 วันแรกเช่นกัน แลกเทตที่เกิดขึ้นจึงไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Chen และคณะ, 1992) ส่วนปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นน้อยมาก ประมาณ 2 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียจึงไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เช่นกัน (Chen และคณะ, 1992; Sadettin และคณะ, 1991)

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิต พบว่ามีปริมาณเซลล์มีชีวิตเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ การที่เซลล์ตาย อาจเนื่องมาจากลักษณะการวางคอลัมน์ในแนวตั้งฉาก ทำให้เซลล์มีการทับถมกันในพื้นที่จำกัด และเมมเบรนชนิดนี้อาจมีการแลกเปลี่ยนสารอาหารและแก๊สต่างๆ ได้ไม่ดี หลังจากการทดลองเสร็จสิ้นสามารถเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติบอดีมีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดเพียง 15.65 ไมโครกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดี ปริมาณเซลล์ และสารต่างๆในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 โดยการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนไปสู่อาหาร ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน และวางคอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้น เติมซีรัมปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในอาหารในส่วนของ ECS ซึ่งใช้ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 คือเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (วันที่ 7-13) และ 20 มิลลิลิตร (หลังวันที่ 16) ทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเริ่มเก็บวันที่ 7

(—■— IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , --×-- viable cell , ---✳--- total cell , —○— viability)

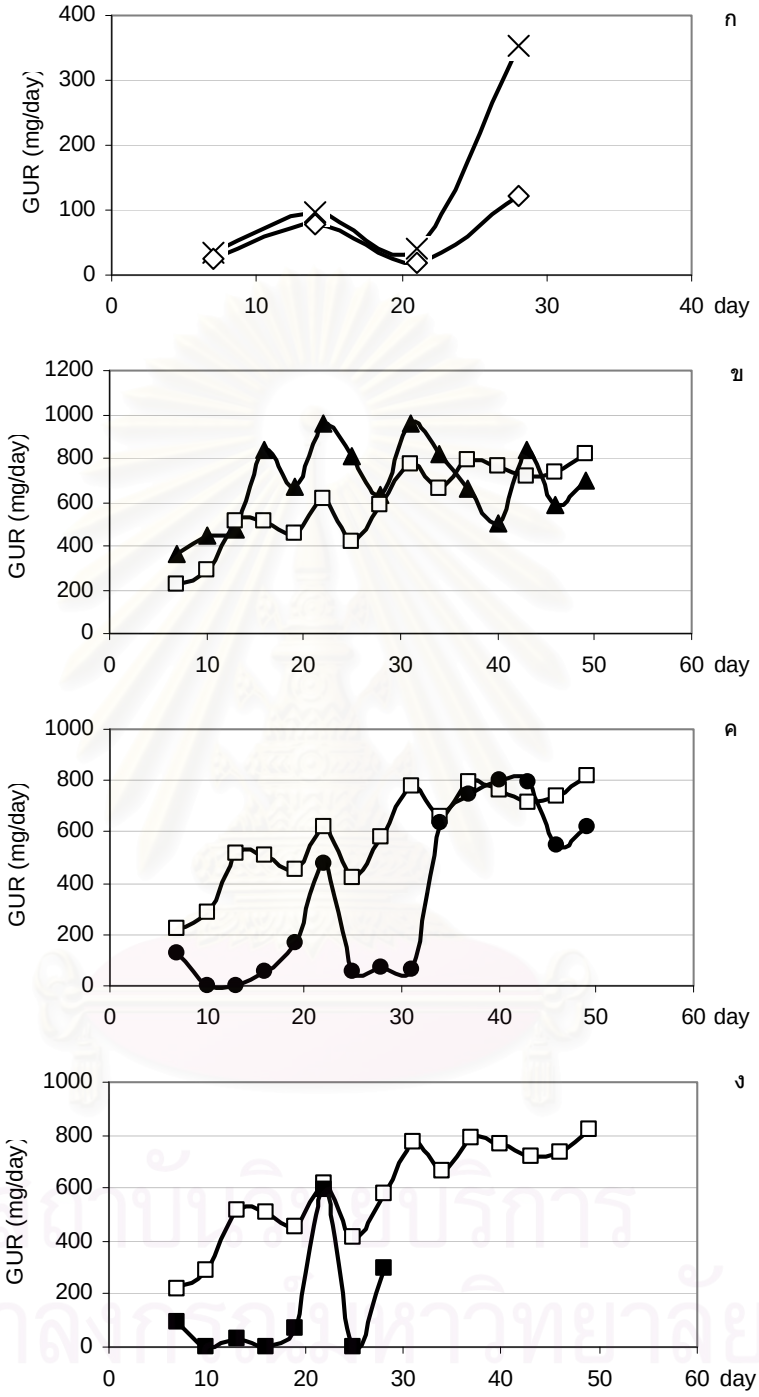
4.3 ผลการเปรียบเทียบเมตาบอลิกแอคติวิตีของการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละวิธี

4.3.1 Glucose Uptake Rate (GUR)

จากรูปที่ 4.13 พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธีให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ ค่า GUR ใกล้เคียงกับวิธีการให้อากาศผ่านทางผนังสายยางซิลิโคน ช่วง 21 วันแรก หลังจากนั้นวิธีใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์เป็นตัวให้อากาศมีค่า GUR สูงกว่า (รูปที่ 4.13 ก) ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงโดยเก็บอาหารจากส่วน ECS ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง ให้ค่า GUR ต่ำในช่วง 13 วันแรก และมีค่ามากขึ้นอยู่ในช่วง 630-960 มิลลิกรัมต่อวัน จนถึงวันที่ 37 ค่า GUR ลดลงเล็กน้อย ส่วนวิธีการเก็บอาหารครั้งละ 20 มิลลิลิตร ค่า GUR ต่ำกว่าในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นจนคงที่ที่ประมาณ 700-800 มิลลิกรัมต่อวัน (รูปที่ 4.13 ข) การลดปริมาณซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่า GUR ต่ำกว่าการใช้ซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.13 ค) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน กับฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส พบว่าการเลี้ยงในเมมเบรนชนิดพอลิซัลโฟน ค่า GUR ต่ำกว่ามาก และต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 0 มิลลิกรัมต่อวัน (รูปที่ 4.13 ง)

4.3.2 Lactate Production Rate (LPR)

จากรูปที่ 4.14 พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธีให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ ค่า LPR เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่วนวิธีการให้อากาศผ่านทางผนังสายยางซิลิโคน ค่า LPR ต่ำกว่า หลังจากวันที่ 21 (รูปที่ 4.14 ก) ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงโดยเก็บอาหารจากส่วน ECS ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง ให้ค่า LPR มากขึ้นเรื่อยๆ จนคงที่ตั้งแต่วันที่ 16 หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย ส่วนวิธีการเก็บอาหารครั้งละ 20 มิลลิลิตร ค่า LPR ต่ำกว่าในช่วงวันที่ 16 ถึงวันที่ 28 หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ประมาณ 800 มิลลิกรัมต่อวัน (รูปที่ 4.14 ข) การลดปริมาณซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ค่า LPR ต่ำกว่าการใช้ซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 31 วันแรกหลังจากนั้นมีค่าสูงกว่า อยู่ในช่วง 900-1000 มิลลิกรัมต่อวัน (รูปที่ 4.14 ค) และการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้เมมเบรนชนิดพอลิซัลโฟน พบว่าค่า LPR ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลสมาก (รูปที่ 4.14 ง)



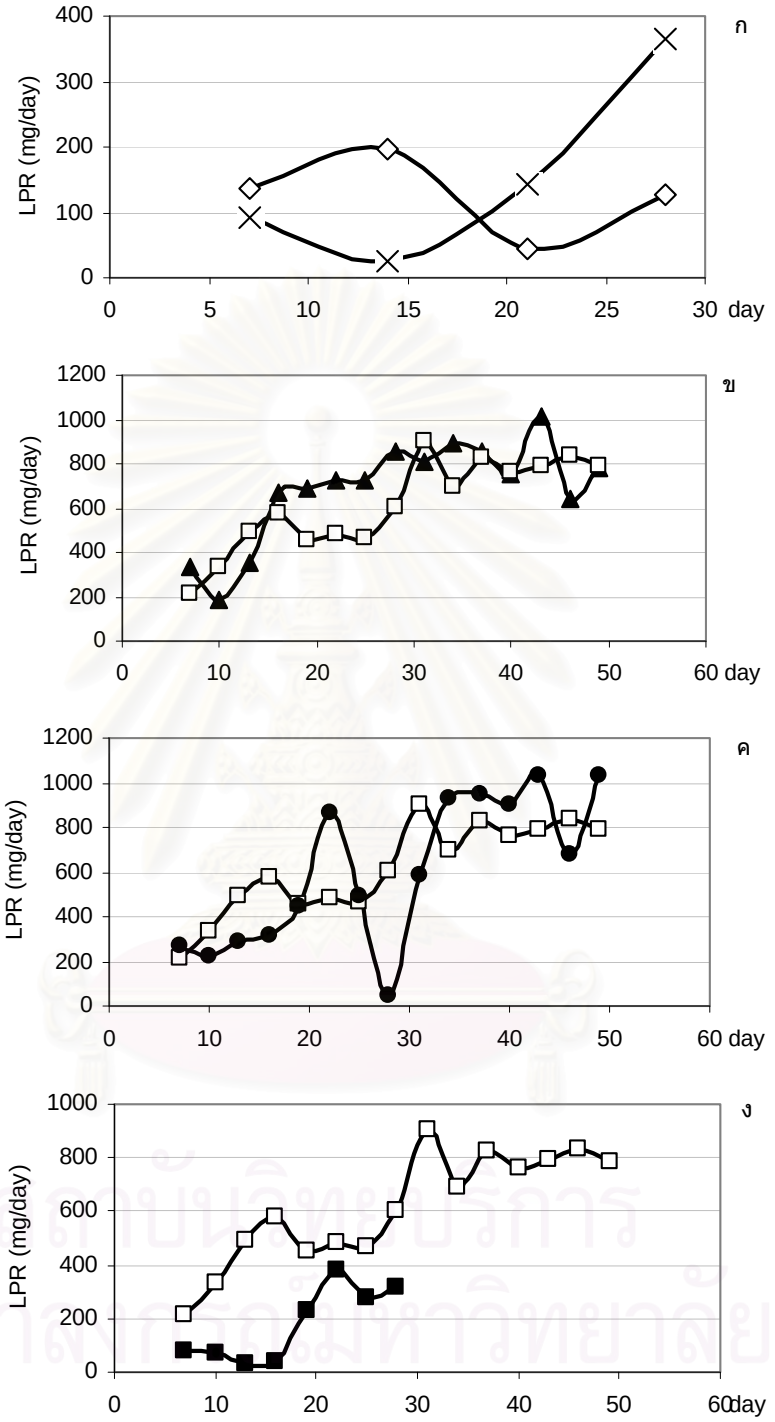
รูปที่ 4.13 กราฟเปรียบเทียบค่า GUR ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์

ก) เปรียบเทียบระหว่างการให้อากาศผ่านฮอลโลว์ไฟเบอร์ (×) กับผนังสายยางซิลิโคน (◇)

ข) เปรียบเทียบระหว่างการเก็บอาหารจาก ECS ครั้งละ 10 มล.(▲) กับ 20 มล.(□) ในวันที่ 16

ค) เปรียบเทียบระหว่างการเติมซีรัมที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (□) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (●)

ง) เปรียบเทียบระหว่างฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส (□) กับพอลิซัลโฟน (■)



<u>รูปที่ 4.14</u> กราฟเปรียบเทียบค่า LPR ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์

ก) เปรียบเทียบระหว่างการให้อากาศผ่านฮอลโลว์ไฟเบอร์ (×) กับผนังสายยางซิลิโคน (◇)

ข) เปรียบเทียบระหว่างการเก็บอาหารจาก ECS ครั้งละ 10 มล.(▲) กับ 20 มล.(□) ในวันที่ 16

ค) เปรียบเทียบระหว่างการเติมซีรัมที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (□) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (●)

ง) เปรียบเทียบระหว่างฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส (□) กับพอลิซัลโฟน (■)

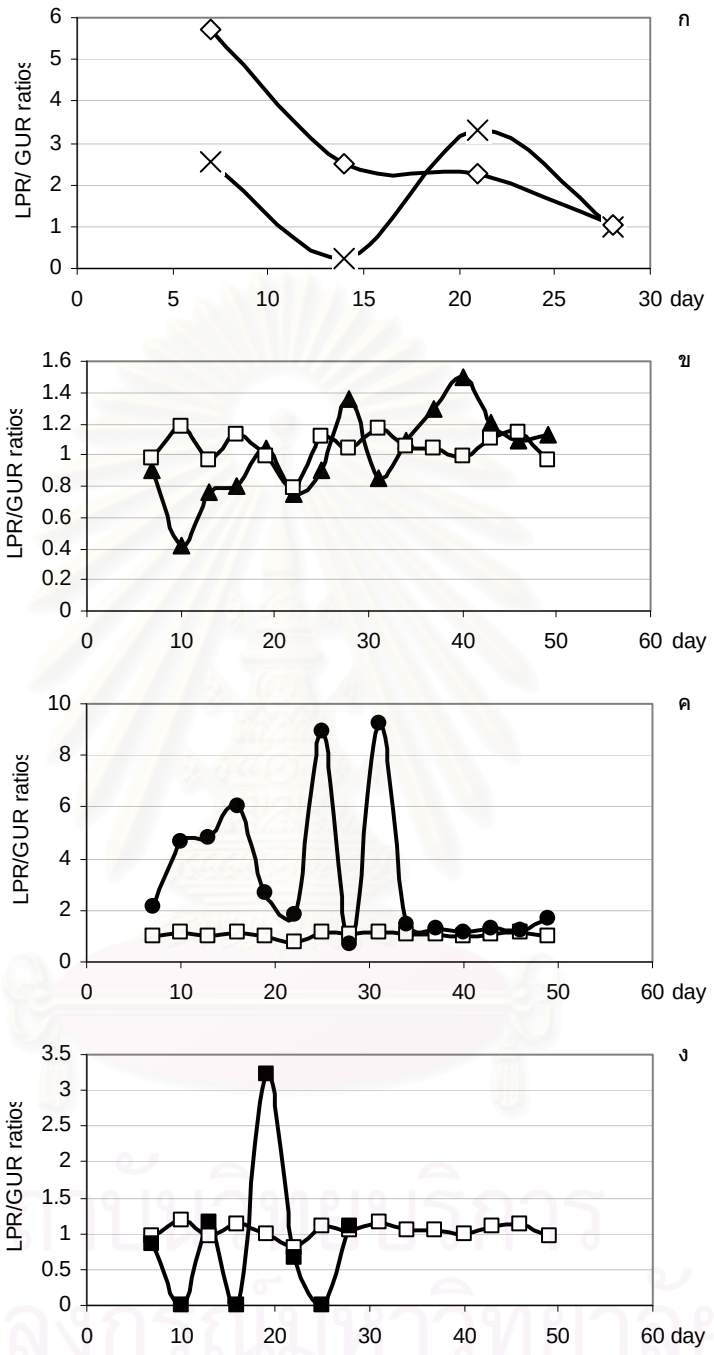
4.3.3 LPR/GUR ratios

จากรูปที่ 4.15 พบว่า ในช่วง 14 วันแรก การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธีให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ ค่า LPR/GUR ratios ต่ำ ส่วนวิธีการให้อากาศผ่านทางผนังสายยางซิลิโคน ค่า LPR/GUR ratios สูง หลังจากนั้นมีค่าเท่ากันเท่ากับ 1.0 ในวันที่ 28 (รูปที่ 4.15ก)

เนื่องจากค่า LPR/GUR ratios เป็นตัวบอกถึง ประสิทธิภาพของการให้อากาศ เมื่อเซลล์ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ เซลล์จะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแลคเทต ทำให้ค่า LPR/GUR ratios สูง ดังนั้นวิธีการให้อากาศผ่านเมมเบรนของฮอลโลว์ไฟเบอร์ ดีกว่าวิธีการให้อากาศผ่านผนังสายยางซิลิโคนเฉพาะในช่วงแรก หลังจากนั้นให้ผลใกล้เคียงกัน ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงโดยเก็บอาหารจากส่วน ECS ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง ใน 16 วันแรก ให้ค่า LPR/GUR ratios ต่ำกว่า วิธีการเพาะเลี้ยงโดยเก็บอาหารครั้งละ 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.15 ข) การลดปริมาณซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ค่า LPR/GUR ratios มีค่าสูงและไม่คงที่ในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นมีค่าต่ำลงจนใกล้เคียงกับการใช้ซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ คงที่ประมาณ 1.3 (รูปที่ 4.15 ค) และการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้เมมเบรนชนิดพอลิซัลโฟน พบว่าค่า LPR/GUR ratios มีค่าไม่คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.15 ง)

4.3.4 Ammonia Production Rate (APR)

จากรูปที่ 4.16 พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธีให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ ค่า APR เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนคงที่ที่ 0.4 มิลลิโมลาร์ต่อวัน ในวันที่ 21 ส่วนวิธีการให้อากาศผ่านทางผนังสายยางซิลิโคน ค่า APR สูงกว่าในช่วงแรก หลังจากนั้นมีค่าต่ำลงเท่ากับ 0.26 ตั้งแต่วันที่ 21 (รูปที่ 4.16 ก) ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงโดยเก็บอาหารจากส่วน ECS ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง ให้ค่า APR ประมาณ 0.4-1.3 มิลลิโมลาร์ต่อวันตลอดการทดลอง ส่วนวิธีการเก็บอาหารครั้งละ 20 มิลลิลิตร ค่า APR สูงประมาณ 2.4 ในช่วง 25 วันแรก หลังจากนั้น ค่า APR ต่ำลงใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.16 ข) การลดปริมาณซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ค่า APR ต่ำกว่าการใช้ซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ มากในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ประมาณ 0.6-0.9 มิลลิโมลาร์ต่อวัน (รูปที่ 4.16 ค) และการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน พบค่า APR ต่ำมาก (รูปที่ 4.16 ง)



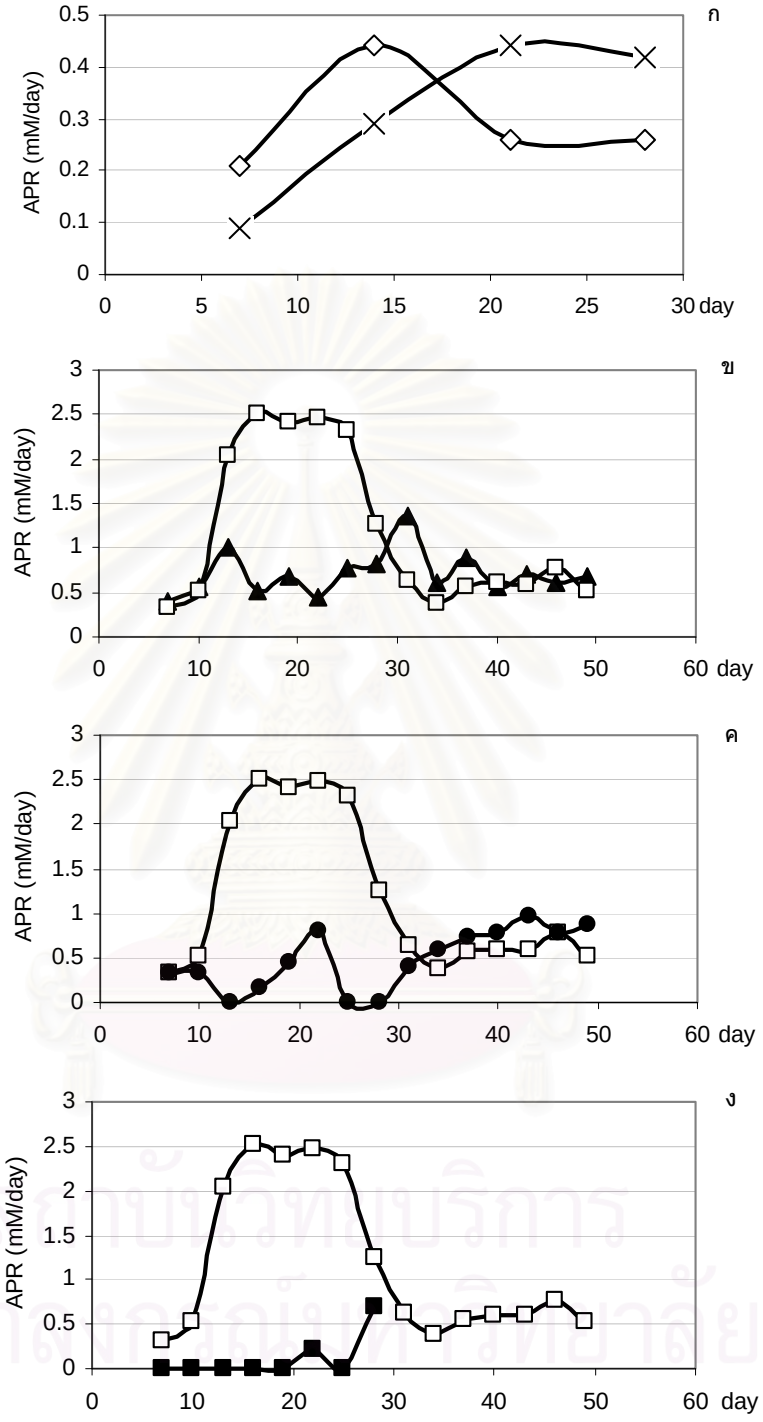
<u>รูปที่ 4.15</u> กราฟเปรียบเทียบ LPR/GUR ratios ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์

ก) เปรียบเทียบระหว่างการให้อากาศผ่านฮอลโลว์ไฟเบอร์ (×) กับผนังสายยางซิลิโคน (◇)

ข) เปรียบเทียบระหว่างการเก็บอาหารจาก ECS ครั้งละ 10 มล.(▲) กับ 20 มล.(□) ในวันที่ 16

ค) เปรียบเทียบระหว่างการเติมซีรัมที่มีความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ (□) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (●)

ง) เปรียบเทียบระหว่างฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส (□) กับพอลิซัลโฟน (■)



<u>รูปที่ 4.16</u> กราฟเปรียบเทียบค่า APR ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์

ก) เปรียบเทียบระหว่างการให้อากาศผ่านฮอลโลว์ไฟเบอร์ (×) กับผนังสายยางซิลิโคน (◇)

ข) เปรียบเทียบระหว่างการเก็บอาหารจาก ECS ครั้งละ 10 มล.(▲) กับ 20 มล.(□) ในวันที่ 16

ค) เปรียบเทียบระหว่างการเติมซีรัมที่มีความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ (□) และ 5 เปอร์เซ็นต์(●)

ง) เปรียบเทียบระหว่างฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส (□) กับพอลิซัลโฟน (■)

ตารางที่ 4.1 สรุปวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในฮอลโลว์ไฟเบอร์กับปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้

วิธีการ	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณซีรัม (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณอาหารทั้งหมด (มล.)	ปริมาณแอนติบอดีทั้งหมด (มก.)	ความเข้มข้นเฉลี่ยของแอนติบอดี (มก./มล.)	อัตราการผลิต (มก./วัน)
1. การให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์	36	10	165	146.9	0.89	4.08
2. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 1	22	10	55	49.7	0.90	2.26
3. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 2	28	10	40	29.6	0.74	1.06
4. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 3	17	10	25	17.0	0.68	1.00
5. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4	22	10	60	81.0	1.35	3.68
6. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 4 (ครั้งที่ 2)	49	10	150	690.5	4.60	14.09
7. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5	49	10	270	1113.5	4.12	22.72
8. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 ลดความเข้มข้นของซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์	58	5	330	796.3	2.41	13.73
9. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 ลดความเข้มข้นของซีรัมเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ครั้งที่ 2)	22	5	90	117.8	1.30	5.35
10. ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน	28	10	130	9.75	0.075	0.35
11.ระยะเวลาและปริมาตรในการเก็บเกี่ยวแบบที่ 5 ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดพอลิซัลโฟน และวางคอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้น	13	10	30	0.016	0.00052	0.001

แบบที่ 1 = เก็บวันที่ 7 (5 มล.), 14 (10 มล.), 18 (20 มล.), 22 (20 มล.)

แบบที่ 2 = เก็บวันที่ 7 (10 มล.), 14 (10 มล.), 21 (10 มล.), 28 (10 มล.)

แบบที่ 3 = เก็บวันที่ 7 (5 มล.), 14 (5 มล.), 17 (15 มล.)

แบบที่ 4 = เก็บวันที่ 7 (10 มล.), 10 (10 มล.), 13 (10 มล.),..., วันสุดท้าย (10 มล.)

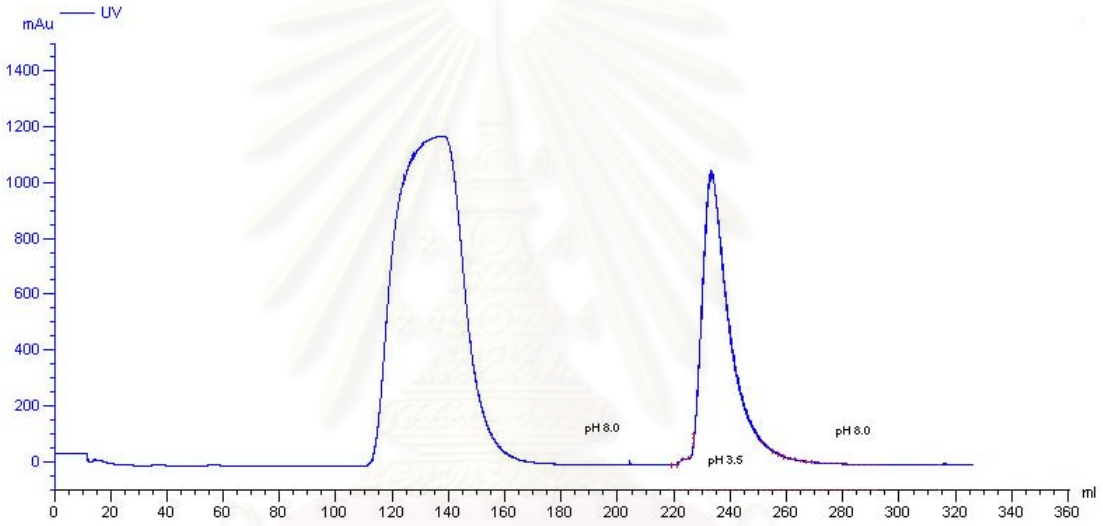
แบบที่ 5 = เก็บวันที่ 7 (10 มล.), 10 (10 มล.), 13 (10 มล.), 16(20 มล.),..., วันสุดท้าย (20 มล.)

วิธีที่ 2-11 ให้อากาศผ่านผนังสายยางซิลิโคน, วิธีที่ 1-9 ใช้ฮอลโลว์ไฟเบอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ ปริมาตร 27.3 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 255.9 มิลลิกรัม และปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 75.2 มิลลิกรัม นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ หลังจากชะแอนติบอดีออกจาก คอลัมน์โปรตีน เอ แล้ว สารละลายแต่ละส่วนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.17

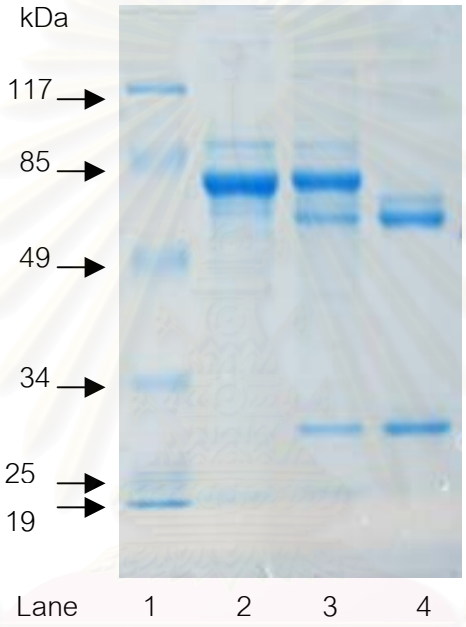


รูปที่ 4.17 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย โปรตีน เอ

เมื่อนำสารละลายในหลอดทดลองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร สามารถหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดได้เท่ากับ 68.2 มิลลิกรัม และปริมาณแอนติบอดีทั้งหมดหลังจากทำให้บริสุทธิ์เท่ากับ 54.9 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 80.5 เปอร์เซ็นต์ และคิดเปอร์เซ็นต์ recovery ของแอนติบอดีได้เท่ากับ 73.1 เปอร์เซ็นต์

4.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

เมื่อนำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีน เอ แล้วนำมาทำ SDS-PAGE ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการทำลายพันธะ disulfide ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วนของ heavy chains และ light chains แยกออกจากกัน และแยกโปรตีนได้ตามขนาดของโมเลกุลดังรูปที่ 4.16



รูปที่4.18 แสดงผล SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

Lane 1 = Standard protein marker (2.5 μl)

Lane 2 = Fetal calf serum (5 μg)

Lane 3 = อาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์ (5 μg)

Lane 4 = แอนติบอดี (IgG_{2b}) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography (5 μg)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 4.16 เมื่อนำแถบโปรตีนมาตรฐาน (Lane 1) มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักโมเลกุล(kDa) กับค่า Relative mobility(Rf) สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของ FCS (Lane 2) ได้เท่ากับ 75.01 kDa ส่วนอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่ (Lane 3) พบ 3 แถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 75.57, 62.69 และ 26.85 kDa ตามลำดับซึ่งน่าจะเป็นส่วนของโปรตีนปนเปื้อนที่มาจาก FCS กับส่วนของ heavy chain และ light chain ของโมเลกุลแอนติบอดี

แอนติบอดี (IgG_{2b}) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography (Lane 4) พบโปรตีน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 62.69 และ 26.85 kDa ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของ heavy chain และ light chain ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) และค่า Relative mobility (Rf) ของแถบโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE

โปรตีน	Molecular weight (kDa)	Relative mobility (Rf)
b-galactosidase	117	0.176
Bovine serum albumin	85	0.313
Ovalbumin	49	0.519
Carbonic anhydrase	34	0.754
b-lactoglobulin	25	0.941
Lysozyme	19	1.000
FCS	75.01	0.366
อาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์	75.57	0.360
	62.69	0.450
	26.85	0.860
แอนติบอดี (IgG_{2b}) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography	62.69	0.450
	26.85	0.860

4.6 การประเมินราคาในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์

ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ในภาวะที่เหมาะสมใน 49 วัน ได้แอนติบอดีทั้งหมด 1113.5 มิลลิกรัม มีความเข้มข้นเฉลี่ย 4.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ความเข้มข้นที่สูงใกล้เคียงกับแอนติบอดีที่ผลิตได้จากช่องท้องหนู แต่ในการผลิตต้องใช้ระยะเวลานานและใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพงหลายอย่างได้แก่ ตู้บ่มที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปั๊ม และ ขวดบรรจุอาหาร (5 ลิตร) เมื่อคิดค่าใช้จ่ายในการผลิตเฉพาะในส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ ซีรัม และอุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ ฮอลโลว์ไฟเบอร์ สายยาง แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ กระบอกฉีดยา เข็มฉีดยา สำลี aluminium foil filter connector และ three-way stopcock คิดเป็นเงินประมาณ 11,978 บาท ถึงแม้ว่าการผลิตแอนติบอดีในหนูจะใช้เวลาน้อยและมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีการปน เปื้อนแอนติบอดีจากหนู นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง โดยต้องทำให้อยู่ภายใต้มาตรฐานการใช้สัตว์ทดลองที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล ซึ่งมีหลักการที่จะไม่ทำให้สัตว์ต้องเจ็บปวดหรือทุกข์ทรมาน ได้แก่ การพิจารณาวิธีอื่นใดที่จะสามารถนำมาทดแทนการใช้ และดูว่าการเลือกใช้สัตว์นั้นเพียงพอหรือเกินไปหรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ใน T-flasks พบว่าเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน 5 วัน ซึ่งจำนวนเซลล์มีชีวิตมีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเซลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดประมาณ 8.5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเซลล์จะตายอย่างรวดเร็ว โดยปริมาณกลูโคสจะลดลงและคงที่ประมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณแลกเตทจะเพิ่มขึ้นและคงที่ประมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการสะสมปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 3.7 มิลลิโมลาร์ โดยเซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้ทุกช่วงระยะเวลาของการเจริญ (และมีปริมาณแอนติบอดีสะสมมากในช่วงปลายระยะ log phase จนถึงระยะ stationary phase) ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงสุดประมาณ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล โดยการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการให้อากาศ พบว่าวิธีการให้อากาศแพร่ผ่านผนังของสายยางซิลิโคนที่มีความยาว 3 เมตร ให้ผลดีใกล้เคียงกับวิธีการให้อากาศไหลสวนทางกับอาหารในฮอลโลว์ไฟเบอร์ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและระยะเวลาการเก็บแอนติบอดี พบว่า วิธีที่ดีที่สุดคือการเก็บแบบที่ 5 ซึ่งเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีพร้อมกับเซลล์บางส่วนออกจาก ECS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ครั้งแรกในวันที่ 7 และเว้นระยะการเก็บทุกๆ 3 วันหลังจากเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงจึงเพิ่มปริมาตรการเก็บเป็นครั้งละ 20 มิลลิลิตร ไปจนสิ้นสุดการทดลอง เพื่อลดจำนวนเซลล์ที่หนาแน่นเกินไป ซึ่งเซลล์เหล่านี้อาจทับถมกันทำให้มีการแลกเปลี่ยนแก๊สและอาหารต่างๆ ได้ไม่ดี วิธีการเก็บแบบนี้ เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 2.5-5.1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์มีชีวิต 20-40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของเสียที่เกิดขึ้นได้แก่ แลคเตทมีค่าประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโมเนีย มีค่าสูงถึง 3.6 มิลลิโมลาร์ ปริมาณกลูโคสลดลงเหลือประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเฉลี่ย 4.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของปริมาณซีรัมที่ใช้เติมในส่วน ECS ของฮอลโลว์ไฟเบอร์ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ พบว่าการใช้ซีรัมที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์มีชีวิตมีปริมาณมากกว่าและมีอัตราการผลิตแอนติบอดีมากกว่า การใช้ซีรัมที่ความเข้ม ข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของฮอลโลว์ไฟเบอร์ พบว่าฮอลโลว์

วิธีที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล เริ่มจากใส่เซลล์เริ่มต้นในส่วน ECS ของฮอลโลไฟเบอร์ ปริมาณ 3×10^8 เซลล์ ในฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่มีเมมเบรนเป็นชนิดเซลลูโลส วางคอลัมน์ในแนวขนานกับพื้น และเติมซีรัมเฉพาะในส่วน ECS ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีการให้อากาศแพร่ผ่านทางผนังของสายยางซิลิโคนที่มีความยาว 3 เมตร ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เขย่าคอลัมน์วันละ 1 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันทั่วคอลัมน์ เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน จึงเริ่มเก็บแอนติบอดีเป็นครั้งแรก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเว้นระยะในการเก็บทุกๆ 3 วัน หลังจากเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase (วันที่ 16) เพิ่มปริมาตรการเก็บเป็น 20 มิลลิลิตร การเก็บแอนติบอดีต้องเก็บสลับด้าน ซ้าย ขวา ก่อนเก็บและหลังเก็บต้องเขย่าคอลัมน์ให้เซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

เมื่อนำแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 27.3 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีเริ่มต้นเท่ากับ 255.9 และ 75.2 มิลลิกรัม ตามลำดับ หลังทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีเท่ากับ 68.2 และ 54.9 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 80.5 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ recovery ของแอนติบอดีเท่ากับ 73.1 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีน 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 62.69 และ 26.85 kDa ซึ่งเป็นส่วนของ heavy chain และ light chain ตามลำดับ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฮอลโลว์ไฟเบอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงในระดับมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยให้ลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าปริมาณแอมโมเนียซึ่งเป็นของเสียที่เกิดขึ้น ที่ความเข้มข้นเกิน 2.5 มิลลิโมลาร์ จะมีผลต่อการเจริญ และอัตราการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา CAP 79 ดังนั้นควรควบคุมปริมาณแอมโมเนียไม่ให้สูงเกิน ซึ่งอาจทำได้โดยเปลี่ยนอาหารในขวดบรรจุอาหารให้ถี่ขึ้น หรือเพิ่มปริมาตรอาหารในขวดบรรจุอาหารให้มากขึ้นเพื่อเป็นการเจือจางของเสียที่เกิดขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

ภาษาอังกฤษ

Altshuler , G. L., Dziewulski, D. M., Sowek, J. A. and Belfort. G. 1985. Continuous Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Hollow Fiber Reactors-Separators. Bioengineering. 28 : 646-658

Aminot, A., Kirkwood, D.S. and Kerouel, R. 1997. Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method : Evaluation of the ICES UNTS I/C5 questionnaire. Marine Chem. 56 : 59-75

Bernfeld, P. 1955. Amylase and method in enzymology. (Colowick, P. S. and Kaplan O. N. eds) vol 1 New York : Academic Press Inc.

Chen, Z., Chen, Y., Chen, J. and Chen, C. 1992. Effects of ammonium and lactate on hybridoma cell growth and metabolism. Chin J Biotechnol. 30(1) : 29-41

Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L. and Carrondo, M. J. T. 2000. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. Enzyme and Microbial Tech. 27 : 43-52

Czirbik, R. J., Rosen, S. M., Trunfio, D. M., Fischberg-Bender, E. W. and Palmer, S. M. 1996. Factors affecting antibody production efficiency in hollow-fiber bioreactors. IVD Tech. 2(4) : 56-61

Fawcett, J. K. and Scott, J. E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. J. clin. Path. 13 : 156

Fitzpatrick, L., Jenkins, H. A. and Butler, M. 1993. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. Appl Biochem Biotechnol. 43 : 93-116

Freshney, R. L., 2005. Culture animal : a manual of basic technigue . 5th ed. United States of America : A John Wiley & Sons, Inc.

Gorter, A., van de Grind, R. J., van Eendenburg, J. D. H., Haasnoot, W. H. B.,and Fleuren, G. J. 1993. Production of bi-specific monoclonal antibodies in a hollow-fiber bioreactor. J. Immunol. Methods. 161: 145-150.

Gramer, M. J. and Poeschl, D. M. 1998. Screening tool for hollow-fiber bioreactor process development. Biotechnol. Prog. 14 : 203-209

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.

Hudson, L. and Hay, F. C. 1980. Practical Immunology. Second edition. Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne : Blackwell scientific publications.

Jackson, L. R., Trudel, L. J., Fox, J. G. and Lipman, N. S. 1996. Evaluation of hollow fiber bioreactors as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production. J. immunol. methods 189 : 217-231

Johnstone, A. and Thorpe, R. 1987. Immuno chemistry in practice. Second edition. Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne : Blackwell scientific publications.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the gead of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685

Lowry, D., Murphy, S., Goffe., R. A. 1994. A comparison of monoclonal antibody productivity in different hollow fiber bioreactors. J. Biotechnol. 36 : 35-38

Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. 1987. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. J. Cell Physiol. 132 : 524-530

Mizrahi, A., 1989. Advances in biotechnological process volume 11. Monoclonal antibodies : production and application. New York : Israel Institute for Biological Research.

Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldran, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K. and Murray, P. G. 2000. Monoclonal antibodies. J. Clin. Pathol. : Mol. Patho. 53 : 111-117

Ozturk, S. S., Riley, M. R. and Palsson, B. O. 1992. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. Biotechnol. Bioeng. 39 : 418-431

Reynard, A. M. 1992. Textbook of Pharmacology. Tetracyclines and Chloramphenicol. Philadelphia : In Smith, C. E. and Reymard, A. M.,. W. B. Saunders Company.

Sadettin, S. O., Mark, R. R. and Bernhard, O. P. 1991. Cellular Biotechnology Laboratory. Department of Chemical Engineering, University of Michigan Ann Arbor.

Sanfeliu, A., Paredes, C., Cairo, J. J. and Godia, F. 1997. Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. Enzyme and Microbial Tech. 21 : 421-428

Shi, Y., Ploof, J. and Correia, A. 1999. Increasing antibody production with hollow-fiber bioreactors. IVD Tech. : 1-8

Shi, Y., Sardonini, C. A. and Goffe, R. A. 1998. The use of oxygen carriers for increasing the production of monoclonal antibodies from hollow fibre bioreactors. Res Immunol. 149 : 576-587.

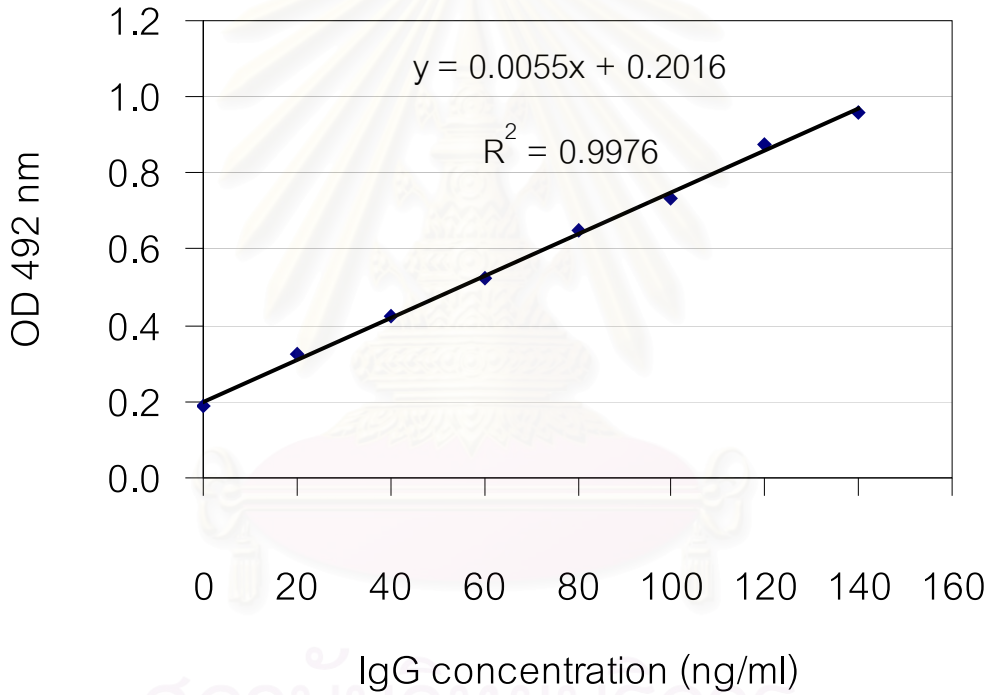
Vetterlein, D. 1989. Monoclonal antibodies : production, purification and technology. Adv. Clin. Chem. 27 : 303-354

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

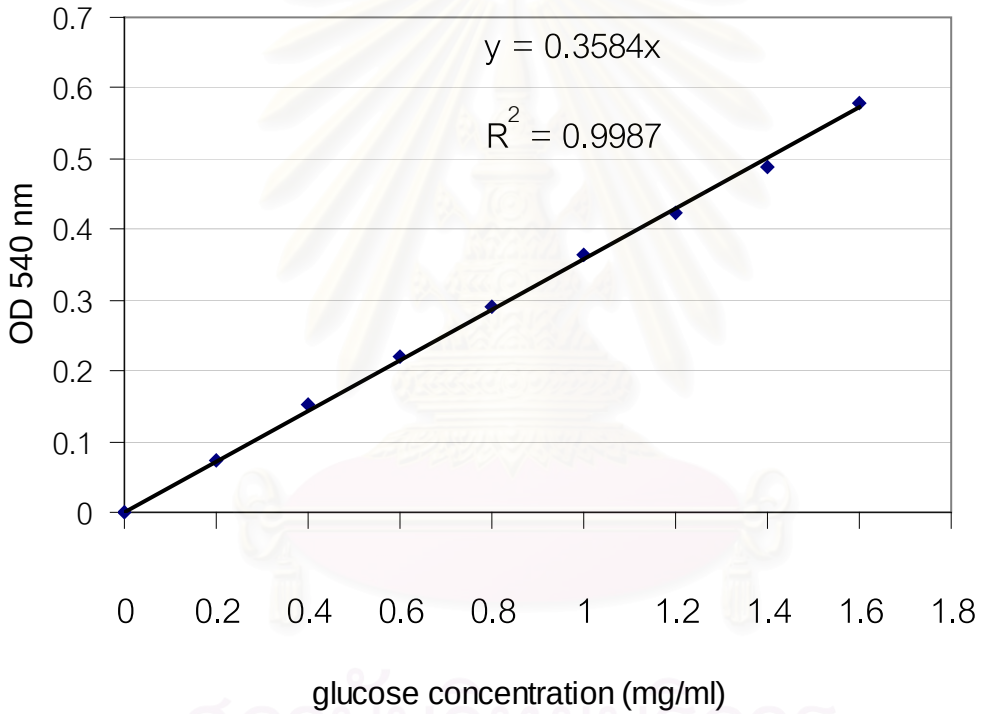
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.



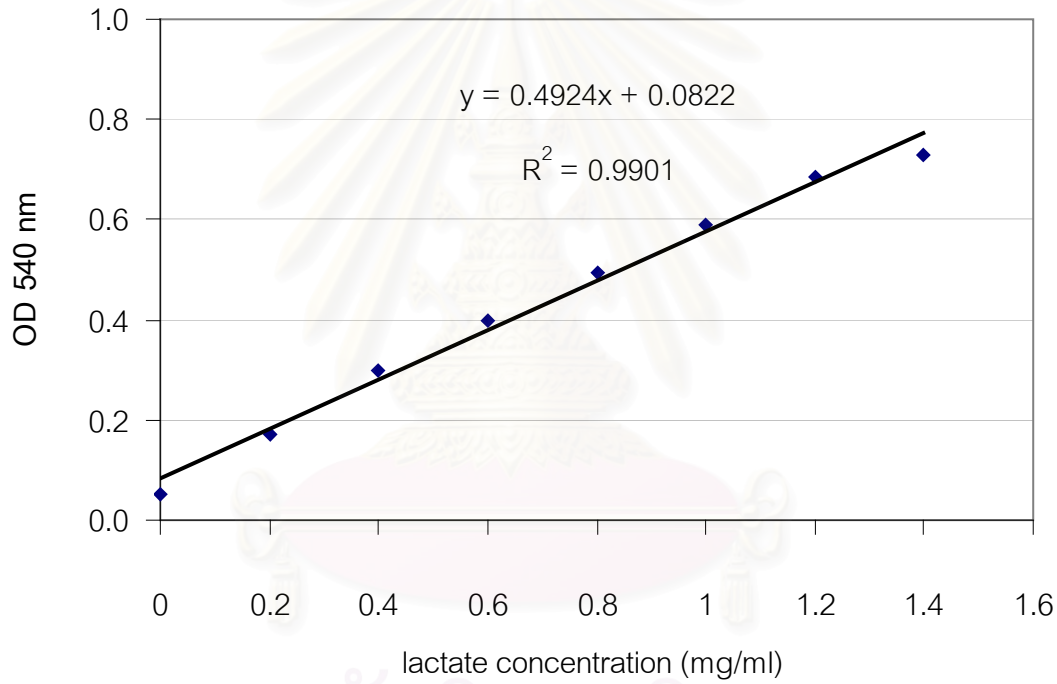
รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส CAP 79 ต่อสารคลอแรมเฟนิคอล ที่ความเข้มข้น 0 – 140 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



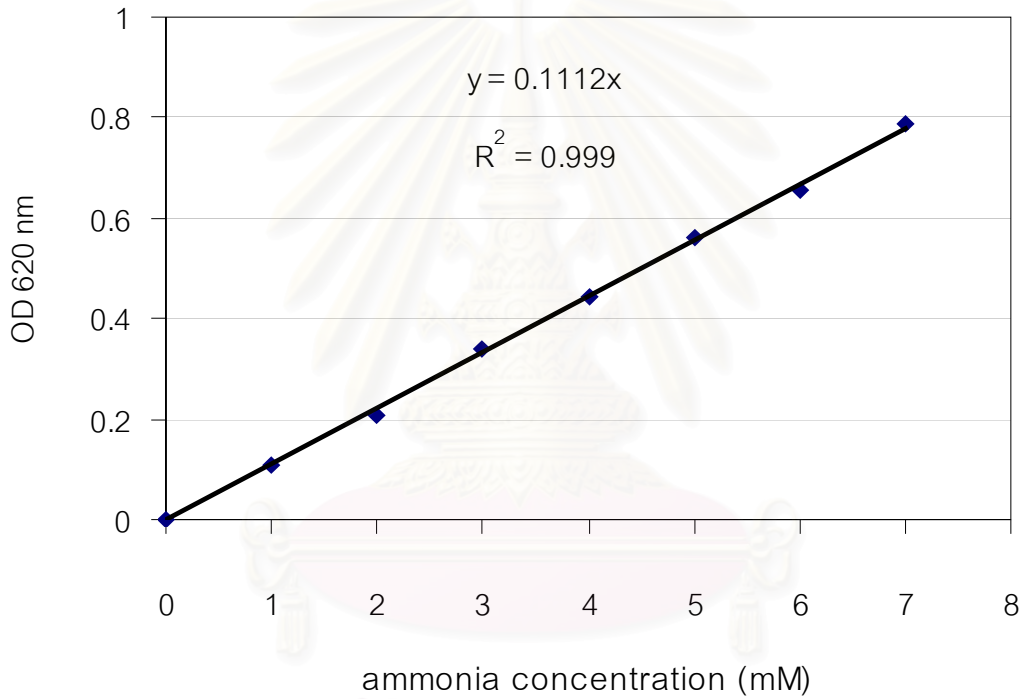
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNSA ที่ความเข้มข้น 0 – 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



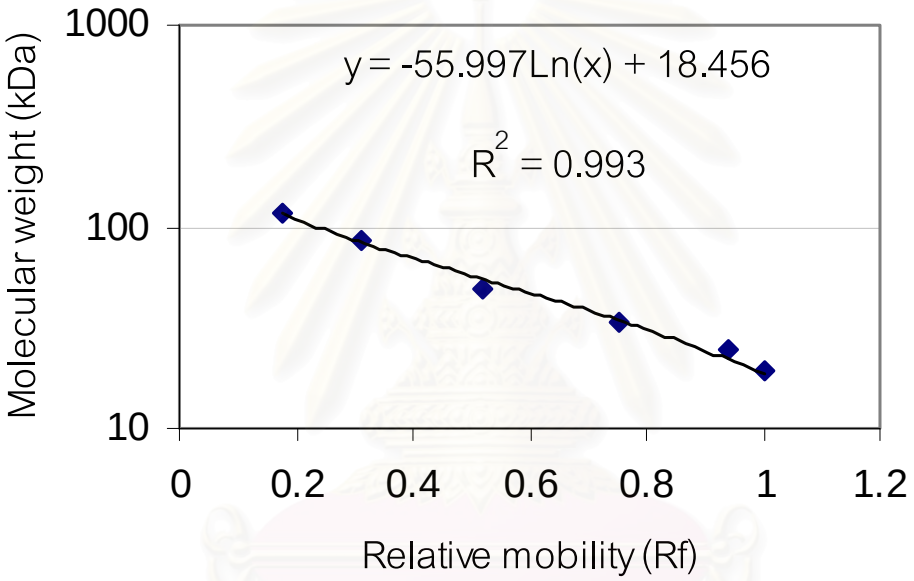
รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแลกเตท ที่ความเข้มข้น 0 – 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



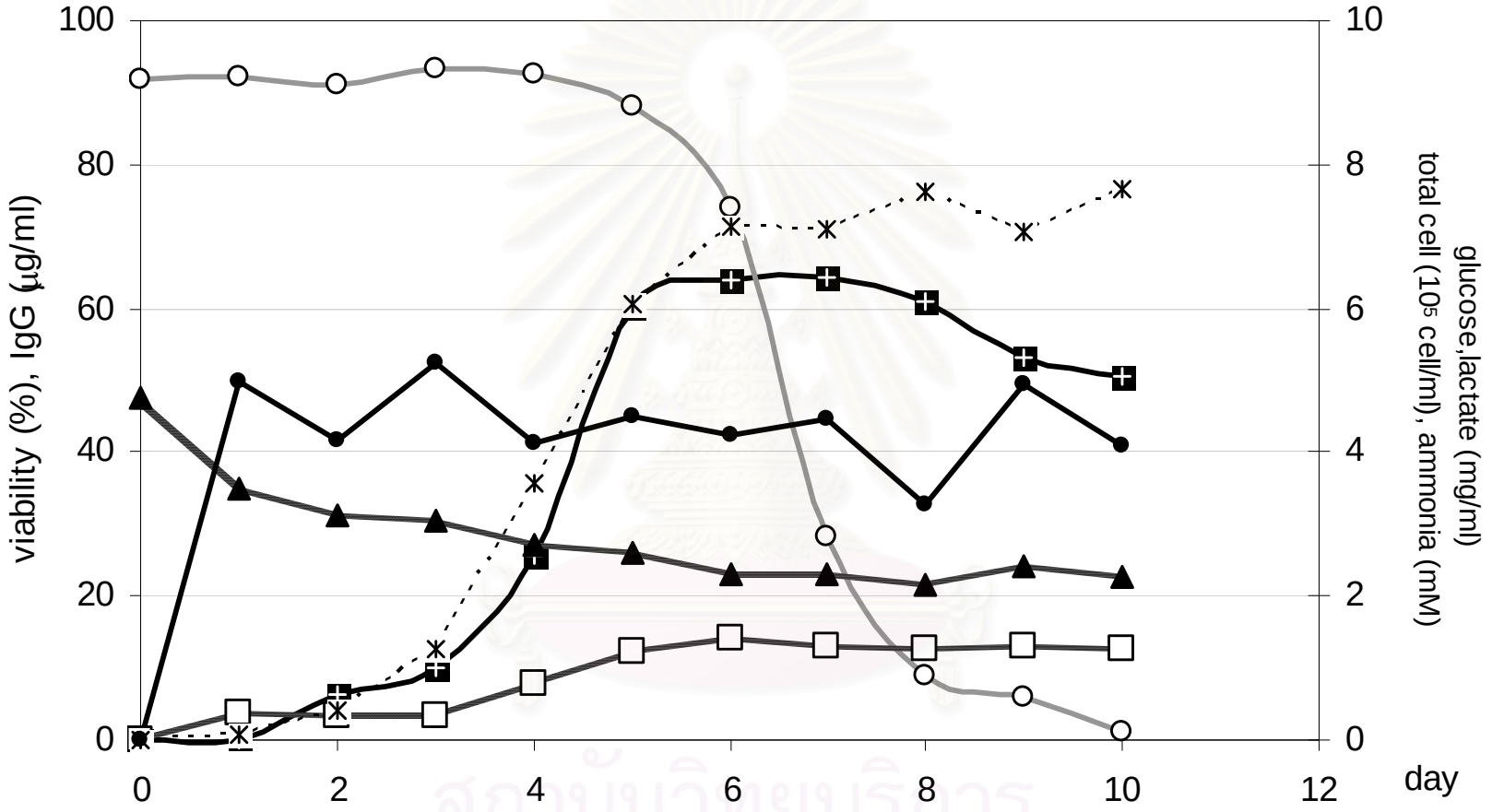
รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณแอมโมเนีย ที่ความเข้มข้น 0 – 7 มิลลิโมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

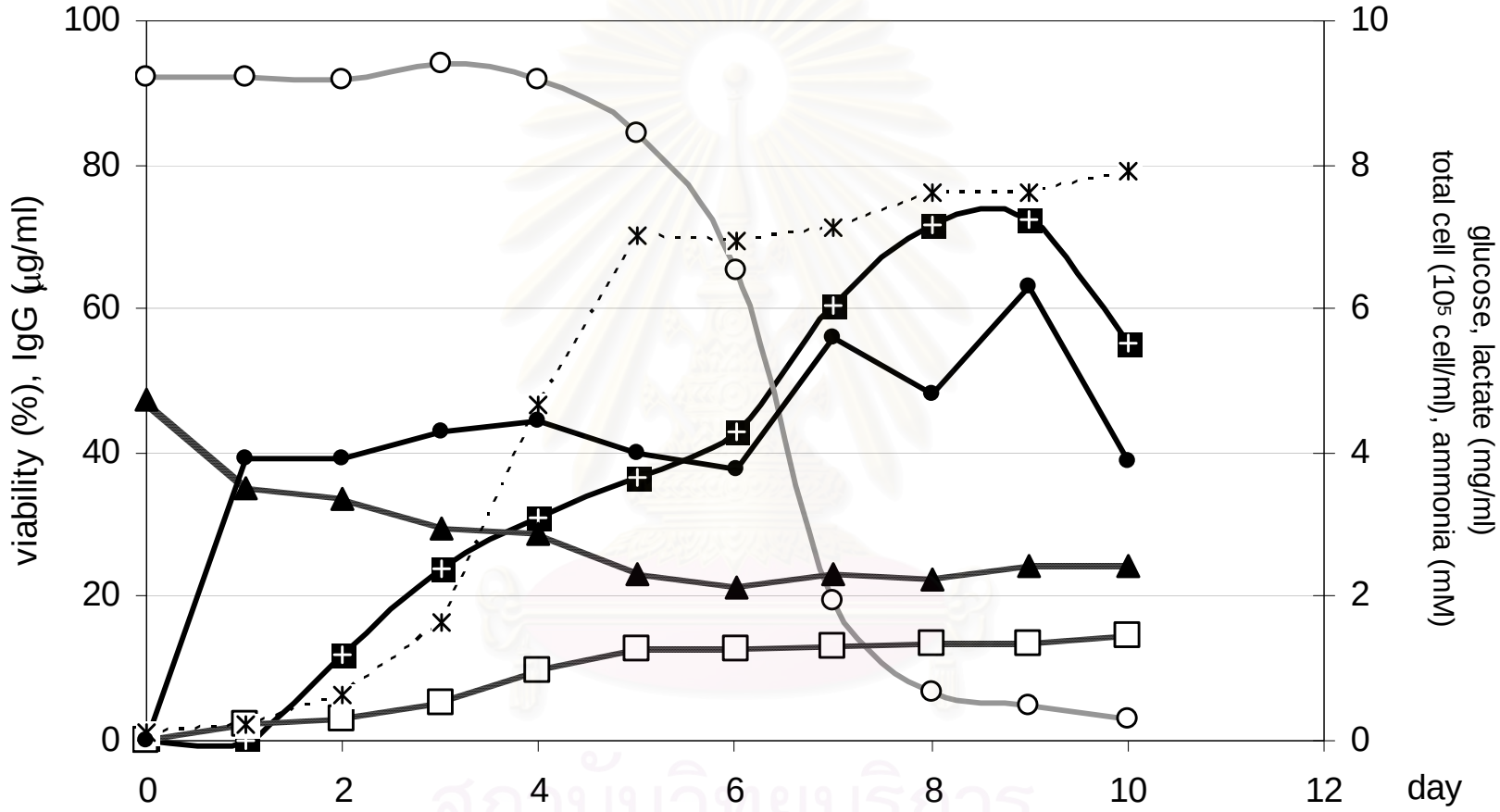


รูปที่ ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ก.6 การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5 x 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์



<u>รูปที่ ก.7</u> การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์

(---■-- IgG , —▲— glucose , —□— lactate , —●— ammonia , —○— viability, ---✳--- total cell)

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสาร

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. นมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซนต์

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

   ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

4. 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

   Na_2HPO_4 11.9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   Citric acid 7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ –20 °C

5. Substrate OPD

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

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

6. 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

18 M H_2SO_4	69.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	430.5	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันจะเกิดความร้อน ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน

การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid) สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมโปตัสเซียมโซเดียมทาเทรต (Potassium sodiumtartate, $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

1. Sodium Phenate

ละลายฟีนอล 25 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซเข้มข้น 4.0 N ปริมาตร 78 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร เก็บในตู้เย็น และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้

2. Sodium Nitroprusside, 0.01%

เตรียมสารละลาย Sodium Nitroprusside จาก stock 1 เปอร์เซ็นต์ โดยนำมาเจือจาง 1 : 100 แล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง

3. Sodium Hypochlorite, about 0.02 N.

เตรียมสารละลาย Sodium Hypochlorite ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.02 N จาก stock ที่มีอยู่

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 0.1 M Citrate buffer pH 3.5

citric acid ($C_6H_8O_7.1H_2O$)	0.1	M
Na_2HPO_4	0.1	M

ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 3.5 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M Phosphate buffer pH 8.0

ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 1 M Tris HCl buffer pH 9.0

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1	M
HCl	1	M

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมน้ำยาแช่แข็งเพื่อเก็บเซลล์อย่างถาวร

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	65	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	25	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม 0.4% Trypan blue สำหรับย้อมเซลล์

Trypan blue	0.4	กรัม
Nacl	0.01	กรัม
K_2HPO_4	0.06	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เขย่าให้ละลายเข้ากันและกรองก่อนใช้

การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stacking and Separating gel

Reagent	Stacking gel (5%)	Separating gel (10%)
distill water	1.46	4.8
40% Acrylamide gel	0.25	2.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	-	2.5
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	-
10% SDS	0.02	0.1
10% APS	0.02	0.1
TEMED	0.002	0.004
final volume (ml)	2	10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Sample buffer

SDS	2%
Bromophenol blue	0.01%
Glycerol	10%
beta-mercaptoethanol	10%
60 mM Tris (pH 6.8)	

3. Running buffer(1X) 1 L

Tris	3.02 g
Glycine	18.8 g
SDS	1.0 g

4. Coomassie brilliant blue (250 ml)

Coomassie Brilliant blue R-250	0.25%
Methanol	50%
Acetic acid	10%

5. Destaining solution (1 L)

Methanol	5%
Acetic acid	10%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

การคำนวณ

การหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของสารตัวอย่าง x 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร}}{\text{ค่า Extinction coefficient ที่ 280 นาโนเมตร ; } E^{1\%}_{280}}$$

วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ คิวเวทควอทซ์ หนา 1 เซนติเมตร และเจือจางสารตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 1.5

Extinction coefficient ที่ 280 ; $E^{1\%}_{280}$ = 13.6

การนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ Haemacytometer

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ใน 4 ช่องใหญ่ x } 10^4 \text{ x อัตราการเจือจาง}}{4}$$

1		2
3		4

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต x 100}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Glucose Uptake Rate

$$\text{Glucose Uptake Rate (mg/day)} = \frac{[(V_f \times G_f) + (V_r \times G_r)] - (V_t \times G_c)}{\text{Days}}$$

V_f = ปริมาตรของอาหารใหม่ใน reservoir (ml)

V_r = ปริมาตรอาหารที่เหลืออยู่ในระบบและใน cartridge (ml)

V_t = ปริมาตรของอาหารทั้งหมด (ml)

G_f = ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารใหม่ (mg/ml)

G_r = ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารที่เหลือในระบบ (mg/ml)

G_c = ความเข้มข้นของกลูโคสวัดจากอาหารปัจจุบัน (mg/ml)

Lactate Production Rate

$$\text{Lactate Production Rate (mg/day)} = \frac{(V_t \times L_c) - [(V_f \times L_f) + (V_r \times L_r)]}{\text{Days}}$$

V_f = ปริมาตรของอาหารใหม่ใน reservoir (ml)

V_r = ปริมาตรอาหารที่เหลืออยู่ในระบบและใน cartridge (ml)

V_t = ปริมาตรของอาหารทั้งหมด (ml)

L_f = ความเข้มข้นของกรดแลคติกในอาหารใหม่ (mg/ml)

L_r = ความเข้มข้นของกรดแลคติกในอาหารที่เหลือในระบบ (mg/ml)

L_c = ความเข้มข้นของกรดแลคติกวัดจากอาหารปัจจุบัน (mg/ml)

Ammonia Production Rate

$$\text{Ammonia Production Rate (mM/day)} = \frac{(V_t \times A_c) - [(V_f \times A_f) + (V_r \times A_r)]}{\text{Days}}$$

V_f = ปริมาตรของอาหารใหม่ใน reservoir (ml)

V_r = ปริมาตรอาหารที่เหลืออยู่ในระบบและใน cartridge (ml)

V_t = ปริมาตรของอาหารทั้งหมด (ml)

A_f = ความเข้มข้นของแอมโมเนียในอาหารใหม่ (mg/ml)

A_r = ความเข้มข้นของแอมโมเนียในอาหารที่เหลือในระบบ (mg/ml)

A_c = ความเข้มข้นของแอมโมเนียวัดจากอาหารปัจจุบัน (mg/ml)

Relative mobility

$$\text{Relative mobility (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุนิสา ด้วงสอาด เกิดเมื่อวันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ.2523 ที่จังหวัด สมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย