

การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน



นายรัฐพล เฉลิมโรจน์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

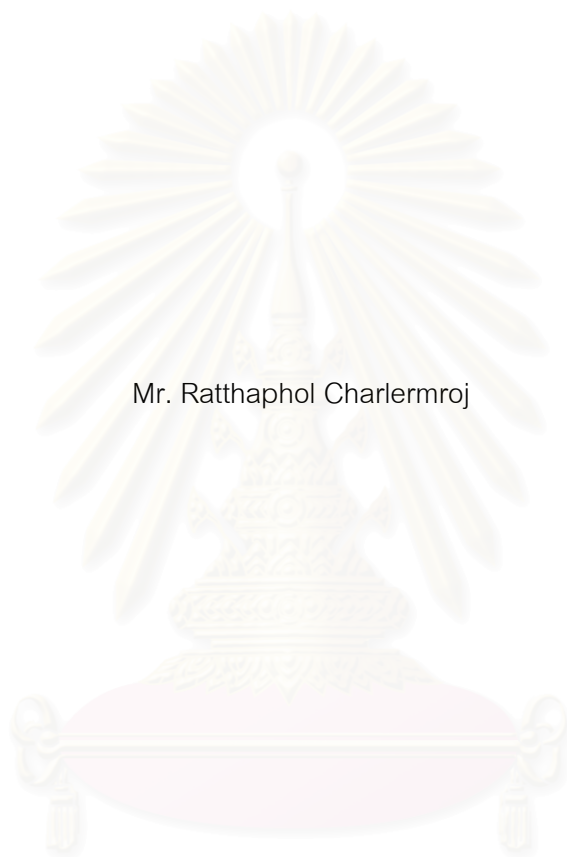
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR
3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE



Mr. Rattaphol Charlermroj

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

รัฐพล เกลิมโรจน์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR 3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ธนาภัทร पालกะ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, ทรงจันทร์ ภูทอง, 102 หน้า.

3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (AOZ) เป็นสารเมแทบอลิซึมที่มีพิษที่สร้างพันธะกับเนื้อเยื่อที่ได้มาจากสารฟูราโซลิโดนซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มไนโตรฟูแรน สารฟูราโซลิโดนถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* และยังเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เนื่องจากสารฟูราโซลิโดนเป็นสารก่อให้เกิดพิษที่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม สารไนโตรฟูแรนถูกห้ามไม่ให้ใช้ในสัตว์ที่ใช้บริโภค การตกค้างของสารไนโตรฟูแรนจึงอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจหาได้ของไนโตรฟูแรนในอาหารจึงถูกกำหนดขึ้นในหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทยด้วย

ในงานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ โดยใช้นุพันธ์ของ AOZ ได้แก่ 3-[[[(3-carboxyphenyl)-methylene]amino-2-oxazolidinone (CPAOZ) เป็นแฮปเทนในการกระตุ้นสัตว์ทดลองในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์มัยอีโลมาและเซลล์ม้ามมีจำนวน 2 โคลน คือ โคลนรหัส CPAOZ#4 และ CPAOZ#12 จากการศึกษาไอโซไทป์ทั้งสองโคลนโดยวิธี indirect ELISA พบว่าทั้งสองโคลนเป็นไอโซไทป์ IgG1 และจากการหาค่า IC50 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ CPAOZ#12 ที่ทำให้บริสุทธิ์ต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดนมีค่าเท่ากับ 5.92, 365.70, 1661 และ 0.024 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า LOD ต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดนมีค่าเท่ากับ 0.23, 41.59, 224.3 และ 0.008 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยโมโนโคลนอล CPAOZ#12 นี้ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามทั้งกับเมแทบอลิซึมของไนโตรฟูแรน สารไนโตรฟูแรน และยาปฏิชีวนะอื่นๆ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้เป็นรายงานแรกของโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการตรวจหาเมแทบอลิซึมของไนโตรฟูแรนโดยไม่ต้องทำการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์และสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจหาสารตกค้าง AOZ ในอาหารโดยอาศัยเทคนิควิเคราะห์ทางวิทยามิคุ้มกันได้

ภาควิชา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772435023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: AOZ / NITROFURANS / MONOCLONAL ANTIBODY / ELISA

RATTHAPHOL CHARLERMROJ : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR 3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE. THESIS ADVISOR : ASST.PROF.TANAPAT PALAGA, Ph.D., THESIS COADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., SONGCHAN PUTHONG, M.Sc., 102 pp.

3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) is a tissue bound toxic metabolite derived from nitrofurantoin antibiotic, furazolidone. Furazolidone has been widely used for prevention and treatment of gastrointestinal infections caused by *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* and also as growth stimulators. Because of the toxicity as a mutagenic and genotoxic of furazolidone, its use was banned in animals destined for consumption. The residue of nitrofurans poses health hazard for humans. Therefore, minimum required performance limit of nitrofurans in food was set in many countries.

In this research, monoclonal antibodies (MAbs) were generated to specifically detect AOZ. Derivatised form of AOZ, 3-[[3-carboxyphenyl]-methylene]amino-2-oxazolidinone (CPAOZ) was used as the immunizing hapten for the production of MAbs against AOZ. Fusions of myeloma and splenocytes yielded two clones of hybridoma, i.e. CPAOZ#4 and CPAOZ#12. Isotypes of both CPAOZ#4 and CPAOZ#12 MAb were determined by indirect ELISA to be an IgG1 subclass. The IC50 values of purified MAb CPAOZ#12 against CPAOZ, NPAOZ, AOZ and furazolidone were 5.92, 365.70, 1661 and 0.024 ng/ml, respectively. The LOD values for CPAOZ, NPAOZ, AOZ and furazolidone were 0.23, 41.59, 224.3 and 0.008 ng/ml, respectively. The CPAOZ#12 MAb did not exhibit cross-reactivity with other nitrofurantoin metabolites, nitrofurans and other antibiotics. This is the first report of monoclonal antibodies for a specific detection of a nitrofurantoin metabolite AOZ without derivatisation step. This MAb could be developed into an immunoassay-based test kit for detecting AOZ residues in food.

Field of study.....Biotechnology Student's signature.....*Ratthaphol Charlermroj*.....

Academic year 2006

Advisor's signature.....*Tanapat Palaga*.....

Co-advisor's signature.....*K. Komolpis*.....

Co-advisor's signature.....*Songchan Puthong*.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส และ คุณทรงจันทร์ ภูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทำงานวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

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

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ และผู้บริหารของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านสำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

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

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้ให้กำเนิด พี่สาว ทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษาตลอด ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจเสมอมา

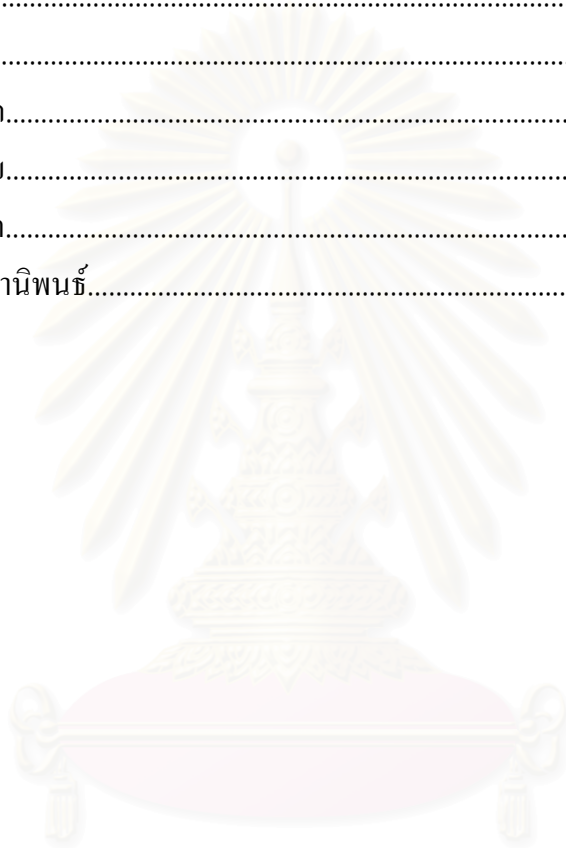
สถาบันวิจัยชีวภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	22
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	22
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	23
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
4.1 การสังเคราะห์สาร CPAOZ.....	38
4.2 การเตรียมแอนติเจน.....	41
4.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ฉีด.....	45
4.4 การหลอมรวมเซลล์.....	49
4.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	53
4.6 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	62

บทที่	หน้า
4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....	65
5 สรุปผลการทดลอง.....	75
รายการอ้างอิง.....	78
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	92
ภาคผนวก ค.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	102



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การตรวจวิเคราะห์ห่อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธีทางเคมี.....	9
2.2 การตรวจวิเคราะห์ห่อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธี ELISA.....	10
2.3 ค่า MPRL ของเมแทบอลิซึมของฟูราโซลิโคน แต่ละประเทศ.....	11
2.4 สารตกค้างเมแทบอลิซึมในโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	11
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	23
4.1 ค่า R _f ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ.....	39
4.2 ปริมาณ โปรตีนของโปรตีนพาหะที่เชื่อมต่อกับสาร.....	41
4.3 เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด (% cross link) ของโปรตีนเชื่อมติด จำนวนโดยวิธี TNBS.....	43
4.4 อัตราส่วนการเชื่อมติดของสารเข้ากับโปรตีนพาหะจำนวนจากน้ำหนักโมเลกุล.....	44
4.5 ระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัวและการหลอมรวมเซลล์.....	45
4.6 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-ed-BSA ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	46
4.7 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ 9 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-glu-ed-BSA (ใช้ glutaraldehyde เป็นสารในเชื่อมติด) ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	47
4.8 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ฉีดด้วย AOZ-BSA (ใช้ EDC และ NHS เป็นสารในการ เชื่อมติด) ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	48
4.9 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ฉีดด้วย AOZ-BSA(ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	48
4.10 การทดสอบแอนติบอดีของโคลน 2/H11 และ 9/C7 ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	50
4.11 โมโนโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5.....	51
4.12 การทดสอบแอนติบอดีของโคลน 3/D9 ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	52
4.13 การทดสอบแอนติบอดีของโคลน 1/C5, 7/A9 และ 9/F9 ต่อสารในรูปอิสระ โดยวิธี Competitive ELISA.....	53
4.14 ค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ค่าการเจือจางต่างๆทดสอบโดย วิธี indirect ELISA.....	54
4.15 ความเจือจางของแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบบนจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม.....	55

4.16 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA	56
4.17 ปฏิกริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#1 CPAOZ#4 CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	58
4.18 เปอร์เซ็นต์ปฏิกริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#1 CPAOZ#4 CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน.....	61
4.19 ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA.....	67
4.20 สรุปค่า IC50 และค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOX และ ฟุราโซลิโดน โดยวิธี indirect competitive ELISA.....	74
ข.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	92
ข.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 โดยวิธี indirect ELISA.....	93
ข.3 ค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานต่างๆวิเคราะห์โดยวิธีฟอลิอะคริละไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส.....	94

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของสารไนโตรฟูแรนและเมแทบอลิซึมของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน.....	4
2.2 เมแทบอลิซึมของสารฟูราโซลิโคนในสุกร.....	5
2.3 แสดงการเปลี่ยนอนุพันธ์ของ AOZ เป็น NPAOZ.....	8
2.4 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน.....	14
2.5 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค somatic hybridization.....	17
2.6 วิธีการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ไฮบริโดมา.....	19
2.7 การเปลี่ยนสาร AOZ เป็น CPAOZ.....	20
2.8 การเชื่อมสาร AOZ เข้ากับโปรตีนโดยวิธีต่างๆ.....	21
3.1 โครงสร้างการเชื่อมสารติดกับโปรตีนพหุโดยใช้สารเชื่อมต่างๆ.....	28
3.2 การเกิดปฏิกิริยาของ TNBS กับหมู่เอมีนปฐมภูมิ.....	29
4.1 โคโรมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ, ก) ย้อมด้วยสารนินไฮดริน ข) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยที่ช่องที่ 1 คือ 3-carboxybenzaldehyde(CBA), 2 คือ AOZ, 3 คือไพริดีน (pyridine), 4 คือ ตัวอย่างก่อนทำรีฟลัก, 5 คือ ตัวอย่างหลังทำรีฟลัก และ 6 คือ ตัวอย่างที่ทำรีฟลัก และทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน.....	38
4.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ CPAOZ โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	40
4.3 สเปกตรัมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา TNBS กับโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงความยาวคลื่น 260 – 800 นาโนเมตร.....	42
4.4 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#1, 4, 7 และ 12 ต่อสาร CPAOZ	57
4.5 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร CPAOZ.....	59
4.6 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร NPAOZ.....	59
4.7 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร AOZ.....	60
4.8 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร furazolidone....	60

รูปที่	หน้า
4.9 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ.....	62
4.10 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ.....	63
4.11 ลักษณะของแถบโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยวิธีฟอลิอะคริลอะไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส.....	64
4.12 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	65
4.13 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ต่อสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	65
4.14 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ต่อสาร Aoz โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	66
4.15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ต่อสาร furazolidone โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	66
4.16 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.063, 0.125 และ 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 1.500, 0.375 และ 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	68
4.17 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25, 1.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย Aoz-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00, 1.50 และ 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	69
4.18 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	70

4.19 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	70
4.20 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร AOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	71
4.21 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสารฟูราโซลิโดน โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	71
4.22 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....	72
4.23 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....	72
4.24 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร AOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....	73
4.25 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสารฟูราโซลิโดน โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....	73
ก.1 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	83
ก.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ ed-BSA โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	84
ก.3 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน OVA โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	85
ก.4 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CPAOZ-ed-BSA (ใช้ EDC เป็นในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	86
ก.5 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CPAOZ-OVA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	87

ก.6	สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-glu-OVA (ใช้ glutaraldehyde เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	88
ก.7	สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-BSA (ใช้ EDC/NHS เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	89
ก.8	สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-BSA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	90
ก.9	สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-OVA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS.....	91
ข.1	กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) โดยวิธี Lowry.....	92
ข.2	กราฟมาตรฐานโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งเคลือบด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร.....	93
ข.3	กราฟโปรตีนมาตรฐานที่วิเคราะห์โดยวิธีฟอลิอะคริละไมด์ เจล อิเล็กโทรโพรเซสแบบเอสดีเอส.....	94

สัญลักษณ์และคำย่อ

AOZ	3-amino-2-oxazolidinone
BSA	bovine serum albumin
CPAOZ	3-{{3-carboxyphenylmethylene}amino}-2-oxazolidinone
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetal calf serum
FZD	furazolidone
g	gram
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HRP	Horseradish peroxidase
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
M	molar
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
ml	millilitre
MRLs	maximum residue limits
MRPL	minimum required performance limit
MW	Molecular weight
NPAOZ	2-nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone
OPD	O-phenylenediamine
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with tween20

PEG	polyethylene glycol
ppb	part per billion
ppm	part per million
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
ug	microgram
v	volume
w	weight
%	percent



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไนโตรฟูแรน (nitrofurans) เป็นยาต้านแบคทีเรียประกอบด้วยสาร 4 ชนิดคือ ฟุราโซลิโดน (furazolidone) ฟุแรลทาโดน (furaltadone) ไนโตรฟูแรนโทอิน (nitrofuratoin) และ ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone) สารกลุ่มนี้ใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค เช่น โค หมู เป็ด ไก่ ปลา และ กุ้ง เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นสารในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ เนื่องจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งและการ กลายพันธุ์ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ในปี ค.ศ. 1995 สหภาพยุโรป ประกาศห้ามใช้สารฟูราโซลิโดนทั้งในอาหารและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสัตว์ (Commission Regulation 1442/95) มีข้อกำหนดความสามารถในการตรวจหาสารปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Minimum Required Performance Limits, MRPL) ของสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ของไนโตรฟูแรนที่ระดับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Commission Decision 2003/181) สำหรับประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 268) พ.ศ. 2546 มีข้อกำหนดคดค้างปริมาณของสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone; AOZ) ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและการจำหน่ายหรือส่งออกสัตว์ออกไปยังต่างประเทศจึงจำเป็นต้องมีวิธีตรวจวิเคราะห์หาสารไนโตรฟูแรนที่มีความแม่นยำและความไวสูง

การตรวจวิเคราะห์สารฟูราโซลิโดนโดยตรงนั้นทำได้ยากเนื่องจากเมื่อสารฟูราโซลิโดนเข้าสู่ร่างกายของสัตว์จะถูกเมแทบอไลต์เป็น AOZ อย่างรวดเร็วภายในเวลาต่ำกว่า 2 ถึง 3 ชั่วโมง โดย AOZ ซึ่งมีความเสถียรมากจะสร้างพันธะเพปไทด์กับเนื้อเยื่อ (Hoogenboom และคณะ, 1991, 1992; Gottschall และคณะ, 1995) สารนี้สามารถถูกสกัดออกจากเนื้อเยื่อได้โดยการใช้กรดเจือจาง (Hoogenboom และคณะ, 1991) แต่สาร AOZ เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กมากซึ่งไม่สามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตได้ และถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารนี้ได้จึงจำเป็นต้องนำสารมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ คือ 2-ไนโตรเบนแซลดีไฮด์-3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (2-nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone; NPAOZ) (Leitener และคณะ, 2001) เสียก่อน การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของ AOZ สามารถตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางเคมีได้หลายวิธี เช่น high-performance liquid chromatography (HPLC) (Hoogenboom และคณะ, 1991) liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (McCracken และคณะ, 1997)

และ LC-MS/MS (Leitener และคณะ, 2001) ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเมแทบอลิต์ของไนโตรฟูแรน ในระดับความเข้มข้นหนึ่งในพันล้านส่วนในเนื้อเยื่อ การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำสูง แต่เนื่องจากวิธีนี้จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ การตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างมีราคาสูง อีกทั้งในการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือวิเคราะห์เท่านั้น จึงได้มีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา คือการทดสอบด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์รวดเร็ว มีความสามารถสูงในการคัดกรองสารตกค้างไนโตรฟูแรนในเนื้อเยื่อ และมีความจำเพาะสูงต่ออนุพันธ์ของ AOZ ปัจจุบันได้มีการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี (Cooper และคณะ, 2004) และ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออนุพันธ์ของ AOZ (Vass และคณะ, 2005) ซึ่งยังคงจำเป็นต้องเปลี่ยน AOZ ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์คือ NPAOZ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากและต้องใช้เวลาหลายชั่วโมง ดังนั้นจำเป็นต้องผลิตและพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการตรวจหาสาร AOZ โดยไม่ต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารของไทยได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็วจึงควรตระหนักถึงการมีระบบการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตได้ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารที่ส่งออกหรือนำเข้าและที่บริโภคภายในประเทศ จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ซึ่งการใช้วิธีการตรวจสอบโดยวิธี ELISA เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจหาสารตกค้าง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาและผลิตเป็นชุดตรวจหาสารดังกล่าวในเนื้อสัตว์ได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
2. เตรียมอนุพันธ์ของ AOZ ในรูปของ 3-(3-คาร์บอกซิฟีนิลเมทิลีนอะมิโน)-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-{{[3-carboxyphenyl methylene]amino}}-2-oxazolidinone; CPAOZ)

3. เตรียมสารเชื่อมต่อระหว่าง CPAOZ และ AOZ กับโปรตีนพาหะต่างๆ
 4. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองโดยใช้ cBSA-CPAOZ และ BSA-AOZ
 5. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี
 6. คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ NPAOZ และ AOZ โดยวิธี ELISA
 7. ทดสอบลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแอนติบอดีที่ได้
 - 7.1 การทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้โปรตีนเอ (Protein A affinity column)
 - 7.2 หาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยใช้ชุดตรวจสอบไอโซไทป์ (isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich, USA)
 - 7.3 การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) กับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน สารอนุพันธ์ของไนโตรฟูแรน และสารปฏิชีวนะอื่นๆ เช่น คลอแรมฟินิคอล เคลนบูเทอรอล เพนนิซิลิน เอนโรฟอกซาซิน เป็นต้น โดยวิธี competitive ELISA
 - 7.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี ELISA
 8. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์
- 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**
- ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ NPAOZ และ AOZ

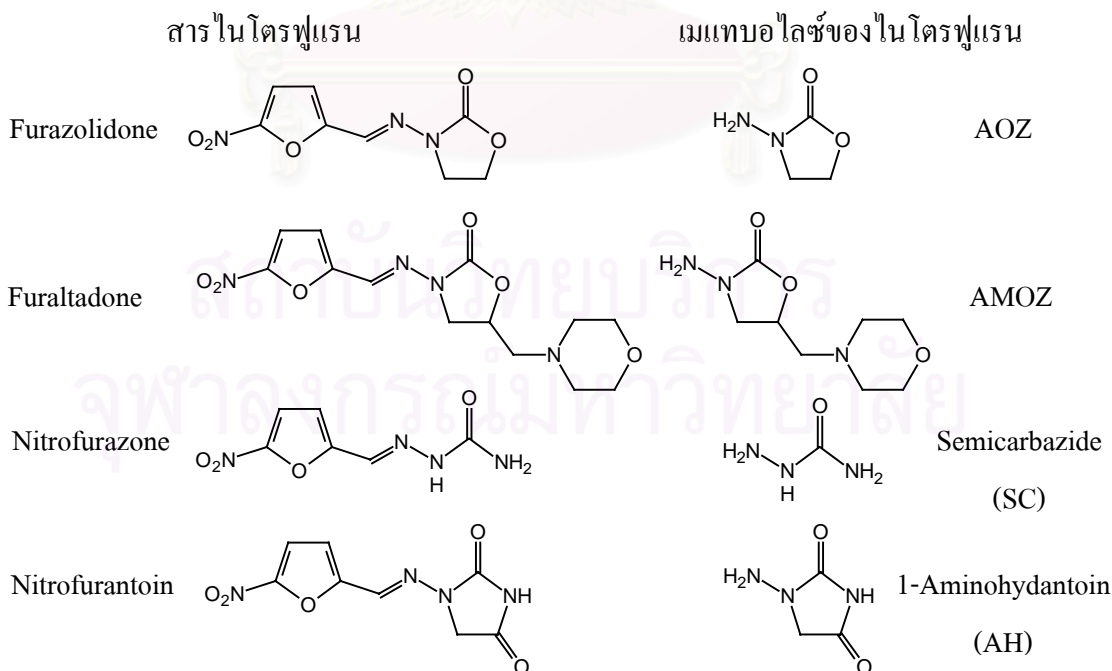
บทที่ 2

ปรีทรรคณ์วรรณกรรม

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารไนโตรฟูแรน

สารไนโตรฟูแรน (nitrofurans) เป็นสารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรกระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococci spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Aerobacter aerogenes*, *Vibrio cholerae* และ *Giardia lamblia* เป็นต้น ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค เช่น โค หมู เป็ด ไก่ ปลา และ กุ้ง เป็นต้น อีกทั้งสารไนโตรฟูแรนยังสามารถนำมาใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญของสัตว์เพื่อการบริโภคได้ สารไนโตรฟูแรนประกอบด้วยสาร 4 ชนิด ได้แก่ ฟูราโซลิโดน (furazolidone) ฟูเรลทาโดน (furaltadone) ไนโตรฟูแรนโทอิน (nitrofurantoin) และ ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone) สารกลุ่มนี้เมื่อเข้าในร่างกายจะถูกเมแทบอลิซึมเปลี่ยนให้อยู่ในอีกโครงสร้างหนึ่ง (ดังรูปที่ 1) อย่างรวดเร็วภายในเวลาต่ำกว่า 2 ถึง 3 ชั่วโมง ซึ่งโครงสร้างของสารที่ถูกเมแทบอลิซึมนี้มีความเสถียรอย่างมากเนื่องจากสามารถสร้างพันธะเพปไทด์กับเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้ (Hoogenboom และคณะ, 1991, 1992; Gottschall และคณะ, 1995)



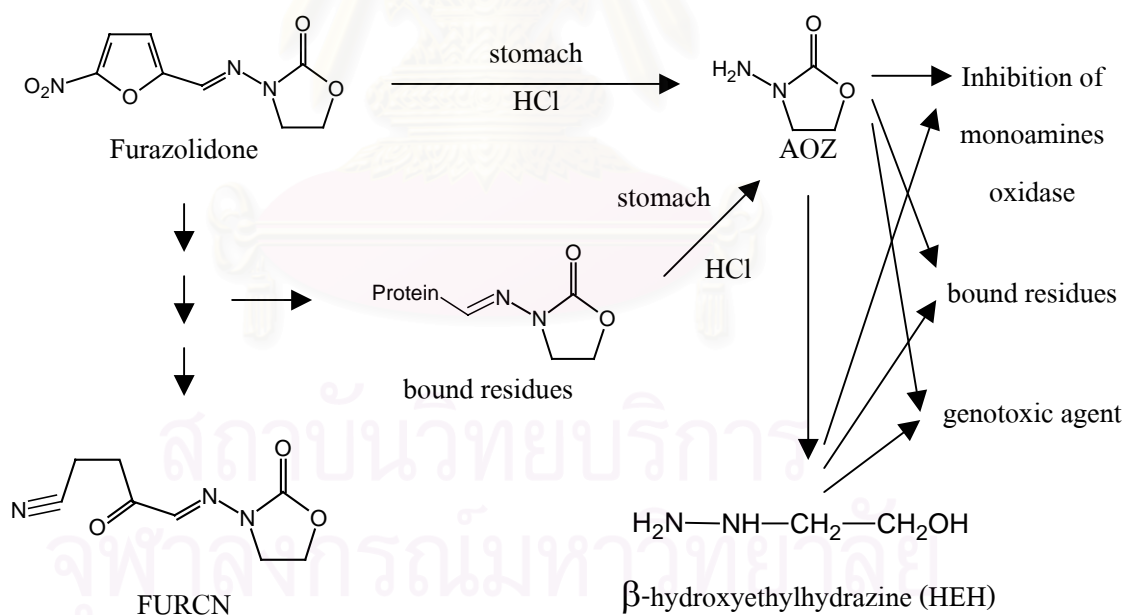
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารไนโตรฟูแรนและเมแทบอลิซึมของสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน

2.1.2 สารฟูราโซลิโดน

สารฟูราโซลิโดน ชื่อทางเคมีคือ 3-[(5-nitro-2-furyl)methylideneamino]oxazolidin-2-one มีสูตรทางเคมีคือ $C_8H_7N_3O_5$ เป็นสารที่มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองเข้ม มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 225.158 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 255 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายในน้ำเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.1.2.1 เมแทบอลิซึมของสารฟูราโซลิโดน

สารฟูราโซลิโดนเมื่อเข้าสู่ในร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็น 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (AOZ) อย่างรวดเร็ว จากการทดลองทั้ง *in vivo* และ *in vitro* โดยใช้สารฟูราโซลิโดนติดฉลากกับสารกัมมันตรังสี (Hoogenboom และคณะ, 1991, 1992) หลังจากสุกรได้รับสารภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณสารฟูราโซลิโดนลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของ AOZ พบที่เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ทั้งใน ตับ และไต อีกทั้งยังสามารถตรวจหา AOZ รูปอิสระในเลือดของสุกรที่ได้รับสารฟูราโซลิโดนปริมาณมากกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ขึ้นตอนการเมแทบอลิซึมของสารฟูราโซลิโดนในสุกร ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 เมแทบอลิซึมของสารฟูราโซลิโดนในสุกร

2.1.2.2 กลไกการทำงานของสารฟูราโซลิโดน

2.1.2.2.1 การยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (Monoamine oxidase inhibitor, MAOi)

จากรูปที่ 2.2 เมื่อฟูราโซลิโดนถูกเมแทบอลิซึมเป็น 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน และ บิตา ไฮดรอกซีเอททิลไฮดรารีน เมแทบอลิซึมหลักทั้งสองนี้มีสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase, MAO) ขณะที่สารฟูราโซลิโดนเองไม่มีสมบัติเป็น MAOi ในหนูที่ได้สารฟูราโซลิโดนทางปากขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO ได้ 81 เปอร์เซ็นต์ ในตับ (Stern และคณะ, 1967) และที่ความเข้มข้นสูง 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในตับและสมองของหนู (Palm และคณะ, 1967) จากการศึกษาผล MAOi ต่อเซลล์ตับของสุกร (Hoogenboom และคณะ, 1991) พบว่าเมแทบอลิซึมของฟูราโซลิโดนทั้งสองสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO ได้แบบไม่สามารถฟื้นกลับได้ ในมนุษย์ใช้ฟูราโซลิโดนยับยั้งเอนไซม์ MAO เพื่อรักษาอาการไม่ย่อยอาหาร ผักผ่อนไม่เพียงพอ อาการนอนไม่หลับ เป็นต้น (Palm และ Magnus, 1968)

2.1.2.2.2 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อฟูราโซลิโดนเข้าสู่ร่างกายจะถูกเมแทบอลิซึมเป็น 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน ซึ่งสามารถยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียได้โดย 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน จะทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างสายเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเกิดการถอดรหัสและแปลรหัสดีเอ็นเอได้ ส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และเพ็ปไทด์ได้ สุดท้ายเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ ใน *Vibrio cholerae* 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน จะยับยั้งดีเอ็นเอในส่วนการสร้างฟิลาเมนต์ (filament) ทำให้เชื้อขาดสมบัติในการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ (Chatterjee และ Raychaudhuri, 1971; Raychaudhuri และคณะ, 1970)

2.1.2.3 ผลกระทบของสารฟูราโซลิโดน

2.1.2.3.1 ผลกระทบต่อต่อมหมวกไตและต่อมไทรอยด์

Bartlet และ Khan (1990) รายงานผลกระทบของสารฟูราโซลิโดนต่อต่อมหมวกไตของไก่ที่ได้รับสารขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าการทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) ในชิ้นส่วนนอกของไตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ AST ในพลาสมา จากการศึกษาดังกล่าวจึงสามารถนำมาช่วยรักษาอาการ Cushing's syndrome หรือ อาการมีน้ำตาลคั่งหลังจากเปลือกต่อมหมวกไตมากเกินไป ซึ่งขนาดของยา

ที่สามารถควบคุมอาการ Cushing's syndrome ได้อยู่ที่ 0.04 เปรอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยน้ำหนัก ถึงอย่างไรก็ตามฟูราโซลิโดนจะถูกเปลี่ยนเป็นเมแทบอลิซึมที่เป็นพิษโดยไซโทโครม P450 ซึ่งมี เอนไซม์ออกซิเดสประกอบอยู่ในไมโทคอนเดรียส่วนชั้นนอกของไต เมแทบอลิซึมนี้จะเป็นพิษต่อ เซลล์ของไต จากการศึกษผลของสารฟูราโซลิโดนต่อความเข้มข้นของคอร์ติโคสเตอโรน (corticosterone) ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดหนึ่งพบที่เปลือกหมวกไต (Bartlet และ คณะ 1990) พบว่าเมื่อได้รับสารฟูราโซลิโดนขนาด 0.04 เปรอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยน้ำหนัก เป็นเวลา 10 วัน ระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนจะเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนนี้จะมีผลต่อการ กระตุ้นการสังเคราะห์ทางชีวภาพในต่อมหมวกไต และชักนำการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดส ต่างๆในตับ จากผลดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการไม่ต้องการรับประทานอาหาร และทำให้การ เจริญลดลง (Jager และคณะ, 1994)

2.1.2.3.2 ผลกระทบต่ออนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาการได้รับสารฟูราโซลิโดนขนาด 75 150 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยทางปากจะทำให้ปริมาณของกลูตาไทโอน (Glutathione-SH ,GSH) และ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซี ลดลงตามปริมาณของสารฟูราโซลิโดนที่ได้รับ และ ทำให้เกิดไลพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อของหนู (Ali, 1992) การเกิดไลพิดเพอร์ออกซิเดชันทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์ (superoxides) และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งมีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อต่างๆได้ (Stroo และ Schaffer, 1989)

2.1.2.3.3 ผลกระทบต่อการกลายพันธุ์

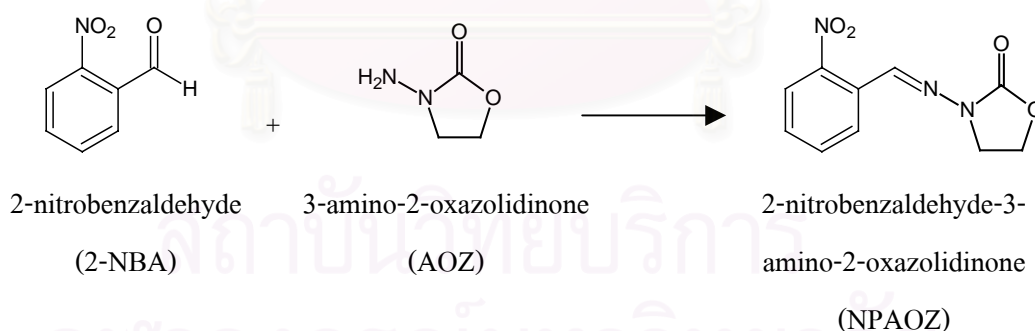
ไนโตรฟูแรนเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างแรง จากการ ทดสอบสารฟูราโซลิโดนต่อการเกิดกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* โดยใช้วิธีทดสอบ Ames test และ SOS-chromotest (Gajewska และคณะ, 1990; Basak, 1995) ผลที่ได้คือเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบเกิดการกลายพันธุ์ นอกจากนี้มีรายงานความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และขณะ เดียวกันยังสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟิลาเมนของเซลล์ *Vibrio cholerae* (Chatterjee และ Raychaudhuri, 1971; Raychaudhuri และคณะ, 1970) ดีเอ็นเอของฟาจ 149 คลอเรลา มีความไวอย่างสูงต่อการยับยั้งของฟูราโซลิโดน (Chatterjee และ Maiti, 1973) การ ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เกิดโดยเมแทบอลิซึมของสารฟูราโซลิโดนเมื่อเข้าสู่เซลล์เมแทบอลิซึม นี้จะไปเชื่อมระหว่างสายเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดปกติส่งผลให้เกิด การกลายพันธุ์ได้ทั้งแบบ transition และ transversion (Chatterjee และ Ghosh, 1979; Raychaudhuri

และคณะ, 1970) Banerjee และ Chatterjee (1984) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของฟูราโซลิโดนต่อการเกิดกลายพันธุ์ของเซลล์ *Vibrio cholerae* ต่อการต้านยาปฏิชีวนะ streptomycin ผลที่ได้คือสารฟูราโซลิโดนสามารถชักนำยีนที่มีความไวต่อ streptomycin (*Str-s*) ของเชื้อ *Vibrio cholerae* OGAWA 154 ให้เกิดการกลายพันธุ์เปลี่ยนไปเป็นยีนที่มีความสามารถต้าน streptomycin (*Str-r*) ได้ โดยที่ความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์จะเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของสารฟูราโซลิโดน 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.3 การตรวจวิเคราะห์สารฟูราโซลิโดน

การตรวจวิเคราะห์สารฟูราโซลิโดนโดยตรงในสัตว์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากสารฟูราโซลิโดนจะถูกเมแทบอลิซึมเป็น AOZ อย่างรวดเร็วภายในเวลาต่ำกว่า 2 ถึง 3 ชั่วโมง เมื่อเข้าสู่ร่างกาย และสร้างพันธะเพปไทด์กับเนื้อเยื่อ (Hoogenboom และคณะ, 1991, 1992; Gottschall และคณะ, 1995) (ดังรูปที่ 2.2) สาร AOZ นี้มีความเสถียรอย่างมากและสามารถสกัดออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้กรดเจือจางได้ (Hoogenboom และคณะ, 1991) อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์สาร AOZ นี้ก็ยังคงทำการตรวจได้ยากเนื่องจาก สาร AOZ เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กมากซึ่งไม่สามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ และถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็วเมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธีผ่านคอลัมน์ ดังนั้นเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สาร AOZ นี้ได้ จึงจำเป็นต้องทำการเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ คือ 2-ไนโตรเบนแซลดีไฮด์-3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (2-nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone; NPAOZ) (Leitner และคณะ, 2001) เสียก่อน ดังรูปที่ 2.3

2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการเปลี่ยนอนุพันธ์ของ AOZ เป็น NPAOZ

2.1.3.1 การตรวจวิเคราะห์ห่อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธีทางเคมี

การตรวจวิเคราะห์ห่อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธีทางเคมี เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำสูง การตรวจวิเคราะห์ห่อนุพันธ์สารดังกล่าวโดยวิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายวิธี และมีขีดความสามารถในการตรวจหา (limit of detection, LOD) แตกต่างกัน สรุปได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธีทางเคมี

เทคนิค	ขีดความสามารถในการตรวจ (LOD) (นาโนกรัมต่อกรัม)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
HPLC-UV	-	ตับ, ไต, กล้ามเนื้อ	Hoogenboom และคณะ, Food Additives and Contaminants, (1992), 9, 623-630
LC-MS	10	ตับ, กล้ามเนื้อ	McCracken และ Kennedy, Journal of Chromatography B, (1997), 691, 87-94
LC-MS-MS	0.5-5	เนื้อเยื่อ	Leitner และคณะ, Journal of Chromatography A, (2001), 939 49-58
HPLC-UV	-	ตับ	Conneely และคณะ, Analyst, (2002), 127, 705-709

การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการทางเคมีนี้ให้ผลที่แม่นยำสูง แต่มีขีดจำกัดหลายอย่างคือ การตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างทำได้น้อยตัวอย่างและมีราคาสูง ในการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มีราคาแพง และการดูแลรักษาเครื่องมือมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์

2.1.3.2 การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)

การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธี ELISA อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะอย่างสูง เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจคัดเลือกระดับเบื้องต้น เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียวกัน มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมี ไม่จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการ ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเครื่องมือมีราคาถูก ปัจจุบันมีรายงานการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออนุพันธ์ของสาร AOZ หรือ NPAOZ เพื่อใช้ในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ NPAOZ โดยวิธี ELISA พอสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การตรวจวิเคราะห์ห่อนุพันธ์ของสาร AOZ โดยวิธี ELISA

ความสามารถในการตรวจ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง	หมายเหตุ
65 (IC50)	-	Analytica chimica Acta,(2004),520, 79-86	โพลีโคลนอล แอนติบอดี
0.52-1.15(IC50)	-	Vet. Med. Czech,(2005), 50, 300-310	โมโนโคลนอล แอนติบอดี
0.4	เนื้อกึ่ง, เป็ด ไก่, วัว และ สุกร	Analytica chimica Acta,(2005),540, 285-292	โมโนโคลนอล แอนติบอดี
0.1	เนื้อสัตว์ ปลา ไข่ และนม	RIDASCREEN	ชุดตรวจ ELISA
0.2	ตับ และกึ่ง		
0.6 (สกัดในบัฟเฟอร์) 0.3 (สกัดในตัวทำละลาย) 0.3 (สกัดด้วยเฟสของแข็ง)	ไข่	Vet. Med. Czech,(2006), 51,248-257	โมโนโคลนอล แอนติบอดี

หมายเหตุ IC50 หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์

2.1.3.3 ข้อกำหนดในการตรวจหาสารตกค้างไนโตรฟูแรน

สารไนโตรฟูแรนเป็นสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรีย และมีรายงานว่าเมแทบอลิซึมของสารไนโตรฟูแรนอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้น คณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) และ สหภาพยุโรป จึงมีประกาศห้ามใช้สารไนโตรฟูแรน และ ต้องไม่พบสารไนโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภคเป็นอันตราย ดังนั้นจึงไม่สามารถกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่ยอมรับให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ (Maximum Residue Limits; MRLs) แต่เพื่อเป็นหลักให้ยึดถือในการปฏิบัติให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและช่วยให้การดำเนินธุรกิจเป็นไปได้อย่างต่อเนื่อง ทางสหภาพยุโรปจึงได้กำหนดค่าปริมาณต่ำสุดที่กำหนดให้ต้องแสดง (Minimum Required Performance Limits ; MRPL) รวมทั้งประเทศไทยด้วย ซึ่งแต่ละประเทศได้กำหนดค่า MRPL แตกต่างกันดังแสดงได้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ค่า MPRL ของเมแทบอลิซึมของฟูราโซลิโดน แต่ละประเทศ

ประเทศ	ค่า MPRL (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)	หมายเหตุ
RIKIT, เนเธอร์แลนด์	0.5	ข้อมูลปรับปรุงเมื่อเดือนมกราคม 2546 เปลี่ยน จาก 1.0 เป็น 0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร
DARDNI, อังกฤษ	1.0	ข้อมูลปรับปรุงเมื่อวันที่ 29มกราคม 2546 เปลี่ยนจาก 0.3 เป็น 1.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร
เยอรมัน	0.5	
ฝรั่งเศส	0.1-0.5	ค่า MRPL ขึ้นอยู่กับขีดจำกัดในการตัดสินใจ (Decision limit; CC α)
เบลเยียม	1.0	
อิตาลี	1.0	
สหรัฐอเมริกา	5.0	
ญี่ปุ่น	30.0	
ไทย	0.3	ข้อมูลจากประกาศของคณะกรรมการอาหาร และยาประเทศไทย

2.1.3.4 การสำรวจความเป็นไปได้ในการตรวจพบสารเมแทบอลิซึมของไนโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์อาหาร

จากการสำรวจสารตกค้างของสารเมแทบอลิซึมไนโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์อาหารภายในประเทศและผลิตภัณฑ์นำเข้าแสดงได้ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 สารตกค้างเมแทบอลิซึมไนโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์อาหาร

ชนิดของส่วนผสม	ความเข้มข้น เมแทบอลิซึมไนโตรฟูแรน (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)
1. ผลิตภัณฑ์ภายในประเทศ	
พริกไทยขาว	SEM = 47.5
ไข่แดง	AOZ = 2.7
แป้งสาลี	SEM = 0.47

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) สารตกค้างเมแทบอลิซึมในโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์อาหาร

ชนิดของส่วนผสม	ความเข้มข้น เมแทบอลิซึมในโตรฟูแรน (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)
1. ผลิตภัณฑ์ภายในประเทศ(ต่อ)	
เศษขนมปัง	SEM = 0.27
ส่วนผสมแบ่งเล็กสำเร็จรูป	SEM = 0.23
2. ผลิตภัณฑ์นำเข้า	
การจีแนน	SEM = 255
ผงไข่ขาว (ไข่ไก่)	AMAZ = 5.89, SEM = 3.31
ผงไข่แดง	AOZ = 34
เศษขนมปัง	AMAZ = 1.47, SEM = 3.31
ผงโปรตีน แยกจากโปรตีนถั่วเหลือง	SEM = 0.57
ผงไข่ขาว	AOZ = 0.07

แหล่งที่มา กรมการพัฒนาด้านปศุสัตว์ ประเทศไทย เดือนกันยายน พ.ศ. 2545 (Department of Livestock Development, DLD)

2.1.3.5 ผลกระทบด้านเศรษฐกิจ

ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหารแปรรูปเป็นอันดับสอง และใหญ่เป็นอันดับที่ 7 ในการผลิตผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสัตว์ปีก ตลาดในการส่งออกของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นประเทศญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป ปัจจุบันประเทศไทยมีรายได้การส่งออกออกไปยังสหภาพยุโรปลดลง เนื่องจากปัญหาเรื่องสารตกค้างโดยเฉพาะสารไนโตรฟูแรนจึงทำให้รัฐบาลต้องสูญเสียงบประมาณในการแก้ปัญหาเรื่องสารตกค้างประมาณ 7.2 ล้านดอลลาร์ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ส่งออก จึงควรมีการตรวจหาสารตกค้างก่อนที่จะส่งออกไปยังต่างประเทศ

2.1.4 การตรวจสารตกค้างโดยใช้การทดสอบทางอิมมูโนวิทยา

การตรวจหาสารตกค้างโดยใช้การทดสอบทางอิมมูโนวิทยาเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก และสามารถตรวจหาสารในตัวอย่างปริมาณมากได้ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากันระหว่างโมเลกุล 2 ชนิดคือ แอนติเจนและแอนติบอดี

2.1.4.1 แอนติเจน

แอนติเจน คือสารที่สามารถทำให้ตัวรับของอิมมูโนโกลบูลินของ B cells เกิดแอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพลกซ์ (Ag-Ab complex) หรือ ตัวรับของ T cells (T cells receptor) ทำให้เกิดโครงสร้างซับซ้อนระหว่างแอนติเจนกับ MHC (TCR-Ag-MHC complex) แล้วสามารถจดจำสารนั้นได้ สมบัติของของสารที่จะเป็นอิมมูโนเจนที่ดีได้ต้องมีองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ การเป็นสิ่งแปลกปลอม (foreignness) ขนาดของโมเลกุล โครงสร้างของสาร และเป็นสารซึ่งสามารถถูกย่อยให้สลายได้

เอพิโทป (epitope หรือ antigenic determinant) คือตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ แอนติเจน 1 โมเลกุลจะมีเอพิโทปได้มากมายและแอนติเจนชนิดหนึ่ง ๆ จะมีเอพิโทปบนโมเลกุลไม่เท่ากัน

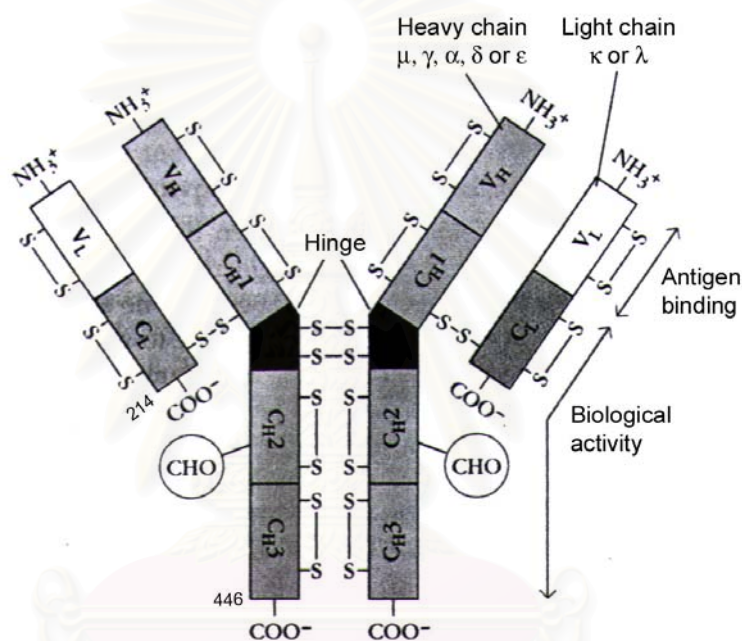
แฮปเทน (hapten) หมายถึงแอนติเจนที่มีขนาดเล็กมากและมีสมบัติไม่ครบถ้วน คือมีความจำเพาะกับแอนติบอดี แต่ไม่สามารถชักนำให้สร้างแอนติบอดีได้ แต่ถ้าแฮปเทนจับกับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าที่เรียกว่า พาหะ (carrier) จะสามารถชักนำให้สร้างแอนติบอดีได้

2.1.5 แอนติบอดี (antibody)

แอนติบอดี คือ โกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82 – 96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4 – 18 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ antigenic determinant หรือ เอพิโทปที่แปลกปลอม และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเอพิโทปนั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้ แอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในซีรัมส่วนแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) ถ้านำซีรัมของคนปกติมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จะแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ คือ อัลบูมิน และ โกลบูลินอีก 4 ส่วน คือ แอลฟา 1 (α_1) แอลฟา 2 (α_2) บีตา (β) และ แกมมา (γ) เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน เป็นผลผลิตของพลาสมาเซลล์ (plasma cell) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ไม่เพียงพบแต่ในซีรัมเท่านั้น ยังพบในส่วนน้ำอื่น ๆ ของร่างกาย และในเนื้อเยื่อ เช่น ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อม้ำเหลือง ม้าม และนอกจากนี้ยังพบบนผิวของ บี ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) ด้วย

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล (monomer) แสดงในรูปที่ 2.4 ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกันมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000-77,000 ดาลตัน และ light (L) chain 2 สายที่เหมือนกันมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) แรงยึดนี้สามารถแยก

ออกจากกันได้ด้วยสารเมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) ปลายข้างหนึ่งของสายพอลิเพปไทด์ เรียก NH_2 หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเรียกว่า COOH หรือ carboxy terminal โดยทุกสายจะหันปลายข้าง NH_2 หรือ COOH ไปทางเดียวกัน โดยอาศัยความแตกต่าง H chain สามารถแบ่งอิมมูโนโกลบูลิน ได้เป็น 5 ไอโซไทป์ คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE ซึ่งมี H chain ชนิด γ α μ δ และ ϵ ตามลำดับ H chain ของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละไอโซไทป์มีความแตกต่างกันในน้ำหนักรวมของโมเลกุล ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต antigenic determinant สมบัติทางชีวภาพ และการเคลื่อนที่เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกันสามารถแบ่ง L chain ออกได้เป็น 2 type คือ แคลป้า (κ) และ แลมป์ดา (λ)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน (Richard A. Goldsby และคณะ, Immunology, 2003, หน้า 77)

2.1.6 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มพลาสมาเซลล์ซึ่งกำเนิดมาจาก บี ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่อเอพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น แต่ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งรวมกันเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody)

2.1.6.1 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว พอลิโคลนอลแอนติบอดี คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์เมื่อได้รับการกระตุ้น โดยแอนติเจน แอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน 4 ประการหลัก

- แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

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

- ความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen specificity)

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

- สัมพรรคภาพ (affinity) และ อะวิติตี (avidity) ของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพ คือ ค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง และอะวิติตี คือ ผลรวมแต่ละตำแหน่งของการจับกับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งสัมพรรคภาพและอะวิติตี เป็นสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือบริเวณแปรผัน (variable region) สัมพรรคภาพเป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของบีลิมโฟไซต์ จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่าง ๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพมากน้อยต่างกัน ได้ ดัง

นั่นหากต้องการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีสัมพรรคภาพคิมน้อยเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น นอกจากนี้ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีนั้น ๆ ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลิน ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพคิมนั้นสูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากบีลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้นมียุติวิธีที่เป็นผลรวมของสัมพรรคภาพของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็มักอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

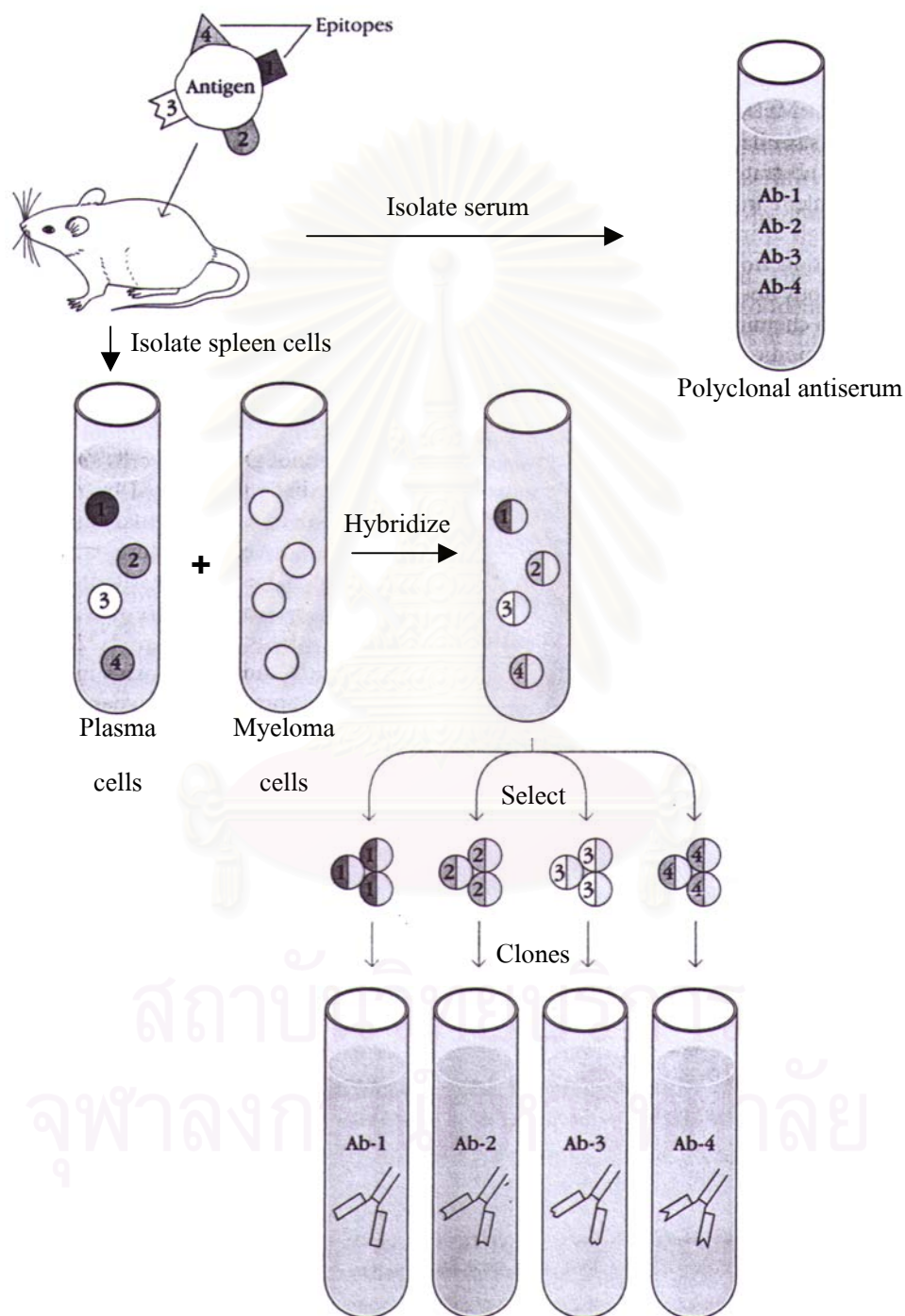
- Effector function

คือสมบัติที่จะถูกกำหนดด้วยบริเวณคงที่ (constant region) ของ H chain เป็นสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ เป็นต้น ซึ่งสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซไทป์และสับคลาสของอิมมูโนโกลบูลินนั้น ๆ ซึ่งจะกำหนดสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ให้มีสมบัติทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ แตกต่างกัน ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้านเนื่องจากอาศัยสมบัติของแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน

2.1.6.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิค somatic hybridization

ในร่างกายมีเซลล์บีลิมโฟไซต์หรือเซลล์พลาสมาที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการได้ แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวจะแบ่งตัวได้ไม่ดีและตายในเวลาอันสั้น ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลอดทดลองได้ ในขณะที่เดียวกันมีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งซึ่งกำเนิดมาจากเซลล์พลาสมา เรียกว่าเซลล์มะเร็งมัยอีโลมา (myeloma) มีสมบัติของเซลล์มะเร็ง คือ สามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไป เซลล์กลุ่มนี้อาจสูญเสียยีนอิมมูโนโกลบูลินไปทำให้ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ แต่จะสามารถสร้างแอนติบอดีได้ถ้าได้รับยีนอิมมูโนโกลบูลินจากเซลล์บีลิมโฟไซต์ หรือ เซลล์พลาสมาอื่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี somatic hybridization มีหลักการที่จะนำสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มารวมไว้ในเซลล์เดียวกัน โดยในปี ค.ศ. 1975 Köhler และ Milstein ได้คิดค้นวิธีเตรียมเซลล์ให้สามารถสร้างแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะได้และสามารถสร้างได้เป็นจำนวนมาก โดยอาศัยหลักการของการหลอมเซลล์ (cell fusion) หรือ somatic cell hybridization ระหว่างบีลิมโฟไซต์ปกติ ซึ่งเป็นเซลล์สร้างแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งมัยอีโลมา หรือ plasmacytomas ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง โดยอาศัยสารที่ช่วยให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol, PEG) ผลการทำหลอมรวมเซลล์ก่อให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการและมีอายุยืนยาวไม่ตายตามสมบัติของ เซลล์มะเร็งมัยอีโลมา เรียกเซลล์นี้ว่า

ไฮบริโดมา (hybridoma) และแอนติบอดีที่ได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากแอนติบอดีนี้ จะสร้างจากเซลล์ที่มาจากโคลนเดียวกันและมีความจำเพาะต่อเอพิโทปที่เป็นตัวชักนำให้สร้างมา เท่านั้น ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค somatic hybridization แสดงดังรูปที่ 2.5

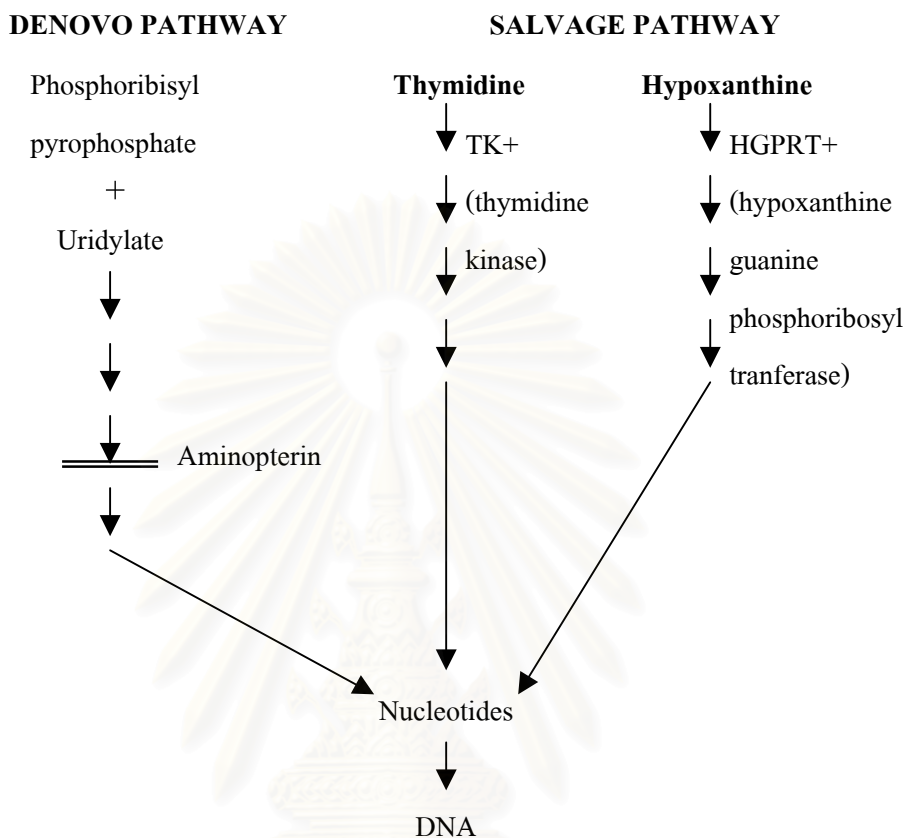


รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค somatic hybridization (Richard A. Goldsby และคณะ, Immunology, 2003, หน้า 99)

Köhler และ Milstein (1975) รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีโดยเทคนิค somatic hybridization โดยเริ่มต้นการฉีดกระตุ้นหนูขาวด้วยแอนติเจนที่ต้องการ พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนในระดับที่สูง จึงนำม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของหนูมาทำการแยกเอาเซลล์บีลิมนโฟไซต์ เพื่อนำมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาของหนูขาว โดยใช้ Sendai virus หรือสารพอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสื่อ โดยพบว่าพอลิเอทิลีนไกลคอลมีสมบัติทำให้เชื่อมหุ้มเซลล์นุ่มและเหนียวหนืด เพื่อให้เซลล์สองเซลล์ที่เข้ามาติดกันสามารถหลอมรวมเป็นเซลล์เดียวกันได้ แต่เนื่องจากความเป็นพิษของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีต่อเซลล์จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการหลอมรวมเซลล์ ซึ่งพบว่า การใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 8.0-8.2 โดยใช้เวลาในการเชื่อมเซลล์ 1-2 นาที จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และต่อจากขั้นตอนการหลอมเซลล์แล้วจำเป็นต้องหาวิธีการคัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมา เนื่องจากเซลล์มัยอีโลมาที่เป็นเซลล์มะเร็งที่เติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุมเซลล์ไฮบริโดมาโดยการใช้อาหารคัดเลือก (selective media) ซึ่งมีสาร hypoxanthine, aminopterin และ thymidine เรียกว่า HAT medium ซึ่งมีสมบัติที่ทำให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นเจริญเติบโต (รูปที่ 2.6) โดยสาร aminopterin เป็นอนุพันธ์ของกรดโฟลิก (folic acid analog) สามารถจับกับเอนไซม์ folic acid reductase ทำให้ยับยั้งโคเอนไซม์ที่จะใช้ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทาง de novo biosynthesis เซลล์ที่จะรอดชีวิตใน HAT medium ได้จึงจะต้องมีการสร้างนิวคลีโอไทด์ผ่านทาง salvage pathway ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ 2 ตัวที่สำคัญ คือ thymidine kinase (TK) และ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งไป จะไม่สามารถสร้างนิวคลีโอไทด์ได้ แต่ถ้ามีเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ TK หรือ HGPRT ไปทำการหลอมรวมกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ก็จะให้เซลล์ลูกผสม หรือเซลล์ไฮบริโดมาสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ใน HAT medium

เซลล์มัยอีโลมาที่นำมาใช้ในการหลอมรวมกับเซลล์บี ลิมโฟไซต์ เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมานี้เป็นเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมา (plasmacytoma) ที่แยกได้จากหนู mice โดยนำมาทำให้มีสมบัติขาดเอนไซม์ HGPRT (HGPRT⁻) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร 6-thioguanine หรือ 8-azaguanine ซึ่งเป็น guanine base analogue และมีความเป็นพิษ เมื่อเซลล์มัยอีโลมาใช้สารนี้ที่สามารถเข้าไปแทนที่เบสกวานีนในการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เอนไซม์ HGPRT ทำให้ได้สายนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติ ซึ่งจะทำให้เซลล์มัยอีโลมาตายในที่สุด แต่เซลล์มัยอีโลมาบางตัวสามารถปรับตัวให้มีชีวิตรอดได้โดยเกิดการกลายพันธุ์ สามารถใช้เอนไซม์ HGPRT ในการสร้างสายนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะนำเซลล์มัยอีโลมาที่มีสมบัติ HGPRT⁻ เหล่านี้มาหลอมรวมกับเซลล์บีลิมนโฟไซต์ที่เป็นเซลล์ปกติ แล้วนำไปเลี้ยงใน HAT medium โดยเซลล์ที่จะมีชีวิตรอดคือ เซลล์ที่เกิดการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์มัยอีโลมา (HGPRT⁻) และเซลล์บีลิมนโฟไซต์ โดยอาศัยสมบัติเด่นของเซลล์มะเร็งที่เจริญเติบโตได้ดีในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และสมบัติทาง

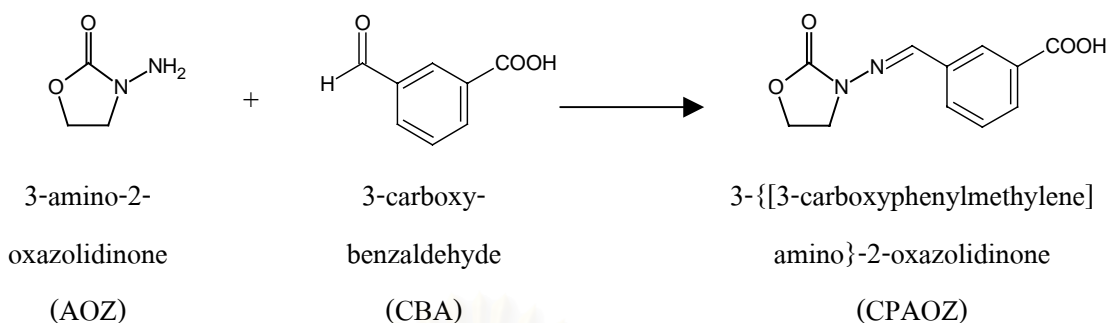
จีโนมของเซลล์บีลิมีโฟไซต์ในการสร้างแอนติบอดี โดยเซลล์บีลิมีโฟไซต์ที่ไม่ได้เกิดการหลอมรวมตัวกับเซลล์มัยอีโลมาจะตายตามธรรมชาติภายในระยะเวลา 3-7 วัน



รูปที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ไฮบริโดมา

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

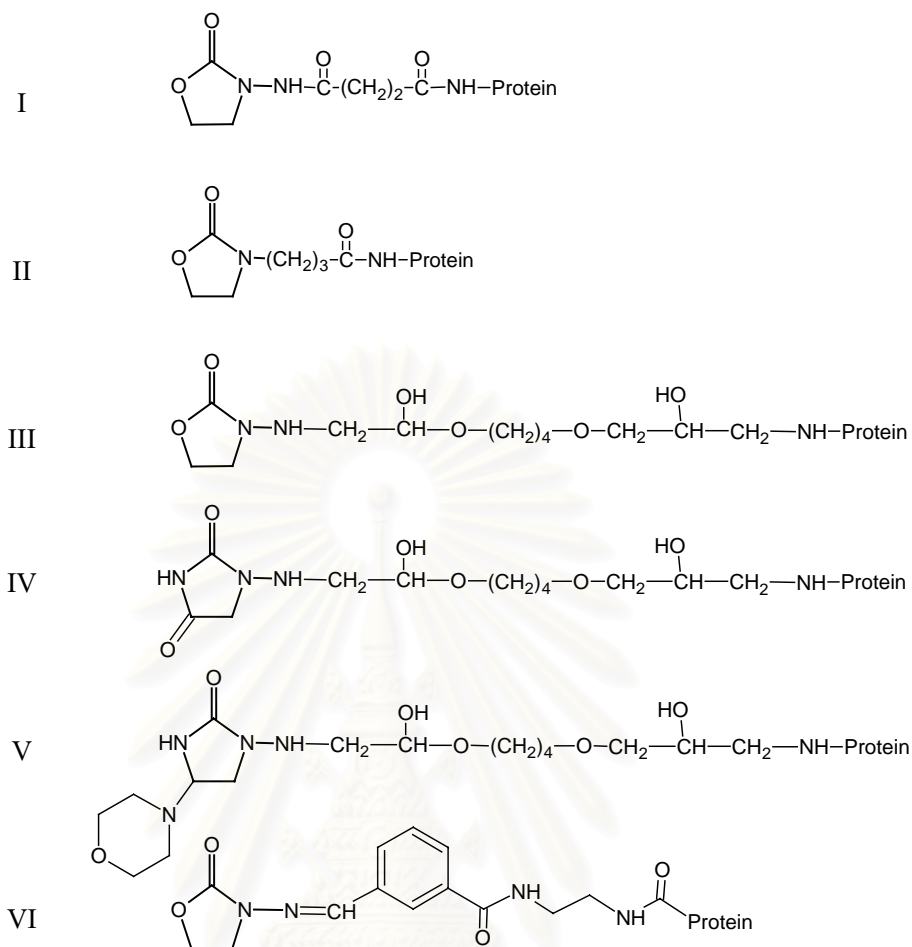
Cooper และคณะ (2004) ได้รายงานการผลิตและศึกษาลักษณะพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่ออนุพันธ์ของ AOZ ซึ่งเป็นเมแทบอลิซ์ของไนโตรฟูเรน โดยวิธี ELISA ครั้งแรก โดยทำการเปลี่ยน AOZ ให้อยู่ในรูป CPAOZ ดังรูปที่ 2.7 จากนั้นนำ CPAOZ มาเชื่อมติดกับโปรตีน human serum albumin (HSA) แล้วจึงนำมาฉีดกระตุ้นในกระต่ายที่ระดับความเข้มข้นและช่วงเวลาในกระตุ้นต่างๆ ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี competitive ELISA ผลที่ได้คือจากการลดความเข้มข้นของแอนติเจนจาก 0.3 เป็น 0.05 มิลลิกรัม และเพิ่มช่วงการกระตุ้นจาก 2 สัปดาห์ เป็น 8 สัปดาห์ สามารถเพิ่มความไวของแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ จาก 3.8 เป็น 0.3 ไมโครกรัม/ลิตร และสามารถนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้เพื่อใช้การตรวจหาสาร AOZ ในรูปอนุพันธ์ได้



รูปที่ 2.7 การเปลี่ยนสาร AOZ เป็น CPAOZ

Vass และคณะ (2005) รายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อจำเพาะต่ออนุพันธ์ของ AOZ โดยทำการเปลี่ยน AOZ ให้อยู่ในรูป CPAOZ และนำมาเชื่อมเข้ากับ ed-HSA (ethylenediamine-human serum albumin) เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ผลที่ได้คือสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ ได้ โดยต้องการเปลี่ยน AOZ ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์คือ NPAOZ เสียก่อน ดังรูปที่ 2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ให้ค่า IC50 (50% binding inhibition) ต่อ NPAOZ อยู่ในช่วง 0.52-1.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี direct ELISA

Diblikova และคณะ (2005) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ โดยทำการเชื่อมสาร AOZ กับโปรตีนโดยวิธีต่างๆ ดังรูปที่ 2.8 และ CPAOZ กับโปรตีน เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง ผลที่ได้คือ แอนติเจน I-VI ไม่ประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ ได้ มีเพียงแต่ CPAOZ ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ NPAOZ ได้ นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบตรวจหา AOZ ในตัวอย่างโดยวิธี ELISA ผลที่ได้คือสามารถตรวจหาสาร AOZ โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูป NPAOZ ที่ระดับความสามารถในการตรวจอยู่ที่ 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง ไข่ วั และ เนื้อสุกร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบโดยวิธี LC-MS/MS มีความไวในการตรวจ NPAOZ อยู่ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความสัมพันธ์ในการตรวจวิธี ELISA กับ LC-MS/MS ในเนื้อกึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-32.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($r = 0.999$, $n=8$) สำหรับในเนื้อ ไข่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($r = 0.999$, $n=8$)



รูปที่ 2.8 การเชื่อมสาร AOZ เข้ากับโปรตีนโดยวิธีต่างๆ (Diblikova และคณะ (2005))

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 หนูขาว (swiss mice) สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
3.1.2 หนูขาว สายพันธุ์ ICR เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
3.1.3 เซลล์มะเร็งอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NSI)	ATCC No: TIB 18
3.1.4 อุปกรณ์ต่างๆ	
กระบอกฉีดขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
ขวดแก้ว	Boro (Germany)
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
เข็มฉีดยาขนาด 18G, 21G และ 22G	Nipro (Thailand)
หลอดฉีดขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
เครื่องชั่งน้ำหนัก AG204	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องชั่งน้ำหนัก PG4002-5	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE (England)
เครื่องมือนับเซลล์	Boeco (Germany)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับเลี้ยงเซลล์	Nunc (Denmark)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA	Nunc (Denmark)
จานชนิด 24 หลุม	Nunc (Denmark)
ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson (France)
ไมโครปิเปต	Biohit (Finland)
ปั๊มสุญญากาศ	Iwaki (Japan)
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambridge (Thailand)

3.1.4 อุปกรณ์ต่างๆ(ต่อ)

หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
หม้อน้ำแช่แข็ง	Udono-RII (Japan)
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
1-aminohydantoin (AHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-(2-Nitrobenzylidenamino)-2, 4-imidazolidinedione (NPAHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride (EDC)	Sigma-Aldrich	USA
2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)	Pierce	USA
2-Nitrobenzaldehyde semicarbazone(NPSCA)	Sigma-Aldrich	USA
3-{{(2-nitrophenyl)methylene} amino}-2-oxazolidinone) (NPAOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-carboxybezaldehyde (CBA)	Sigma-Aldrich	USA
5-(Morpholinomethyl)-3-(2-nitrobenzylidenamino)-2-oxazolidinone (NPAMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
5-morpholinomethyl-3-amino-oxazolidinone (AMOZ)	Sigma-Aldrich	USA

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย(ต่อ)

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich	USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich	USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	USA
Butanol	Merck	Germany
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	USA
Citric monohydrate	Merck	Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich	USA
Copper sulfate	Fluka	Switzerland
D-glucose	Sigma-Aldrich	USA
Diethyl ether	Sigma-Aldrich	USA
Dimethyl sulfoxide	Fluka	Switzerland
Disodium carbonate	Fluka	Switzerland
Disodium hydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich	USA
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich	USA
Fetal bovine serum	Invitromex	USA
Flumequine	Sigma-Aldrich	USA
Folin-Ciocalteu Phenol reagent	Sigma-Aldrich	USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich	USA
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich	USA
Glycerol	Sigma-Aldrich	USA
Glycine	Merck	Germany
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	USA
Hydrogen peroxide	Fluka	Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich	USA

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย(ต่อ)

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
L-glutamine	Sigma-Aldrich	USA
L-lysine	Sigma-Aldrich	USA
Methanol	BDH	England
N-hydroxysuccimide ester (NHS)	Fluka	Switzerland
Non-fat dry milk	Mission health food	Thailand
Norfloxacin	Sigma-Aldrich	USA
O-phenylenediamine dihydrochloride(OPD)	Sigma-Aldrich	USA
Ovalbumin (OVA)	Ovalbumin (OVA)	USA
Oxytetracycline	Fluka	Switzerland
Penicillin G	Sigma-Aldrich	USA
Peroxidase Goat anti-mouse IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	USA
Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	Zymed	USA
Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich	USA
Potassium chloride	Sigma-Aldrich	USA
Potassium dihydrogen phosphate	Sigma-Aldrich	USA
Pyridine	Carlo Erba	USA
Pyruvic acid	Invitromex	USA
RPMI 1640 medium	Invitromex	USA
Salbutamol	Sigma-Aldrich	USA
Semicarbazide (SEM)	Sigma-Aldrich	USA
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich	USA
Sodium carbonate	Merck	Germany
Sodium chloride	Merck	Germany

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย(ต่อ)

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Sodium dihydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Sodium dodecyl sulphate	Merck	Germany
Sodium hydrogen carbonate	Merck	Germany
Sodium hydroxide	Merck	Germany
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich	USA
Sulfamethazine	Sigma-Aldrich	USA
Sulfuric acid	Merck	Germany
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	USA
Trisodium citrate	Fluka	Switzerland
Tween 20	Sigma-Aldrich	USA

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การสังเคราะห์สาร CPAOZ

การเตรียมสาร CPAOZ ตามวิธีของ Cooper และคณะ, 2004 โดยนำ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone; AOZ) ความเข้มข้น 2 โมล มาทำปฏิกิริยากับ 3-คาร์บอกซีเบนแซลดีไฮด์ (3-carboxybenzaldehyde; CBA) 1 โมล โดยวิธีการกลั่นไหลกลับในไฟรดินปราศจากน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี MALDI-TOF/MS และวิธี thin layer chromatography (TLC) ใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ เมธานอลในคลอโรฟอร์มเป็นโมบายเฟส คำนวณค่า R_f เทียบกับ R_f ของ Copper และคณะ

$$R_f (\text{ค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์}) = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3.3.2 การเชื่อมต่อระหว่าง CPAOZ และ AOZ กับโปรตีนพาหะต่างๆ

3.3.2.1 การเชื่อมสาร CPAOZ กับ โปรตีนพาหะ โดยวิธี EDC

โปรตีนพาหะที่ใช้คือ ovalbumin (OVA) และ ed-BSA (ethylenediamine-Bovine serum albumin) ซึ่ง ed-BSA คือ โปรตีน BSA ที่ทำการเพิ่มหมู่เอมีนโดยทำการเชื่อมไคเอมีนเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีน (Hermanson, 1996) เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกได้มากยิ่งขึ้น ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นในสัตว์ทดลองได้เพิ่มมากขึ้น ทำได้โดยละลาย BSA 25 มิลลิกรัม ใน ethylenediamine (EDA) ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในสารละลาย 0.1 โมลลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) pH 7.4 เติม EDC 10 มิลลิกรัม กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกโดยใช้การแยกชั้นผ่านเยื่อบางและใช้ PBS ในการทวน

นำ CPAOZ ที่ได้จากข้อ 3.3.1 ทำการเชื่อมกับโปรตีนพาหะโดย นำสาร CPAOZ 2 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 100 ไมโครลิตร เติมสาร EDC ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลลาร์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้มาค่อยๆ เติมใน ed-BSA หรือ OVA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกโดยใช้การแยกชั้นผ่านเยื่อบางและใช้ PBS ในการทวน หลังจากนั้นนำมาวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ตามข้อที่ 3.3.2.5 และวัดการเชื่อมติดตามข้อที่ 3.3.3

3.3.2.2 การเชื่อมสาร AOZ กับ โปรตีนพาหะ โดยใช้ glutaraldehyde

โปรตีนพาหะที่ใช้คือ OVA และ ed-BSA ทำการเชื่อมโดยนำ AOZ ความเข้มข้นโมล 100 เท่าของความเข้มข้นโมลของโปรตีน ละลายใน PBS เติมสารละลาย glutaraldehyde ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25 เปอร์เซ็นต์ กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกชั้นผ่านเยื่อบางและใช้ PBS ในการทวน หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และวัดการเชื่อมติดโดยวิธี ตามข้อ 3.3.3.2 และ 3.3.3.3

3.3.2.3 การเชื่อมสาร AOZ กับ โปรตีนพาหะ โดยวิธี EDC/NHS

เชื่อมโปรตีน BSA และ OVA กับ AOZ โดยนำโปรตีน 10 มิลลิกรัม ละลายใน PBS 1 มิลลิลิตร เติมสาร EDC และ NHS ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลลาร์ และ 25 มิลลิโมลลาร์ ตามลำดับ กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นค่อยๆ เติมสาร AOZ 2 มิลลิกรัม กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกชั้นผ่านเยื่อบาง

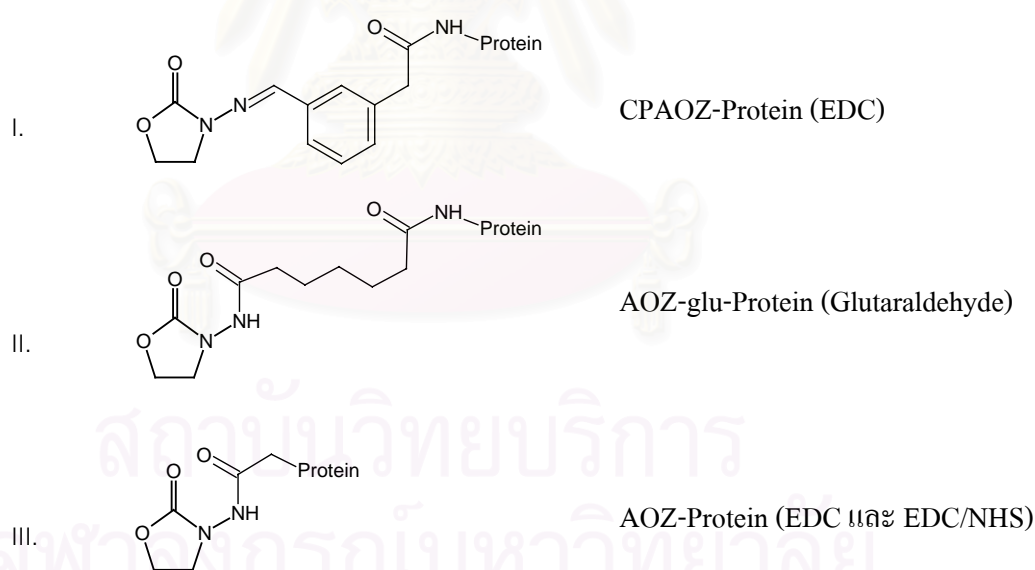
และใช้ PBS ในการทวน หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และวัดการเชื่อมติดโดยวิธี ตามข้อ 3.3.3.2 และ 3.3.3.3

3.3.2.4 การเชื่อมสาร AOZ กับ โปรตีนพหุ โดยวิธี EDC

ทำการเชื่อมสารตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.3 แต่ไม่เติมสาร NHS

3.3.2.5 หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

หาปริมาณโปรตีนหลังจากเชื่อมสาร CPAOZ และ AOZ กับโปรตีนพหุ โดยทำการหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน BSA ขั้นตอนการทำคือ เตรียมความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายโปรตีน 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย รีเอเจนต์ ซี (Reagent C) (ภาคผนวก ข.4) 250 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายรีเอเจนต์ ดี (Reagent D) (ภาคผนวก ข.4) 25 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



รูปที่ 3.1 โครงสร้างการเชื่อมสารติดกับโปรตีนพหุโดยใช้สารเชื่อมต่างๆ

- I. การเชื่อมสาร CPAOZ กับโปรตีนพหุโดยสารเชื่อม EDC
- II. การเชื่อมสาร AOZ กับโปรตีนพหุโดยสารเชื่อม glutaraldehyde
- III. การเชื่อมสารกับ AOZ กับโปรตีนพหุโดยสารเชื่อม EDC และ EDC/NHS

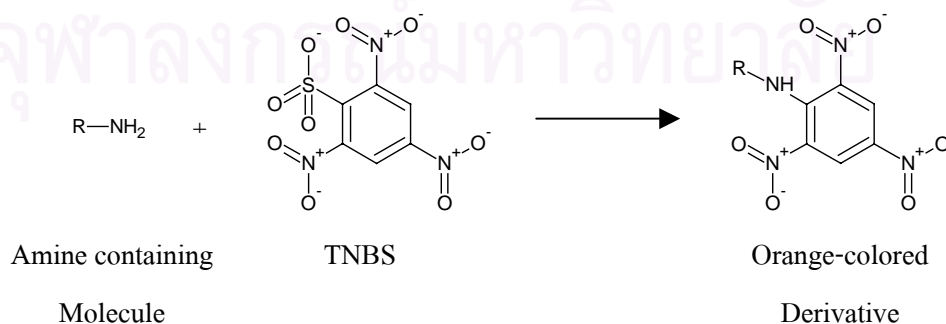
3.3.3 การทดสอบการเชื่อมสารกับโปรตีนพหุ

3.3.3.1 การทดสอบการเชื่อมสารกับโปรตีนโดยวิธี 2,4,6-Trinitrobenzene

Sulfonic Acid (TNBS) (Habeeb, 1966)

วิธี TNBS เป็นวิธีที่ใช้วัดหมู่เอมีนปฐมภูมิในโมเลกุล โดยหลักการของ TNBS คือ สารละลาย TNBS เป็นสารละลายสีเหลือง ทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนปฐมภูมิที่อยู่บนโมเลกุลของสารเกิดเป็นสารอนุพันธ์ซึ่งเป็นสารสีส้ม แสดงการเกิดปฏิกิริยาได้ดังรูปที่ 3.2 ซึ่งสามารถนำมาใช้วัดการเชื่อมสารติดกับโปรตีนคือก่อนนำสารมาเชื่อมติดบนโมเลกุลของโปรตีนจะมีหมู่เอมีน ซึ่งเมื่อนำสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกมาติดกับหมู่เอมีนบนโมเลกุลของโปรตีนจะทำให้หมู่เอมีนบนโมเลกุลของโปรตีนลดลง เมื่อนำมาวัดโดยวิธี TNBS จะเกิดสารละลายสีส้มลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนที่ยังไม่ได้ทำการเชื่อมติด วิธี TNBS ทำได้โดย เติมสารละลาย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) TNBS 50 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างที่ละลายใน 0.1 โมลลาร์ โซเดียมไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 8.5 ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS 50 ไมโครลิตร และ 1 โมลลาร์ กรดไฮโดรคลอริก 25 ไมโครลิตร แต่ละตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดได้ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด} = \frac{A_{335} \text{ โปรตีนก่อนเชื่อมติด} - A_{335} \text{ โปรตีนหลังเชื่อมติด}}{A_{335} \text{ โปรตีนหลังเชื่อมติด}} \times 100$$



รูปที่ 3.2 การเกิดปฏิกิริยาของ TNBS กับหมู่เอมีนปฐมภูมิ

3.3.3.2 การทดสอบการเชื่อมสารกับโปรตีนโดยวิธี MALDI-TOF/MS

เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหลังจากการเชื่อมติด โดยดูว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพาหะเพิ่มขึ้นหรือไม่ หากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพาหะเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารที่ใช้ในการเชื่อมติดติดกับโปรตีนพาหะ ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพาหะก่อนและหลังการทำการเชื่อมติด ด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สามารถคำนวณอัตราส่วนการเชื่อมติดได้จากสูตร

$$\text{อัตราส่วนการเชื่อมติด} = \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลหลังเชื่อมติด} - \text{น้ำหนักโมเลกุลก่อนเชื่อมติด}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของสารที่นำมาเชื่อมติด}}$$

3.3.4 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง

นำแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 ฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c หรือ ICR เพศเมีย อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ ตัวละ 50-100 ไมโครกรัมต่อตัว ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก จะใช้แอนติเจน PBS ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยผสมให้มีลักษณะเป็นอิมัลชัน (emulsion) ก่อนฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู (intraperitoneal) หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นหนูซ้ำโดยใช้ปริมาณแอนติเจนเท่าเดิมแต่ผสม Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในวันที่ 14 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และฉีดเว้นอย่างน้อย 2 อาทิตย์ 3-4 ครั้ง เก็บเลือดหลังฉีด 5-7 วัน เตรียมซีรัมจากเลือดที่เก็บได้โดยเจาะเลือดจากหางหนูแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 - 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใสนำไปตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA ตามรายละเอียดในข้อ 3.3.6 และถ้ามีระดับแอนติบอดีสูง ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายใช้ความเข้มข้นแอนติเจนเท่ากับความเข้มข้นในการกระตุ้นแต่ผสมกับน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เข้าที่ช่องท้อง 3-4 วัน ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์

3.3.5 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

3.3.5.1 การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา

นำเซลล์มัยอิโลมา NSI มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอิโลมาให้ได้จำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์มัยอิโลมาออกมาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่ไม่มีซีรัม 2 ครั้ง โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเซลล์ไว้ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหลอมรวมเซลล์

3.3.5.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

นำหนู BALB/c หรือ ICR ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนและให้ระดับแอนติบอดีสูง มาสลบโดยใช้ไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) เปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดขนาด 5 มิลลิลิตร กดม้ามให้ผ่านตะแกรงลวดตาถี่ นำเซลล์ม้ามไปปั่นเวียงใน RPMI 1640 ที่ไม่มีซีรัม ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง

3.3.5.3 การหลอมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมา

ผสมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมาในอัตราส่วน 1:2 รวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองผสมกัน นำไปปั่นเวียงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งจนหยดสุดท้าย เคาะเบาหลอดเบาๆ ให้เซลล์ผสมเข้ากันดี ค่อยๆ หยด 50 เปอร์เซ็นต์ พอลิเอทิลีนไกลคอล (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับเขย่าเบาๆ โดยควบคุมให้สารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ พอลิเอทิลีนไกลคอลไหลภายใน 1 นาที จากนั้นค่อยๆ หยดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ภายใน 1-2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร ภายใน 2-5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ จนครบ 40 มิลลิลิตร นำไปปั่นเวียงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก เทส่วนใสทิ้ง ทำการปั่นเวียงล้างอีก 1 รอบ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ลงไปประมาณ 200 มิลลิลิตร นำเซลล์ใส่ในจานสำหรับเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ คอยสังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ประมาณ 1-2 สัปดาห์ รอจนโคโลนีเจริญประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของหลุม ทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี ทำการโคลนเซลล์จนให้ได้เซลล์เดี่ยว

3.3.6 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPAOZ หรือ AOZ โดยวิธี indirect ELISA

นำ CPAOZ-OVA หรือ AOZ-glu-OVA หรือ AOZ-OVA มาเคลือบบนพื้นหลุมของจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-16

ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่มี tween20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง ใส่ตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horse redish peroxidase (HRP) เชื่อมอยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง และเติมสารละลายสับสเตรต OPD (ภาคผนวก ข.2) หลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่มีไดออกซิมิฮ้อง เป็นเวลา 15-30 นาที เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 2.5 โมลลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

3.3.7 การโคลนเซลล์ (single cell cloning) และทำให้เจือจางโดยวิธี Limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดี แล้วให้ผล ELISA เป็นบวก นำมาทำให้เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า จนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปใส่ลงในจานสำหรับเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม จำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม) ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร จะได้เซลล์ไฮบริโดมาปริมาณ 8 เซลล์ 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% ประมาณ 14 วัน ตรวจสอบเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ เลือกหลุมที่มีเซลล์ 1 โคลโลนี เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมนำไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA ตามข้อ 3.3.6 ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน

3.3.8 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาระยะยาว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่อยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียลซึ่งเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี 10% FCS มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 25 เปอร์เซ็นต์ และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์ ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ Pasteur pipette เป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดี ใส่เซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.3.9 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.3.9.1 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี และแอนติเจนที่เหมาะสม ด้วยวิธี indirect ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยง เซลล์มีความเข้มข้นมากเมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA จะทำให้เกิดสัญญาณรบกวน และ เป็นการสิ้นเปลืองแอนติบอดี จึงต้องหาความเจือจางที่เหมาะสมเพื่อนำความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้ สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป โดยทำการเคลือบจาน ชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA ด้วย CPAOZ-OVA หรือ Aoz-glu-OVA หรือ Aoz-OVA ความเข้มข้นต่างๆ (0.094–3.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS ที่ความเจือจางต่างๆ (2-16 เท่า) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6

3.3.9.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการทดลองตามข้อแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม Isotyping specific antibody ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:1000 นำไปเติมในงานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HRP-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:600 ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของแอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H₂O₂ ละลายใน citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาแอนไซม์โดยเติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 2.5 โมลลาร์ หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำงานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA ไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

3.3.9.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี competitive indirect ELISA

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี competitive indirect ELISA ทำได้โดย นำแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.9.1 มาผสมรวมกับสารที่ทำการทดสอบ (CPAOZ, NPAOZ, AOZ และ furazolidone) ที่ความเข้มข้น $10^3 - 10^4$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในPBS แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า IC50 ซึ่งคือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสาร สามารถคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 โดยใช้สมการในการคำนวณคือ

$$y = B + \{(B_0 - B) / [1 + 10^{((\log IC50 - x) * \text{slope})}]\}$$

เมื่อ B, B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีหรือไม่มีแอนติเจน ตามลำดับ
 y คือ เปอร์เซ็นต์ของ B/B_0
 x คือ ความเข้มข้นของสารหรือแอนติเจนที่นำมาทดสอบ

ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ หรือ LOD
 คำนวณจากสูตร

$$\text{Limit of detection (LOD)} = B_0 - 3SD \text{ โดยที่ } n \geq 20$$

เมื่อ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน
 SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.9.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารทั้งในกลุ่มไนโตรฟูแรน และนอกกลุ่มหรือไม่ ทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA นำสารที่นำมาทดสอบปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆผสมกับแอนติบอดีในอัตราส่วน 1:1 นำสารละลายตัวอย่างมาทดสอบตามรายละเอียดในข้อ 3.3.9.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC50 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 และนำค่า IC50 ที่ได้จากการคำนวณมาหาเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) ได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{\text{IC50 ของ CPAOZ}}{\text{IC50 ของสารที่ใช้แข่งจับ}} \times 100$$

3.3.10 การทำโมนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.3.10.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมนโคลนอลแอนติบอดีเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์ไฮบริโดมาผลิตและหลั่งโมนโคลนอลแอนติบอดีออกมาซึ่งจะสะสมรวมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยโปรตีนเอ

3.3.10.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ (Protein A affinity column)

นำโปรตีน เอ 5 มิลลิลิตรเติมใส่คอลัมน์ ทำคอลัมน์ให้สมดุลโดยเติม 0.1 โมลลาร์ phosphate buffer, pH 9 ที่มีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 โมลลาร์ ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 9 โดยใช้บัฟเฟอร์ 1 โมลลาร์ Tris, pH 9 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ชะล้างโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับโปรตีน เอ ด้วย 0.1 โมลลาร์ phosphate buffer, pH 8 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยการเติม 0.1 โมลลาร์ citrate buffer, pH 3.5 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมกับการใช้หลอดทดลองที่มี 4 M Tris ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการรวมแต่ละหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และนำมาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 3.3.2.5 และหาปริมาณแอนติบอดีตามวิธีข้อ 3.3.10.3

3.3.10.3 การหาปริมาณแอนติบอดี

นำโมนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีนเอไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแอนติบอดีได้จากสูตร (Johnstone และ Thorpe, 1987)

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

หมายเหตุ : ค่า extinction coefficient ของ IgG เท่ากับ 13.6

หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยหาจากกราฟมาตรฐานแอนติบอดีบริสุทธิ์ (ภาคผนวก ก.2) ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยวิธี indirect ELISA และหาปริมาณโปรตีนในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี Lowry

3.3.11 การหาความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนและหลังจากทำให้บริสุทธิ์

3.3.11.1 หาความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโพรเซสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE)

การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น

เตรียมเจลโดยใช้กระจก 2 แผ่น มีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1.5 มิลลิเมตร ประกอบเป็นแม่พิมพ์ นำ separating gel 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.5) เทลงในกระจกแม่พิมพ์อย่างช้าๆระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแผ่นเจลแข็งตัว ประมาณ 1 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นส่วนบนทิ้ง จากนั้นเทสารละลาย stacking gel 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.5) ใส่แม่พิมพ์ช่องเจล (comb) ทิ้งให้เจลแข็งตัว ประมาณ 1 ชั่วโมง

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร ผสมกับ สีย้อมโปรตีนที่มีเอสดีเอส (ภาคผนวก ข.5) 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำไปหยดลงในช่องเจล ตัวอย่างละ 40 ไมโครลิตรต่อช่อง

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ β -galactosidase (น้ำหนักโมเลกุล 117 กิโลดอลตัน) BSA (น้ำหนักโมเลกุล 85 กิโลดอลตัน) OVA (น้ำหนักโมเลกุล 49 กิโลดอลตัน) Carbonic anhydrase (น้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดอลตัน) β -lactoglobulin (น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดอลตัน) Lysozyme (น้ำหนักโมเลกุล 19 กิโลดอลตัน)

การทำอิเล็กโทรฟอเรซิส

นำแผ่นเจลที่เตรียมประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรฟอเรซิส บรรจุลงในอ่างบัฟเฟอร์ที่มี running buffer (ภาคผนวก ข.5) ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จึงทำการหยุดกระแสไฟฟ้า

การย้อมสีโปรตีนในแผ่นพอลิอะคริลอะไมด์เจล

นำแผ่นเจลที่ผ่านขั้นตอนการทำอิเล็กโทรฟอเรซิส ไปย้อมในสารละลายยูมาซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250 (ภาคผนวก ข.5) เป็นเวลา 20 นาที ล้างสีออกโดยแช่ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destainimg solution) (ภาคผนวก ข.5) จนกระทั่งเห็นแถบสีโปรตีนชัดเจน

3.3.11.2 หาค่าความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีจากการหาปริมาณโปรตีนและแอนติบอดี

นำค่าการหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์มาทำการเปรียบเทียบกับค่าการหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากข้อ 3.3.10.3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์บริสุทธิ์ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์บริสุทธิ์} = \frac{\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนก่อน}} \times 100$$

3.3.12 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทดสอบความไวด้วยวิธี competitive indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.9.3

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์สาร CPAOZ

สาร AOZ เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมากทำให้ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีได้ ดังนั้น จึงต้องทำการเชื่อมสารให้ติดกับโปรตีนพาหะเพื่อให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองสามารถรับรู้และสร้างแอนติบอดีต่อสารนั้นได้ ดังนั้น จึงทำการสังเคราะห์สาร CPAOZ ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับสาร NPAOZ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ AOZ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี และมีหมู่คาร์บอกซิลิกซึ่งสามารถใช้เชื่อมกับโปรตีนพาหะได้ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์สารที่สังเคราะห์โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) แสดงดังรูปที่ 4.1 และนำมาคำนวณค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ได้ค่าดังตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้ กับของ Copper และคณะ (2004)

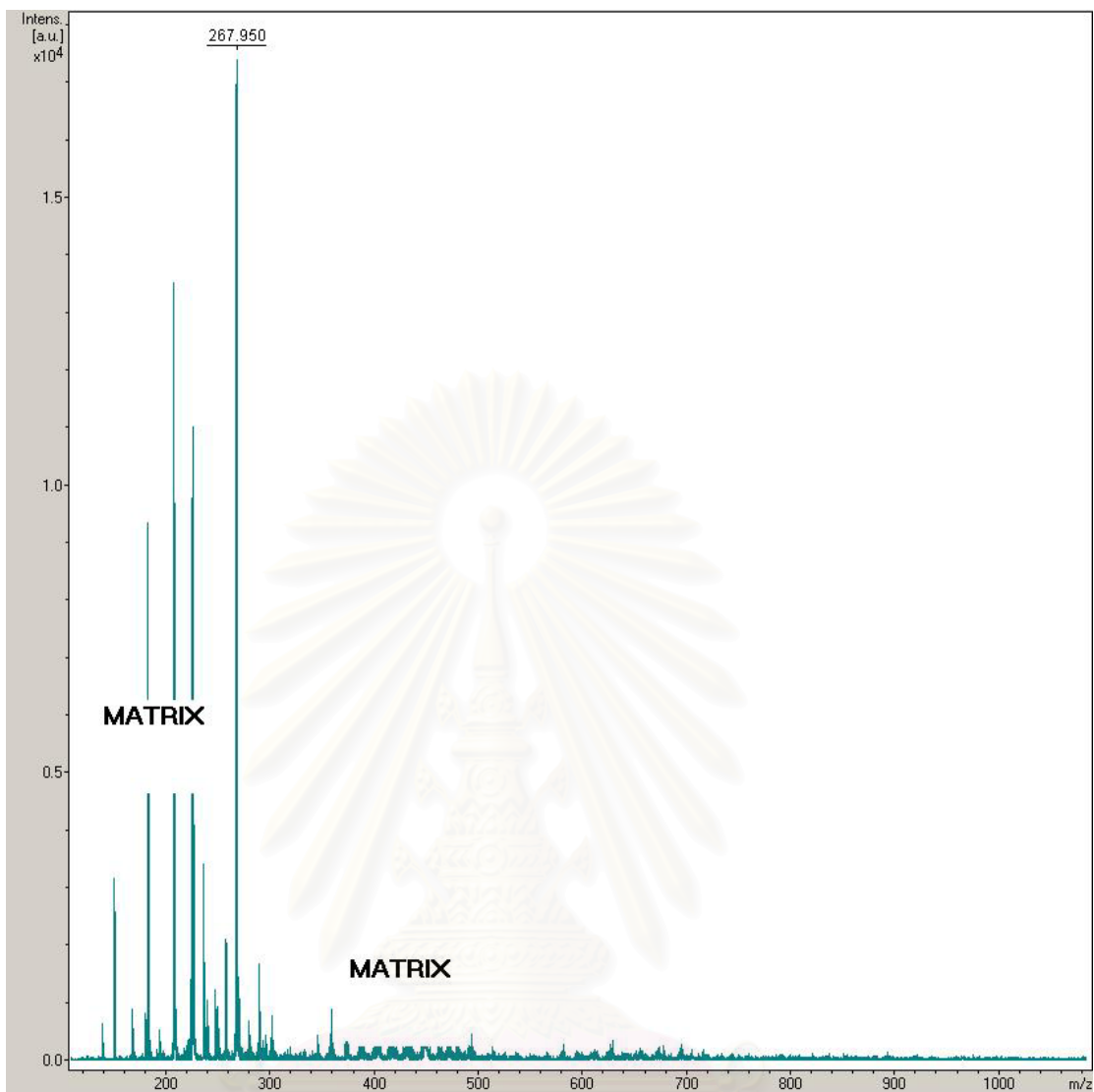


รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ , ก) ย้อมด้วยสารนินไฮดริน ข) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยที่ช่องที่ 1 คือ 3-carboxybenzaldehyde(CBA), 2 คือ AOZ, 3 คือ ไพริดีน (pyridine), 4 คือ ตัวอย่างก่อนทำรีฟลัก, 5 คือ ตัวอย่างหลังทำรีฟลัก และ 6 คือ ตัวอย่างทำรีฟลักและให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน

ตารางที่ 4.1 ค่า R_f ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ

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

จากการคำนวณค่า R_f ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังจากการทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.03 และ 0.18 เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้ดังกล่าวกับค่า R_f ของสารต่างๆในปฏิกิริยาสรุปได้ว่า น่าจะเป็นสาร CPAOZ และ AOZ ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า R_f ของสาร CPAOZ ในการทดลองนี้กับของ Cooper และคณะ(2004) พบว่าให้ค่าเท่ากันแสดงว่าสามารถทำการเตรียมสาร CPAOZ ได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม ยังสามารถตรวจพบ AOZ ในปริมาณน้อยได้ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์นั้นได้ใช้สาร AOZ ปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยากับสาร CBA ทำให้พบสาร AOZ เหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ CPAOZ โดยวิธี MALDI-TOF/MS

นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF/MS พบว่าสารมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 267.95 (ดังรูปที่ 4.2) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากสูตรโครงสร้างทางเคมีซึ่งมีค่าเท่ากับ 234.25 พบว่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้คือสาร CPAOZ

4.2 การเตรียมแอนติเจน

ทำการเชื่อมสาร CPAOZ และ AOZ กับ โปรตีนพาหะ โดยใช้สารเชื่อมติดต่างๆ ซึ่งโปรตีนพาหะที่ใช้ได้แก่ BSA ed-BSA และ OVA โดยสารที่เชื่อมติดกับ BSA และ ed-BSA จะใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดี สำหรับสารที่เชื่อมติดกับ OVA จะใช้เป็นแอนติเจนในการทำ ELISA เพื่อใช้คัดกรองแอนติบอดีที่สามารถจับกับ CPAOZ หรือ AOZ เท่านั้น

4.2.1 การหาปริมาณโปรตีนของโปรตีนเชื่อมติด

เมื่อทำการเชื่อมสารกับโปรตีนพาหะ นำไปหาโปรตีนโดยวิธี Lowry เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) (ภาคผนวก ข) ได้ปริมาณโปรตีน ดังตารางที่ 4.2

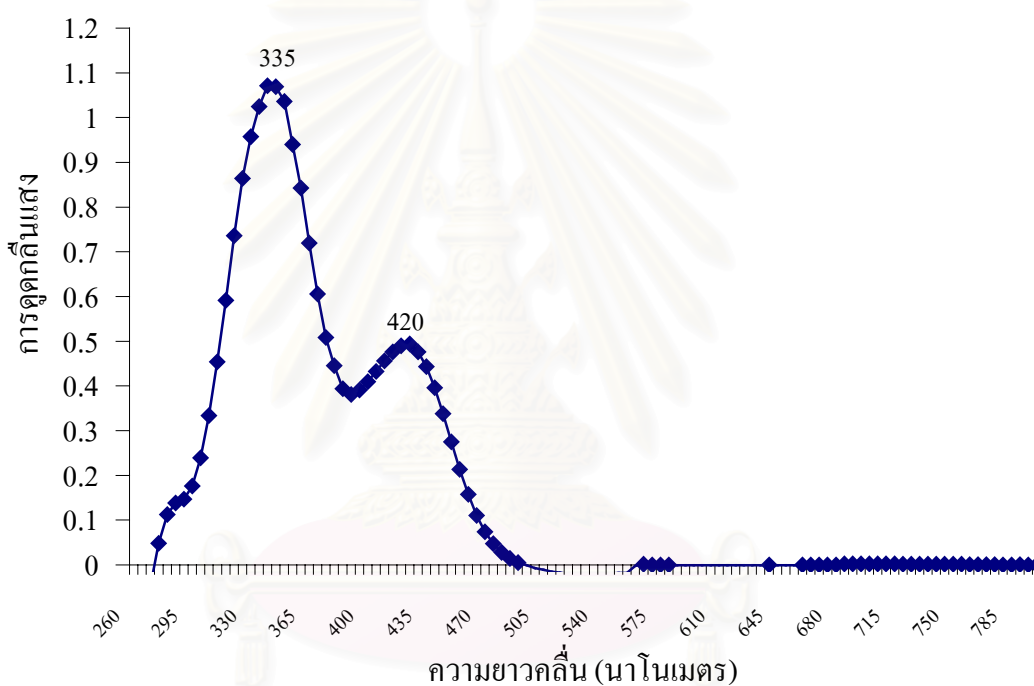
ตารางที่ 4.2 ปริมาณ โปรตีนของโปรตีนพาหะที่เชื่อมต่อกับสาร

โปรตีนเชื่อมติด	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารที่ใช้ในการเชื่อมติด
CPAOZ-ed-BSA	3.1	EDC
CPAOZ-OVA	2.4	EDC
AOZ-glu-ed-BSA	3.0	Glutaraldehyde
AOZ-glu-OVA	3.85	Glutaraldehyde
AOZ-BSA	9.0	EDC และ NHS
AOZ-OVA	9.0	EDC และ NHS
AOZ-BSA	9.8	EDC
AOZ-OVA	9.9	EDC

จากการหาปริมาณโปรตีนของโปรตีนเชื่อมติด สามารถนำความเข้มข้นโปรตีนมาหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดโดยวิธี TNBS และคำนวณความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสารที่ต้องการได้

4.2.2 การหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดโดยวิธี TNBS

2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS) เป็นสารที่มีความไวและรวดเร็วในการวิเคราะห์หาหมู่เอมีนได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา TNBS ต่อโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 260 ถึง 800 นาโนเมตร (ดังรูปที่ 4.3) พบว่าสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงมากที่สุดได้ที่ 335 และ 420 นาโนเมตร



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา TNBS กับ โปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงความยาวคลื่น 260 – 800 นาโนเมตร

จากการทำปฏิกิริยา TNBS สามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด (% cross link) ของโปรตีนเชื่อมติดต่างๆได้ (ตารางที่ 4.3) พบว่า CPAOZ-ed-BSA CPAOZ-OVA AOZ-glu-ed-BSA และ AOZ-glu-OVA ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดเท่ากับ 40.34, 34.01, 81.42 และ 28.30 ตามลำดับ แสดงว่าสามารถนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองและใช้สำหรับ ELISA ได้ และยืนยันการเชื่อมติดโดยการหาน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี MALDI-TOF/MS ส่วน AOZ-BSA และ AOZ-OVA ไม่สามารถวัดเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดได้เนื่องจากการเชื่อมติดสาร AOZ ใช้หมู่เอมีนของ AOZ เชื่อมติดกับหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีนพาหะ ซึ่งวิธี TNBS เป็นวิธีวัดหมู่เอมีนบนโปรตีน แต่สามารถวัดการเชื่อมติดได้โดยหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF ได้

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด (% cross link) ของโปรตีนเชื่อมติด จำนวนโดยวิธี TNBS

โปรตีนเชื่อมติด	เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด (% cross link)	สารที่ใช้ในการเชื่อมติด
CPAOZ-ed-BSA	40.34	EDC
CPAOZ-OVA	34.01	EDC
AOZ-glu-ed-BSA	81.42	Glutaraldehyde
AOZ-glu-OVA	28.30	Glutaraldehyde
AOZ-BSA	ND	EDC และ NHS
AOZ-OVA	ND	EDC และ NHS
AOZ-BSA	ND	EDC
AOZ-OVA	ND	EDC

หมายเหตุ ND (non-detectable) หมายถึง ไม่สามารถวัดได้

4.2.3 การทดสอบการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะโดยวิธี MALDI-TOF/MS

วิธี MALDI-TOF/MS เป็นวิธีในการหาน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการหาการเชื่อมติดของสารเข้ากับโปรตีนพาหะได้ สามารถนำน้ำหนักโมเลกุลก่อนและหลังทำการเชื่อมติด ดังรูปผนวกที่ ก.1 – ก.9 มาคำนวณหาอัตราส่วนในการเชื่อมติด ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 อัตราส่วนการเชื่อมติดของสารเข้ากับโปรตีนพาหะคำนวณจากน้ำหนักโมเลกุล

โปรตีนเชื่อมติด	น้ำหนักโมเลกุล	อัตราส่วนการเชื่อมติดของสาร (โมเลกุลของสารต่อโมเลกุลของ โปรตีนพาหะ)	สารที่ใช้ในการ เชื่อมติด
BSA	67020.627	-	-
OVA	44757.791	-	-
ed-BSA	67268.229	1.86	EDC
CPAOZ-ed-BSA	70476.041	13.69	EDC
CPAOZ-OVA	44642.017	< 1	EDC
AOZ-glu-ed-BSA	ND	-	Glutaraldehyde
AOZ-glu-OVA	45579.843	4.05	Glutaraldehyde
AOZ-BSA	72007.780	48.47	EDC และ NHS
AOZ-OVA	-	-	EDC และ NHS
AOZ-BSA	68160.898	11.17	EDC
AOZ-OVA	45068.234	3.04	EDC

หมายเหตุ ND (non-detectable) หมายถึงไม่สามารถวัดได้

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเชื่อมติด CPAOZ-ed-BSA, AOZ-glu-OVA, AOZ-BSA, AOZ-OVA (ใช้สาร EDC ในการเชื่อมติด) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นแสดงว่ามีสารเชื่อมติดที่โมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติเจนข้างต้นมาทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองและนำมาใช้ในการทำ ELISA สำหรับ CPAOZ-OVA พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่าเดิมแสดงว่าไม่มีสารเชื่อมติดกับโมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีผลขัดแย้งกับการวัดการเชื่อมติดโดยวิธี TNBS ซึ่งให้ผลการเชื่อมติด 34 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงนำมาโปรตีนเชื่อมติดมาทดสอบโดยวิธี ELISA โดยนำ CPAOZ-OVA เคลือบบนหลุม 96 หลุม และทำปฏิกิริยากับซีรัมจากหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-ed-BSA พบให้ผลเป็นบวกต่อ CPAOZ-OVA ที่เคลือบบนหลุม 96 หลุม และให้ผลเป็นลบต่อ OVA ที่เคลือบบนหลุม 96 หลุม แสดงว่ามีสาร CPAOZ เชื่อมติดบนโมเลกุลของโปรตีน OVA ดังนั้น จึงสามารถนำ CPAOZ-OVA มาใช้ในการทำ ELISA ได้ ส่วน AOZ-glu-ed-BSA และ AOZ-OVA (ใช้สาร EDC และ NHS ในการเชื่อมติด) เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี MALDI-TOF พบว่าไม่สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ ดังนั้น จึงนำ AOZ-glu-ed-BSA และ AOZ-OVA (ใช้สาร EDC และ NHS ในการเชื่อมติด) มาทดสอบโดยวิธี ELISA โดยทำปฏิกิริยากับ

ซีรัมจากหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-ed-BSA และ AOZ-BSA ตามลำดับ พบว่าให้ผลเป็นบวก แสดงว่ามีสารเชื่อมติดกับโมเลกุลของโปรตีนพาหะ ฉะนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองและใช้ในการทำ ELISA ได้

4.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ฉีด

นำแอนติเจนที่เตรียมได้มาทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง และเมื่อฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันครั้งที่ 3 ทำการเจาะเลือดหนูและนำซีรัมมาหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA โดยหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีที่สูงจึงนำมาทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อให้ได้ไฮบริโดมาต่อไป จากการทดลองได้ทำการฉีดกระตุ้นหนูทั้ง 16 ตัว ซึ่งมี 12 ตัวเป็นหนูสายพันธุ์ BALB/c และอีก 4 ตัวเป็นหนูสายพันธุ์ ICR ทำการหาระดับแอนติบอดี และทำการหลอมรวมเซลล์ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัวและการหลอมรวมเซลล์

หนูตัวที่	สายพันธุ์	แอนติเจนที่ฉีด	แอนติเจนที่ใช้เคลือบใน 96 หลุม	ระดับแอนติบอดี	การหลอมรวมเซลล์ ครั้งที่
1	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:16000	1
2	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:32000	2
3	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:16000	ตาย
4	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:512000	3
5	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:2048000	5
6	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:64000	4
7	BALB/c	AOZ-glu-ed-BSA	AOZ-glu-ed-BSA	0	-
8	BALB/c	AOZ-glu-ed-BSA	AOZ-glu-ed-BSA	0	-
9	BALB/c	AOZ-glu-ed-BSA	AOZ-glu-ed-BSA	1:32000	6
10	ICR	AOZ-glu-ed-BSA	AOZ-glu-ed-BSA	1:32000	7
11	ICR	AOZ-glu-ed-BSA	AOZ-glu-ed-BSA	1:32000	-
12	ICR	AOZ-BSA (EDC/NHS)	AOZ-BSA	1:16384000*	8
13	ICR	AOZ-BSA (EDC/NHS)	AOZ-BSA	1:16384000*	9
14	BALB/c	CPAOZ-ed-BSA	CPAOZ-OVA	1:512000*	10
15	BALB/c	AOZ-BSA (EDC)	AOZ-OVA (EDC)	1:64000*	12
16	BALB/c	AOZ-BSA (EDC)	AOZ-OVA (EDC)	1:512000*	11

หมายเหตุ * ล้างจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมสำหรับทำ ELISA ด้วย PBS ที่มี tween 20 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำซีรัมของหนูตัวที่ 1-6 และ 14 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-ed-BSA มาทดสอบจับกับสารในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าการฉีดกระตุ้นหนูด้วย CPAOZ-ed-AOZ สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ สำหรับสาร AOZ ในรูปอิสระนั้น แอนติบอดีมีความสามารถในการจับได้เช่นกันแต่มีความสามารถในการจับสารในรูปอิสระ AOZ น้อยกว่าสาร CPAOZ และ NPAOZ

ตารางที่ 4.6 การทดสอบซีรัมของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-ed-BSA ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492						
	หนูตัวที่						
	1	2	3	4	5	6	14
ซีรัม	1.214	1.313	1.692	2.275	0.839	0.756	0.734
ซีรัมที่เติม CPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	0.193	0.297	0.268	0.807	0.127	0.121	0.091
ซีรัมที่เติม NPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	-	-	-	-	0.165	0.194	0.116
ซีรัมที่เติม AOZ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	-	-	-	0.463	0.489	0.389	0.562
ตัวควบคุมลบ	0.081	0.081	0.081	0.087	0.098	0.098	0.088

หมายเหตุ เคลือบจานเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับทำ ELISA ด้วย CPAOZ-OVA ปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูก่อนทำการฉีดกระตุ้น

จากตารางที่ 4.5 พบว่าหนูตัวที่ 7 และ 8 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-ed-BSA ไม่สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ฉีดได้ ส่วนหนูตัวที่ 9, 10 และ 11 สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ AOZ-ed-BSA ได้ ดังนั้นจึงนำซีรัมของหนูที่ 9 มาทดสอบจับกับสารในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA จากตารางที่ 4.7 พบว่าหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-ed-BSA ไม่สามารถสร้าง

แอนติบอดีที่สามารถจับกับสาร AOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระได้ แต่สามารถจับกับสาร NPAOZ ในรูปอิสระได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งซีรัมของหนูตัวที่ 10 และ 11 ให้ผลเช่นเดียวกัน ดังนั้น จึงได้ทำการทดสอบหลอมรวมเซลล์หนูตัวที่ 9 และ 10

ตารางที่ 4.7 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ 9 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-glu-BSA (ใช้ glutaraldehyde เป็นสารในเชื่อมติด) ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร
ซีรัมเจือจาง 500 เท่าใน PBS	1.849
ซีรัมเจือจาง 500 เท่าใน BSA	0.912
ซีรัมเจือจาง 500 เท่าใน BSA และเติม AOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.928
ซีรัมเจือจาง 500 เท่าใน BSA และเติม NPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.722
ซีรัมเจือจาง 500 เท่าใน BSA และเติม CPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.963
ตัวควบคุมลบ	0.064
ตัวควบคุมบวก	1.299

หมายเหตุ ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูก่อนทำการฉีดกระตุ้นเจือจาง 500 เท่า

ตัวควบคุมบวกคือ ซีรัมของหนูตัวที่ 5 เจือจาง 4000 เท่า

เคลือบ 96 หลุมด้วย AOZ-ed-BSA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำซีรัมของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA (ใช้ EDC และ NHS เป็นสารในการเชื่อมติด) ทดสอบกับสารในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA (ตารางที่4.8) พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีต่อ AOZ-BSA ได้และไม่ทำปฏิกิริยากับ BSA แต่ไม่สามารถจับกับสาร CPAOZ, NPAOZ หรือ AOZ ในรูปอิสระได้ จากผลการทดสอบการเชื่อมติด AOZ กับ BSA (ใช้ EDC และ NHS เป็นสารเชื่อมติด)โดยวิธี MADLI-TOF/MS พบว่ามีสาร AOZ ประมาณ 47 โมเลกุลต่อโมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีปริมาณสาร AOZ เชื่อมติดสูงและระดับแอนติบอดีของหนูมีระดับแอนติบอดีสูง ดังนั้น จึงได้ทำการทดสอบหลอมรวมเซลล์เพื่อให้ได้โมโนโคลนมาทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4.8 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ฉีดด้วย AOZ-BSA (ใช้ EDC และ NHS เป็นสารในการเชื่อมติด) ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร	
	หนูตัวที่	
	12	13
ซีรัม	1.640	1.898
ซีรัมที่เติม CPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1.591	1.795
ซีรัมที่เติม NPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1.583	1.840
ซีรัมที่เติม AOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1.508	1.743
ตัวควบคุมลบ	0.099	0.099

หมายเหตุ เกลือบ 96 หลุมด้วย AOZ- BSA (ใช้ EDC และ NHS เป็นสารในการเชื่อมติด) ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำซีรัมของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) นำซีรัมของหนูมาทดสอบจับกับสารในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA (ตารางที่ 4.9) พบว่าหนูสามารถสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระได้ แต่ไม่สามารถจับกับสาร AOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระได้ ดังนั้น จึงได้ทำการหลอมรวมเซลล์หนูตัวที่ 15 และ 16

ตารางที่ 4.9 การทดสอบแอนติบอดีของหนูที่ฉีดด้วย AOZ-BSA(ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร	
	หนูตัวที่	
	15	16
ซีรัม	1.355	1.446
ซีรัมที่เติม CPAOZ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	1.236	1.221
ซีรัมที่เติม NPAOZ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	0.929	0.948
ซีรัมที่เติม AOZ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	1.407	1.429
ตัวควบคุมลบ	0.065	0.065

หมายเหตุ เกลือบ 96 หลุมด้วย AOZ-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4 การหลอมรวมเซลล์

4.4.1 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1-4

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์มี้มของหนูกับเซลล์มัยอีโลมา โดยภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วประมาณ 1 สัปดาห์ นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) พบว่าเซลล์มี้มและเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่หลอมรวมไม่เจริญ และพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม โดยพบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1-3 มีเซลล์เจริญประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของหลุมทั้งหมดที่ทำการแบ่งเลี้ยง และหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 มีเซลล์เจริญประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อโคโลนีมีขนาดประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมมาทำการทดสอบหาแอนติบอดีโดยใช้ CPAOZ-OVA ในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ผลที่ได้คือไม่พบเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อ CPAOZ และ NPAOZ ได้

4.4.2 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ พบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กเจริญในหลุมประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของหลุมทั้งหมด และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมมาทำการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ NPAOZ โดยใช้ CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาสามารถสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ CPAOZ-OVA ที่เคลือบบนหลุม 96 หลุมได้ และมีเซลล์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้ทำการย้ายเซลล์ไฮบริโดมาจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ไปยังจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปรากฏว่ามีเพียง 2 โคลนเท่านั้นที่ยังคงสามารถเจริญได้คือ โคลน 2/H11 และ 9/C7 จึงได้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบการจับกับสารในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA (ตารางที่ 4.10) โดยใช้ CPAOZ-OVA, AOZ-glu-ed-BSA และ BSA เคลือบบนหลุม 96 หลุม พบว่าโคลน 2/H11 สามารถจับกับสาร CPAOZ, NPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระได้ และโคลน 9/C7 สามารถจับกับสาร CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ ดังนั้นจึงทำการโคลนเซลล์ให้เป็นโมโนโคลนได้ทั้งหมด 12 โคลนแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 การทดสอบแอนติบอดีของโคลน 2/H11 และ 9/C7 ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

รหัสโคลน	ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		
		แอนติเจนที่ใช้เคลือบบน 96 หลุม (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
		CPAOZ-OVA	AOZ-glu-ed-BSA	BSA
2/H11	อาหารเลี้ยงเซลล์	1.299	1.654	0.061
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า	1.248	1.646	0.064
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ CPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.061	0.132	0.069
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ NPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.183	0.458	0.054
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ AOZ 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.641	1.825	0.054
9/C7	อาหารเลี้ยงเซลล์	1.092	0.594	0.095
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า	1.041	0.571	0.067
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ CPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.198	0.120	0.067
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ NPAOZ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.480	0.165	0.066
	อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ AOZ 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.901	0.579	0.086
ตัวควบคุมบวก		1.030	1.554	1.351
ตัวควบคุมลบ		0.068	0.087	0.051

หมายเหตุ ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูตัวที่ 5 ความเจือจาง 4000 เท่า

ตารางที่ 4.11 สรุปโมโนโคลนจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5

ลำดับที่	รหัส โคลน	รหัสโคลนอย่างย่อ
1	9/C7/B3/C3	CPAOZ#1
2	9/C7/B3/D5	CPAOZ#2
3	9/C7/B3/F2	CPAOZ#3
4	9/C7/H10/B12	CPAOZ#4
5	9/C7/H10/C8	CPAOZ#5
6	9/C7/H10/F10	CPAOZ#6
7	2/H11/B6/H4/C8/G12/G8	CPAOZ#7
8	2/H11/D5/G10/D7/F8/C11	CPAOZ#8
9	2/H11/E5/C4/C1/F3/E4	CPAOZ#9
10	2/H11/E5/H4/C8/F8/D8	CPAOZ#10
11	2/H11/F9/G8/B2/G2/G4	CPAOZ#11
12	2/H11/F9/H10/B8/B8/C10	CPAOZ#12

4.4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 6

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์พบเซลล์ไฮบริโดมาเจริญประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของหลุมทั้งหมด และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมมาทำการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ AOZ โดยใช้ AOZ-BSA (ใช้ EDC และ NHS เป็นสารในการเชื่อมติด) ในการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ผลที่ได้คือให้ผลบวกเป็นจำนวนมากจึงได้ทำการย้ายจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ไปยังจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปรากฏว่ามีเพียง 1 โคลนเท่านั้นที่ยังคงสามารถเจริญได้คือ โคลน 3/D9 นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม นำมาทดสอบกับสารในรูปอิสระโดยวิธี competitive ELISA ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12 ซึ่งสามารถจับกับสาร NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระได้ ดังนั้นจึงได้ทำการโคลนเซลล์ให้เป็นโมโนโคลน ได้ทั้งหมด 2 โคลน คือ โคลน 3/D9/A3 และ 3/D9/B12 เมื่อนำโมโนโคลนทั้ง 2 มาทำการจับกับสารในรูปอิสระพบว่าสูญเสียความสามารถจับกับสารในรูปอิสระได้ จึงไม่นำมาศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.12 การทดสอบแอนติบอดีของโคลน 3/D9 ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		
	ครั้งที่		
	1	2	3
อาหารเลี้ยงเซลล์ไม่เจือจาง	1.173	0.655	0.724
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า	0.559	0.561	0.507
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับสาร CPAOZ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	-	0.168	0.234
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับสาร NPAOZ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	0.088	0.103	0.191
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับสาร AOZ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	0.491	0.458	0.231
ตัวควบคุมบวก	1.102	0.950	0.989
ตัวควบคุมลบ	0.102	0.098	0.110

ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่ฉีดกระตุ้น AOZ-glu-ed-BSA

ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูก่อนทำการฉีดกระตุ้น

4.4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 7-11

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 7-9 พบเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถจับกับแอนติเจนที่เคลือบบน 96 หลุมได้ แต่เมื่อทดสอบการจับกับสารในรูปอิสระพบว่าไม่สามารถจับกับสารในรูปอิสระได้ ส่วนการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 10 และ 11 เปอร์เซ็นต์การหลอมรวมเซลล์ได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ของหลุมทั้งหมด เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำการคัดเลือกโดยวิธี indirect ELISA ผลคือไม่พบเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อสารที่ต้องการได้

4.4.4 ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 12

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 12 ได้เซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และมีเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีจับกับ AOZ-OVA (ใช้ EDC เป็นสารเชื่อมติด) ได้ เมื่อนำมาทดสอบการจับกับสารในรูปอิสระ โดยวิธี competitive ELISA พบว่ามีเพียง 3 โคลนคือ 1/C5, 7/A9 และ 9/F9 สามารถสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับสารในรูปอิสระได้ (ตารางที่ 4.13)

จึงนำมาทำให้เป็นโมโนโคลนแต่ในขั้นตอนการทำให้เป็นโมโนโคลน เซลล์ไฮบริโดมาเจริญแต่ไม่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จับกับ AOZ-OVA ได้อีกต่อไป

ตารางที่ 4.13 การทดสอบแอนติบอดีของโคลน 1/C5, 7/A9 และ 9/F9 ต่อสารในรูปอิสระโดยวิธี Competitive ELISA

ภาวะการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		
	เคลือบบน 96 หลุม ด้วย AOZ-OVA (3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	รหัสโคลน		
	1/C5	7/A9	9/F9
อาหารเลี้ยงเซลล์	2.200	1.680	2.631
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า	1.924	1.274	2.003
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ NPAOZ 5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	1.773	1.049	1.629
อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจาง 2 เท่า ผสมกับ AOZ 5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	1.165	0.897	0.886
ตัวควบคุมลบ	0.060	0.061	0.059

4.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.5.1 การหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมด้วยวิธี indirect ELISA

นำโมโนโคลนมาทำการเลี้ยงเก็บในอาหารเลี้ยงเซลล์และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้มาทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ competitive ELISA (ตารางที่ 4.14) เลือกค่าการดูดกลืนแสงที่ความเจือจางสุดท้ายใกล้เคียง 1 พบว่าทั้ง 12 โคลนได้ค่าความเจือจางเท่ากับ 2 เท่า นำค่าความเจือจางที่ได้ไปใช้ในการหาค่าความเข้มข้นของ CPAOZ-OVA สำหรับเคลือบบนหลุม 96 หลุม และนำไปทดสอบหาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี competitive ELISA

ตารางที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำการเจือจางต่างๆทดสอบโดย วิธี indirect ELISA

ความเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CPAOZ#1	CPAOZ#2	CPAOZ#3	CPAOZ#4	CPAOZ#5	CPAOZ#6
0	1.011	0.962	0.943	1.042	1.075	0.965
2	0.978	0.753	0.767	0.936	0.871	0.729
4	0.848	0.638	0.618	0.817	0.794	0.649
8	0.785	0.509	0.526	0.751	0.645	0.525
16	0.709	0.395	0.401	0.704	0.541	0.416
ตัวควบคุม บวก	0.846					
ตัวควบคุม ลบ	0.075					

ตารางที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำการเจือจางต่างๆทดสอบโดย วิธี indirect ELISA (ต่อ)

ความเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CPAOZ#7	CPAOZ#8	CPAOZ#9	CPAOZ# 10	CPAOZ# 11	CPAOZ# 12
0	1.092	1.119	1.050	1.059	1.125	1.189
2	1.007	1.014	0.970	0.977	1.031	0.957
4	0.946	0.956	0.972	0.968	0.927	0.896
8	0.893	0.897	0.899	0.931	0.818	0.775
16	0.818	0.843	0.815	0.855	0.704	0.741
ตัวควบคุม บวก	0.846					
ตัวควบคุม ลบ	0.075					

หมายเหตุ ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่ฉีดกระตุ้น CPAOZ-ed-BSA

ตัวอักษรหนา คือค่าความเจือจางที่ทำการเลือก

เคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเจือจาง 2 เท่า (จากตารางที่ 4.14) มาหาปริมาณแอนติเจนที่ใช้เคลือบบนจานเลี้ยงเซลล์โดยทำการเจือจางแอนติเจนที่ความเข้มข้น 3.000, 1.500, 0.750, 0.375, 0.188, และ 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.15) พบว่าความเข้มข้นของ CPAOZ-OVA ที่เหมาะสมสำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีเจือจาง 2 เท่าเท่ากับ 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าความเจือจางของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ได้ไปหาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี competitive ELISA

ตารางที่ 4.15 ความเจือจางของแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบบนจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม

รหัสโคลนอย่างย่อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	ความเข้มข้นของ OVA-CPAOZ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	3.000	1.500	0.750	0.375	0.188	0.094
CPAOZ#1	1.955	1.443	1.065	0.803	0.487	0.292
CPAOZ#2	1.692	1.242	1.130	0.727	0.417	0.275
CPAOZ#3	1.682	1.268	1.020	0.702	0.408	0.265
CPAOZ#4	1.946	1.578	1.421	0.928	0.640	0.383
CPAOZ#5	2.124	1.519	1.293	0.895	0.563	0.383
CPAOZ#6	2.002	1.355	1.198	0.734	0.458	0.293
CPAOZ#7	2.394	1.783	1.620	1.112	0.743	0.456
CPAOZ#8	2.462	1.905	1.730	1.271	0.901	0.547
CPAOZ#9	2.204	1.556	1.257	0.906	0.603	0.350
CPAOZ#10	2.155	1.542	1.378	0.934	0.666	0.370
CPAOZ#11	2.044	1.305	1.176	0.974	0.588	0.330
CPAOZ#12	1.933	1.366	1.139	0.880	0.503	0.292
ตัวควบคุมบวก	2.007	-	-	-	-	-
ตัวควบคุมลบ	0.077	-	-	-	-	-

ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่ฉีดกระตุ้น CPAOZ-ed-BSA

ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูก่อนทำการฉีดกระตุ้น

ตัวอักษรหนา คือค่าความเจือจางที่เลือก

4.5.3 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดเป็นชนิด IgG1 (ตารางที่ 4.16)

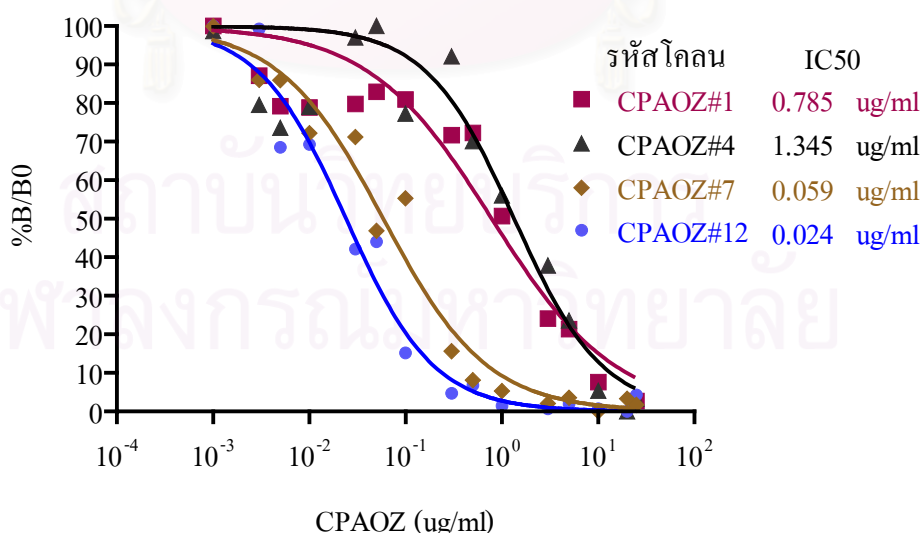
ตารางที่ 4.16 ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร						สรุปไอโซไทป์ที่ได้
	อิมมูโนโกลบูลิน ไอโซไทป์						
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	
CPAOZ#1	0.595	0.063	0.075	0.068	0.074	0.082	IgG1
CPAOZ#2	0.599	0.068	0.066	0.065	0.073	0.077	IgG1
CPAOZ#3	0.615	0.069	0.064	0.061	0.072	0.066	IgG1
CPAOZ#4	0.641	0.065	0.082	0.067	0.080	0.071	IgG1
CPAOZ#5	0.641	0.067	0.070	0.066	0.077	0.057	IgG1
CPAOZ#6	0.645	0.069	0.067	0.067	0.076	0.065	IgG1
CPAOZ#7	0.771	0.123	0.154	0.086	0.244	0.117	IgG1
CPAOZ#8	0.827	0.138	0.102	0.086	0.262	0.107	IgG1
CPAOZ#9	0.786	0.124	0.140	0.103	0.268	0.088	IgG1
CPAOZ#10	0.797	0.126	0.095	0.083	0.249	0.094	IgG1
CPAOZ#11	0.835	0.132	0.082	0.077	0.248	0.082	IgG1
CPAOZ#12	0.828	0.130	0.081	0.074	0.243	0.082	IgG1
ตัวควบคุมบวก	0.067	0.186	0.168	1.099	0.121	0.058	IgG3

ตัวควบคุมบวก คือ IgG3 มาตรฐาน

4.5.4 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect competitive ELISA

โมโนโคลน CPAOZ#1 ถึง CPAOZ#6 มาจากเซลล์หลุมต้นแบบ 9/C7 และมีไอโซไทป์เป็น IgG1 เช่นเดียวกันจึงคาดว่า CPAOZ#1 ถึง CPAOZ#6 เป็นโมโนโคลนมาจากหลุมต้นแบบเดียวกันจึงทำการเลือกสุ่มมา 2 โคลน คือ CPAOZ#1 และ CPAOZ#4 ส่วนโมโนโคลน CPAOZ#7 ถึง CPAOZ#12 มาจากเซลล์หลุมต้นแบบ 2/H11 และมีไอโซไทป์ IgG1 ทั้งหมดเช่นเดียวกันจึงคาดว่า CPAOZ#7 ถึง CPAOZ#12 เป็นโมโนโคลนมาจากหลุมต้นแบบเดียวกันจึงทำการเลือกสุ่มมา 2 โคลน คือ CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 ทำการทดสอบหาความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และยาปฏิชีวนะอื่นๆ โดยวิธี indirect competitive ELISA การทดลองหาความไวต่อสาร CPAOZ ตั้งแต่ 0.001 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 4 โคลน (รูปที่ 4.4) ผลที่ได้คือ โมโนโคลน CPAOZ#12 มีความไวต่อสาร CPAOZ สูงสุดให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 24 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และยาปฏิชีวนะอื่นๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.17) พบว่าโคลน CPAOZ#1 และ CPAOZ#4 ทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร NPAOZ และ ฟุราโซลิโดน สำหรับโคลน CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 ทำปฏิกิริยาข้ามกับ NPAOZ, AOZ และ ฟุราโซลิโดน จากการผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโมโนโคลน CPAOZ#12 มีความไวต่อสาร CPAOZ สูงที่สุด และสามารถทำปฏิกิริยากับสาร NPAOZ, AOZ และฟุราโซลิโดนได้ ดังนั้น จึงทำการเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 มาทดสอบหาค่า IC_{50} ต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟุราโซลิโดน คำนวณเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#1, 4, 7 และ 12 ต่อสาร CPAOZ

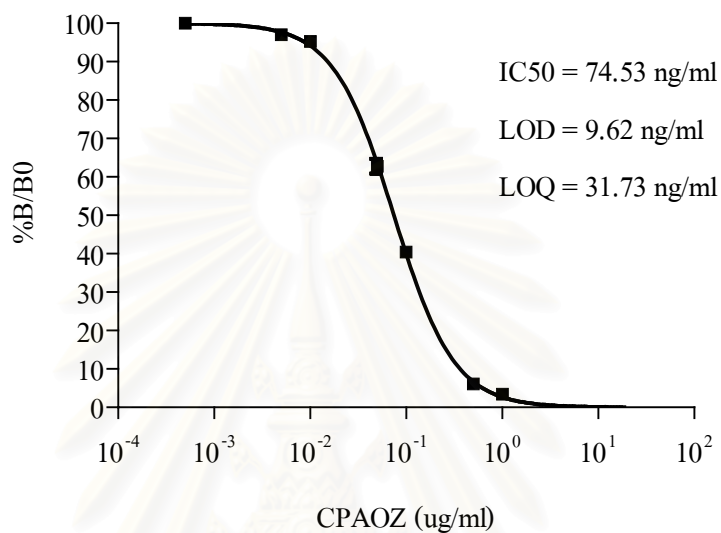
ตารางที่ 4.17 ปฏิกริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#1 CPAOZ#4 CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารแย่งจับ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			
	รหัสโคลนอย่างย่อ			
	CPAOZ#1	CPAOZ#4	CPAOZ#7	CPAOZ#12
ไม่เติมสารแย่งจับ	0.749	1.000	1.139	1.080
Furazolidone	0.117	0.144	0.096	0.160
CPAOZ	0.311	0.171	0.082	0.104
NPAOZ	0.458	0.513	0.418	0.220
AOZ	0.685	0.905	0.614	0.406
CBA	0.785	1.045	0.914	0.871
NPAHD	0.783	0.983	0.905	0.787
NPSCA	0.701	0.887	0.911	0.884
NPAMOZ	0.731	1.332	1.117	0.776
AMOZ	0.756	1.015	0.978	0.791
AHD	0.766	0.986	1.071	0.983
SEM	0.778	1.166	1.039	1.066
Flumequine	0.638	0.991	0.883	0.858
Norfloxacin	0.758	0.976	1.232	0.902
Penicilin G	0.943	0.902	0.929	0.853
Clenbuterol	0.703	0.943	0.984	0.909
Salbutamol	0.843	1.088	1.149	1.059
Chloramphenicol	0.738	1.019	0.982	0.937
Oxytetracycline	0.761	1.152	0.964	0.892
ตัวควบคุมลบ	0.095	0.086	0.100	0.098

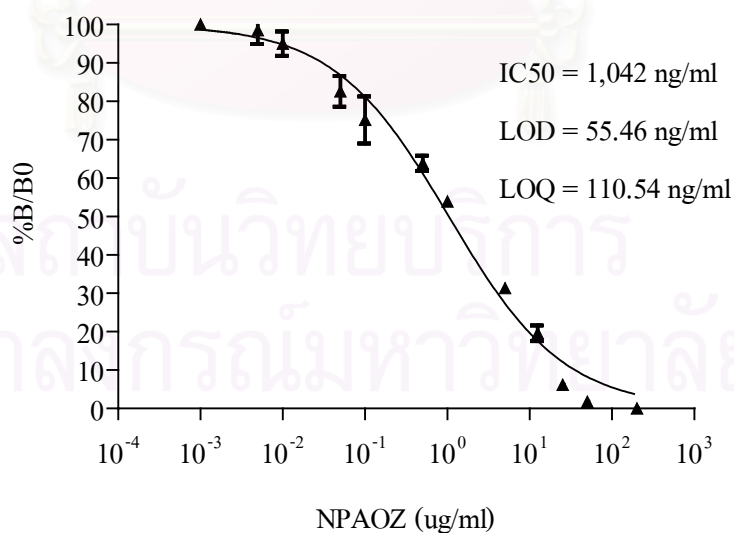
หมายเหตุ ตัวควบคุมลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์

ตัวอักษรหนา คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เกิดปฏิกริยาข้าม

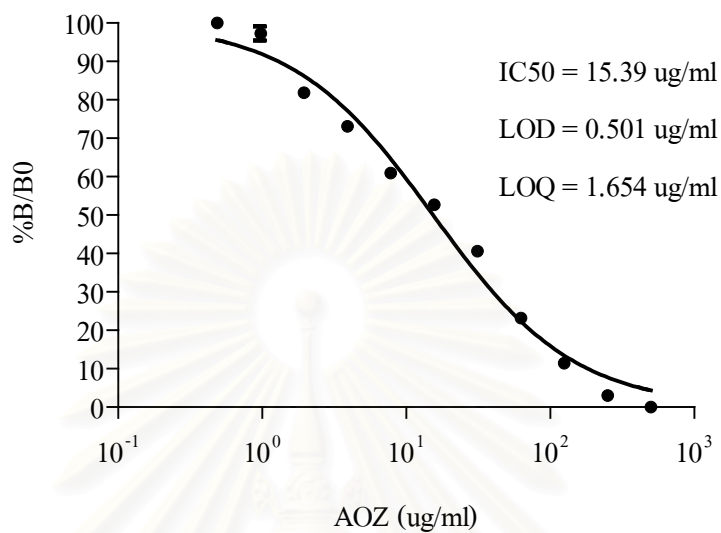
การทดสอบหาค่า IC_{50} ต่อสาร CPAOZ NPAOZ AOZ และฟูราโซลิโดน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 (รูปที่ 4.5-4.8) โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้ค่าเท่ากับ 74.53 1,042 15,390 และ 2.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 (ตารางที่ 4.18) พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดนเท่ากับ 100, 7.5, 0.45 และ 2,500 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



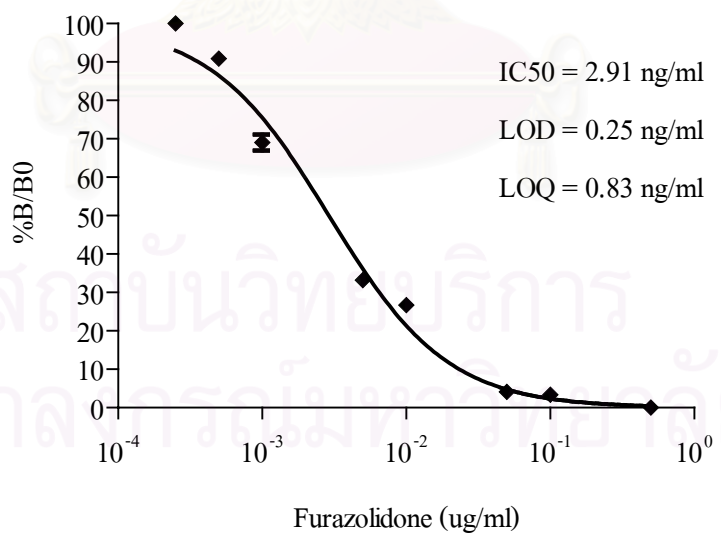
รูปที่ 4.5 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร CPAOZ



รูปที่ 4.6 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร NPAOZ



รูปที่ 4.7 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร AOZ



รูปที่ 4.8 การทดสอบความจำเพาะของโมโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร furazolidone

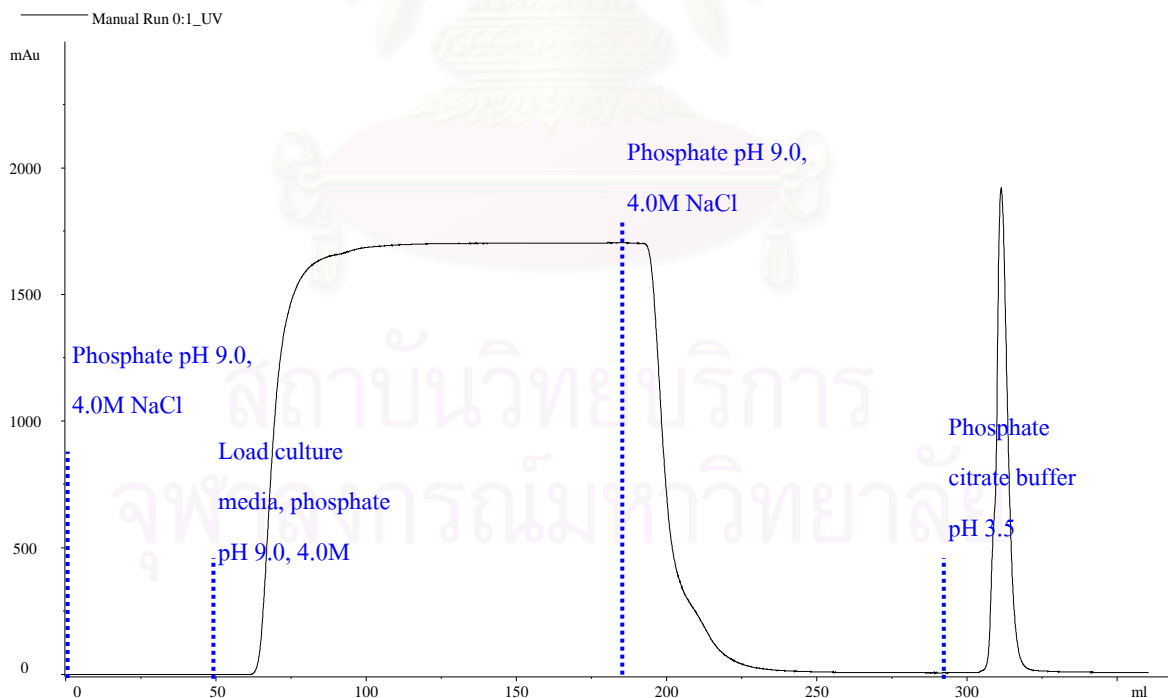
ตารางที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#1 CPAOZ#4 CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

ชนิดสาร	CPAOZ#12	
	IC50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม
CPAOZ	0.075	100
NPAOZ	1.0	7.5
AOZ	15.39	0.49
Furazolidone	0.003	2500
CBA	-	-
NPAHD	-	-
NPSCA	-	-
NPAMOZ	-	-
AMOZ	-	-
AHD	-	-
SEM	-	-
Flumequine	-	-
Norfloxacin	-	-
Penicilin G	-	-
Clenbuterol	-	-
Salbutamol	-	-
Chloramphenicol	-	-
Oxytetracycline	-	-

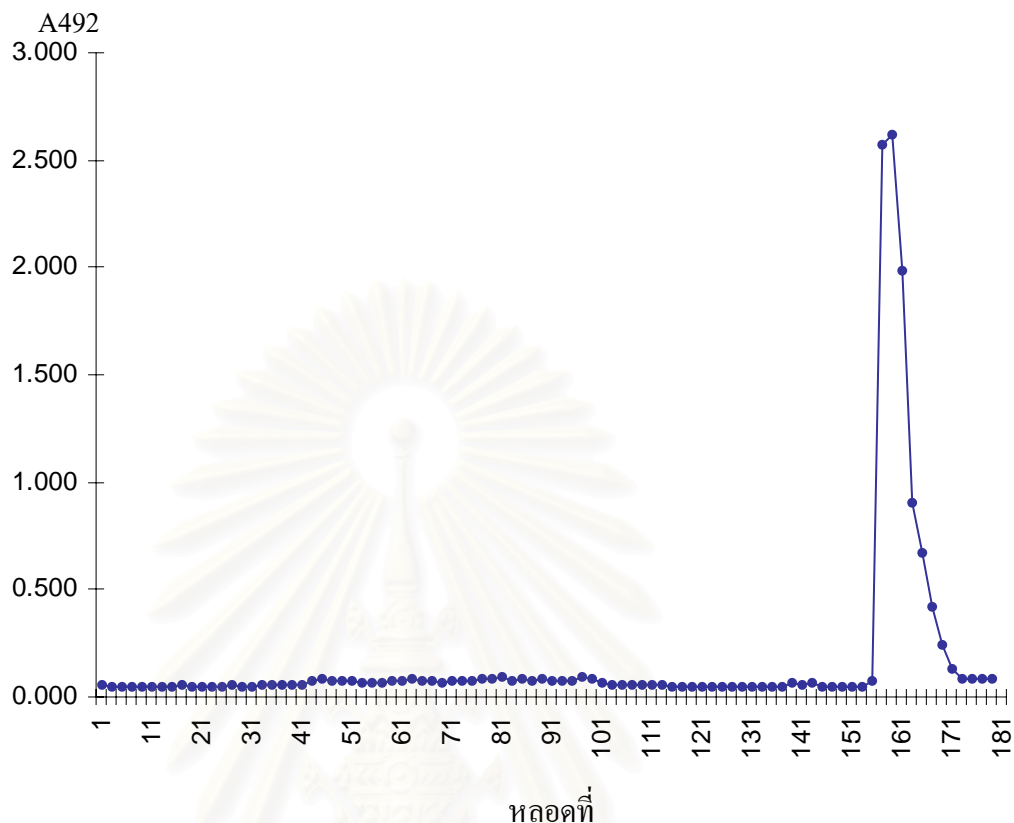
หมายเหตุ “-” หมายถึง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม

4.6 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.6.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ นำเซลล์ไฮบริโดมารหัส CPAOZ#12 มาเพิ่มจำนวนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โปรตีน เอ ซึ่งแอนติบอดีไอโซไทป์ IgG1 จะมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีน เอ ที่ pH 9 และความเข้มข้นของเกลือ 4 โมลลาร์ ส่วนโปรตีนและสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่จับกับโปรตีน เอ และที่ค่า pH 3.5 สัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อโปรตีน เอ จะลดลง มีผลทำให้แอนติบอดีถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกจากองค์ประกอบอื่นๆของอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 4.9 และนำแต่ละส่วนไปตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA ซึ่งเคลือบ 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.10 พบว่าเมื่อนำส่วนที่ชะด้วย pH 9 มาทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ปรากฏว่าให้ผลเป็นลบ แสดงว่าแอนติบอดีไม่ถูกชะออกมาและเมื่อนำส่วนที่ชะด้วย pH 3.5 มาทดสอบ ELISA ปรากฏว่าให้ผลเป็นบวกแสดงว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาจากคอลัมน์ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถแยกแอนติบอดีออกจากองค์ประกอบอื่นๆของอาหารเลี้ยงเซลล์ได้



รูปที่ 4.9 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ



รูปที่ 4.10 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ

4.6.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

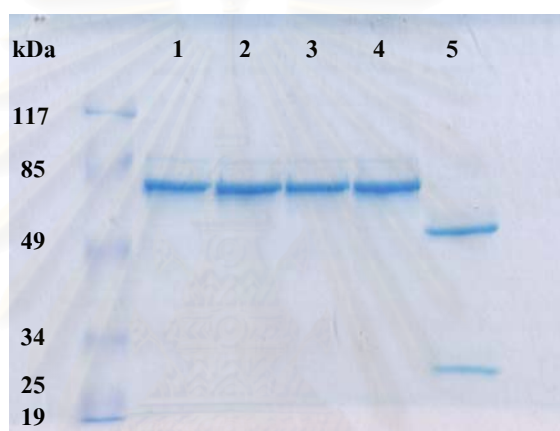
จากรูปที่ 4.17 และ 4.18 ทำการเก็บแอนติบอดีที่ชะตั้งแต่หลอดที่ 156-170 นำมาหาความเข้มข้นของแอนติบอดีโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้แอนติบอดีเท่ากับ 1.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นแอนติบอดีทั้งหมด 44.82 มิลลิกรัม และมีโปรตีนเท่ากับ 1.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นโปรตีนทั้งหมด 49.45 มิลลิกรัม คำนวณเป็นความบริสุทธิ์ได้ 90.64 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด นำแอนติบอดีบริสุทธิ์และทราบความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปผนวกที่ ข.2) เพื่อหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์

จากกราฟมาตรฐานแอนติบอดีบริสุทธิ์ (ภาคผนวกที่ ข.2) สามารถหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ ได้ปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นแอนติบอดีทั้งหมด 153.57 มิลลิกรัม และคำนวณโปรตีนได้เท่ากับ 16.36 มิลลิกรัมต่อ/มิลลิลิตร คิด

เป็นโปรตีนทั้งหมด 1,635.63 มิลลิกรัม คำนวณค่าความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ ได้เท่ากับ 9.38 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด

4.6.4 การหาความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE

จากการนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์แถบโปรตีนโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส (รูปที่ 4.11) พบว่าแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ มีความบริสุทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ CPAOZ#12 ที่ไม่ผ่านคอลัมน์ เอ และหาน้ำหนักโมเลกุลได้จากกราฟมาตรฐาน (รูปผนวกที่ ข.3) ได้เท่ากับ 59,000 และ 28,000 ดาลตัน

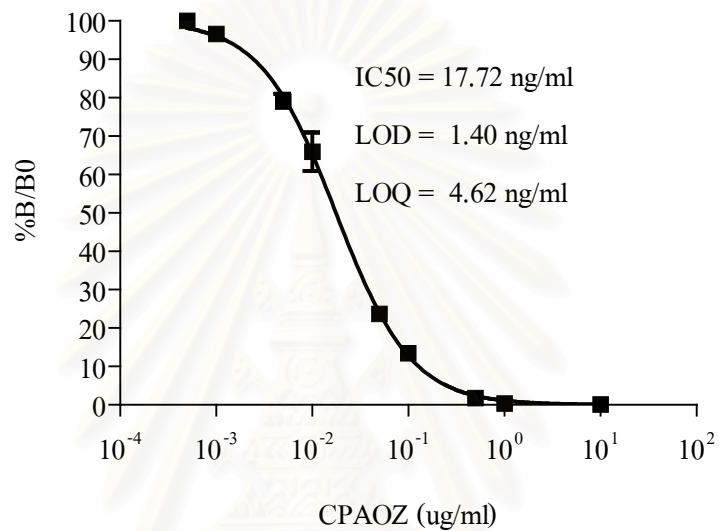


รูปที่ 4.11 ลักษณะของแถบโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส โดยที่

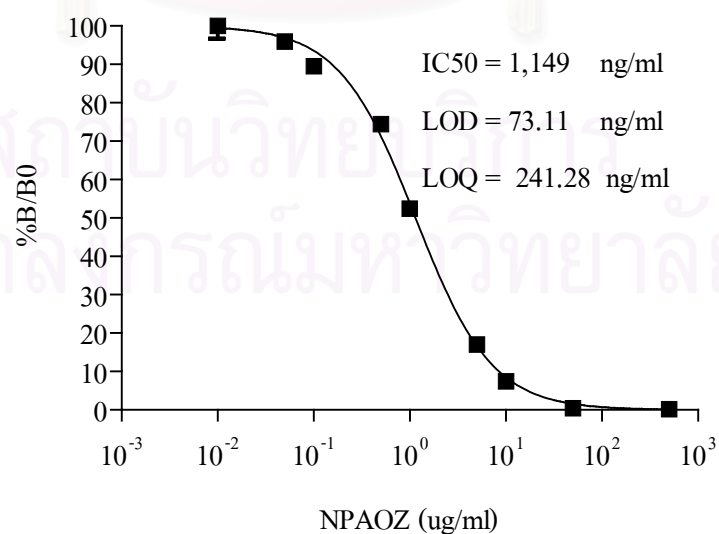
- 1 ซีรัม (Fetal calf serum, FCS)
- 2 อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของซีรัม
- 3 อาหารเลี้ยงเซลล์มีอีโลมา NSI ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของซีรัม
- 4 อาหารเลี้ยงเซลล์โมโนโคลน CPAOZ#12
- 5 อาหารเลี้ยงเซลล์โมโนโคลน CPAOZ#12 ที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ

4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

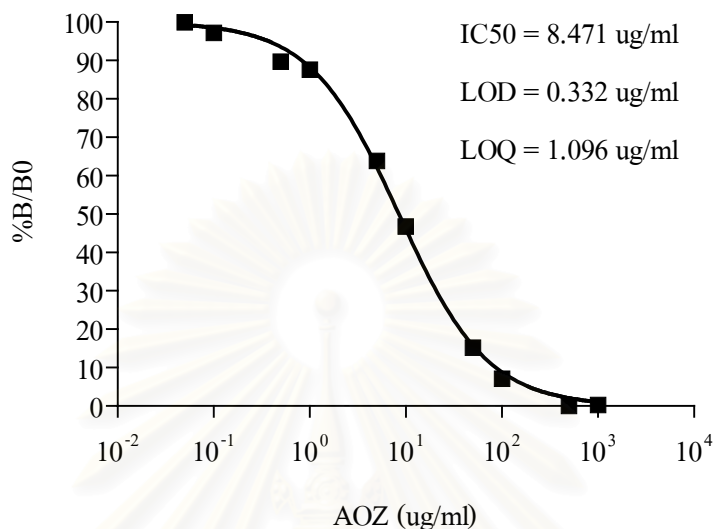
นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วข้างต้น มาหาความไวต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOX และ ฟุราโซลิโดน โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.12-4.15) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 17.72, 1,042, 8,471 และ 0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าขีดความสามารถในการตรวจ (LOD) เท่ากับ 1.40, 11.32, 332.00 และ 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



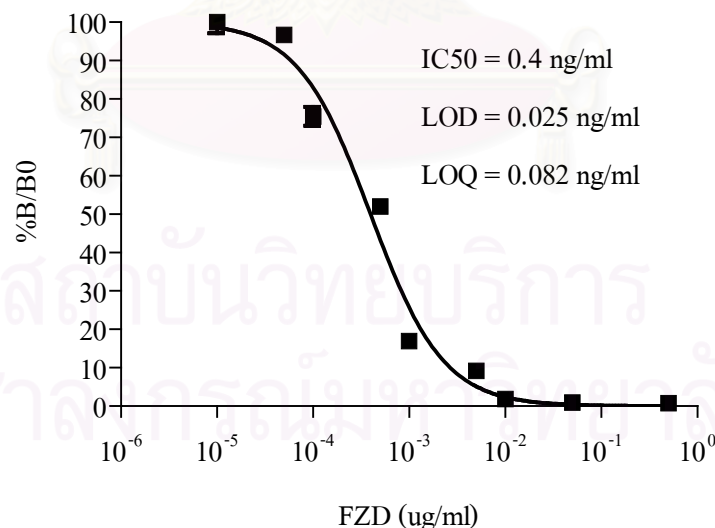
รูปที่ 4.12 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.13 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.14 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร AOX โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.15 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ต่อสาร furazolidone โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

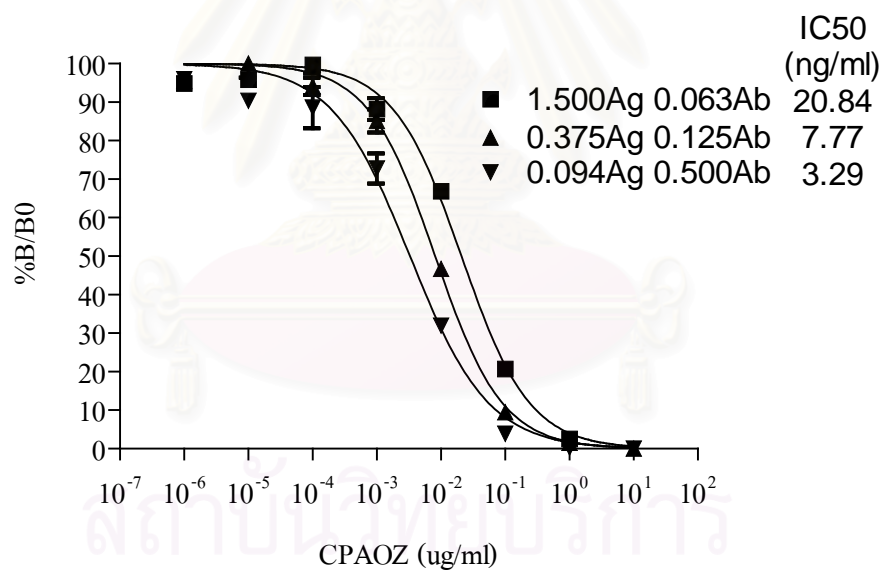
จากค่า LOD ต่อดสาร CPAOZ NPAOZ และ AOZ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 พบว่าค่าที่ได้สูงเกินกว่าค่า MRPL (1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามที่สหภาพยุโรป กำหนด ดังนั้น จึงได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับแอนติเจน โดยใช้ CPAOZ-OVA และ AOZ-glu-ed-BSA เคลือบหลุม 96 หลุม ความเข้มข้น 0.094 – 3.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ความเข้มข้น 0.016-2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.19) ผลที่ได้คือ เมื่อเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 1.500, 0.375 และ 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้แอนติบอดี 0.063, 0.125 และ 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเคลือบหลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA 3.00, 1.500 และ 0.750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้แอนติบอดี 0.250, 1.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.000 ดังนั้น จึงทำการเลือกความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีดังกล่าวมาทดสอบกับสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตารางที่ 4.19 ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA

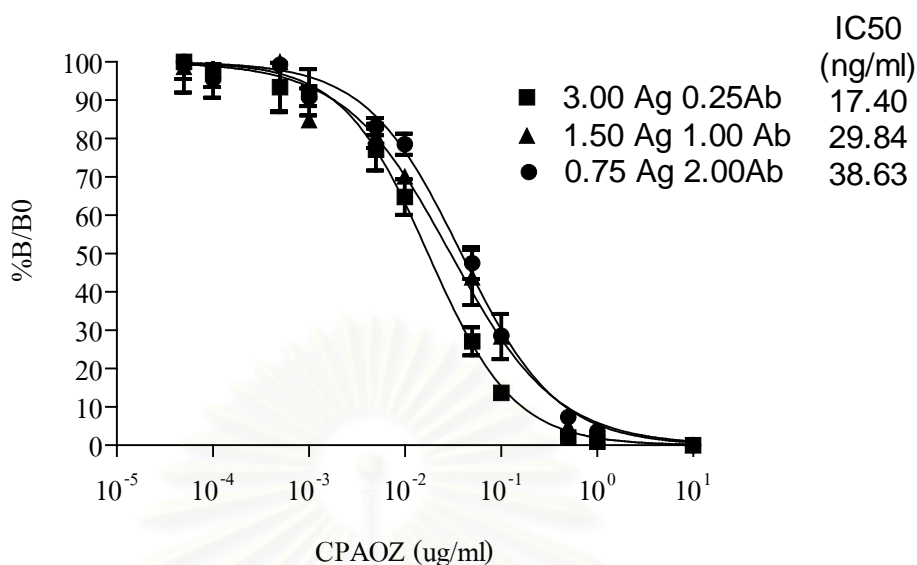
แอนติบอดี CPAOZ#12 บริสุทธิ์ (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร									
	เคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					เคลือบหลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	1.500	0.750	0.375	0.188	0.094	3.000	1.500	0.750	0.375	0.188
2.000	2.726	2.726	2.377	1.876	1.190	1.669	1.087	0.705	0.375	0.206
1.000	2.648	2.707	2.256	1.691	1.051	1.405	0.971	0.583	0.302	0.163
0.500	2.466	2.394	1.879	1.376	0.804	1.308	0.834	0.503	0.256	0.137
0.250	2.097	1.903	1.336	0.889	0.500	1.103	0.653	0.384	0.143	0.112
0.125	1.364	1.202	0.813	0.486	0.256	0.680	0.361	0.263	0.104	0.083
0.063	0.907	0.771	0.498	0.297	0.164	0.430	0.274	0.171	0.068	0.059
0.031	0.366	0.311	0.202	0.129	0.084	0.241	0.156	0.104	0.054	0.049
0.016	0.211	0.180	0.117	0.090	0.058	0.163	0.105	0.079	0.035	0.042
ตัวควบคุม ลบ	0.044	0.045	0.037	0.036	0.038	0.033	0.034	0.036	0.036	0.036

หมายเหตุ ตัวควบคุมลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์

จากการทดสอบเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ที่ความเข้มข้น 1.500, .0375 และ 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี 0.063, 0.125 และ 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จับกับสาร CPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA (รูปที่ 4.16) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำ indirect competitive ELISA คือ CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ แอนติบอดี 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากให้ค่า IC_{50} น้อยที่สุด และการเคลือบหลุมด้วย AOX-glu-ed-BSA (รูปที่ 4.17) ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำ indirect competitive ELISA คือ AOX-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ แอนติบอดี 0.250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.16 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.063, 0.125 และ 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 1.500, 0.375 และ 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

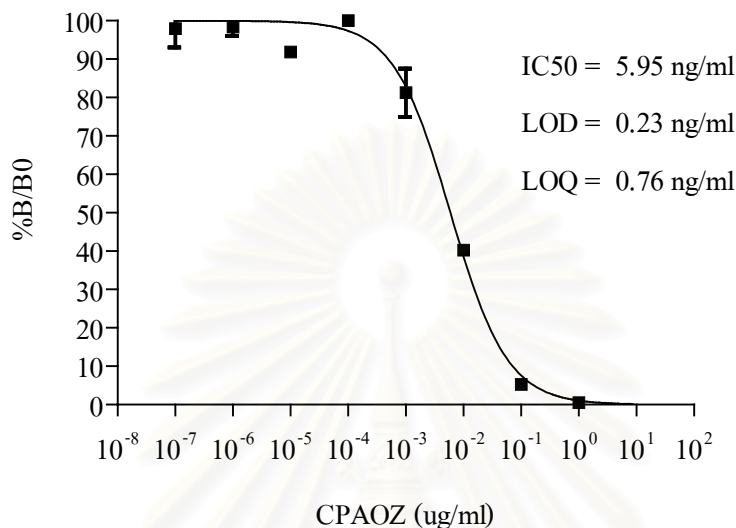


รูปที่ 4.17 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25, 1.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00, 1.50 และ 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

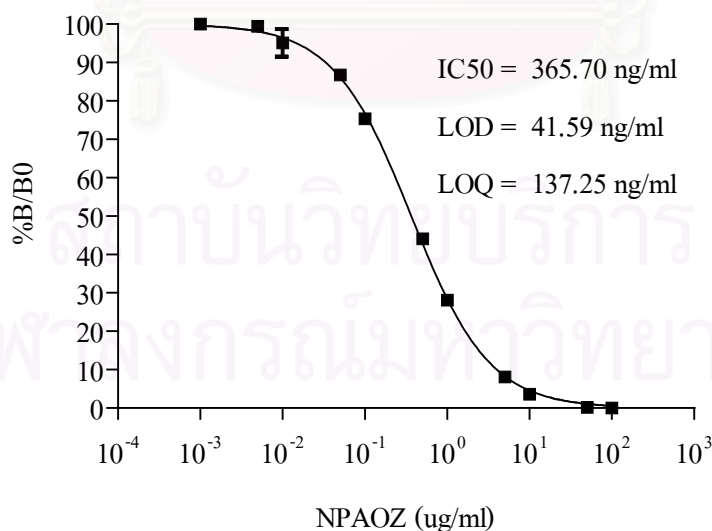
เมื่อทำการเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้แอนติบอดี 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดน โดยวิธี competitive ELISA (รูปที่ 4.18-4.21) ได้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.95, 372.10, 1,661 และ 0.024 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเคลือบหลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดน โดยวิธี competitive ELISA (รูปที่ 4.22-4.25) ได้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.01, 517.40, 7360 และ 0.025 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากตาราง 4.20 จะเห็นได้ว่าเมื่อนำแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์ และหาภาวะที่เหมาะสมระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีมาทดสอบหาค่า IC₅₀ ของสารต่างๆ ซึ่งเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ผลปรากฏว่าค่า IC₅₀ ของสารต่างๆ มีค่าลดลงตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าแอนติบอดียังมีศักยภาพเพียงพอที่จะพัฒนาความไวในการตรวจหาสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดนโดยวิธี indirect competitive ELISA ได้ สำหรับการเคลือบหลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA พบว่าเมื่อนำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ และหาภาวะที่เหมาะสมมาทดสอบค่า IC₅₀ ของสารต่างๆ ให้ค่า IC₅₀ ของสารต่างๆ มีค่าสูงกว่าใช้ CPAOZ-OVA ในการเคลือบหลุม ยกเว้นสารฟูราโซลิโดนซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับใช้ CPAOZ-OVA เคลือบหลุม อีกทั้งการใช้ AOZ-glu-ed-

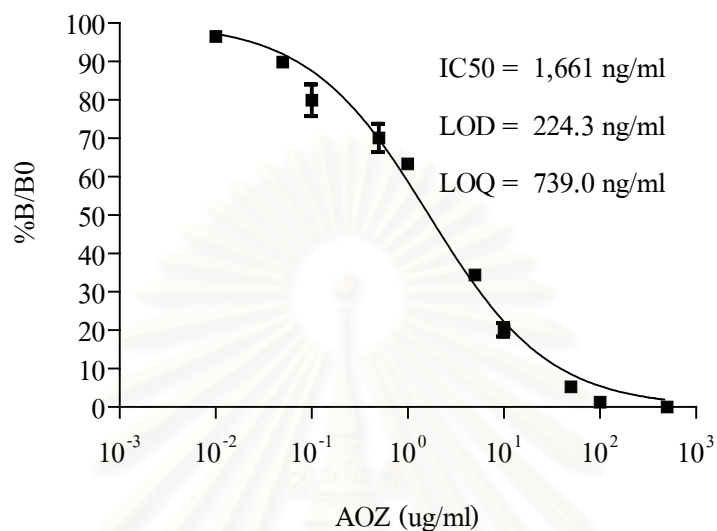
BSA ในการเคลือบหลุมสามารถทำปฏิกิริยากับสาร AOZ ในรูปอิสระได้โดยวิธี competitive indirect ELISA ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับเมื่อใช้แอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งไม่สามารถจับกับสาร AOZ ได้



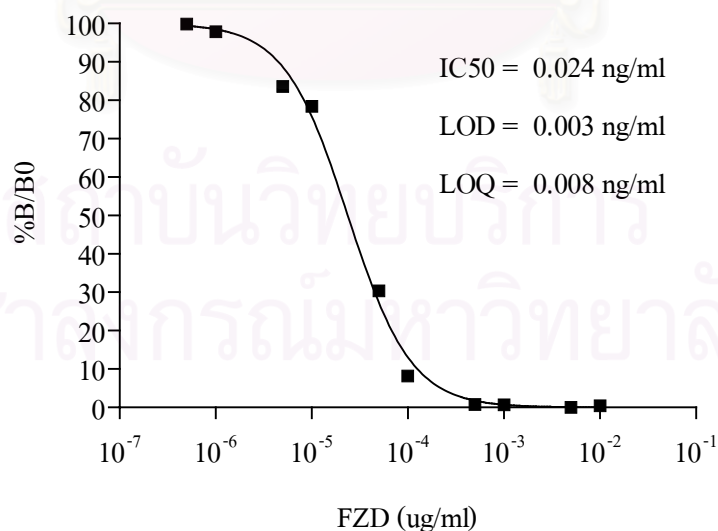
รูปที่ 4.18 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



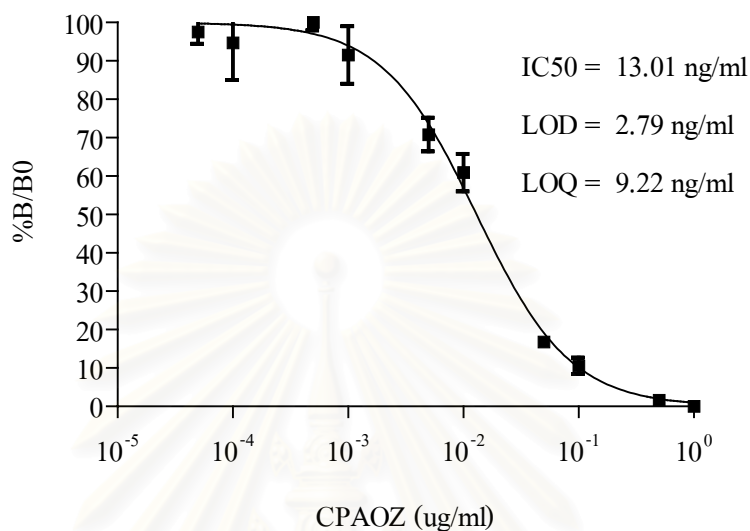
รูปที่ 4.19 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



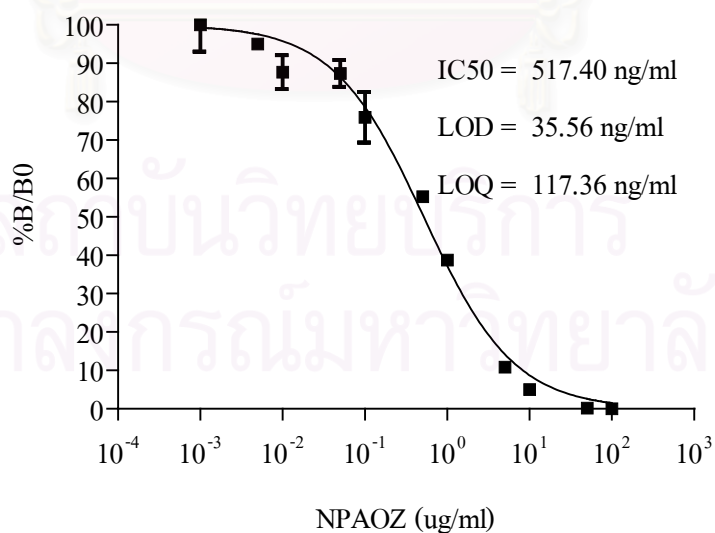
รูปที่ 4.20 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร AOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



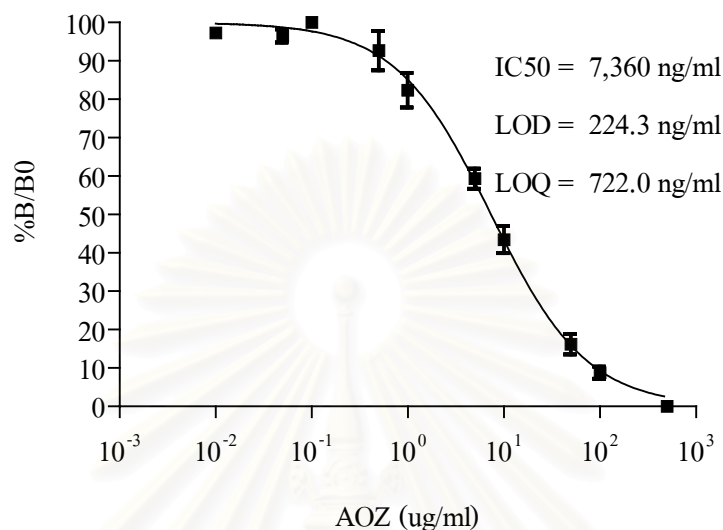
รูปที่ 4.21 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสารฟูราโซลิโคนโดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย CPAOZ-OVA 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



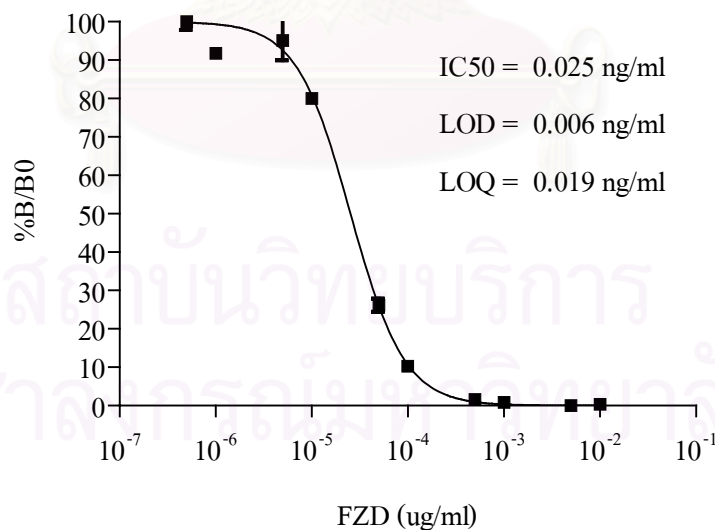
รูปที่ 4.22 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย Aoz-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.23 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย Aoz-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.24 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสาร AOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบ หลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.25 การทดสอบความไวของโมโคลนอลแอนติบอดีโคลน CPAOZ#12 บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อสารฟูราไซลิโคน โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเคลือบหลุม 96 หลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.20 สรุปค่า IC_{50} และค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 ต่อสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และ ฟุราโซลิโดน โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร	เคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA						เคลือบหลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA	
	อาหารเลี้ยงเซลล์ ¹		แอนติบอดีบริสุทธิ์ ¹		แอนติบอดีบริสุทธิ์ ²		แอนติบอดีบริสุทธิ์ ³	
	IC50	LOD	IC50	LOD	IC50	LOD	IC50	LOD
	(นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)		(นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)		(นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)		(นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)	
CPAOZ	75.53	9.62	17.72	1.40	5.92	0.23	13.01	2.79
NPAOZ	1000	55.46	1149	73.11	365.70	41.59	517.40	35.56
AOZ	15000	500	8000	332	1661	224.3	7360	722.0
FZD	2.91	0.25	0.4	0.025	0.024	0.008	0.025	0.006

หมายเหตุ ¹ เคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

² เคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.094 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

³ เคลือบหลุมด้วย AOZ-glu-ed-BSA ความเข้มข้น 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการสังเคราะห์สาร CPAOZ นั้นเมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF/MS ได้เท่ากับ 267.95 ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจากสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ 234.25 และเมื่อทดสอบโดยวิธี TLC ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.03 ซึ่งเท่ากับที่มีรายงานโดย Copper และคณะ (2004) การเชื่อมสาร CPAOZ และ AOZ เข้ากับโปรตีนพาหะโดยใช้สารในการเชื่อมติด 3 ชนิด ได้แก่ EDC, NHS หรือ กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เมื่อทดสอบการเชื่อมติดโดยวิธี TNBS และ MALDI-TOF/MS พบว่า CPAOZ และ AOZ เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะได้ทั้งสามวิธี

จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองพบว่า CPAOZ-ed-BSA, AOZ-glu-ed-BSA และ AOZ-BSA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) สามารถใช้กระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร CPAOZ, NPAOZ และ AOZ ได้ แต่แอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วย AOZ-glu-ed-BSA และ AOZ-BSA ไม่สามารถจับกับสาร CPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระได้ เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย CPAOZ-ed-BSA มาทำให้บริสุทธิ์และทดสอบกับ AOZ-glu-ed-BSA ที่ใช้เคลือบหลุม 96 หลุม พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับสาร CPAOZ, NPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระได้ แสดงว่าในการเชื่อม AOZ ติดกับ ed-BSA โดยวิธีกลูทาร์ลดีไฮด์มีสาร AOZ ติดอยู่กับโปรตีนพาหะ และเมื่อนำโคลนที่ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA (ใช้ EDC เป็นสารเชื่อมติด) มาทดสอบกับสารอิสระโดยใช้ AOZ-BSA เคลือบหลุม 96 หลุมผลที่ได้คือแอนติบอดีสามารถจับกับสารในรูปอิสระได้

ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ซึ่งฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย CPAOZ-ed-BSA แล้วนำเซลล์ม้าของหนูมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา ผลที่ได้คือได้โมโนโคลนอล จำนวน 12 โคลน คือ โมโนโคลน รหัส CPAOZ#1 ถึง CPAOZ#12

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดเป็นไอโซไทป์ IgG1 มีค่า IC50 ต่อสาร CPAOZ อยู่ในช่วง 0.024-1.345 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนและสารปฏิชีวนะอื่นๆ พบว่า ทั้ง 12 โคลนไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารทั้งในกลุ่มของไนโตรฟูแรนและสารปฏิชีวนะต่างๆที่ทดสอบ โดยที่โคลน CPAOZ#7 ถึง CPAOZ#12 สามารถจับกับสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดนในรูปอิสระได้ ส่วนโคลน CPAOZ#1 ถึง CPAOZ#6 สามารถจับกับสาร CPAOZ, NPAOZ และฟูราโซลิโดนในรูปอิสระได้ จึงทำการคัดเลือก 4 โคลน คือ CPAOZ#1, CPAOZ#4, CPAOZ#7 และ CPAOZ#12 มาทดสอบกับสาร CPAOZ พบว่าโคลน CPAOZ#12 มีความไวสูงที่สุด อีกทั้งยังสามารถจับกับสาร AOZ ได้ ดัง

นั้น จึงได้ทำการเลือกโคลน CPAOZ#12 มาศึกษาสมบัติเบื้องต้น โดยให้ค่า IC50 ของสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดน เท่ากับ 5.92, 365.70, 1661 และ 0.024 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า LOD เท่ากับ 0.23, 41.59, 224.3 และ 0.008 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการทดสอบเคลือบหลุม 96 หลุมด้วยโปรตีนพาหะ BSA และ OVA นำสาร AOZ ใส่ในหลุมแล้วทำการล้างออก แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 มาทดสอบโดยวิธี indirect ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวกแสดงว่าสาร AOZ เกิดการจับกันระหว่างสารกับโปรตีนที่เคลือบบนหลุม 96 หลุมแบบไม่จำเพาะ แต่ถึงอย่างไรโมโนโคลนอลแอนติบอดีก็ยังคงมีความสามารถในการจับกับสาร AOZ ในรูปอิสระได้แต่ค่า IC50 ที่ได้มีค่าสูงอาจเนื่องมาจากเหตุผลดังกล่าว

การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ พบว่าแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์คิดเป็น 90.64 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE ได้แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 59,000 และ 28,000 คาลตัน

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เคลือบบนหลุม 96 หลุมโดยทดสอบการจับกับสารในรูปอิสระโดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่าค่า IC50 ของสาร CPAOZ, NPAOZ, AOZ และฟูราโซลิโดนที่ได้มีค่าลดลงจาก 17.72, 1149, 8000 และ 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5.92, 365.70, 1161 และ 0.024 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่าระบบการตรวจหาโดยใช้แอนติบอดีมีความไวสูงขึ้น ดังนั้น จึงมีความน่าจะเป็นที่จะสามารถนำมาพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์ที่มีความไวสูงขึ้นได้อีก

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ ELISA แบบ direct ELISA และ competitive ELISA ได้ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสาร AOZ และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ และสารปฏิชีวนะอื่นๆ ที่ได้ทำการทดสอบ ซึ่งการตรวจสาร AOZ ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของฟูราโซลิโดนโดยตรงทำให้สะดวกและใช้ระยะเวลาสั้นในการตรวจหาสารตกค้าง เนื่องจากไม่ต้องทำการเปลี่ยน AOZ ให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ ดังนั้น จึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับตรวจ AOZ ที่ตกค้างในอาหารสำหรับบริโภค และสารฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

จากค่า IC50 และค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่า ค่าที่ได้สูงกว่าค่า MRPL ซึ่งกำหนดโดยสหภาพยุโรป ดังนั้น ในการนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA จะต้องเพิ่มความไวให้แก่ระบบการตรวจวิเคราะห์ โดยอาจใช้วิธีเพิ่มสัญญาณของแอนติบอดีโดยใช้ biotin-streptavidin หรือ เชื่อมสาร AOX กับแอนไซม์เพื่อนำมาพัฒนาชุดตรวจสอบโดยวิธี direct competitive ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตเป็นชุดตรวจสอบทั่วไป และหาวิธีป้องกันการที่ AOX ไปจับกับโปรตีนที่ใช้เคลือบหลุม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Ali, B.H. 1992. Effect of furazolidone on tissue sulphhydryl groups, ascorbic acid, and lipid peroxide levels in the rat, and the influence of dimethylsulphoxide thereon. Pharmacological Research. 25: 247-254
- Banerjee, S.K. and Chatterjee, S. N. 1984. Effects of furazolidone on the mutation of *Vibrio cholerae* cells to streptomycin resistance. Current Microbiology. 10:19-22
- Bartlet, A.L. and Khan, F.H. 1990. Effects of nitrofurans on adrenal cortical tissue in chickens. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 13: 206-216
- Bartlet, A.L., Harvey, S. and Klandorf, H. 1990. Contrasting effects of nitrofurans on plasma corticosterone in chickens following administration as a bolus or diet additive. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 13: 261-269
- Basak, J. 1995. Inter-strand cross-linking of *Vibrio cholera* DNA induced by furazolidone: a quantitative assay by four simple methods. Mutation Research. 327: 5-15
- Chatterjee, S. N. and Raychaudhuri, C. 1971. Filamentation of *Vibrio cholerae* by furazolidone. Indian Journal of Experimental Biology. 9: 270-271
- Chatterjee, S. N. and Maiti, M. 1973. Effects of furazolidone on the infection of *Vibrio cholerae* by Bacteriophage 0149. Journal of Virology. 872-878
- Chatterjee, S. N. and Ghosh, S. C. 1979. Mechanism of action of furazolidone: Inter-strand cross-linking in DNA and liquid holding recovery of *Vibrio cholerae* cells. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 16:125 - 130.

- Commission Decision 2002/181/EC (2003): of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. Official Journal of the European Communities, L71, 17–18
- Conneely, A., Nugent, A. and Keeffe, M. 2002. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues. Analyst .127: 705-709.
- Cooper, K.M., Caddell, A., Elliott, C.T. and Kennedy, D.G. 2004. Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivative of AOZ, a metabolite of the nitrofurans furazolidone. Analytica Chimica Acta. 520: 79–86
- Diblikova, Iva., Cooper, K M., Kennedy, D. G., and Frank Milan. 2005. Monoclonal antibody based ELISA for the quantification of nitrofurans metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation. Analytica Chimica Acta. 540: 285–292
- Dodd, M. E., and Stillman, W. B. 1944. The in-vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 82: 11-18
- Franek, M., Diblikova, I., Vass, M., Kotkova, L., Stastny, K., Frgalova, K. and Hruska, K. 2006. Validation of a monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of the furazolidone metabolite (AOZ) in eggs using various sample preparation. Veterinary Medicina. 51 : 248–257
- Gajewska, J., Szczypka, M., Tudek, B. and Szymczyk, T. 1990. Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. Mutation Research. 232: 191-197

- Gottschall, D.W. and Wang, R. 1995. Depletion and bioavailability of [14C] furazolidone residues in swine tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43: 2520
- Habeeb, A.F.S.A. 1966. Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfonic acid. Analytical Biochemistry. 14: 328
- Hermanson, G. 1996. Bioconjugate techniques. Academic Press. San Diego. California. 112-113
- Hoogenboom, L.A., Kammen, van. M., Berghmans, M., Koeman, J.H. and Kuiper, H.A. 1991. The use of pig hepatocytes to study the nature of protein-bound metabolites of furazolidone: a new analytical method for their detection. Food and Chemical Toxicology. 29: 321-328
- Hoogenboom, L A., Berghmans, M. C., Polman, T. H., Parker, R. and Shaw, I. C. 1992. Depletion of protein-bound furazolidone metabolites containing the 3-amino-2-oxazolidinone side-chain from liver, kidney and muscle tissues from pigs. Food Additives and Contaminants. 9(6):623-630
- Jager, L.P., Widjaja-Greefkes, H.C., Accord-Burleson, C.C.F., Dungen, H.M. and Baars, A.J., 1994. Effects of feed additives and veterinary drugs on aldosterone production and release by porcine adrenal cells in vitro. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 17:175-185
- Johnstone, A., and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publication, England
- Kohler, G., and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256:495

- Leitner, A., Zollner, P. and Linder, W. 2001: Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 939: 49–58
- McCracken, R.J. and Kennedy, D.G. 1997. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatographythermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. Journal of Chromatography B. 691: 87–94
- Raychaudhuri, C., Chatterjee, S. N. and Maiti, M.1970. Effects of furazolidone on the macromolecular synthesis and morphology of *Vibrio cholerae* cells. Biochemistry Biophysics Acta. 222:637-646
- Stern, I.J., Hoolifield, R.D., Wilk, S. and Buzard, J.A. 1967. The anti-monoamine oxidase effects of furazolidone. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 156(3): 492-499
- Stroo, W.E. and Schajer, S.W. 1989. Furazolidone-enhanced production of free radicals by avian cardiac and hepatic microsomal membranes. Toxicology and Applied Pharmacology. 98: 81-86
- Vass, M., Kotkova, L., Diblikova, I., Nevorankova, Z., Cooper, K.M., Kennedy, D.G. and Franek, M.2005. Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone. Veterinary Medicine. 50(7): 300–310

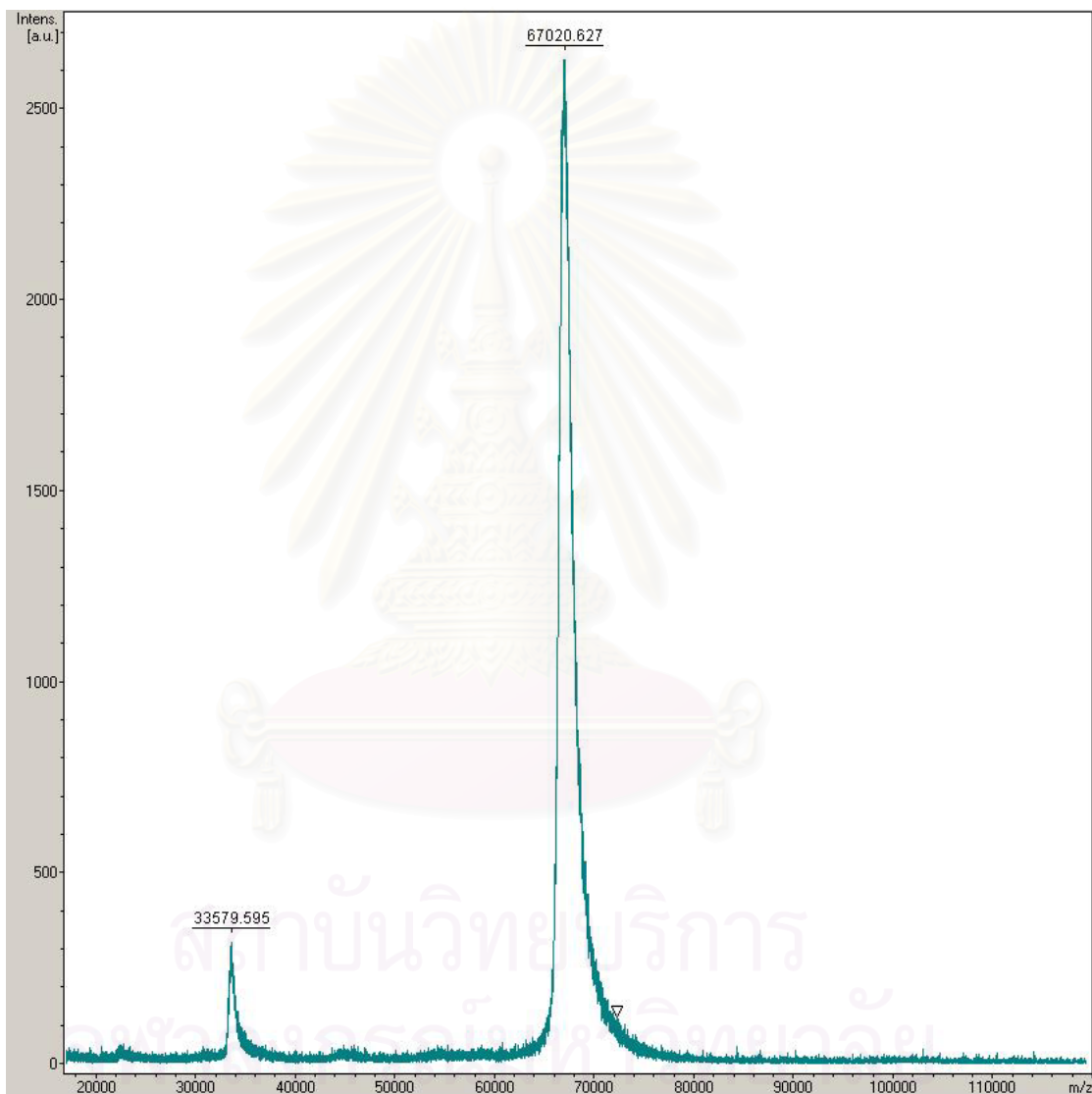


ภาคผนวก

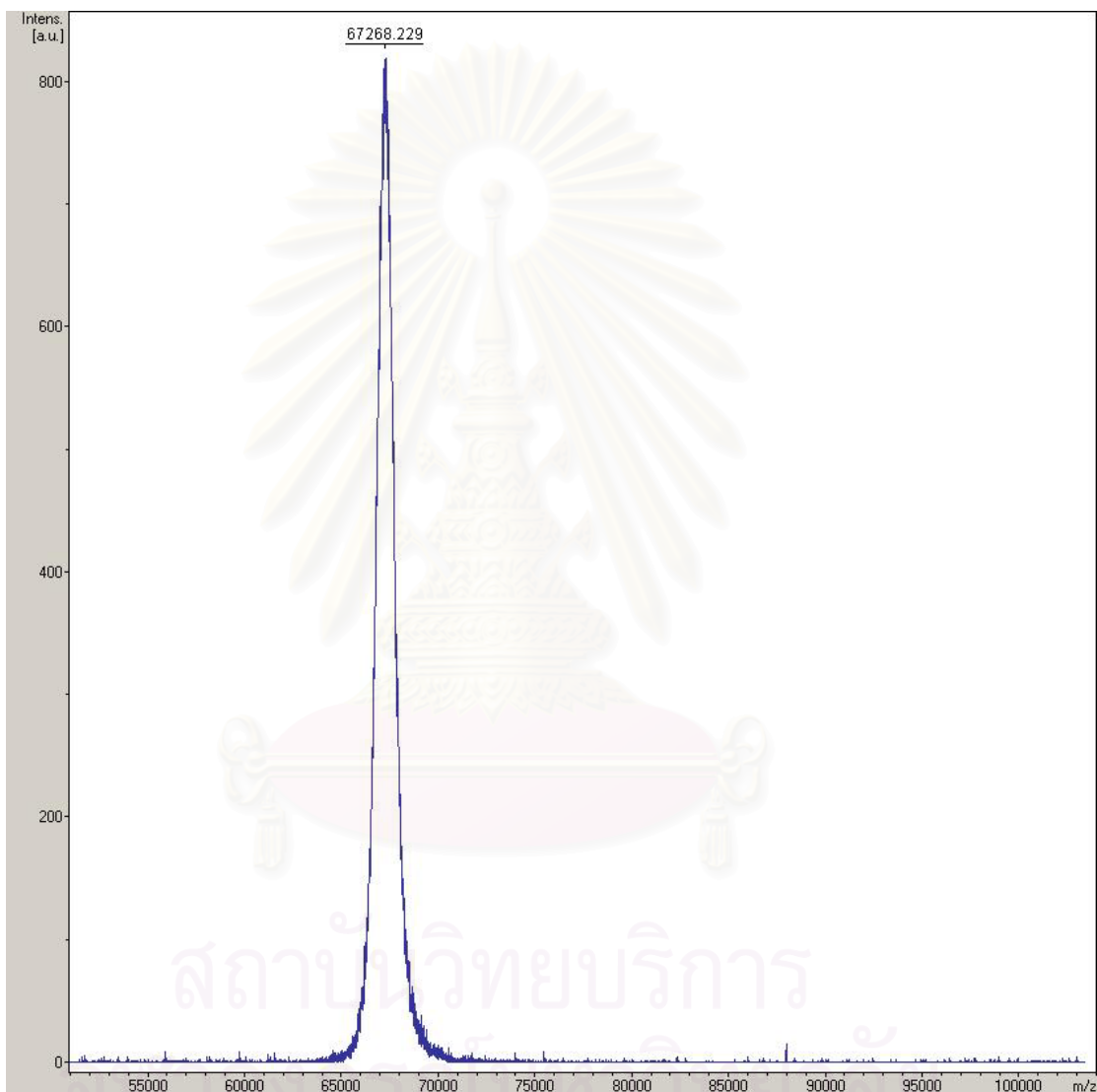
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

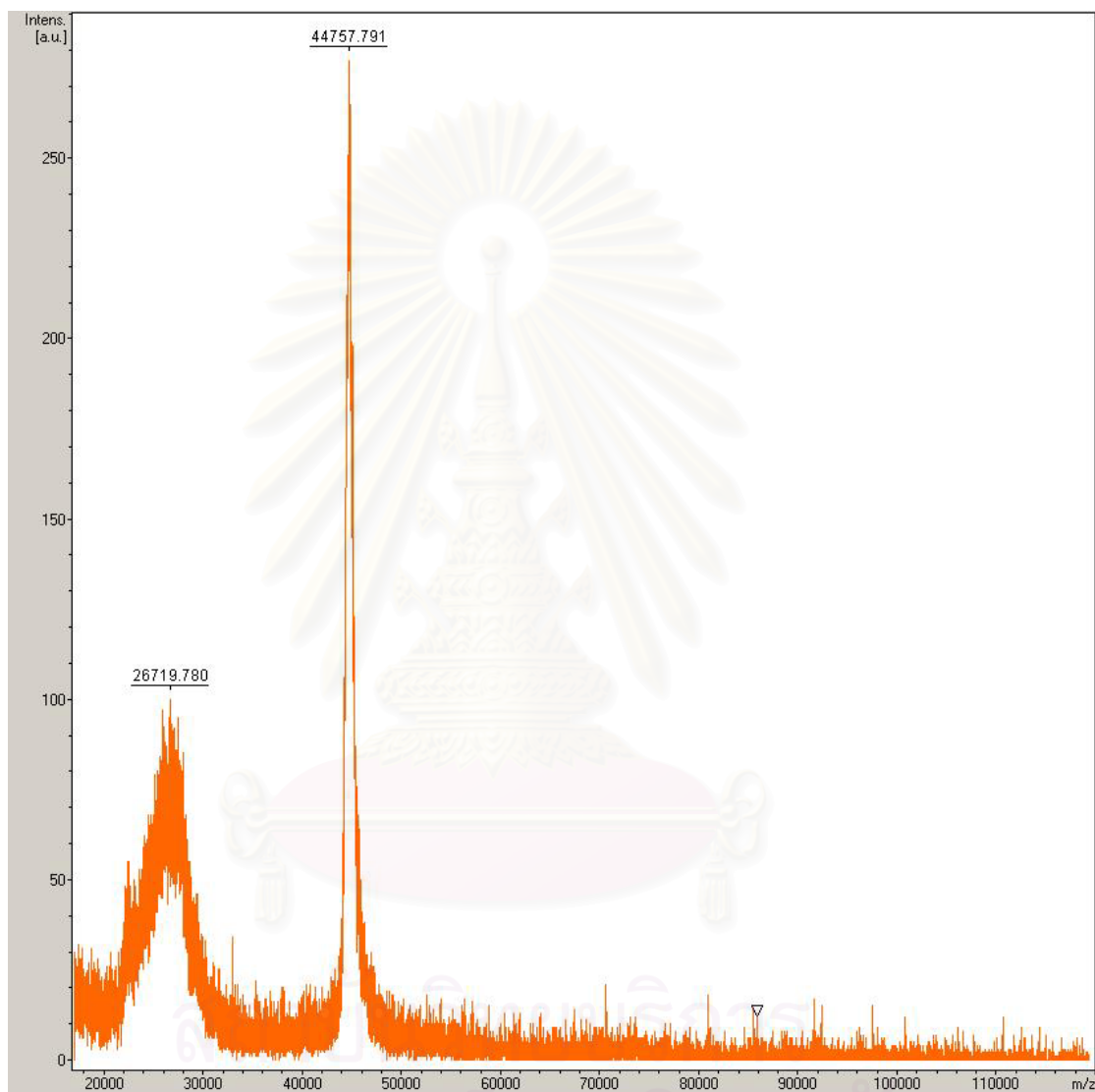
การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF/MS



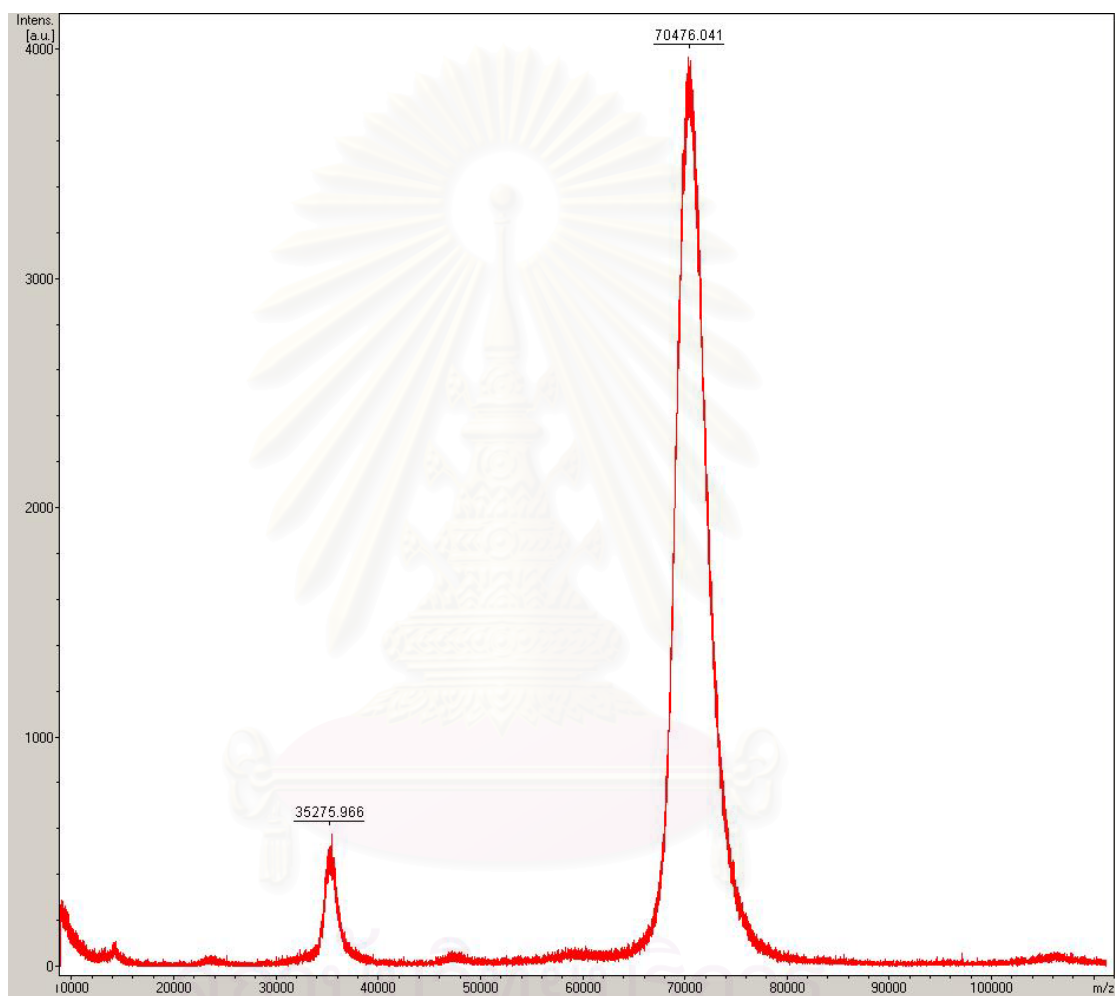
รูปผนวกที่ ก.1 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี MALDI-TOF/MS



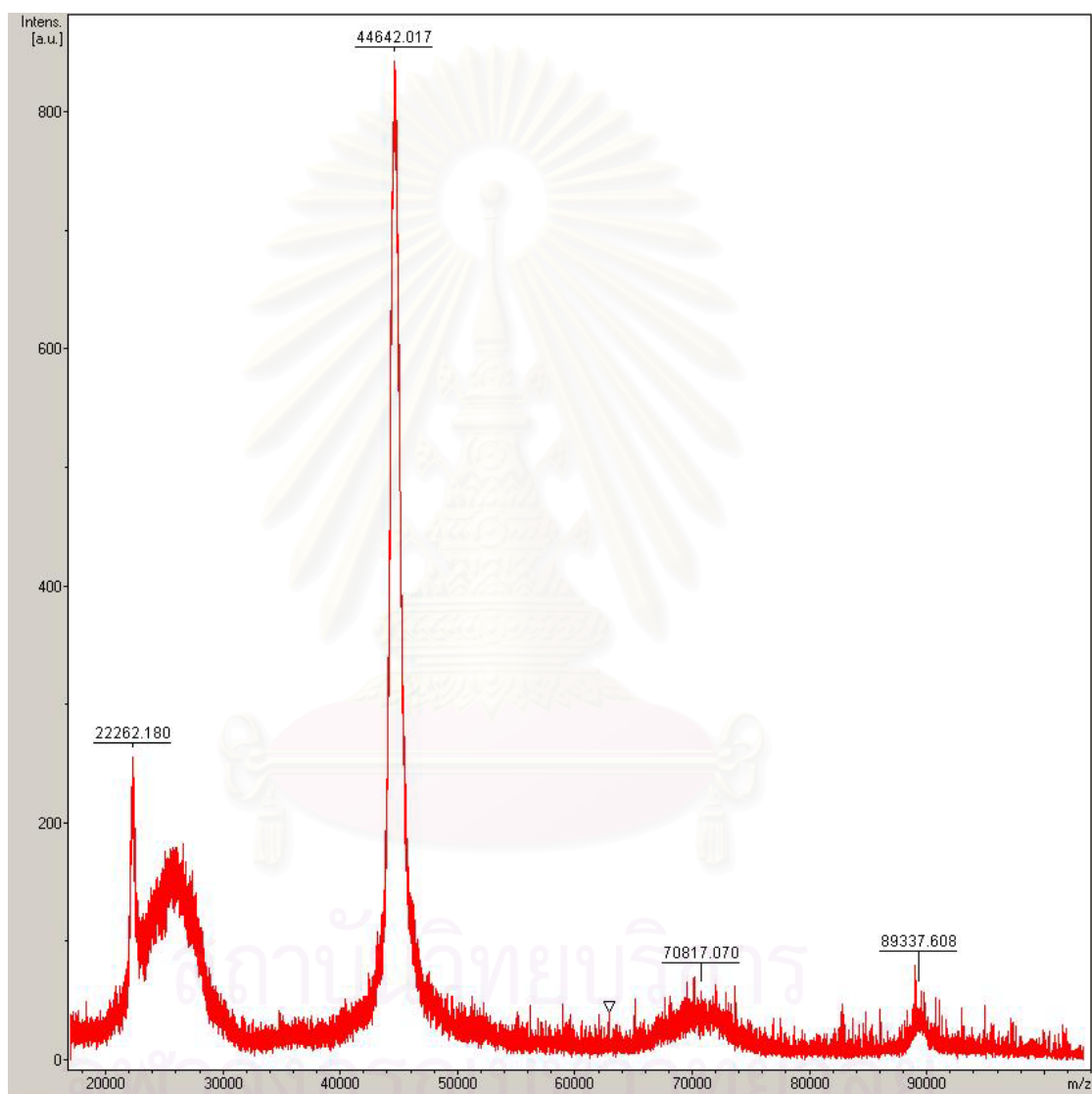
รูปผนวกที่ ก.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ cd-BSA โดยวิธี MALDI-TOF/MS



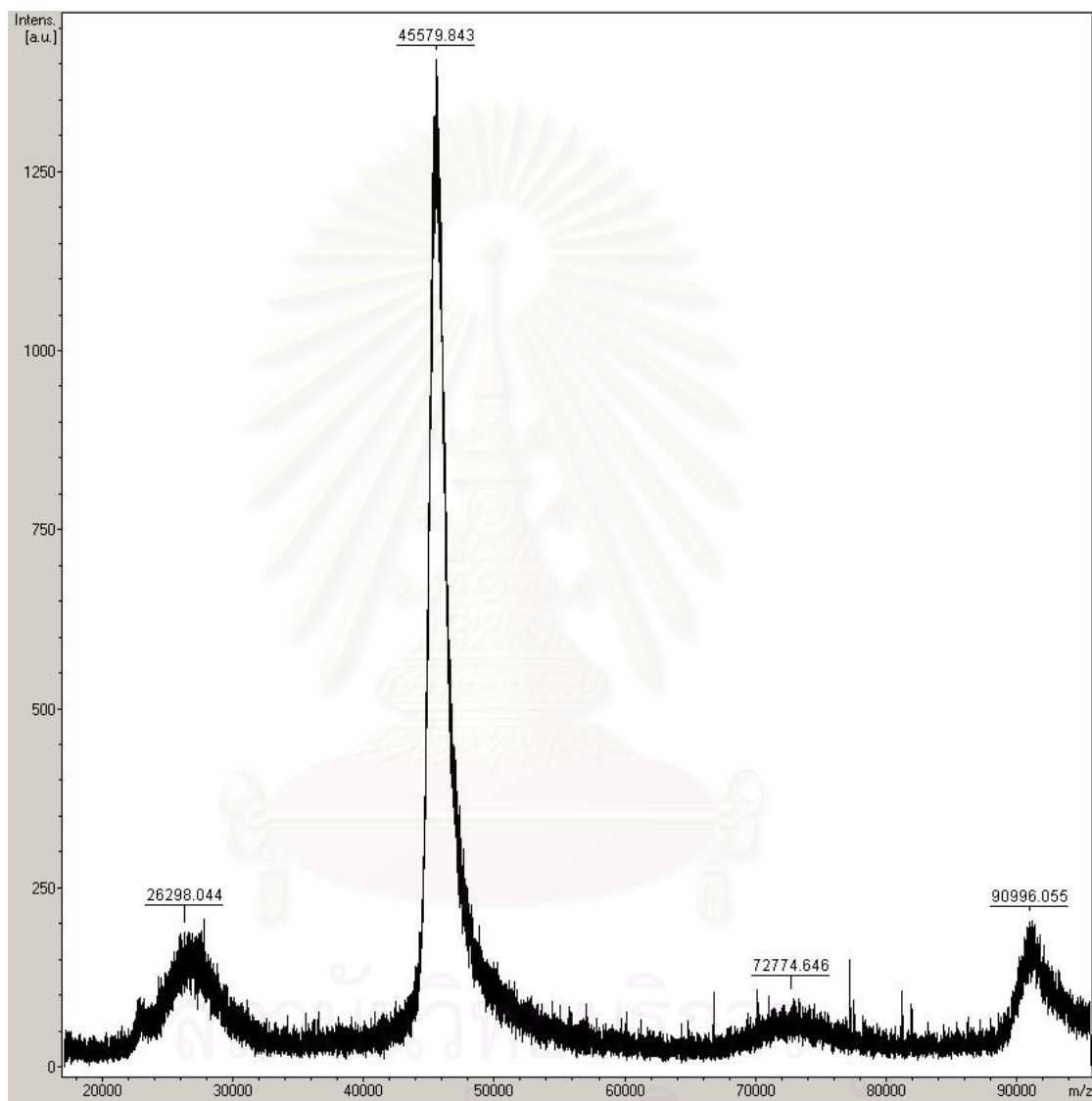
รูปผนวกที่ ก.3 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน OVA โดยวิธี MALDI-TOF/MS



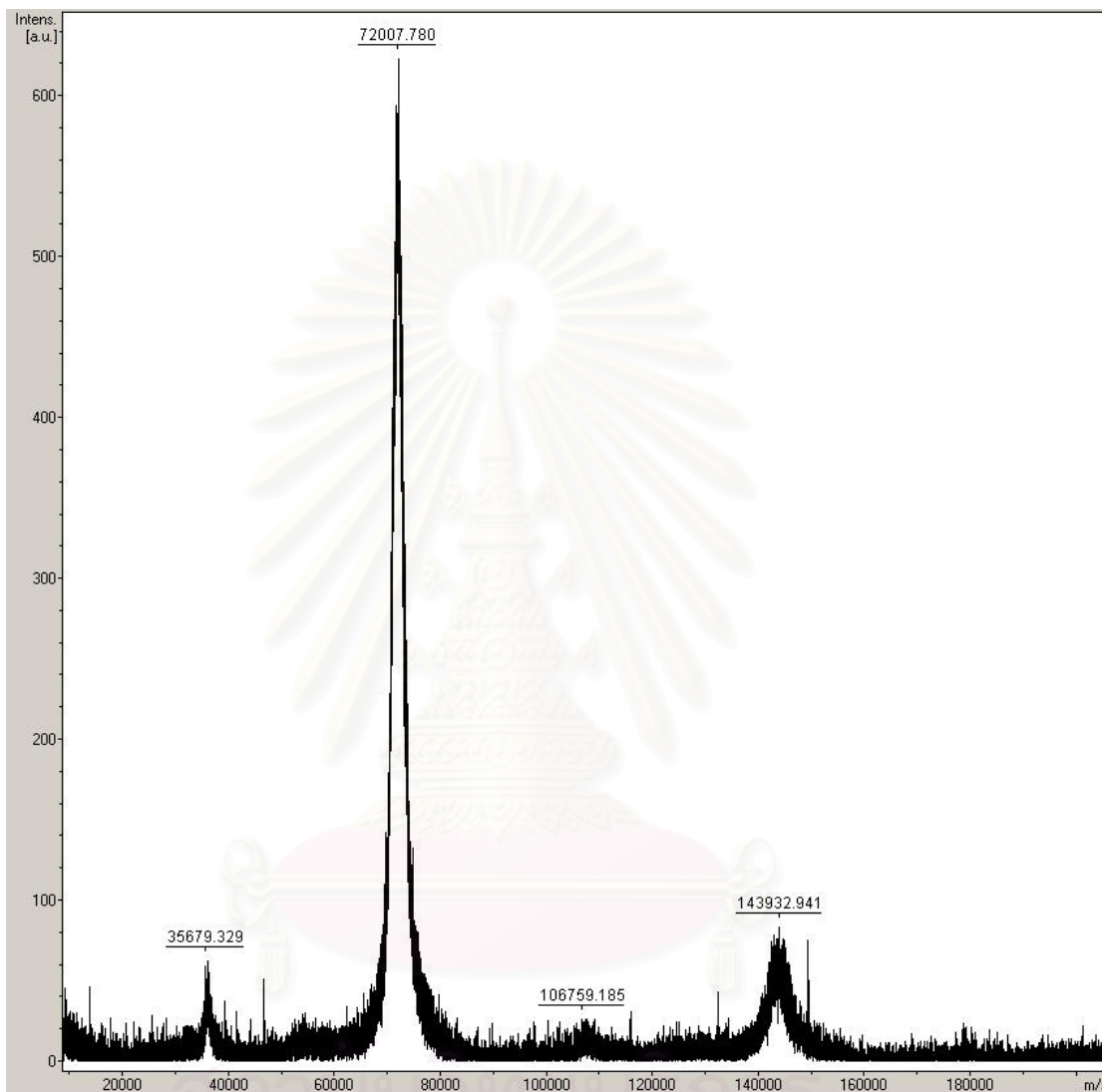
รูปผนวกที่ ก.4 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CPAOZ-ed-BSA (ใช้ EDC เป็นในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS



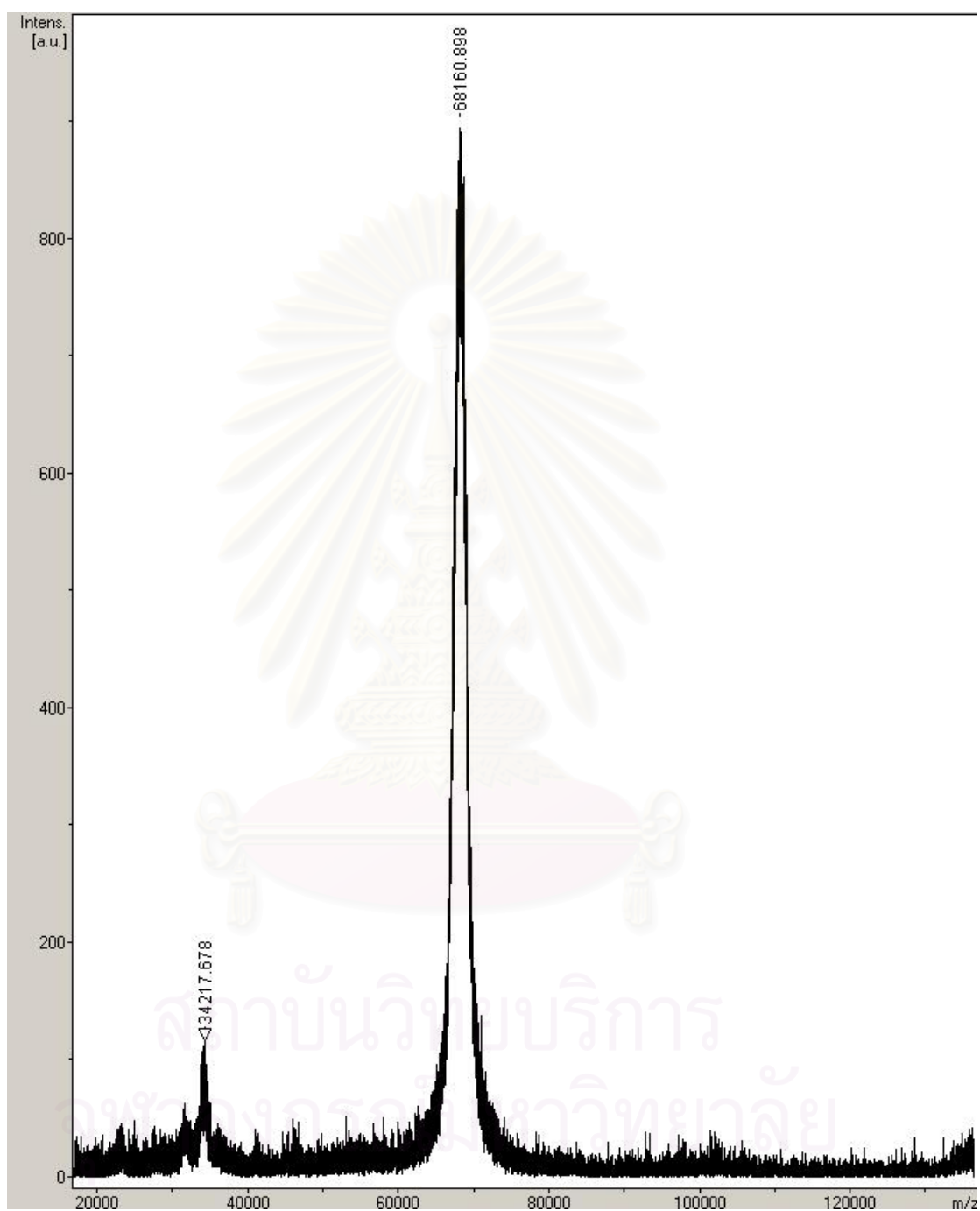
รูปผนวกที่ ก.5 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CPAOZ-OVA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS



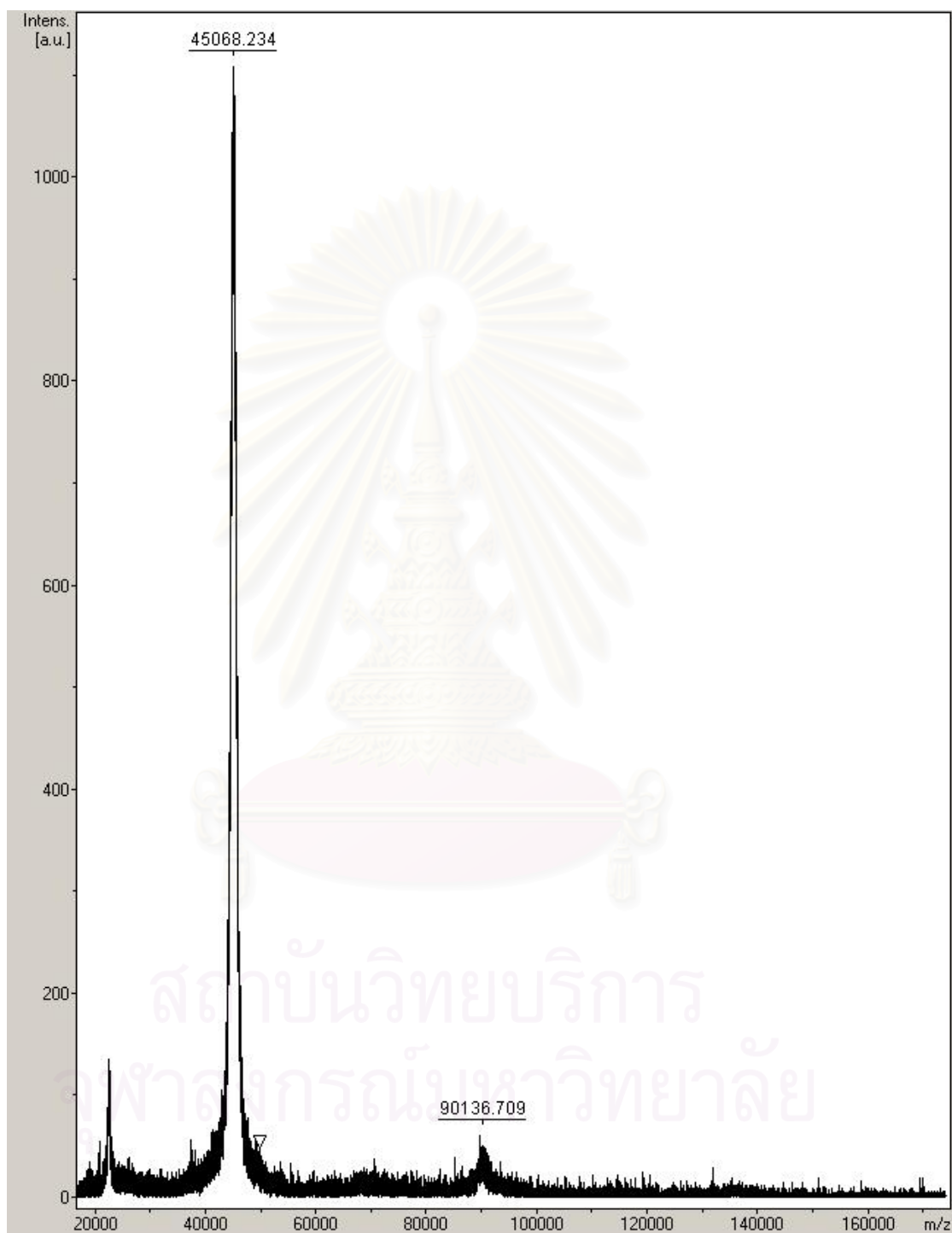
รูปผนวกที่ ก.6 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-glu-OVA (ใช้ glutaraldehyde เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS



รูปผนวกที่ ก.7 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-BSA (ใช้ EDC/NHS เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS



รูปผนวกที่ ก.8 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-BSA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด)
โดยวิธี MALDI-TOF/MS

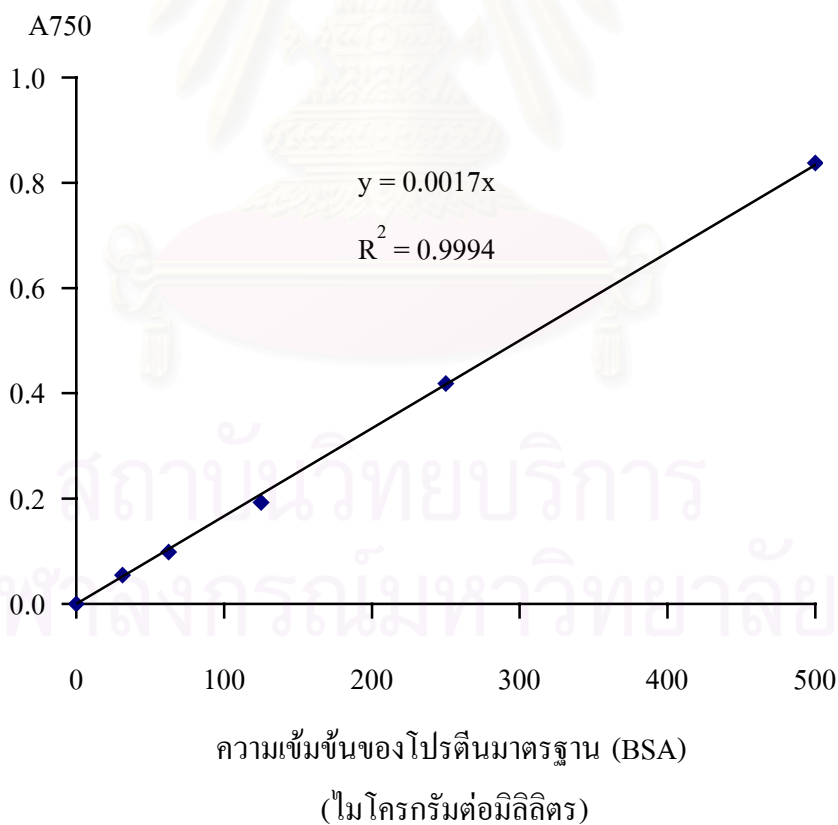


รูปผนวกที่ ก.9 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ AOZ-OVA (ใช้ EDC เป็นสารในการเชื่อมติด) โดยวิธี MALDI-TOF/MS

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ ข.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

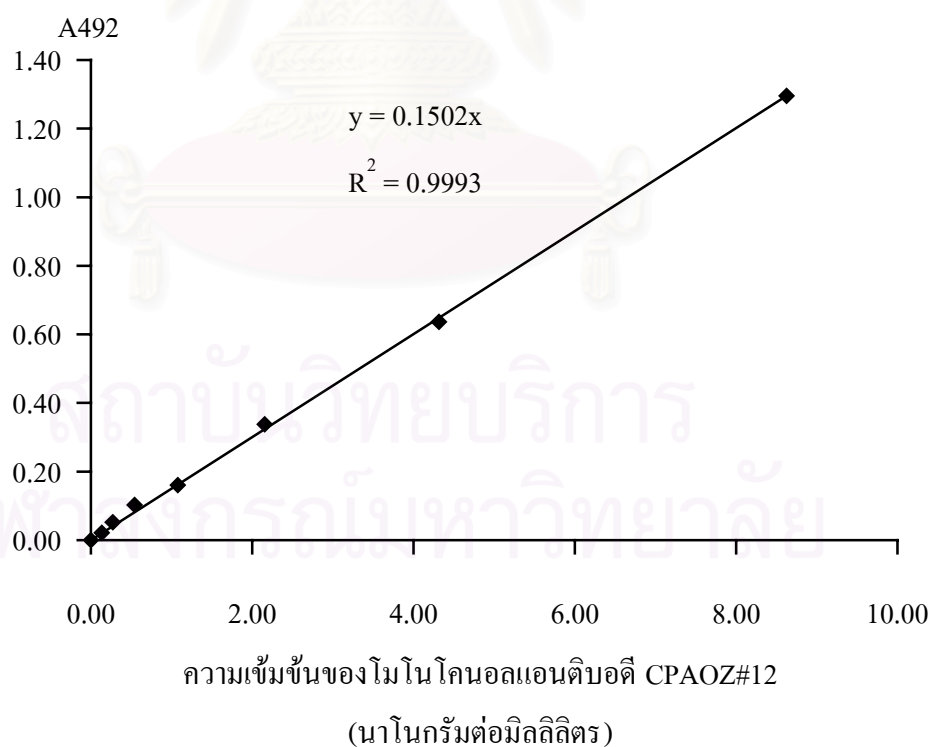
ความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐาน (BSA) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A_{750})		
	ครั้งที่		ค่าเฉลี่ย
	1	2	
0.00	0.000	0.000	0.000
31.25	0.057	0.053	0.055
62.50	0.100	0.097	0.099
125.00	0.205	0.181	0.193
250.00	0.418	0.419	0.419
500.00	0.829	0.845	0.837



รูปผนวกที่ ข.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) โดยวิธี Lowry

ตารางผนวกที่ ข.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของสารละลายโมโนโคลนอล แอนติบอดี CPAOZ#12 โดยวิธี indirect ELISA

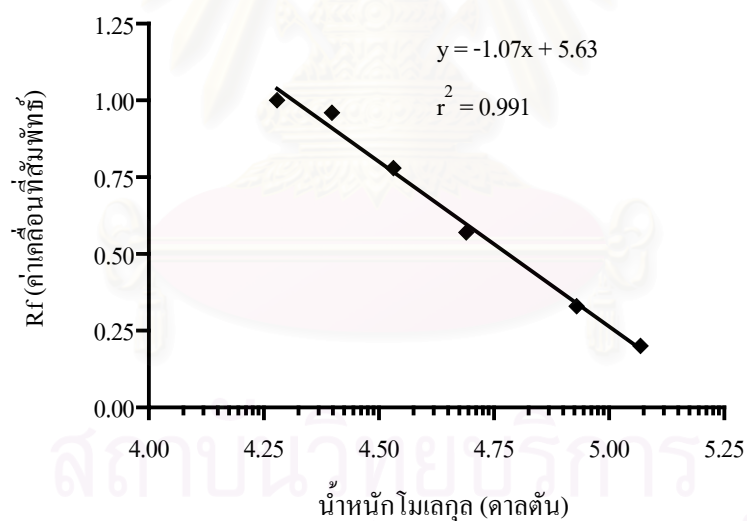
ความเข้มข้น โมโนโคลนอล แอนติบอดี CPAOZ#12 (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A_{492})			
	ครั้งที่		ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ยหักตัวควบคุมลบ
	1	2		
0.00	0.053	0.062	0.058	0.000
0.13	0.086	0.079	0.083	0.022
0.27	0.117	0.110	0.114	0.053
0.54	0.166	0.161	0.164	0.103
1.08	0.222	0.222	0.222	0.161
2.16	0.399	0.399	0.399	0.338
4.31	0.702	0.693	0.698	0.637
8.63	1.354	1.359	1.357	1.296
17.25	2.063	2.039	2.051	1.990
34.50	2.632	2.577	2.605	2.544



รูปผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐาน โมโนโคลนอลแอนติบอดี CPAOZ#12 บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งเคลือบด้วย CPAOZ-OVA ความเข้มข้น 0.375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข.3 ค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานต่างๆวิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส แบบเอสดีเอส

น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	โปรตีนมาตรฐาน	แหล่งที่มา	ค่าเคลื่อนที่ สัมพัทธ์ (R_f)
117	β -galactosidase	<i>E. coli</i>	0.20
85	BSA	Bovine plasma	0.33
49	OVA	Chicken egg white	0.55
34	Carbonic anhydrase	Bovine erythrocyte	0.78
25	β -lactoglobulin	Bovine milk	0.96
19	Lysozyme	Chickem egg white	1.00



รูปผนวกที่ ข.3 กราฟโปรตีนมาตรฐานที่วิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส แบบเอสดีเอส

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร

ภาคผนวก ค.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบการเชื่อมติดสารกับโปรตีนโดยวิธี TNBS

- 1) 0.1 Sodiumbicarbonate buffer pH 8.5

- Na ₂ CO ₃	3.18	กรัม
- NaHCO ₃	5.86	กรัม
- น้ำกลั่น	1	ลิตร

- 2) 10% SDS

- Sodium dodecyl sulfate(SDS)	10	กรัม
- น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค.2 การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

- 1) 0.01 M Phosphate Buffer Saline ความเข้มข้น 5 เท่า pH 7.4 (5X PBS)

- NaCl (MW. 58.44)	40.5	กรัม
- KCl (MW. 74.56)	1	กรัม
- KH ₂ PO ₄ (MW. 136.09)	1	กรัม
- Na ₂ HPO ₄ (MW.141.96)	5	กรัม
- น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลานำมาใช้ผสม 5X PBS 100 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

- 2) PBS-0.05% Tween 20 ความเข้มข้น 5 เท่า (5X PBS-T)

- 5X PBS	1	ลิตร
- Tween 20	2.5	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลานำมาใช้ผสม 5X PBS 100 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

3) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย ชี่ห้อ mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

4) 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

Na_2HPO_4 (MW. 141.96)	9.5	กรัม
Citric acid monohydrate	7.3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) Stock OPD

O-phenylenediamine HCl	80	มิลลิกรัม
0.15M Phosphate citrate buffer, pH5.0	1	มิลลิลิตร

ผสมเข้ากันในหลอดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6) Substrate OPD

Stock OPD	75	ไมโครลิตร
30% H_2O_2	6	ไมโครลิตร
0.15 M Phosphate citrate buffer	15	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีชา) เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7) 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

96% H_2SO_4 (98.08 mol/l)	133	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	867	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

1) Stock HAT 100X

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

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

2) Stock HT 100X

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

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

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
NaHCO ₃	2	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

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

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

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

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

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

6) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บเซลล์ระยะยาว

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7) การเตรียม 50% PEG

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

ภาคผนวก ค.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

1) สารละลายรีเอเจนต์ เอ (reagent A)

- 0.1M NaOH

NaOH	40	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2CO_3 5 กรัม ละลายใน 0.1M NaOH 250 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

2) สารละลายรีเอเจนต์ บี (reagent B)

- 1% trisodium citrate

Trisodium citrate(MW.294.10)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม ละลายใน 1% trisodium citrate 100 มิลลิลิตร

3) สารละลายรีเอเจนต์ ซี (reagent C)

ผสมรีเอเจนต์ เอ 20 มิลลิลิตร กับ รีเอเจนต์ บี 0.4 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้

4) สารละลายรีเอเจนต์ ดี (reagent D)

ผสม Folin-Ciocalteu Phenol reagent 1 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้

ภาคผนวก ค.5 การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1) 0.1 M citrate buffer, pH 3.5

0.1M citric acid

- Citric acid (MW. 210.14)	41.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1	ลิตร

0.1M Na_2HPO_4

- Na_2HPO_4 (MW. 358.14)	71.63	กรัม
- น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรทกรดด้วยด่างจนได้ pH 3.5 กรองผ่าน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2) 0.1 M Phosphate buffer, pH 8.0

- Na ₂ HPO ₄ (MW. 358.14)	30.8	กรัม
- NaH ₂ PO ₄ (MW. 156.01)	2.2	กรัม
- น้ำกลั่น	1	กรัม

กรองผ่าน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3) 1.0 M Tris-HCl buffer, pH 9.0

- Tris (hydroxymethyl) aminomethane(MW. 121)	60.5	กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร		

ปรับ pH กรดไฮโดรคลอริก จนได้ pH เท่ากับ 9 นำไปกรองผ่าน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ค.6 การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

1) 10% separating gel

-น้ำกลั่น	3.84	มิลลิลิตร
-40% Acrylamide gel	2.00	มิลลิลิตร
-1.5M Tris (pH 8.8)	2.00	มิลลิลิตร
-10% SDS	0.08	มิลลิลิตร
-10% Ammoniumpersulfate(APS)	0.08	มิลลิลิตร
-TEMED	0.0032	มิลลิลิตร

2) 5% stacking gel

-น้ำกลั่น	1.46	มิลลิลิตร
-40% Acrylamide gel	0.25	มิลลิลิตร
-1.0M Tris (pH 6.8)	0.25	มิลลิลิตร
-10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
-10% Ammoniumpersulfate(APS)	0.02	มิลลิลิตร
-TEMED	0.002	มิลลิลิตร

3) SDS staining dye		
-SDS dye	900	ไมโครลิตร
- β -mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร
4) Running buffer		
-Trisma base	15.1	กรัม
-Glycine	94	กรัม
-SDS	5	กรัม
-น้ำกลั่น	1	ลิตร
5) Staining solution		
-comassie brillant blue R 250	5	กรัม
-95% ethanol	450	มิลลิลิตร
-acetic acid	100	มิลลิลิตร
-น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร
6) Destaininng solution		
-methanol	250	มิลลิลิตร
-glacial acetic acid	70	มิลลิลิตร
-น้ำกลั่น	680	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายรัฐพล เฉลิมโรจน์ เกิดเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2523 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547 เสนอผลงานวิชาการในงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย