จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ

โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ (ปีที่ 1)

โดย

อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

นายอณุมาศ บัวเขียว

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณกระตุ้นเศรษฐกิจ (บัชญีเงินกู้) ทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อคณะกรรมการที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาวชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ นิสิตปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการดำเนินการวิจัยนี้สำเร็จไปตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในงานวิจัยครั้งนี้ให้ประสบความสำเร็จ

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2554

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ (ปีที่ 1)

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
นายอณุมาศ บัวเขียว

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ กันยายน 2554

เตตราไซคลิน (TC) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ในวงกว้างในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์และมนุษย์ เนื่องจากการตกค้างของ TC ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์สามารถเป็นสาเหตุของการดื้อยาในมนุษย์ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA โดยทำการเชื่อม TC กับโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของวัวที่ถูกเติมประจุบวก และใช้เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว หนูทดลองทุกตัวตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อ TC และมีระดับแอนติบอดี 1:64000 ถึง 1:512000 เพื่อสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่หลั่งแอนติบอดีต่อ TC จึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยอีโลมา NSI พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC จำนวน 3 โคลน คือ 7-C4, 12-3F และ 5-9H จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าเป็นไอโซไทป์ชนิด IgG_1, IgG_{2a} และ IgG_1 ตามลำดับ มีความไวซึ่งคำนวณในรูปของค่าปริมาณของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 2, 16 และ 56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) ตามลำดับ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความจำเพาะต่อสารในกลุ่ม TCs ที่นำมาทดสอบ คือ ออกซิเตตราไซคลิน (OTC) คลอเตตราไซคลิน (CTC) ดอกซิไซคลิน (DC) และโรลิเตตราไซคลิน (RTC) อยู่ในช่วง 2 ถึง 307 เปอร์เซ็นต์ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มอื่นๆที่นำมาทดสอบ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้นี้จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบโดยหลักการภูมิคุ้มกันสำหรับตรวจวัด TC ได้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title Production of monoclonal antibody against tetracycline for developing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit (1St Year)

Name of the investigators Dr. Nanthika Khongchareonporn

Dr. Kittinan Komolpis

Mr. Anumart Buakeaw

Year September, 2011

Tetracycline (TC) is a broad-spectrum antibiotic used against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. It is, Therefore, widely used to treat diseases in livestock and human. Since TC residue in livestock products can cause drug resistance in human, it is essential to detect its residue in the products. The aim of this work was to generate monoclonal antibodies against TC for uses in ELISA test kit development. TC conjugated to cationized bovine serum albumin was used as an immunogen to immunize five BALB/c mice. All mice responsed by producing antibodies against TC and gave antiserum titers 1:64000 to 1:512000. To generate hybridoma cell secreting antibody against TC, fusions of splenocytes and myeloma cells NSI were performed yielding three hybridoma clones, 7-C4, 12-3F and 5-9H, which produce monoclonal antibodies against TC. Isotype, sensitivity and specificity of monoclonal antibodies from these three clones were characterized. The isotype of these clones was IgG_1, IgG_{2a} and IgG_1, respectively. Their sensitivities calculated as limit of detection were 2, 16 and 56 ppb, respectively. The monoclonal antibodies were highly specific to antibiotics in TCs group, oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), doxycycline (DC) and rolitetracycline (RTC) ranging from 2 to 307% and did not cross react with other tested antibiotics. Thus, these monoclonal antibodies have a potential use in the development of an immunoassay-based test kit for detecting TC.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ii
บทคัดย่อภาษาไทย..... iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... iv
สารบัญ..... v
รายการตารางประกอบ..... vii
รายการรูปประกอบ..... viii
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์..... 3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย..... 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
บทที่ 2 แนวคิดและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี..... 4
2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์สารกลุ่มเตตราไซคลิน..... 4
2.1.2 มาตรฐานยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs..... 6
2.1.3 แอนติเจนและแอนติบอดี..... 7
2.1.4 การผลิตแอนติบอดี..... 12
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 17
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 17
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 17
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 19
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 21
3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู..... 21
3.4.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย TC-cBSA..... 23
3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ต่อ TC..... 24

หน้า

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้..... 26
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัยและอภิปราย..... 28
4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง..... 28
4.2 ผลการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ TC..... 33
4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ TC..... 35
4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 46
เอกสารอ้างอิง..... 48
ตารางสรุปกิจกรรมการวิจัยที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ได้ดำเนินการแล้ว..... 50
ผลผลิตและผลลัพธ์ของโครงการ การคำนวณต้นทุนและราคาในท้องตลาด..... 50
ภาคผนวก 51
ภาคผนวก ก..... 52
ภาคผนวก ข..... 59

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ปริมาณยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม Tcs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximun Residues Limit, MRLs) 7

2.2 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ..... 11

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 18

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 18

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 19

4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนพาหะ cBSA โดยใช้วิธี BCA..... 29

4.2 ผลทดสอบการเพิ่มหมู่เอมีนในโมเลกุลของโปรตีน BSA โดยวิธี TNBS..... 29

4.3 ค่าความเข้มข้นของแอนติเจน TC-cBSA โดยใช้วิธี BCA..... 31

4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่าง TC กับโปรตีน cBSA โดยวิธี TNBS..... 32

4.5 การทดสอบระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA จำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA..... 33

4.6 การทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนอิสระของซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA..... 35

4.7 ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 5 ครั้ง..... 36

4.8 ผลของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA..... 36

4.9 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA..... 37

4.10 ค่าความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ที่เหมาะสมโดยวิธี indirect ELISA..... 37

4.11 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-4C ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA..... 40

4.12 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 12-3F ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA..... 42

4.13 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-9H ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA..... 44

4.14 ผลสรุปการหาไอโซไทป์ การศึกษาความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 45

รายการรูปประกอบ

รูปที่ **หน้า**

2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม TCs..... 5

2.2 epitope หรือ antigenic determinant บนแอนติเจน แอนติเจนนี้มี epitope ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะของแต่ละ epitope จึงมีแอนติบอดี 3 แบบต่อแอนติเจนนี้..... 8

2.3 ตัวอย่าง epitope ปรากฏในไวรัส ถ้านำส่วนนอกของไวรัสซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนจะพบว่าแอนติเจนส่วนนี้ประกอบด้วย epitope แตกต่างกันหลากหลาย epitope..... 9

2.4 นำแฮปเทน (dinitropheno, DNP) ยึดติดกับ carrier เช่น Bovine serum albumin (BSA) ฉีดให้กับกระต่าย และตรวจแอนติบอดีที่กระต่ายสร้างขึ้น จะพบแอนติบอดี anti-BSA, anti- DNP และ anti-DNP/BSA..... 9

2.5 โครงสร้างของแอนติบอดี..... 11

2.6 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์..... 12

2.7 แอนติเจนที่ประกอบด้วย epitope 4 แบบ หากผลิตแบบพอลีโคลนอลแอนติบอดี จะได้ซีรัมที่ มีความจำเพาะต่อ epitope ทั้ง 4 แบบ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะได้แอนติ-บอดีจำเพาะต่อ epitope หนึ่งๆ บนแอนติเจน..... 13

2.8 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง..... 15

2.9 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ De Novo และ Salvage pathway..... 16

4.1 การแทนที่ไดเอมีนเข้าที่ตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีนโดยใช้ EDA และ EDC..... 28

4.2 สเปกตรัมของมวลโมเลกุลของโปรตีน BSA และ cBSA โดยวิธี MALDI-TOF MS..... 30

4.3 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ cBSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich..... 31

4.4 สเปกตรัมของมวลโมเลกุลของ TC-cBSA โดยวิธี MALDI-TOF MS..... 32

4.5 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA จำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:1000 ถึง 1:512000..... 34

รูปที่ **หน้า**

4.6 การหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ต่อ TC โดยวิธีindirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H เจือจาง 1:20, 1:800 และ 1:10 ตามลำดับ แข่งขันกับ TC อิสระ 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 38

4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-4C โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C เจือจาง 1:20 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 39

4.8 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 12-3F โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 12-3F เจือจาง 1:1600 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 41

4.9 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-9H โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 5-9H เจือจาง 1:10 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 43

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งสินค้าเกษตรและอาหารที่สำคัญของโลก ปัญหาสารตกค้างในกลุ่มยาปฏิชีวนะ เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ มีการนำยาปฏิชีวนะหลายชนิดมาใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อเร่งการเจริญเติบโต เพื่อป้องกันและรักษาโรค แต่การใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ถ้าเกษตรกรมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้โดยไม่มีการควบคุมที่ดี เช่น ขนาดที่จะใช้ ระยะเวลาการใช้ ระยะเวลาหยุดใช้ พบว่าจะนำไปสู่ปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างและการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้น ดังนั้นหน่วยงานที่รับผิดชอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของผู้บริโภค จากประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย เช่น Codex (Joint FAO/WHO Food Standard Program) EU คณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ได้มีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่สามารถตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) ขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ

เตตราไซคลิน (tetracycline) เป็นหนึ่งในกลุ่มยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ (antibiotic) ประกอบด้วยสารเช่น เตตราไซคลิน (TC) ออกซีเตตราไซคลิน (OTC) และ คลอเตตราไซคลิน (CTC) เป็นต้น มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง แกรมบวกและแกรมลบ โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการจับของ tRNA บนไรโบโซมของเชื้อทำให้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์อย่างแพร่หลาย เช่น ในสุกร โค ไก่ และผึ้ง หรือใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นเวลานานเพื่อเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ เช่น ในเนื้อ ไข่ น้ำนม หรือน้ำผึ้ง จากการสำรวจของสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1993 ตรวจพบเตตราไซคลินตกค้างอยู่ในสัตว์บ่อยถึง 4% ของสัตว์ที่มียาตกค้างอยู่ (Lee และคณะ, 2001) การตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้น อาจก่อให้เกิดการเป็นพิษหรือการแพ้ในผู้บริโภค รวมถึงการเกิดการดื้อยาในเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะเชื้อแกรมลบได้ จากสาเหตุดังกล่าว ทำให้แต่ละประเทศหันมาเน้นเรื่องความปลอดภัยของอาหารโดยมีการตรวจสอบการตกค้างของสารเตตราไซคลินในผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ สำหรับอาหารที่จัดได้ว่าได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขจะต้องพบปริมาณสารเตตราไซคลินปนเปื้อนในผลิตภัฑณ์อาหารจากสัตว์ ได้แก่ กล้ามเนื้อ ตับ ไต ไข่ และ นม น้อยกว่า 0.2, 0.6, 1.2, 0.4 และ 0.1 ppm ตามลำดับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) และในสหรัฐอเมริกาได้กำหนดค่าปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถตกค้างได้ สำหรับเตตราไซคลินในกล้ามเนื้อ ตับ และ ไต เป็น 2, 6 และ 12 ppm (Moats, 2000) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์

หาสารตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติการ โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Pena และคณะ, 2005; Zhenfeng และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2008) และ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)/LC MS-MS) (Koesukwiwat และคณะ, 2007; Giannett และคณะ, 2010) ซึ่งการตรวจโดยวิธีเหล่านี้สามารถหาปริมาณสารตกค้างได้ถูกต้องและแม่นยำสูง แต่เครื่องมือมีราคาแพง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการของวิธี colorimetric method โดยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างน้ำยาทดสอบกับยาแต่ละชนิดเกิดสีที่แตกต่างกัน มีวิธีการไม่ยุ่งยาก ราคาถูก ใช้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ค่อนข้างสูง (ระดับ ppm) เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน เช่นเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างในสัตว์เลี้ยงและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง(Pastor-Navarro และคณะ, 2007; Zhangและคณะ, 2007; Jeon และคณะ, 2008) โดยอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่ประหยัด รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถหาสารตกค้างปริมาณน้อยได้ การตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้เป็นวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบตัวอย่างเบื้องต้นได้เป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างก่อนที่จะนำไปตรวจโดยการใช้เครื่องมือ เช่น LC-MS จึงทำให้ต้นทุนในการตรวจสารนี้ลดลง ตัวอย่างชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่าย เช่น MaxSignal™ Tetracycline ELISA Test Kit ใช้ตรวจสอบเตตราไซคลินที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ สามารถตรวจสอบความเข้มข้นที่ต่ำที่ต่ำสุดถึง 0.1 ppb

ในปัจจุบันประเทศไทยนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA จำนวนมากสำหรับตรวจหาสารตกค้าง ซึ่งมีราคาสูงประมาณ 20,000 บาทต่อชุด สามารถตรวจตัวอย่างได้ประมาณ 40 ตัวอย่าง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปใช้เองจึงช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้ ซึ่งการเตรียมชุดตรวจสอบนั้น ต้องมีการเตรียมแอนติบอดีซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชุดตรวจสอบ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสารเตตราไซคลิน (TC) สำหรับการสร้างแอนติบอดีในรูปโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ เนื่องจากสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ในปริมาณไม่จำกัด และมีคุณภาพสม่ำเสมอ ซึ่งต่างจากการผลิตในรูปแบบพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ถึงแม้จะมีขั้นตอนการผลิตง่ายไม่ยุ่งยาก แต่สามารถผลิตได้ปริมาณจำกัด และมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอขึ้นอยู่กับสัตว์ทดลอง โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจหาสารตกค้างเตตราไซคลินโดยใช้วิธี ELISA ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู
3. ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน
4. หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน
5. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินและทราบลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์สารกลุ่มเตตราไซคลิน

สารกลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracyclines; TCs) เป็นสารที่ผลิตขึ้นเพื่อให้ออกฤทธิ์ในวงกว้างทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สารในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นมาจากเชื้อราในตระกูล Streptomyces สารตัวแรกที่ค้นพบคือคลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline; CTC) ค้นพบในปี ค.ศ. 1048 โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* อีก 2 ปีต่อมาก็ค้นพบออกซิเตตราไซคลิน (Oxytetracycline; OTC) โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี 1952 สามารถผลิตสารกลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้ โดยการดึงเอาอะตอมของคลอรีนออกจาก CTC สารที่ผลิตได้ใหม่นี้จะเรียกว่าเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC) เหมือนชื่อกลุ่มสาร ในปัจจุบันนี้ได้มีการผลิตสารในกลุ่มนี้ตัวใหม่ขึ้นมาใช้อีกหลายตัว ได้แก่ดอกซีไซคลิน (Doxycycline; DC) ดีมีคลอไซคลิน (Demechlocycline; DMC) เมธาไซคลิน (Methacycline; MC) และโรลิเตตราไซคลิน (Rolitetracycline; RTC) (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

กลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม TC สามารถเกิดได้หลายแบบ ดังนี้

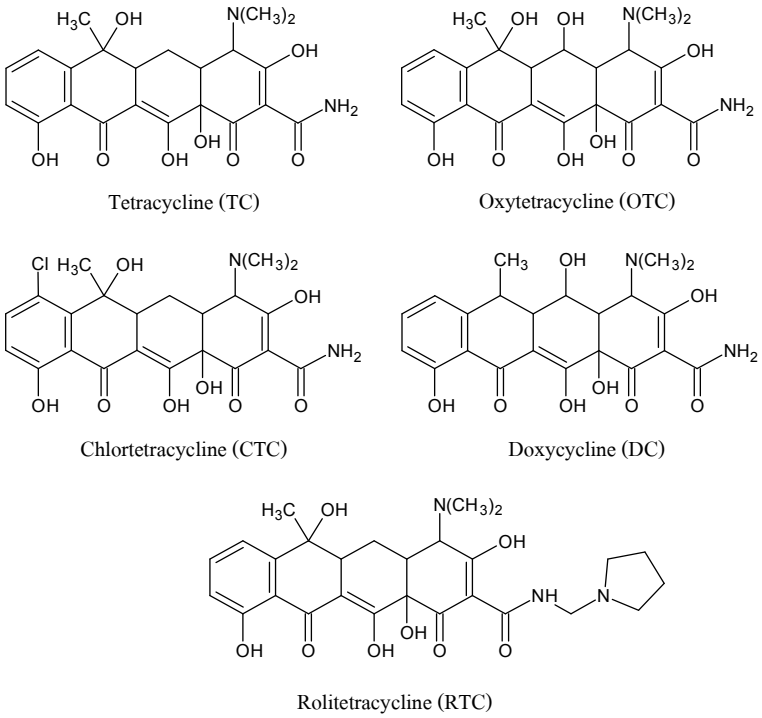
1) Active chelation ของไอออนบวก (cation) โดยจะไปเกาะกับแมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียม ยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ร่างกายสัตว์
2) ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเป็น โดย CTC จะยับยั้งเอนไซม์ organic nitroreductase ของเซลล์แบคทีเรีย
3) ขัดขวางการสร้างโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังเจริญแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ โดยจะไปเกาะกับส่วน ไรโบโซมย่อย 50s ของ 70s ไรโบโซมของเชื้อแบคทีเรีย ไปขัดขวางการขนย้ายกรดอะมิโน จาก aminoacyl t-RNA ไปยังส่วนพอลิเปปไทด์ ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและแบ่งเซลล์ (bacteriostatic)

ขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม TCs แบ่งออกได้ดังนี้

1) ออกฤทธิ์วงกว้าง (broad spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารจะไปออกฤทธิ์ยับยังการเจริญและแบ่งเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารในกลุ่มนี้ได้แก่ β-hemolytic Streptococci, nonhemolytic Streptococci, Clostridium, Brucella, Hemophius และ Klebsiella
2) ออกฤทธิ์ทำลาย pathogenic agent บางชนิดที่สารปฏิชีวนะชนิดอื่นทำลายไม่ได้ เช่น Rickettsiae, ไวรัสขนาดใหญ่ เช่น Psittacosis ในสัตว์ และ Lymphogranuloma venereum ในคน
3) ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ Mycoplasma, Spirochete และ Actinomycetes
4) ถ้าให้ปริมาณสูงๆจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโปรโตซัวได้

สูตรโครงสร้างทางเคมี ลักษณะ และสมบัติของสารในกลุ่ม TCs

สารทุกตัวในกลุ่ม TCs จะมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือ hydronapthacene skeleton หรือเรียกว่า Tetracycline nucleus ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม TCs

สาร TCs ในรูปผงผลึกจะมีสีเหลือง ไม่มีกลิ่น และมีรสขมเล็กน้อย เก็บไว้ได้นาน สารกลุ่มนี้ในรูปเป็นเบสจะละลายน้ำได้เล็กน้อยที่ pH 7 ละลายได้เพียง 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร สารในกลุ่ม TCs จัดเป็น amphoteric compound สามารถเกิดเป็นเกลือกับกรดหรือด่าง เช่น การเกิดเกลือกับกรดไฮโดรคลอริก เกลือของสารกลุ่มนี้จะสามารถละลายน้ำได้ดี สารกลุ่ม TC ในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์มักนิยมให้กินในรูปแคปซูล แต่สารนี้จะเกิดเป็นสารประกอบโลหะเชิงซ้อนกับ chelating agent และไอออนของโลหะเช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก จึงอาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่สามารถถูกดูดซึมในทางเดินอาหารได้ ฤทธิ์ของสารที่ให้กินจึงขึ้นกับสารส่วนที่ไม่จับกับไอออนของโลหะเนื่องจากจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ตามปกติ pH ของทางเดินอาหารและ pKa ของสารกลุ่มนี้เหมาะสำหรับการที่สารจะถูกดูดซึมเข้าไปออกฤทธิ์ในร่างกาย (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

พิษของยาตกค้าง TC

การเกิดการตกค้างของสาร TCs ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว เนื่องจากการที่สารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงกับขนาดที่ใช้รักษาโรค จึงไม่ทำให้เชื้อโรคที่มีในร่างการตายแต่กลับทำให้เชื้อโรคนั้นปรับตัวและดื้อต่อยา ทำให้เกิดปัญหาการรักษาโรคในภายหลังได้ และถ้าตรวจพบในระดับ 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจทำเกิดอันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภคได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยจะสามารถทำลาย normal flora จนทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อรา และแบคทีเรียอื่นๆ ทำให้มีอาการท้องเดิน มีไข้จากเชื้อ *Staphylococci* เกิดการติดเชื้อรา *Candida albicans* ในช่องปาก ลำคอ ช่องคลอด หรือทางเดินอาหาร มีผลต่อกระดูกและฟัน โดย TC จะไปจับกับแคลเซียมที่กระดูกและฟัน ยับยั้งการเจริญของกระดูกและฟัน สารที่เกาะบริเวณฟันจะทำให้ฟันมีสีน้ำตาลและเมื่อถูกแสงสีน้ำตาลจะยิ่งเข้มขึ้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้สามารถผ่านรกได้ ดังนั้นถ้าใช้ขณะตั้งครรภ์จะทำให้ฟันน้ำนมของทารกมีสีน้ำตาลแต่จะไม่มีผลกับฟันแท้ นอกจากนี้สาร TCs ทุกชนิดยังทำให้ผิวหนังแพ้ต่อแสง ผิวไหม้ และรู้สึกชาบริเวณที่ถูกแสงเป็นต้น (ปริญญา มาสวัสดิ์, 2550)

2.1.2. มาตรฐานยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง ได้ให้นิยามคำว่า <u>*ยาสัตว์*</u> หมายความว่า สารใดๆที่ให้แก่สัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ เช่น สัตว์ที่ให้เนื้อหรือนม สัตว์ปีก สัตว์น้ำและผึ้ง เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษา ป้องกัน หรือวินิจฉัยโรค หรือเพื่อวัตถุประสงค์ในการเปลี่ยนแปลงทางสรีระหรือพฤติกรรมของสัตว์นั้น <u>*ยาสัตว์ตกค้าง*</u> หมายความว่า ยาสัตว์ที่เป็นสารประกอบตั้งต้น (Parent drug) สารในกระบวนการสร้างและสลายของสัตว์ (Metabolite) และสารอื่นที่ปนมากับยาสัตว์ (Associated impurities) <u>*อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง*</u> หมายความว่า ส่วนของเนื้อเยื่อ อวัยวะหรือผลิตผลของสัตว์ที่บริโภคได้ ซึ่งพบยาสัตว์ตกค้าง

ตารางที่ 2.1 ปริมาณยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residues Limits, MRLs)

ชนิดของยาสัตว์ตกค้าง	ชนิดของสัตว์	ชนิดของเนื้อเยื่อ หรือผลิตผลของสัตว์	ปริมาณตกค้างสูงสุด (ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัม หรือต่อ 1 ลิตรของน้ำนม)
คลอเตตราไซคลิน/ออกซิเตตราไซคลิน/เตตราไซคลิน ในรูปของคลอเตตราไซคลิน/ออกซิเตตราไซคลิน/เตตราไซคลิน อย่างหนึ่งอย่างใด หรือผลรวมของยาทั้ง 3 ชนิด (Chlotetracycline/ Oxytetracycline/Tetracycline, single or in combination)	โค	กล้ามเนื้อ	200
	โค	ตับ	600
	โค	ไต	1,200
	โค	น้ำนม	100
	สุกร	กล้ามเนื้อ	200
	สุกร	ตับ	600
	สุกร	ไต	1,200
	แกะ	กล้ามเนื้อ	200
	แกะ	ตับ	600
	แกะ	ไต	1,200
	แกะ	น้ำนม	100
	สัตว์ปีก	กล้ามเนื้อ	200
	สัตว์ปีก	ตับ	600
	สัตว์ปีก	ไต	1,200
	สัตว์ปีก	ไข่	400
	ปลา*	กล้ามเนื้อ	200
	กุ้งกุลาดำ*	กล้ามเนื้อ	200

ที่มา : ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง

หมายเหตุ * ออกซีเตตราไซคลิน ชนิดเดียว

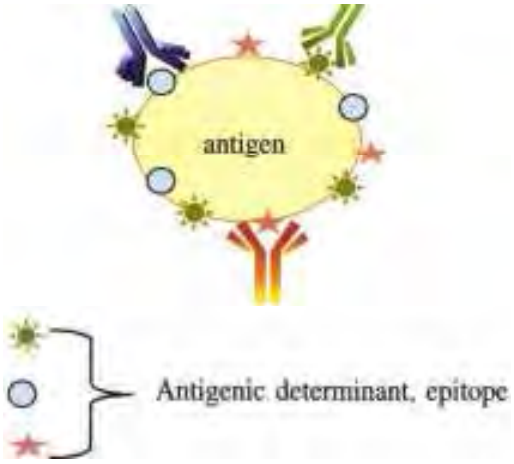
2.1.3. แอนติเจนและแอนติบอดี

2.1.3.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

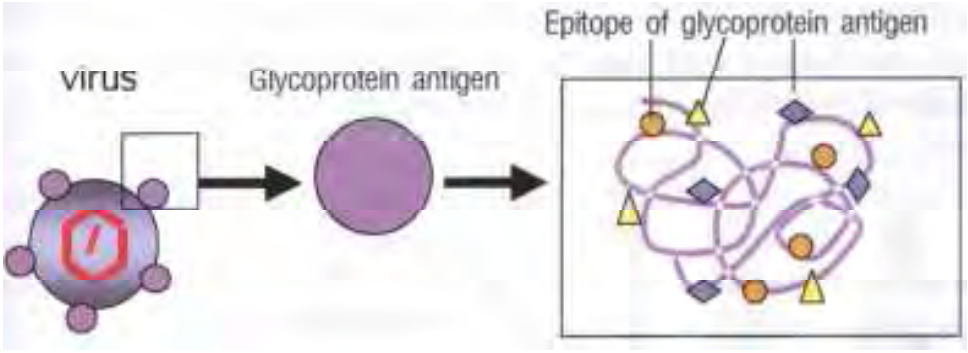
โดยทั่วไปแอนติเจน หมายถึง สิ่งแปลกปลอมที่แตกต่างจากร่างกาย (non-self) และร่างกายเกิดการตอบสนองต่อสิ่งนั้น ตัวอย่างของแอนติเจนเช่น จุลชีพ หรือองค์ประกอบของจุลชีพ โปรตีน สารเคมี

ไกลโคโปรตีน และอนุภาคไวรัส เป็นต้น แอนติเจนที่สมบูรณ์จะมีคุณสมบัติสำคัญ 2 ประการ คือ ความสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน เรียกว่า immunogenicity กล่าวคือสารนั้นจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี และกระตุ้นการทำงานของ T lymphocyte อย่างจำเพาะที่เรียกว่า sensitized T lymphocyte ในคุณสมบัตินี้จึงมักใช้คำว่า immunogen แทนแอนติเจนด้วย คุณสมบัติที่สองคือ ความสามารถของสารที่จะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้น เช่น ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี และหรือ sentitized T lymphocyte เรียกว่ามี specific reactivity การที่สารทำปฏิกิริยาจำเพาะดังกล่าวนิยมใช้คำว่า แอนติเจน

แอนติเจนเป็นสารต่างๆ ที่จะมีโครงสร้างจำเพาะใน 1 โมเลกุลจะมีส่วนที่จำเพาะหรือหน่วยย่อยๆ ที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีหนึ่งๆ หน่วยย่อยๆบนโมเลกุลของแอนติบอดีนี้ เรียกว่า epitope หรือ antigenic determinant โดยทั่วไปแล้ว epitope จะปรากฏอยู่ด้านนอกของโมเลกุล ดังนั้นแอนติเจน 1 โมเลกุลอาจทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติบอดีหลายชนิดขึ้นอยู่กับจำนวน epitope ที่แตกต่างกันบนโมเลกุลของแอนติเจนหนึ่งๆ (รูปที่ 2.2 และ 2.3) (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)



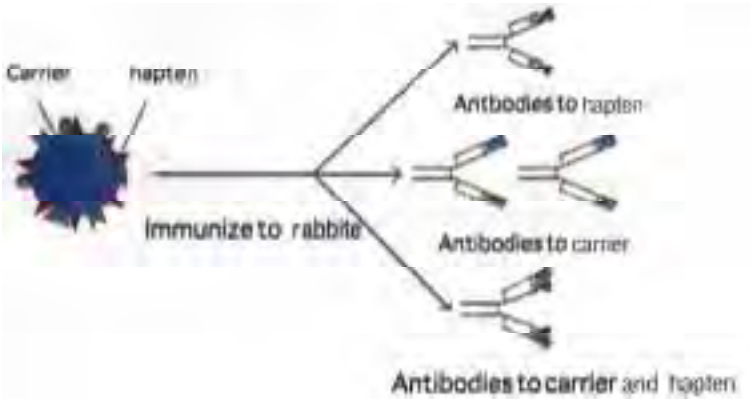
รูปที่ 2.2 epitope หรือ antigenic determinant บนแอนติเจน แอนติเจนนี้มี epitope ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะของแต่ละ epitope จึงมีแอนติบอดี 3 แบบต่อแอนติเจนนี้ (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)



รูปที่ 2.3 ตัวอย่าง epitope ปรากฏในไวรัส ถ้านำส่วนนอกของไวรัสซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนจะพบว่าแอนติเจนส่วนนี้ประกอบด้วย epitope แตกต่างกันหลากหลาย epitope

แฮปเทน (Hapten)

Hapten หมายถึง สารที่มีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลน้อยไม่สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานได้ แต่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ นั่นคือมีคุณสมบัติ specific reactivity แต่ขาดคุณสมบัติ immunogenicity ตัวอย่างเช่น ยาและฮอร์โมน อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้หากนำไปรวมกับสารอื่นๆที่ทำหน้าที่เป็น carrier ก็จะสามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหรือกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ carrier ที่ใช้มักเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ทำหน้าที่เสมือนเป็นแอนติเจนโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มี hapten เหล่านั้นเป็นองค์ประกอบคล้ายกับเป็น epitope หนึ่งๆ บนโมเลกุลของแอนติเจน จากการศึกษาสารที่เป็น hapten เมื่อฉีดให้กับสัตว์ทดลองพบว่าการให้ hapten เพียงลำพัง ไม่มีการตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดีขณะที่เมื่อให้ hapten ผสมกับ carrier จะสามารถตรวจพบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับ hapten ได้ร่วมกับแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับ carrier และแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับทั้ง hapten และ carrier ดังแสดงในรูปที่ 2.4



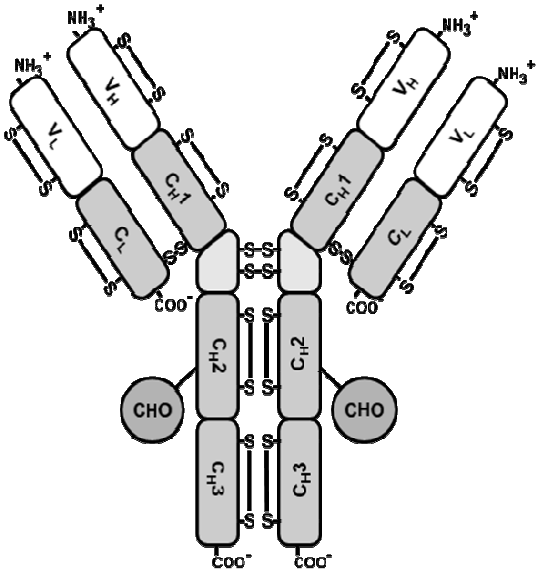
รูปที่ 2.4 นำแฮปเทน (dinitropheno, DNP) ยึดติดกับ carrier เช่น Bovine serum albumin (BSA) ฉีดให้กับกระต่าย และตรวจแอนติบอดีที่กระต่ายสร้างขึ้น จะพบแอนติบอดี anti-BSA, anti-DNP และ anti-DNP/BSA (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)

2.1.3.2 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนตรงบริเวณจำเพาะของโมเลกุลแอนติเจนที่เรียกว่าอิพิโทป (epitope) สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์ แอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู้กระแสเลือดจะทำหน้าที่เป็นตัวจักรสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity)

โครงสร้างของแอนติบอดี (รูปที่ 2.5) มีโครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (L chain) และโปรตีนสายยาว (H chain) ที่กรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน (N terminal) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 100-110 หน่วยที่มีความแปรปรวนมากเรียกว่าบริเวณแปรปรวน (variable region; V) โดยจะแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิดซึ่งจะเป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจน ส่วนบริเวณที่เหลือเป็นบริเวณคงที่ (constant region; C) ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน ซึ่งในสายสั้นมี 2 ชนิดเป็น κ หรือ λ สายยาวเป็นชนิด $\mu, \gamma, \alpha, \delta$ หรือ ε โครงสร้างทุติยภูมิของแอนติบอดีเกิดจากการพับทบกันไปมาของสายเพปไทด์แบบ β-pleated sheet เสถียรภาพของโครงสร้างนี้เกิดจากพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายที่เชื่อมระหว่างสายเพปไทด์ที่พับไปมา ซึ่งสายเพปไทด์ม้วนทับเป็นโครงสร้างตติยภูมิอัดแน่นเป็นก้อน (globular domain) และส่วนของโดเมนที่อัดแน่นเป็นก้อนต่างๆของสายสั้นและสายยาวอย่างละ 2 สายรวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิซึ่งประกอบกันเป็นบริเวณที่จับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะและแสดงปฏิกิริยาทางชีวภาพได้

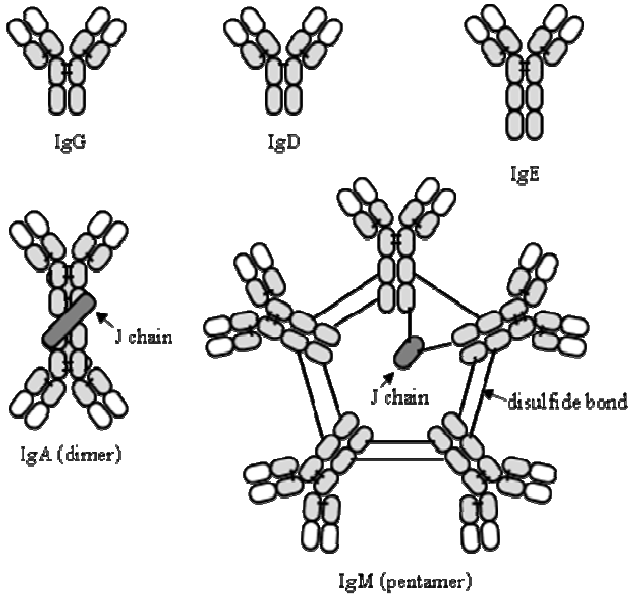
ไอโซไทป์ (isotype) หรือคลาส (class) ของ Ig ชนิดต่างๆ ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE เกิดจากความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนสายยาวบริเวณคงที่ (ตารางที่ 2.2) ทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้าง (รูปที่ 2.6) และบทบาทการทำงานแตกต่างกันไป โดยบทบาทการทำงานของแต่ละไอโซไทป์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างส่วนของโปรตีนสายยาวกับองค์ประกอบต่างๆของโปรตีนในซีรัมหรือตัวรับบนผิวเซลล์ ในหนูเมาส์ (mouse) โปรตีนสายยาวชนิด γ สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (subclass) ได่แก่ γ_1, γ_{2a}, γ_{2b} และ γ_3 เกิดเป็นไอโซไทป์ IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b} และ IgG_3 ตามลำดับ ซึ่งจะแตกต่างกันตรงขนาดของข้อพับ จำนวน และตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในสายระหว่างโปรตีนสายยาว (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ

ไอโซไทป์	สายยาว	สายสั้น	กลุ่มย่อย	สูตรโมเลกุล
IgG	γ	κ หรือ λ	ในมนุษย์ γ_1, γ_2, γ_3 หรือ γ_4 ในหนูเมาส์ γ_1, γ_{2a}, γ_{2b} หรือ γ_3	$\gamma_1\kappa_2$ $\gamma_1\lambda_2$
IgA	α	κ หรือ λ	α_1 หรือ α_2	$(\alpha_2\kappa_2)_n$ $(\alpha_2\lambda_2)_n$ n = 1,2,3 หรือ 4
IgM	μ	κ หรือ λ	ไม่มี	$(\mu_2\kappa_2)_n$ $(\mu_2\lambda_2)_n$ n = 1 หรือ 5
IgD	δ	κ หรือ λ	ไม่มี	$\delta_1\kappa_2$ $\delta_1\lambda_2$
IgE	ε	κ หรือ λ	ไม่มี	$\varepsilon_1\kappa_2$ $\varepsilon_1\lambda_2$



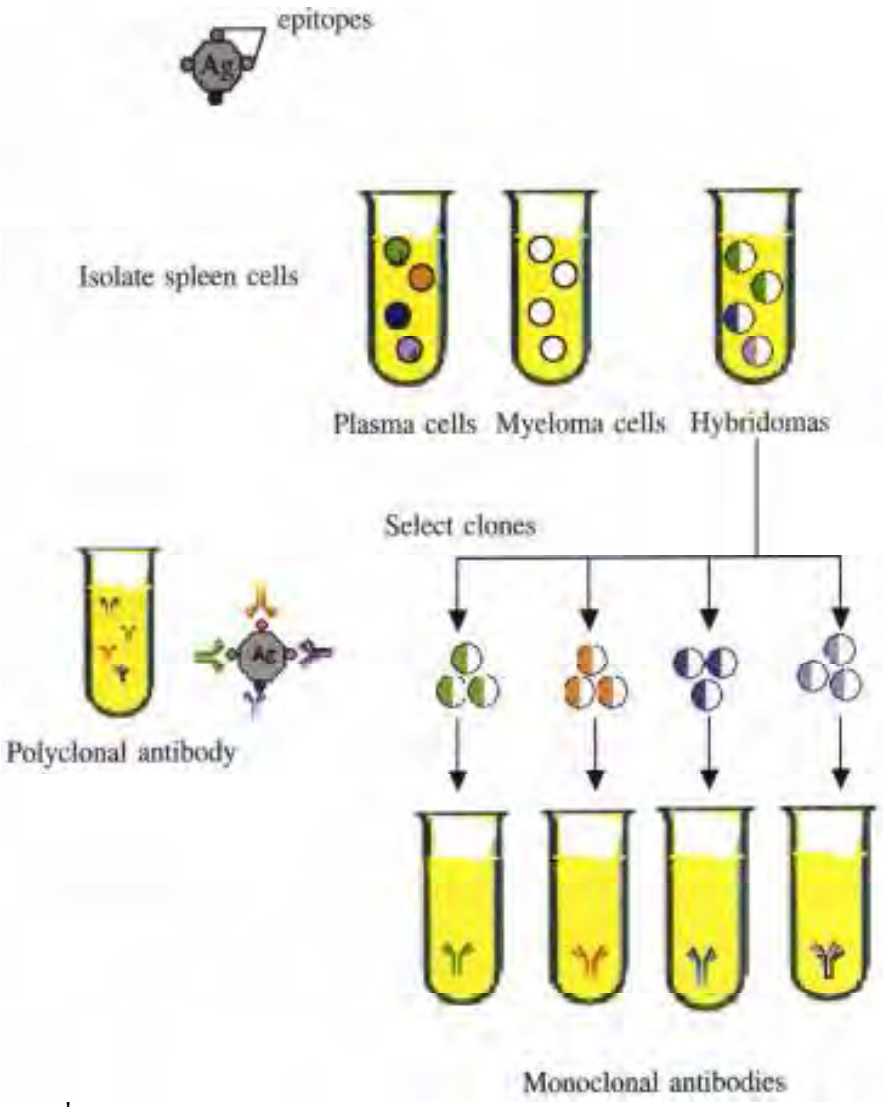
รูปที่ 2.6 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.1.4. การผลิตแอนติบอดี (Antibody Production)

การผลิตแอนติบอดี ในสิ่งมีชีวิตจะเริ่มจากการที่ร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่เรียกว่า แอนติเจน จากนั้นกระบวนการทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น กล่าวคือ แอนติเจนจะกระตุ้น B-cell ที่จำเพาะต่อแต่ละ epitope บนแอนติเจนพร้อมกันหลายๆ เซลล์หรือหลายๆโคลน (clone) แอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากหลายโคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อหลากหลาย epitope จะเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) (รูปที่ 2.7) อย่างไรก็ตามการสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้ในงานวิจัยหรืออื่นๆ สามารถสร้างและคัดเลือกแอนติบอดีที่สร้างจากโคลนเดียวหรือจำเพาะต่อ epitope หนึ่งๆ ของแอนติเจน ซึ่งจะทำให้แอนติเจนนั้นมีความจำเพาะสูง เรียกแอนติบอดีนี้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

2.1.4.1 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีหมายถึงแอนติบอดีที่ผลิตจาก บี-เซลล์ หลายๆโคลน ซึ่งตอบสนองต่อแอนติเจนหลากหลาย epitope ทำให้แอนติบอดีผสมกันอยู่หลายชนิดที่จะจับแอนติเจนได้หลาย epitope การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน X อาจผลิตในสัตว์ทดลอง เช่น กระต่าย ม้า และแกะ โดยแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายจะเรียกว่า rabbit anti-x antibody แอนติบอดีที่ผลิตจากม้าเรียกว่า horse anti-x antibody เป็นต้น ขั้นตอนการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจากเตรียมแอนติเจนตามต้องการ จากนั้นฉีดแอนติเจนให้กับสัตว์ทดลองที่ต้องการและรอเวลาการสร้างแอนติบอดี จากนั้นฉีดกระตุ้นซ้ำ เพื่อให้สร้างแอนติบอดีปริมาณมากทำการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง และปั่นเก็บแยกซีรัมเก็บไว้ใช้งานต่อไป (รูปที่ 2.7) (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)



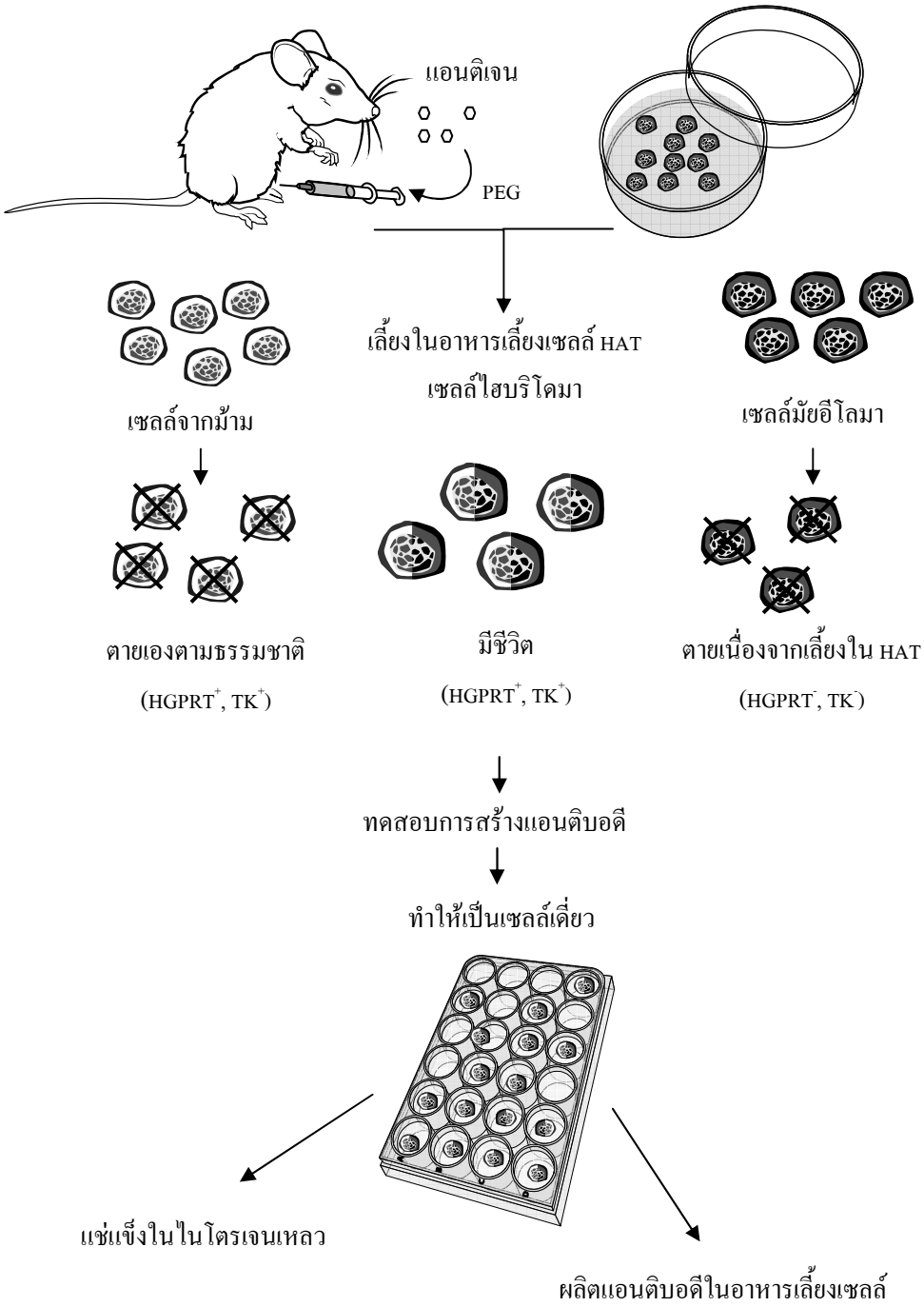
รูปที่ 2.7 แอนติเจนที่ประกอบด้วย epitope 4 แบบ หากผลิตแบบพอลิโคลนอลแอนติบอดี จะได้ซีรัมที่มีความจำเพาะต่อ epitope ทั้ง 4 แบบ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะได้แอนติบอดีจำเพาะต่อ epitope หนึ่งๆ บนแอนติเจน

2.1.4.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้หลักการ somatic hybridization

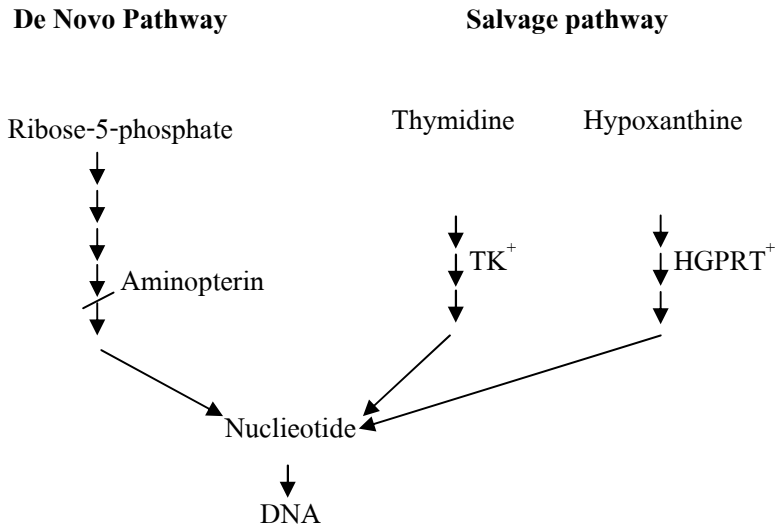
การใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากพอลิโคลนอลแอนติบอดีทำได้ยากมาก แต่ในปี ค.ศ.1975 George Kohler และ Cesar Milestein หาแนวทางในการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ ซึ่งได้กลายเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญทางภูมิคุ้มกัน จากการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมารวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือมัยอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) กลายเป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่จำกัดของเซลล์มะเร็งสามารถสร้างแอนติบอดีได้ ทำให้สามารถผลิตโคลนของไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้จำนวนมากและไม่จำกัดปริมาณ เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและใช้ในงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทำให้ Kohler และ Milestein ได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ.1984 (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจาก นำบี-เซลล์จากสัตว์ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาชักนำให้เกิดการหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาโดยการใช้โพลีเอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) (รูปที่ 2.8) ในทางปฏิบัติไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเอง ไม่หลอมรวมกัน และไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกให้มีเพียงแค่เซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ โดยการใช้เซลล์มัยอีมาที่ถูกทำให้มีความบกพร่องของเอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) ที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน Salvage pathway (รูปที่ 2.9) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งมี hypoxanthine, aminopterin และ thymidine ผสมอยู่ aminopterin จะไปขัดขวาง de novo pathway ซึ่งเป็นอีกกระบวนการพื้นฐานในการสร้างนิวคลีโอไทด์ ส่วน hypoxanthine และ t thymidine ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ Salvage pathway ดังนั้นเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองที่ขาดเอนไซม์ HGPRT และ TK จะตายในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เพราะไม่สามารถใช้ Salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ จึงมีเพียงเซลล์ที่เป็นไฮบริโดมาเท่านั้นที่มีชีวิตรอด ส่วนบี-เซลล์หรือเซลล์อื่นที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆและจะตายไปเอง เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาแล้วจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง ไฮบริโดมาจำนวนมากผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนอื่นๆที่ไม่ต้องการจึงจำเป็นต้องคัดออก วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไป ได้แก่ ELISA และ immunoassay ต่างๆ

หลังจากสามารถพิสูจน์ทราบว่าได้ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะที่ต้องการแล้ว จำเป็นต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวจริง และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาณที่ต้องการต่อไป



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง



รูปที่ 2.9 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ De Novo และ Salvage pathway (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Faraj และ Ali (1981) ได้ผลิตแอนติบอดีต่อ TC โดยทำการเชื่อม TC-HCl เข้ากับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich แล้วฉีดเข้ากระต่าย หลังจากนั้นนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาตรวจวัดสาร TC โดยใช้วิธี radioimmunoassay (RIA) โดยใช้ตัวแข่งขันที่เป็น [^{3}H]TC พบว่าสามารถตรวจสอบสาร TC ได้ โดยมีค่าขีดจำกัดในการวัด และค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (50% of inhibition concentration; IC_{50}) เท่ากับ 1 และ 7 นาโนกรัมตามลำดับ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ OTC และ CTC เท่ากับ 10 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปตรวจสอบ TC ในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของสุนัขพบว่ามี %recovery อยู่ระหว่าง 90 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Lee และคณะ (2001) ใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ในการตรวจสอบสารเตตราไซคลิน TC, OTC และ CTC ที่ตกค้างในพลาสมาของสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่เพื่อทำนายสารเหล่านี้ที่จะตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยปริมาณ TC, OTC และ CTC ที่ตรวจวัดได้น้อยที่สุดของชุดตรวจสอบนี้ คือ 0.05, 0.01 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทำการให้ TC ทางปากสุกร 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรต่อวัน ฉีด OTC เข้าทางกล้ามเนื้อสุกร 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสุกรต่อวัน และให้ CTC ทางปากสุกร 1.1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารสัตว์ต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบโดยนำพลาสมาจากที่ได้จากเลือดสุกรมาทำ ELISA พบว่าไม่สามารถตรวจสอบ TC, OTC และ CTC ที่ตกค้างอยู่ในเลือดเมื่อเลิกให้ยา 3, 8 และ 4 วันได้

Pena และคณะ (2005) ใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนส์ เพื่อตรวจสอบสารเตตราไซคลิน TC และ OTC ในน้ำผึ้งโดยสกัดสารตัวอย่างที่ตกค้างด้วย Na_2-EDTA-Mcllvaline buffer, pH 4.0 และ solid-phase extraction (SPE) ที่แตกต่างกัน mobile phase ที่เหมาะสมคือสารละลาย acetonitrile และ oxalate buffer ในอัตราส่วน 20:80 pH 2 ความเข้มข้น 10 มิลลิ

โมลาร์ โดยใช้คอลัมน์ C_{18} Nucleocil ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ TC และ OTC ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.050 และ 0.049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Koesukwiwat และคณะ (2007) ได้ใช้เทคนิค LC-MS สำหรับตรวจสอบการตกค้างของสารเตตราไซคลิน TC, OTC และ CTC ในน้ำนมโค พบว่าปริมาณสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 0.67, 0.65 และ 2.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตรวจสอบแบบปริมาณวิเคราะห์ได้น้อยที่สุดที่ 0.95, 1.03 และ 8.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Pastor-Navarro และคณะ (2007) ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำผึ้งโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วยสารในกลุ่ม TCs ที่ถูกทำให้เป็นสารอนุพันธุ์ของ carboxamido และ diazo ก่อนจะเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการวัดที่ต่ำที่สุดถึง 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs คือ RTC, OTC, MC และ CTC ถึง 91, 30, 14 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสามารถใช้ในน้ำผึ้งตัวอย่างได้ %recovery อยู่ระหว่าง 79 ถึง 108 เปอร์เซ็นต์

Zhang และคณะ (2007) ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำนมโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วย TC ที่ใช้วิธีในการเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะที่แตกต่างกัน 3 วิธี เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามี IC_{50} เท่ากับ 3.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm) เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs คือ CTC ถึง 112 เปอร์เซ็นต์ และ OTC น้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำไปตรวจในน้ำนมตัวอย่างได้ %recovery อยู่ระหว่าง 74 ถึง 116 เปอร์เซ็นต์

Jeon และ Paeng (2008) ได้ใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC จากแกะ ในการตรวจหาปริมาณ TC ในน้ำผึ้ง โดยวิธี biotin-avidin mediated ELISA ใช้ PBS-EDTA buffer pH 7.2 เป็นสารละลายสกัดและไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบ (no additional pre-treatment) พบว่า ปริมาณสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจได้ (dynamic range) เท่ากับ 1.52 -152 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับในในกลุ่ม TCs เมื่อนำไปตรวจในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ %recovery อยู่ระหว่าง 95% ถึง 101%

และปีเดียวกัน Jeon และคณะได้พัฒนาวิธีการการตรวจหาปริมาณ TC ในน้ำนม โดย วิธี biotin-avidin mediated ELISA และใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC จากแกะ ใช้ PBS-EDTA buffer pH 7.2 เป็นสารละลายสกัด พบว่าปริมาณสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจได้ (dynamic range) เท่ากับ 0.316-316 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ CTC, OTC, และ DC เท่ากับ 13.7%, 10% และน้อยกว่า 1% ตามลำดับ สามารถนำไปตรวจ TC ในน้ำนมได้ % recovery ประมาณ 90%

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนู Mouse สายพันธ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์มัยอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NS-I)	ATCC No: TIB 18

3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เข็มฉีดยาขนาด18G และ 21G	Nipro, Thailand
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Germany
เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (vortex)	Sientific Industries, Inc., USA
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	BIO-TEK Instrument, Inc., USA
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Metter Toledo, USA
เครื่อง Lyophilizer	Yamato, Japan
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Finland
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc, Denmark
จานเลี้ยงเซลล์	Corning Incorporated, USA
จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม	Corning Incorporated, USA
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation, USA
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co.,Ltd.,

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
	Thailand
ทิป (tip) ขนาด 0.01, 0.2 และ 1 มิลลิลิตร	Axygen, USA
ปั๊มลม	Iwaki, Japan
ปิเปตแก้ว	HBG, Germany
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII Memmert, Japan
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA
หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (cryotube)	Nunc, Denmark
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Aminopterine	Sigma-Aldrich, USA
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
BCA™ protein assay kit	Pierce, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	Fluka, China
Citric acid	Merck, Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich, USA
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Diethyl ether	Merck, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka, Switzerland
di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Germany
Doxycycline (DC)	Sigma-Aldrich, USA
1-ethy-3-(3-diamethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich, USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Fetal calf serum (FCS)	Invitromax, USA
Formaldehyde	Sigma-Aldrich, USA
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	T.P. drug laboratories (1969) Co.,Ltd., Thailand
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
Isotyping kit	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	BDH, England
2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)	Fluka, China
Norfloxacin	Sigma-Aldrich, USA
O-phenylenediamine (OPD)	Abkem Iberia L.S., Spain
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, USA
Oxytetracycline hydrochloride (OTC)	Fluka, China
Penicillin G	Sigma-Aldrich, USA
Picrylsufonic acid (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; TNBS)	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol HYBRI-MAX® (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
Rolitetracycline (RTC)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Germany
Salbotamol	Sigma-Aldrich, USA
Skim milk	Anline, Thailamd
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck, Germany

สารเคมี	แหล่งที่มา
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Carlo Erba, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Germany
Tetracycline hydrochloride (TC)	Sigma-Aldrich, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Riedel-de Haën, UK

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู

3.4.1.1 การเตรียมโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมวัวที่ถูกเติมประจุบวก (cationized bovine serum albumin; cBSA) (Collie, de Block และ Reybroeck, 2004)

cBSA คือโปรตีนที่ทำการเพิ่มหมู่เอมีนโดยทำการเชื่อมไดเอมีนเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการกระตุ้นในสัตว์ทดลอง นำโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมวัว (bovine serum albumin; BSA) ปริมาณ 50 มิลลิกรัมมาละลายใน โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มี ethylenediamine (EDA) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม 1-ethy-3-(3-diamethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กวนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปทำ dialysis ด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 (phosphate buffer saline; PBS) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเทคนิค lyophilization นำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยใช้ BCA™ Protein Assay Kit หาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี TNBS และตรวจสอบหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นโดยคำนวณจากมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปโดยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) ได้ cBSA ในรูปผงผลึกสีขาว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.4.1.2 การเตรียม TC เชื่อมกับ cBSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich (Hermanson, 1996)

เชื่อมต่อสาร TC กับ cBSA โดยนำสารละลายโปรตีน cBSA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน MES pH 4.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TC ที่ละลายในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้น 37% (v/v) 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำวันละ 2 ครั้ง นำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA หาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดของสารโดยวิธี TNBS และคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง TC กับ cBSA โดยคำนวณจากมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปโดยวิธี MALDI-TOF-MS

3.4.1.3 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการหาปริมาณโปรตีนต่างๆด้วยวิธี bicinchoninic acid protein assay (BCA) โดยใช้ BCA™ protein assay kit โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย PBS และสารตัวอย่าง เพื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาโดยผสมสารละลาย A (โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)โซเดียมไบคาร์บอเนต(sodium bicarbonate) กรดไบคาร์บอร์นินิค (bicinchoninic acid) และโซเดียมทาร์เทรต (sodium tartrate) อยู่) และสารละลาย B (คูปริกซัลเฟต (cupric sulfate) เข้มข้น 4%) ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุมหลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อนคำนวณกลับเป็นปริมาณโปรตีน

3.4.1.4 การวัดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอมีนอิสระ

ทำการเตรียมโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างในโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์(sodium bicarbonate buffer) pH 8.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสาระลาย TNBS เข้มข้น 0.05% (w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม SDS เข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตามด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นและเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดของสารจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น} = \frac{A_{\lambda\lambda\lambda} \text{ ของ cBSA} - A_{\lambda\lambda\lambda} \text{ ของ BSA}}{A_{\lambda\lambda\lambda} \text{ BSA}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้} = \frac{A_{\lambda\lambda\lambda} \text{ ของ cBSA} - A_{\lambda\lambda\lambda} \text{ ของ TC-cBSA}}{A_{\lambda\lambda\lambda} \text{ ของ cBSA}}$$

3.4.1.5 การหาอัตราส่วนโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นและ TC ที่เชื่อมติดโดยวิธี MALDI-TOF MS

หาอัตราส่วนโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นและสารที่เชื่อมติดด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Tine-Of-Flighht Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อหามวลโมเลกุลของสาร โดยคำนวณจาก

$$\text{จำนวนโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น} = \frac{\text{มวลโมเลกุลของ cBSA} - \text{มวลโมเลกุลของ BSA}}{\text{มวลโมเลกุลของเอมีน}}$$

$$\text{จำนวนโมเลกุลของสารที่เชื่อมติด} = \frac{\text{มวลโมเลกุลของ TC-cBSA} - \text{มวลโมเลกุลของ cBSA}}{\text{มวลโมเลกุล TC}}$$

3.4.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย TC-cBSA

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย TC ที่เชื่อมกับ cBSA โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ฉีดเข้าภายในช่องท้องหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ 100 ไมโครกรัมต่อตัว และฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้งทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยผสมกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เช่นกัน เก็บเลือดจากหางหลังฉีด 7 วัน เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีข้อ 3.4.3.4.1 และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ TC อิสระได้หรือไม่โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ TC-OVA ที่เตรียมได้จากวิธีเดียวกับการเตรียม TC-cBSA ในข้อ 3.4.1.2 แต่เปลี่ยนโปรตีนพาหะจาก cBSA เป็น ovalbumin (OVA) มาเคลือบบน จานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA จากนั้นเลือกหนูตัวที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดและสามารถจับกับ TC อิสระได้ไปทำต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วัน ฉีดกระตุ้นหนูด้วย TC-cBSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมที่ไม่ผสม Freund's adjuvant

3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโลมา NS-I เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 10% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในวันหลอมรวมเซลล์นับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

เตรียมได้จากนำหนูทดลองที่เลือก (ข้อ 3.4.2) แล้วว่าสามารถผลิตแอนติบอดีต่อTC ทำการสลบหนูโดยใช้ไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้ต่อไป ทำการเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธีปลอดเชื้อ ใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด เมื่อได้เซลล์ม้ามแล้วนำไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาที่เตรียมไว้

3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์ของม้ามหนูจากข้อ 3.4.3.2 มารวมกับเซลล์มัยอีโลมาจากข้อ 3.4.3.1 ในอัตราส่วน 1:3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆก่อนหยด โพลีเอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ความเข้มข้น 50% (v/v) ที่เป็นสารช่วยหลอมเซลล์ลงไปพร้อมการหมุนหลอดช้าๆ ควมคุมการหยด PEG (มวลโมเลกุล 3000 ถึง 3700 ดาลตัน) ให้หมดภายใน 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทำเช่นนี้ 2 ครั้งเพื่อเพื่อล้าง PEG ออกจากเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นปิเปตเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมหลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ 12-14 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ TC หรือไม่ตามวิธีในข้อ 3.4.3.4

3.4.3.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ TC

3.4.3.4.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย TC-OVA (เตรียมได้เช่นเดียวกับ TC-cBSA ตามวิธีในข้อ 3.4.1.2) เข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS ที่มี Tween20 (PBS-T) เข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 4 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) เข้มข้น 5% (w/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horse redish peroxidase (GAM-HRP) เชื่อมอยู่ที่เจือจาง 1:10000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายในฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ (phosphate citrate buffer) pH 5.0 ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) เข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.4.3.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับ TC ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยปิเปตสารละลาย TC ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในจานหลุม ELISA ที่เคลือบด้วย TC-OVA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนย และล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ (หรือซีรัมหนู) จากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกขั้นแรก (ข้อ 3.4.3.4.1) ลงไปผสมกับสารละลาย TC นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติม TC อิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่เติม TC อิสระ แสดงว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่สามารถจับกับ TC ในรูปอิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาแยกให้ได้โคลนเดี่ยว โดยวิธี limiting dilution

3.4.3.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเดียวกัน นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระจากการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์เจริญเป็นโคโลนีเดียวในหลุม นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาว่ายังคงมีแอนติบอดีต่อ TC หรือไม่ ถ้าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีต่อ TC ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ จากนั้นนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บ มาเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FCS เข้มข้น10% (v/v) ให้อยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียลมาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาเก็บเซลล์ที่มี ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 10% (v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาเก็บเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาเก็บเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v)

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบ Isotyping kit โดยทำการเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไอโซไทป์ชนิดต่างๆ (IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM) นำมาเจือจาง 1:1000 เท่าใน PBS แล้วเติมลงในหลุมของจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase) ที่เจือจาง 1:2000 ใน PBS-T บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้งเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายในฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.4.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive

ELISA ที่ทำได้โดยนำแอนติบอดีที่ความเจือจางที่เหมาะสมมาผสมรวมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ก้นหลุม มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ และคำนวณค่า LOD ได้จากสูตรเพื่อนำมาเทียบกับกราฟได้เป็นความเข้มข้น

$$LOD\ ;\ B_0 - 3SD$$

เมื่อ B, B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีหรือไม่มีแอนติเจนตามลำดับ

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

ความจำเพาะของแอนติบอดีจะรายงานอยู่ในค่าของการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มหรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ทำได้โดยแอนติบอดีที่ความเจือจางที่เหมาะสมมาผสมรวมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ก้นหลุม มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% of inhibition concentration; IC_{50}) หาได้จากการนำค่าที่ 50% ของ B/B_0 มาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้น และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวที่ใช้เป็นตัวแข่งขัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50}\text{ของ TC}}{IC_{50}\text{ ของตัวแข่งขันอื่น}}$$

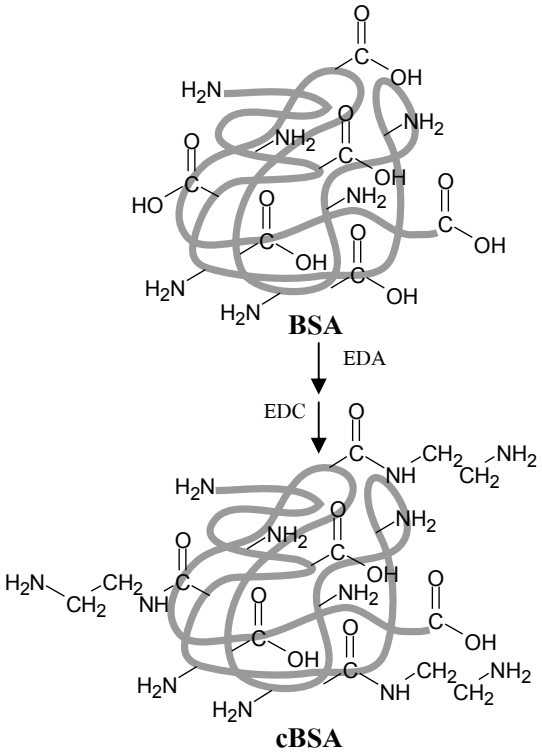
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

สารเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC) มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กเรียกว่าแฮปเทน (hapten) ซึ่งไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ TC ได้ด้วยตัวมันเอง ดังนั้นจึงต้องเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ก่อนนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

4.1.1 ผลการเตรียมโปรตีนพาหะ

จากการนำโปรตีน BSA มาทำปฏิกิริยากับ EDA โดยมี EDC เป็นสารตัวกลางเพื่อให้เกิดการแทนที่ไดเอมีนเข้าที่ตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีนเกิดเป็นหมู่เอมีนขึ้นแทน ปฏิกิริยาดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 การแทนที่ไดเอมีนเข้าที่ตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีนโดยใช้ EDA และ EDC

พบว่าเมื่อทำการเพิ่มหมู่เอมีนให้กับโปรตีน BSA ให้เป็นโปรตีนพาหะ cBSA แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนสำหรับนำไปใช้ในการเชื่อมติดกับ TC ต่อไป โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรที่ความเจือจางต่างๆ เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ BSA (ตารางที่ ก.1 และรูปที่ ก.1, ภาคผนวก ก) ผลดังตารางที่ 4.1 ได้ความเข้มข้น

ของโปรตีน cBSA เท่ากับ 3.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปทำให้แห้งด้วยเทคนิค lyophilization จะได้โปรตีน cBSA ในรูปผงสีขาว

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนพาหะ cBSA โดยใช้วิธี BCA

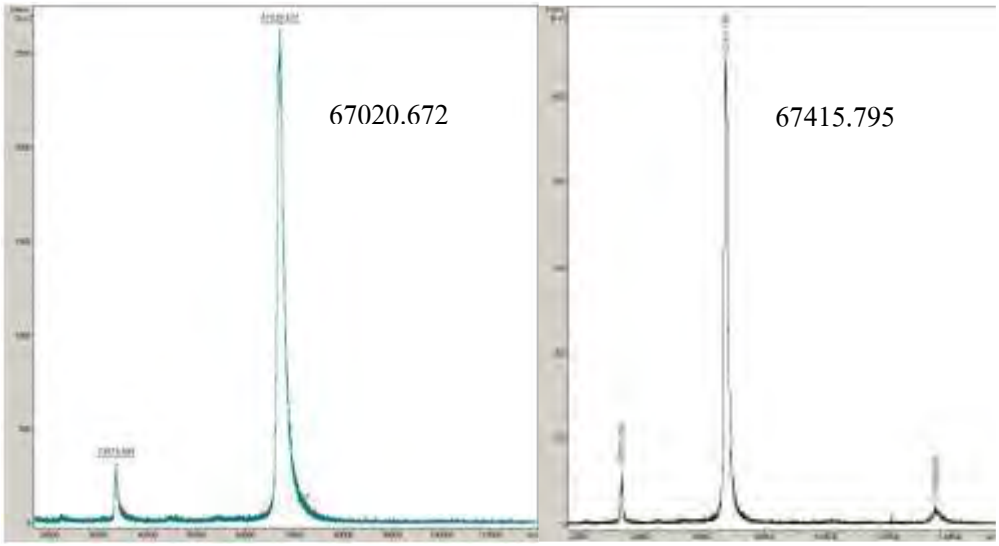
ค่าความเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:4	0.689	3.31
1:8	0.376	3.60
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		3.46

จากการนำโปรตีน cBSA ไปหาโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี TNBS โดยสาร TNBS เมื่อจับกับหมู่เอมีนอิสระแล้วจะเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีส้มที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่าหมู่เอมีนบนโมเลกุลของ BSA มีเพิ่มมากขึ้นเฉลี่ย 8.06 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2 ผลทดสอบการเพิ่มหมู่เอมีนในโมเลกุลของโปรตีน BSA โดยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{355} ของโปรตีน BSA	A_{355} ของโปรตีน cBSA	ค่าเปอร์เซ็นต์หมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นของ cBSA
0.5	0.746	0.792	6.24
0.25	0.417	0.455	9.12
0.125	0.221	0.241	8.82
ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น			8.06

ผลการหามวลโมเลกุลของ cBSA โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS แสดงในรูปที่ 4.2 จากโครมาโตแกรมที่ได้พบว่าโปรตีน BSA มีมวลโมเลกุล 67020.67 ดาลตัน และโปรตีน cBSA มีมวลโมเลกุล 67415.80 ดาลตัน มีมวลโมเลกุลมากขึ้น 395.13 ดาลตัน แสดงว่ามีหมู่เอมีน (มวลโมเลกุล 16.5 ดาลตัน) เพิ่มขึ้นในโปรตีน BSA เท่ากับ 24 โมเลกุล จากการทำให้โมเลกุลของ BSA มีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้นนั่นคือ cBSA และใช้เป็นโปรตีนพาหะ ส่งผลให้โอกาสในการเชื่อมติดกับแฮปเทนมีมากขึ้น ซึ่งจากรายงานของ Muckerheide และคณะ (1987) พบว่าการใช้ cBSA เป็นโปรตีนพาหะ ช่วยทำให้ประสิทธิภาพของการกระตุ้นในสัตว์ทดลองเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกระตุ้นการแบ่งตัวของที-เซลล์โดยเฉพาะ T_H ได้ไวกว่าโปรตีนในรูปเดิม (native form)

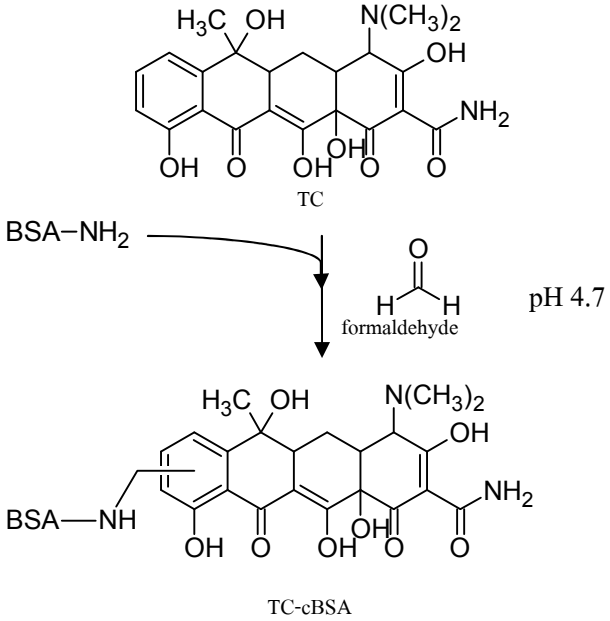


BSA cBSA

รูปที่ 4.2 สเปกตรัมของมวลโมเลกุลของโปรตีน BSA และ cBSA โดยวิธี MALDI-TOF MS

4.1.2 ผลการเตรียม TC เชื่อมกับ cBSA

จากการเตรียมแอนติเจนที่จะนำมาฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนูโดยทำการเชื่อมต่อ TC กับโปรตีนพาหะ cBSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich ซึ่งจะมีการเติมฟอร์มัลดีไฮด์ทำให้เกิดปฏิกิริยาควบแน่นระหว่างหมู่เอมีนของโปรตีนพาหะกับวงฟีนอลของ TC โดยจะเกิดตัวเชื่อมเมทธิลลีนขึ้นระหว่างสองโมเลกุล (รูปที่ 4.3) นำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรที่ความเจือจางต่างๆ เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ cBSA (ภาคผนวก ก, ตารางที่ ก.2 และรูปที่ ก.2) ได้ผลดังตารางที่ 4.3 พบว่าแอนติเจน TC-cBSA มีความเข้มข้นของโปรตีน 2.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.3 การเชื่อม TC กับโปรตีนพาหะ cBSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของแอนติเจน TC-cBSA โดยใช้วิธี BCA

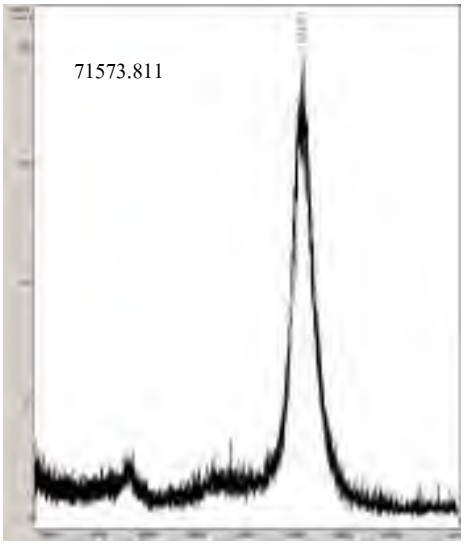
ค่าความเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:5	0.537	2.45
1:10	0.299	2.73
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		2.59

จากการทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมติดโดยการนำแอนติเจน TC-cBSA มาหาโมเลกุลของหมู่เอมีนของโปรตีน cBSA ที่ถูกใช้ไปในการเชื่อมต่อกับ TC โดยวิธี TNBS ได้ผลดังตารางที่ 4.4 พบว่าหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดระหว่าง TC กับ cBSA คิดเป็น 26.42 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่าง TC กับโปรตีน cBSA โดยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{355} ของ cBSA	A_{355} ของ TC-cBSA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด
1.0	1.143	0.912	20.21
0.5	0.622	0.419	32.64
ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเชื่อมติดแอนติเจน TC-cBSA			26.42

และทำการยืนยันผลการเชื่อมติดโดยหาอัตราส่วนโมเลกุลของ TC ที่เชื่อมกับ cBSA 1 โมเลกุล จากการหามวลโมเลกุลของ cBSA ที่เปลี่ยนไปโดยเทคนิค MALDI-TOF MS แสดงในรูปที่ 4.4 จากสเปกตรัมที่ได้ พบว่าโปรตีน cBSA มีมวลโมเลกุล 67415.80 ดาลตัน (รูปที่ 4.1) และแอนติเจน TC-cBSA มีมวลโมเลกุล 71573.811 ดาลตัน มีมวลโมเลกุลมากขึ้น 4158.011 ดาลตัน สามารถคำนวณเป็นอัตราส่วนโมเลกุลของ TC (มวลโมเลกุล 444.44 ดาลตัน) ที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ cBSA 1 โมเลกุลเท่ากับ 9 โมเลกุล ในขณะผลของการเชื่อม TC กับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich ในงานวิจัยของ Faraj และ Ali (1980) พบว่าสามารถเชื่อมต่อ TC ได้ถึง 30-40 โมเลกุลบน BSA แต่เมื่อนำ TC-cBSA ไปฉีดกระตุ้น พบว่าหนูสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ TC ได้เช่นกัน แม้ว่า TC ที่เชื่อมกับ cBSA มีอัตราส่วนน้อยกว่างานวิจัยของ Faraj และ Ali (1980) ก็ตาม



TC-cBSA

รูปที่ 4.4 สเปกตรัมของมวลโมเลกุลของ TC-cBSA โดยวิธี MALDI-TOF MS

4.2 ผลการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ TC

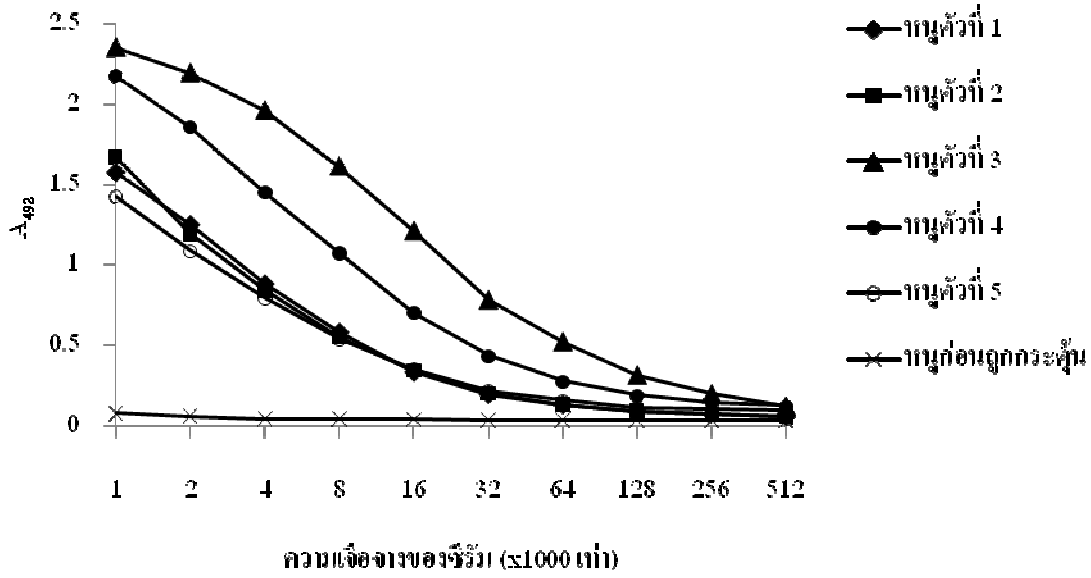
จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองทั้งหมด 5 ตัวด้วยแอนติเจน TC-cBSA ที่เตรียมได้ และนำซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นมาหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ TC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ทำการคัดเลือกหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด และสามารถจับกับ TC ในรูปอิสระได้ เพื่อใช้สำหรับหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

4.2.1 การหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น

จากการทดสอบหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.5 โดยเลือกระดับแอนติบอดีคือความเจือจางของซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรประมาณ 0.1 พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC-cBSA โดยมีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 1:64000, 1: 64000, 1:512000, 1:256000 และ 1:64000 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 การทดสอบระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA จำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA

ความเจือจางของซีรัม	A_{492}					
	ซีรัมหนูก่อนถูกกระตุ้น	หนูตัวที่ 1	หนูตัวที่ 2	หนูตัวที่ 3	หนูตัวที่ 4	หนูตัวที่ 5
1:1000	0.076	1.575	1.617	2.348	2.170	1.423
1:2000	0.058	1.249	1.190	2.189	1.852	1.085
1:4000	0.044	0.880	0.840	1.957	1.448	0.794
1:8000	0.042	0.579	0.549	1.611	1.070	0.538
1:16000	0.039	0.331	0.339	1.207	0.700	0.348
1:32000	0.036	0.192	0.198	0.778	0.432	0.212
1:64000	0.036	0.128	0.129	0.518	0.271	0.155
1:128000	0.035	0.086	0.090	0.311	0.186	0.110
1:256000	0.035	0.070	0.070	0.194	0.138	0.098
1:512000	0.035	0.056	0.056	0.118	0.123	0.091



รูปที่ 4.5 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA จำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:1000 ถึง 1:512000

4.2.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ

จากการทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.6 พบว่าแอนติบอดีจากหนูทั้ง 5 ตัวสามารถจับกับ TC ในรูปอิสระได้ เนื่องจากเมื่อมี TC เป็นตัวแข่งขัน ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของการทำ competitive ELISA ลดลงเมื่อเทียบกับค่าที่ไม่มีการเติมสาร TC อิสระลงไป โดยจะมีค่าลดลงเป็น 68.0-91.4 เปอร์เซ็นต์ และแอนติบอดีจากหนูทั้ง 5 ตัวไม่จำเพาะต่อส่วนของ BSA เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อใช้ BSA เป็นแอนติเจนแย่งจับ

ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนอิสระของซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA

ซีรัม	ความเจือจาง	A_{492}			$\%A_{492}$ที่ลดลงเมื่อเติม TC
		ไม่เติมสารอิสระ	10 μg/ml BSA	10 μg/ml TC	
หนูตัวที่ 1	1:2000	1.205	1.059	0.201	83.32
หนูตัวที่ 2	1:2000	0.925	0.810	0.165	82.16
หนูตัวที่ 3	1:16000	0.852	0.744	0.380	55.40
หนูตัวที่ 4	1:8000	1.239	1.196	0.084	91.74
หนูตัวที่ 5	1:2000	1.229	1.227	0.393	68.02

4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นกับเซลล์มัยอีโลมา NSI ทั้งหมด 5 ครั้ง หลังจากนั้นประมาณ 12-14 วัน ตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเจริญเป็นโคโลนีในหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่พบโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมามาทำการคัดกรองโดยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA ได้ผล ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 5 ครั้งดังตารางที่ 4.7 โดยได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC อิสระทั้งหมด 3 หลุม (ตารางที่ 4.8) นำแต่ละหลุมมาทำการแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเดียวกันและยังคงสร้างแอนติบอดีต่อ TC อิสระอยู่ โดยตั้งเป็นรหัสจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1,4 และ 5 คือ 7-4C, 12-3F และ 5-9H ตามลำดับ ต่อมาจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการตรวจสอบลักษณะสมบัติต่อไป ส่วนผลจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ไม่พบเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ TC อาจเนื่องมาจากการที่ได้จำนวนเซลล์ไฮบริมาน้อย จึงส่งผลให้โอกาสที่จะได้เซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการมีน้อยตามไปด้วย และผลจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 พบเซลล์ไฮบริโดมา 2 หลุมที่สามารถผลิตบอดีต่อแอนติเจนในรูปที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะที่เคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA แต่ไม่สามารถจับกับ TC อิสระในการคัดเลือกขั้นที่ 2 ได้ จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 4.7 ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 5 ครั้ง

ครั้งที่หลอมรวมเซลล์	ระดับแอนติบอดีในซีรัมก่อนการหลอมรวม	จำนวนหลุมตั้งตั้งต้น	เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญ	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดี	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดีต่อสารอิสระ TC	รหัสโคลนที่ได้
1	1:64000	1152	461	1	1	7-4C
2	1:64000	1152	29	0	0	-
3	1:512000	1152	393	2	0	-
4	1:256000	1152	468	1	1	12-3F
5	1:64000	1152	760	1	1	5-9H

ตารางที่ 4.8 ผลของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

ครั้งที่หลอมรวมเซลล์	โคลน	A_{492}	
		ไม่เติมสารอิสระ	10 µg/ml TC
1	7-4C	1.84	0.061
2	9-11E	1.419	1.306
	11-7B	1.581	1.415
4	12-3F	1.643	0.441
5	5-9H	0.972	0.051

4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอไซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบไอไซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนโดยวิธี indirect ELISA antigen capture โดยใช้แอนติบอดีมาตรฐาน IgG_3 เป็นตัวควบคุม (ตารางที่ 4.9) พบว่าโคลน 7-4C และ 5-9H มีไอโซไทป์ IgG_1 และโคลน 12-3F มีไอโซไทป์ IgG_{2a}

ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

รหัสโคลน	A_{492}					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgM	IgA
7-4C	1.147	0.126	0.389	0.301	0.296	0.193
12-3F	0.044	1.068	0.062	0.808	0.072	0.105
5-9H	1.122	0.120	0.228	0.157	0.140	0.106
Control IgG3	0.287	0.448	0.663	1.923	0.465	0.178

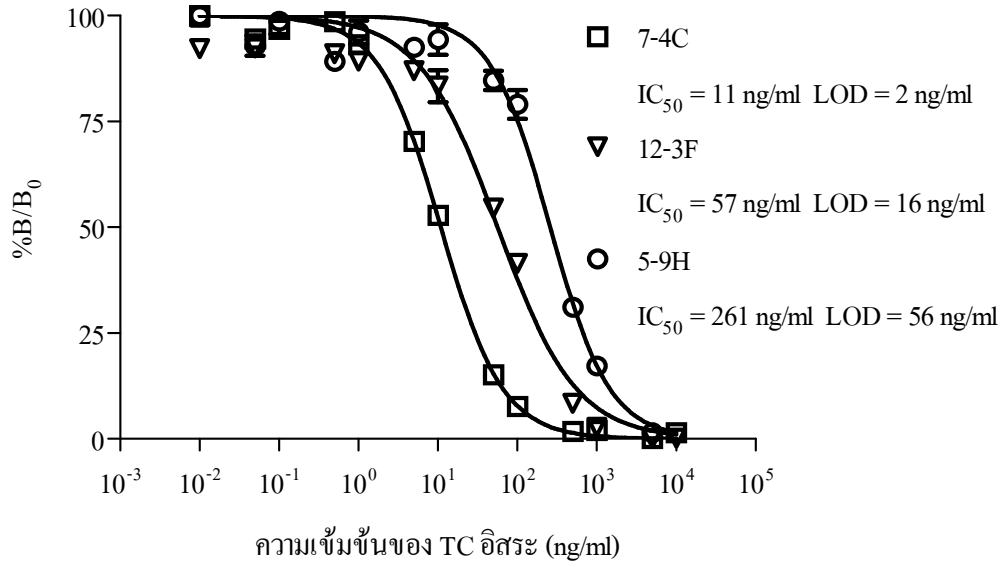
4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ

การหาความเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการนำไปทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TC โดยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.10 เลือกความเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 ได้ความเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H คือ 1:20, 1:800 และ 1:10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ค่าความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ที่เหมาะสมโดยวิธี indirect ELISA

ความเจือจางของ 7-4C	A_{492}	ความเจือจางของ 12-3F	A_{492}	ความเจือจางของ 5-9H	A_{492}
-	1.223	-	1.448	-	1.048
1:2.5	1.263	1:25	1.671	1:2.5	1.035
1:5	1.240	1:50	1.652	1:5	1.042
1:10	1.208	1:100	1.602	1:10	1.008
1:20	1.113	1:200	1.488	1:20	0.938
1:40	0.960	1:400	1.381	1:40	0.804
1:80	0.703	1:800	1.182	1:80	0.585
1:160	0.438	1:1600	0.954	1:160	0.363
1:320	0.243	1:3200	0.696	1:320	0.224
1:640	0.137	1:6400	0.406	1:640	0.133

ทำการหาค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ TC ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขัน คำนวณโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4 ได้ผลดังรูปที่ 4.6 (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.3) พบว่าทั้ง 3 โคลน คือ 7-4C, 12-3F และ 5-9H ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 11, 57 และ 261 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 2, 16 และ 56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL ที่กำหนดไว้ต่ำที่สุดที่ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb)

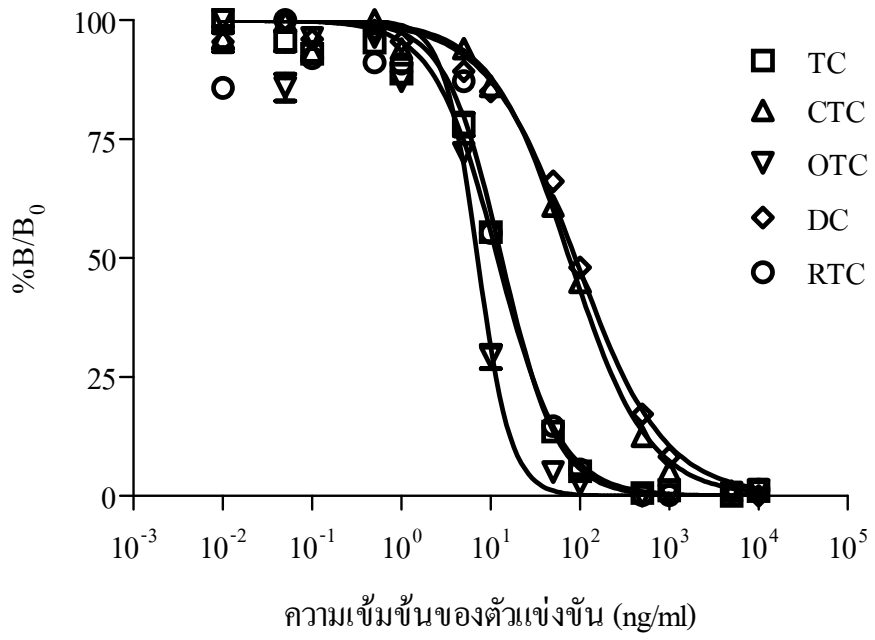


รูปที่ 4.6 การหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ต่อ TC โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H เจือจาง 1:20, 1:800 และ 1:10 ตามลำดับ แข่งขันกับ TC อิสระ 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากทั้ง 3 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs ได้แก่ OTC, CTC, DC และ RTC และสารนอกกลุ่ม TCs คำนวณโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4 ได้ผลดังรูปที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 (ภาคผนว ก กตารางที่ ก.4, ก.5, ก.6 และ ก.7) และตารางที่ 4.11, 4.12 และ 4.13 พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความไวต่อ TC ต่างกันโดยเรียงจากความไวมากไปน้อยคือ 7-4C, 12-3F และ 5-9H ตามลำดับ ผลของการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs ทั้ง 5 ตัวคือ TC, OTC, CTC, DC และ RTC พบว่าแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนจะสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs ทุกตัว ตั้งแต่ 2 ถึง 307 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 4.13 และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม TCss แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอล

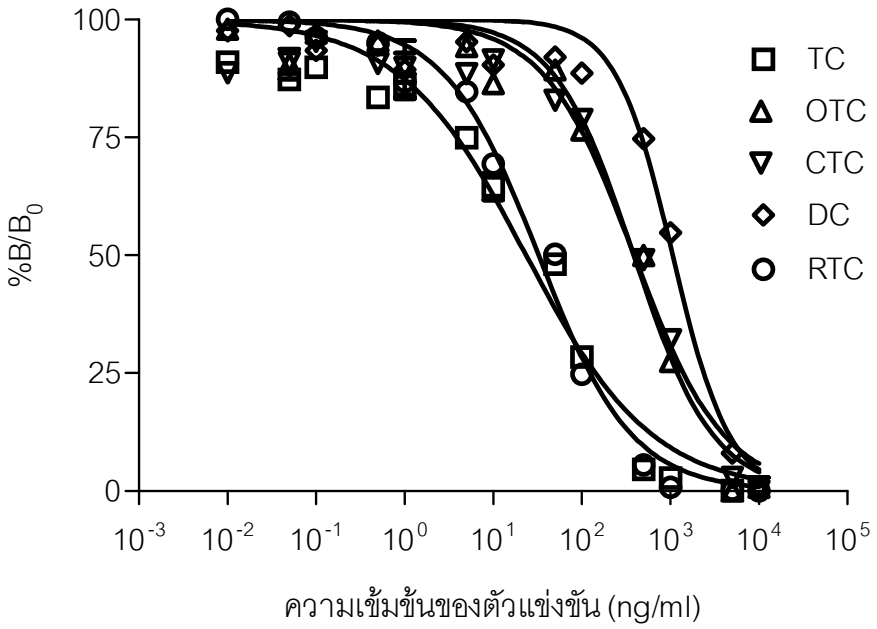
แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะกับสารในกลุ่ม TCs สูง คาดว่าเนื่องจากสารในกลุ่ม TCs มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Pastor-Navarro และคณะ (2007) ซึ่งได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs ทุกตัว โดยเฉพาะ RTC มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และในงานวิจัยของ Zheng และคณะ (2007) ได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ CTC ถึง 112 เปอร์เซ็นต์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้คาดว่าสามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี ELISA ได้



รูปที่ 4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-4C โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C เจือจาง 1:20 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.11 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-4C ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA

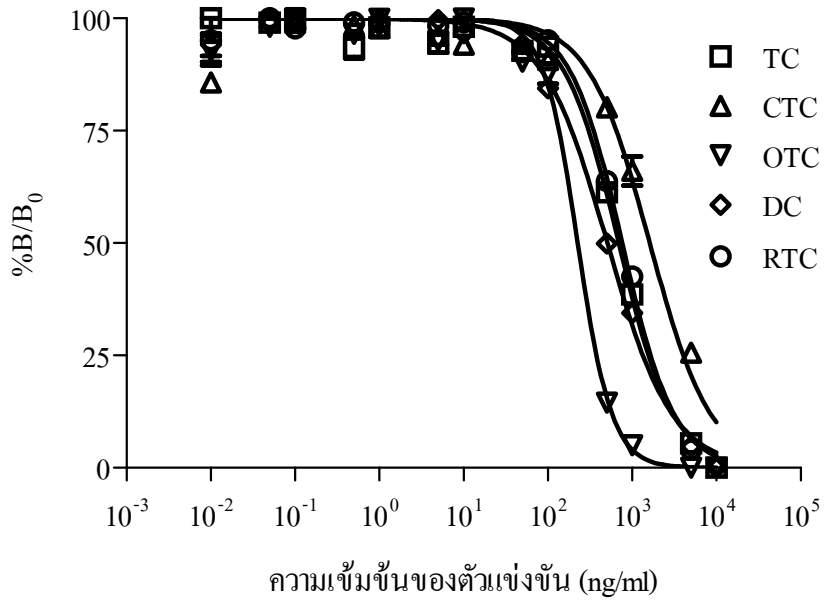
	ตัวแข่งขัน	IC_{50} (ng/ml)	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม
TCs	Tetracycline (TC)	12	100
	Oxytetracycline (OTC)	76	16
	Chlortetracycline (CTC)	7	168
	Doxycycline (DC)	89	13
	Rolitetracycline (RTC)	13	90
Antibiotics	Norfloxacin	>10000	<0.01
	Enrofloxacin	>10000	<0.01
	Streptomycin	>10000	<0.01
	Kanamycin	>10000	<0.01
	Amoxicillin	>10000	<0.01
	Gentamycin	>10000	<0.01
	Penicillin G	>10000	<0.01
	Spectinomycin	>10000	<0.01
	Chloramphenicol (CAP)	>10000	<0.01
	Furazolidone (FZD)	>10000	<0.01
	3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	>10000	<0.01
β-agonists	Clenbuterol	>10000	<0.01
	Salbutamol	>10000	<0.01



รูปที่ 4.8 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 12-3F โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 12-3F เจือจาง 1:1600 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.12 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 12-3F ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA

	ตัวแข่งขัน	IC_{50} (ng/ml)	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม
TCs	Tetracycline (TC)	24	100
	Oxytetracycline (OTC)	388	6
	Chlortetracycline (CTC)	391	6
	Doxycycline (DC)	1065	2
	Rolitetracycline (RTC)	33	72
Antibiotics	Norfloxacin	>10000	<0.01
	Enrofloxacin	>10000	<0.01
	Streptomycin	>10000	<0.01
	Kanamycin	>10000	<0.01
	Amoxicillin	>10000	<0.01
	Gentamycin	>10000	<0.01
	Penicillin G	>10000	<0.01
	Spectinomycin	>10000	<0.01
	Chloramphenicol (CAP)	>10000	<0.01
	Furazolidone (FZD)	>10000	<0.01
	3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	>10000	<0.01
β-agonists	Clenbuterol	>10000	<0.01
	Salbutamol	>10000	<0.01



รูปที่ 4.9 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-9H โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 5-9H เจือจาง 1:10 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.13 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-9H ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA

	ตัวแข่งขัน	IC_{50} (ng/ml)	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม
TCs	Tetracycline (TC)	694	100
	Oxytetracycline (OTC)	1623	43
	Chlortetracycline (CTC)	226	307
	Doxycycline (DC)	468	148
	Rolitetracycline (RTC)	763	91
Antibiotics	Norfloxacin	>10000	<0.01
	Enrofloxacin	>10000	<0.01
	Streptomycin	>10000	<0.01
	Kanamycin	>10000	<0.01
	Amoxicillin	>10000	<0.01
	Gentamycin	>10000	<0.01
	Penicillin G	>10000	<0.01
	Spectinomycin	>10000	<0.01
	Chloramphenicol (CAP)	>10000	<0.01
	Furazolidone (FZD)	>10000	<0.01
	3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	>10000	<0.01
β-agonists	Clenbuterol	>10000	<0.01
	Salbutamol	>10000	<0.01

ตารางที่ 4.14 ผลสรุปการหาไอโซไทป์ การศึกษาความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ลักษณะสมบัติ		7-4C	12-3F	5-9H
ไอโซไทป์		IgG_1	IgG_{2a}	IgG_1
IC_{50} (ng/ml)		11	57	261
LOD (ng/ml)		2	16	56
เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม	TC	100	100	100
	OTC	16	6	43
	CTC	168	6	307
	DC	13	2	148
	RTC	90	72	91

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ทำการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง โดยเชื่อม TC เข้ากับโปรตีนพาหะ cBSA ที่เตรียมได้จากการเพิ่มหมู่เอมีนบนโปรตีน BSA พบว่ามีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น 8.06 เปอร์เซ็นต์เมื่อวัดโดยวิธี TNBS และ เมื่อเปรียบเทียบมวลโมเลกุลจากก่อนและหลังการเพิ่มหมู่เอมีนโดยเทคนิค MADI-TOF MS พบว่าโปรตีน cBSA ที่ได้มีมวลโมเลกุล 67415.795 ดาลตัน เพิ่มขึ้น 395.13 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีน BSA พบว่ามีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น 24 โมเลกุลในโปรตีนแต่ละโมเลกุล จากการเชื่อม TC กับ cBSA โดยปฏิกิริยา Mannich ได้เป็น TC-cBSA พบว่ามีการใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมติดคิดเป็น 24.42 เปอร์เซ็นต์ และจากการเปรียบเทียบมวลโมเลกุลจากการใช้เทคนิค MALDI-TOF MS พบว่าแอนติเจน TC-cBSA ที่ได้มีมวลโมเลกุล 71573.811 สามารถคำนวณได้ว่าโปรตีน cBSA แต่ละโมเลกุลจะมีการเชื่อมติดของ TC ถึง 9 โมเลกุล จากนั้นจึงทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง 5 ตัว ด้วย TC-cBSA พบว่าซีรัมของหนูทดลองมีระดับแอนติบอดี 1:64000-1:512000 และสามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับ TC ในรูปอิสระได้ทุกตัว หลังจากหลอมรวมเซลล์ม้ามหนูกับเซลล์มัยอีโลมา NSI ทั้งหมด 5 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC จำนวน 3 โคลน คือโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ซึ่งมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1, 4 และ 5 ตามลำดับ หลังจากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 3 โคลน พบว่าแอนติบอดีจากโคลน 7-4C และ 5-9H มีไอโซไทป์ IgG_1 และ 12-3F มีไอโซไทป์ IgG_{2a} เมื่อทดสอบความไวต่อ TC ในรูปอิสระและการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่ม TCs พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 7-4C มีความไวต่อ TCในรูปอิสระมากที่สุดโดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 11 และ 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs มากไปน้อยดังนี้ CTC, RTC, OTC และ DC โดยมีค่า 168, 90, 16 และ 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแอนติบอดีจากโคลน 12-3F ที่มีความไวรองลงมามีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 57 และ 16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs มากไปน้อยดังนี้ RTC, OTC, CTC และ DC โดยมีค่า 72, 6, 6 และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแอนติบอดีจากโคลน 5-9H มีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 261 และ 56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs มากไปน้อยดังนี้ CTC, DC, RTC และ OTC โดยมีค่า 307, 148, 90 และ 43 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม TCs (ปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

จากลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ จะเห็นได้ว่าสามารถตรวจวัดสาร TC ในรูปอิสระได้ต่ำกว่าค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ ที่ประกาศโดยกระทรวงสาธารณสุข คือ 100 นาโนกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA ในการตรวจหาสารตกค้าง TC ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยอาจใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-4C หรือ 12-3F

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา จรรยาพูน. 2552. พื้นฐานทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น: โรงพิมพ์แอนนาออฟเซต.

กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

ปริญญา มาสวัสดิ์. 2550. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมโดยวิธี On-line SPE-FIA. LAB.TODAY 6 (สิงหาคม): 41-48.

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

สาธารณสุข, กระทรวง. 2550 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ.2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [online]. แหล่งที่มา: http://newsser.fda.moph.go.th/food/file/Laws/Notification%20of%20Ministry%20of%20Public Health/Law03P303.pdf [20 สิงหาคม 2554]

ภาษาอังกฤษ

Coillie, E.S.; de Block, J.; and Raybroeck, R. 2004. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52: 4975-4978.

Faraj, B.A., and Ali, F.M. 1981. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 127: 10-14.

Giannetti, L.; Longo, F.B.; Russo, M.V.; and Neri, B. 2010. Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according tocommiss decision 2002/657/EC. Analytical Bioanalytical Chemistry 398: 1017-1023.

Hermanson, G.T. 1996. Bioconjugate Techniques. San Diego: Academic Press.

Jeon, M.; and Paeng, I.R. 2008. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sentitive immunoassay. Analytica Chimica Acta 626: 180-185.

Jeon, M.; Kim, J.; Paeng, K.j.; Park, S.W.; and Paeng, I.R. 2008. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. Microchemical Journal 88:26-31.

Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; and Leepipatpiboon, N. 2007. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracycline, and pyrimethamine in milk. Journal of Chromatography A 1140:147-156.

Lee, H.; Lee, M.; Ryu, P.; Lee, H.; and Cho, M. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assays for screening the plasma residue of tetracycline antibiotics in pigs. Journal of Veterinary and Medical Science 63(5): 553-556.

Moata, W.A. 2000. Determination of tetracycline antibiotics in beef and pork tissues using ion- paired liquid chromatography. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 2244-2248.

Muckerheide, A.; Apple, R.J.; Pesce, A.J.; and Michael, J.G. 1987. Cationization of protein antigens. I. Alteration of immunogenic properties. The Journal of Immunology 138: 833-837.

Pastor-Navarro, N.; Morais, S.; Maquieira, A.; and Puchades, R. 2007. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues Application to honey samples. Analytica Chemica Acta 594, 211-218.

Pena, A.; Pelantova, C.; Lino, C.M.; Silveira, M.I.N.; and Solich, P. 2005. Validation of an analytical methodology for detection of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53: 3784-3788.

Wang, L.F.; Peng, J.D.; and Lui, M.L. 2008. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotic. Analytica Chimica Acta 630: 101-106.

Zhang, Y.; Lu, S.; Lui, W.; Zhao, C.; and Xi, R. 2007. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. Journal of Agriculture and Food Chemistry 55: 211-218.

Zhenfeng, y.; Yueming, Q.; Xiuyum, L.; and Caini, J. 2006. Determination of muti-residues of tetracycline and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry 34(9): 1255-1259.

ตารางสรุปกิจกรรมการวิจัยที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ได้ดำเนินการแล้ว

การดำเนินงาน	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. ศึกษาและรวบรวมข้อมูล	----■											
2. เตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู	----■	----■										
3.ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน		----■	----■	----■								
4. หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน				----■	----■	----■	----■	----■	----■			
5. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้							----■	----■	----■	----■		
6. สรุปและเขียนรายงาน											----■	----■

หมายเหตุ สัญญาลักษณ์ ---- หมายถึง กิจกรรมการวิจัยที่ได้วางแผนไว้

■ หมายถึง กิจกรรมที่ได้ดำเนินการแล้ว

ผลผลิตและผลลัพธ์โครงการ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธี ELISA ต่อไปได้

การคำนวณต้นทุนและราคาในท้องตลาด

ต้นทุนสำหรับการหลอมรวมเซลล์ เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการ ต่อครั้ง ประมาณ 10,000 บาท

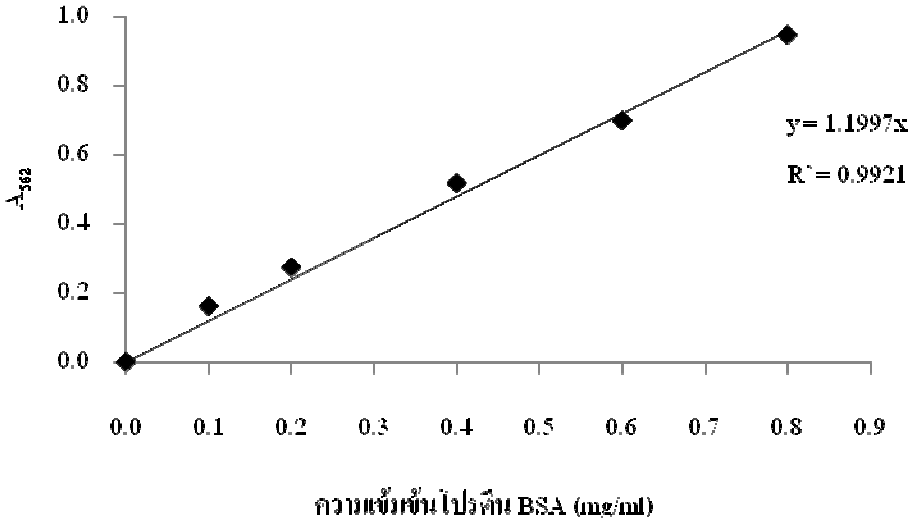
ราคาในท้องตลาดที่มีการขายโมโนโคลนอลแอนติบอดี ประมาณ 15,000-20,000 ต่อ 0.2-0.5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

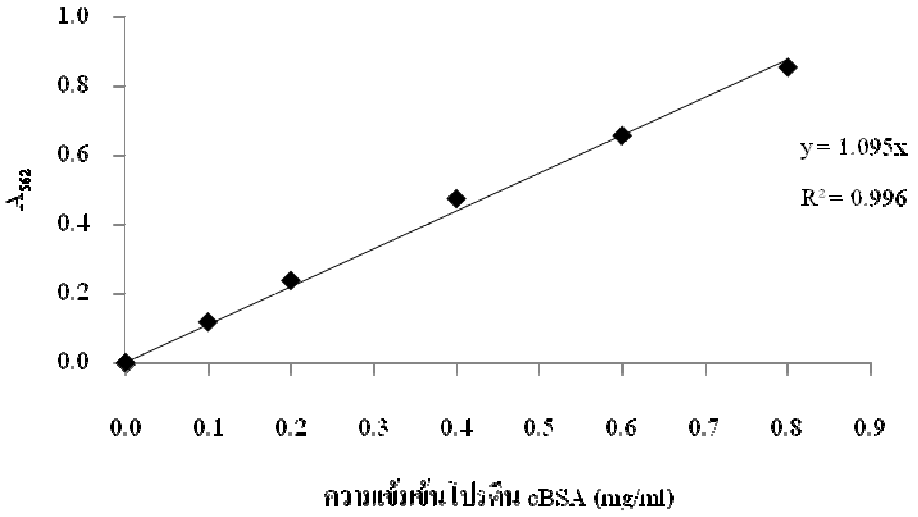
ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.162
0.2	0.274
0.4	0.517
0.6	0.698
0.8	0.945



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน cBSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน cBSA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.117
0.2	0.237
0.4	0.474
0.6	0.656
0.8	0.854



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน cBSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H โดยวิธี indirect competitive ELISA

TC	A_{492}		
(ng/ml)	7-4C	12-3F	5-9H
0	1.130	0.901	1.149
0.01	1.168	0.932	1.176
0.05	1.106	0.933	1.099
0.1	1.132	1.006	1.161
0.5	1.152	0.921	1.059
1	1.090	0.904	1.133
5	0.833	0.883	1.095
10	0.635	0.848	1.115
50	0.210	0.574	1.010
100	0.125	0.451	0.949
500	0.059	0.137	0.431
1000	0.062	0.084	0.280
5000	0.039	0.058	0.109
10000	0.056	0.059	0.094

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน	A_{492}				
(ng/ml)	TC	OTC	CTC	DC	RTC
0	1.377	1.348	1.269	1.330	1.283
0.01	1.480	1.352	1.375	1.308	1.250
0.05	1.417	1.398	1.190	1.366	1.447
0.1	1.380	1.313	1.327	1.315	1.337
0.5	1.413	1.401	1.328	1.338	1.324
1	1.320	1.321	1.207	1.309	1.321
5	1.169	1.322	1.009	1.229	1.270
10	0.847	1.218	0.446	1.174	0.827
50	0.252	0.886	0.128	0.932	0.263
100	0.135	0.676	0.095	0.701	0.138
500	0.069	0.249	0.062	0.306	0.062
1000	0.077	0.152	0.065	0.192	0.062
5000	0.060	0.097	0.073	0.096	0.059
10000	0.075	0.083	0.081	0.086	0.078

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 12-3F กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน	A_{492}				
(ng/ml)	TC	OTC	CTC	DC	RTC
0	1.526	1.365	1.481	1.375	1.501
0.01	1.369	1.366	1.333	1.357	1.512
0.05	1.343	1.278	1.362	1.366	1.504
0.1	1.379	1.357	1.421	1.325	1.457
0.5	1.288	1.337	1.359	1.3334	1.440
1	1.324	1.391	1.347	1.294	1.319
5	1.164	1.323	1.331	1.339	1.289
10	1.041	1.218	0.370	1.302	1.066
50	0.777	1.263	0.256	1.315	0.787
100	0.494	1.082	0.203	0.288	0.417
500	0.150	0.793	0.814	0.182	0.137
1000	0.123	0.510	0.592	0.029	0.068
5000	0.084	0.195	0.210	0.672	0.059
10000	0.083	0.209	0.172	0.610	0.056

ตารางที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 5-9H กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน	A_{492}				
(ng/ml)	TC	OTC	CTC	DC	RTC
0	1.774	1.732	1.611	1.614	1.744
0.01	1.861	1.625	1.631	1.616	1.759
0.05	1.845	1.789	1.721	1.698	1.841
0.1	1.858	1.777	1.752	1.707	1.803
0.5	1.750	1.770	1.694	1.708	1.826
1	1.826	1.764	1.749	1.686	1.826
5	1.766	1.744	1.669	1.703	1.814
10	1.829	1.721	1.751	1.656	1.826
50	1.739	1.708	1.590	1.618	1.714
100	1.754	1.682	1.545	1.463	1.758
500	1.202	1.561	0.315	0.917	1.230
1000	0.814	1.398	0.156	0.674	0.871
5000	0.250	0.933	0.073	0.204	0.222
10000	0.157	0.639	0.072	0.463	0.154

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ5-9H กับสารนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน		A_{492}		
	(10 μg/ml)	7-4C	12-3F	5-7H
	ไม่มีตัวแข่งขัน	1.377	1.279	1.774
Antibiotics	Norfloxacin	1.336	1.394	1.810
	Enrofloxacin	1.290	1.362	1.780
	Streptomycin	1.296	1.434	1.842
	Kanamycin	1.358	1.332	1.816
	Amoxicillin	1.269	1.462	1.815
	Gentamycin	1.260	1.411	1.736
	Penicillin G	1.276	1.374	1.780
	Spectinomycin	1.275	1.344	1.794
	Chloramphenicol (CAP)	1.304	1.393	1.829
	Furazolidone (FZD)	1.265	1.375	1.852
	3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	1.230	1.416	1.822
β-agonists	Clenbuterol	1.348	1.449	1.872
	Salbutamol	1.342	1.465	1.818

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการเตรียมโปรตีนพาหะ BSA ให้เป็น cBSA

0.1 M Sodiumphosphate buffer pH 7.4

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (MW 358.14)	21.94	กรัม
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (MW 137.99)	5.34	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 3 M HCl หรือ 3 M NaOH

ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ TC กับโปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS

1) 0.1 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

Na_2CO_3	3.18	กรัม
$NaHCO_3$	5.86	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

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

2) 0.05% TNBS (Picrylsulfonic acid)

5% TNBS (w/v) ละลายใน methanol

Picrylsulfonic acid	5	กรัม
Methanol	100	มิลลิลิตร

เจือจาง Stock 5% TNBS เป็น 0.05% TNBS ใน 0.1 M Sodium bicarbonate, pH 8.5

3) 10% SDS (Sodium dodecyl sulphate)

SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4) 1 N HCl

Conc. HCl	7.7	มิลลิลิตร

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

ข.3 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

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

NaH_2PO_4	27.6	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Na_2HPO_4	71.63	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

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

PB stock	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

5) 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

Na_2HPO_4 (MW 141.96)	9.5	กรัม
Citric acid (MW 192.13)	7.3	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) Substrate OPD

O-phenylenediamine	40	มิลลิกรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7) 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	256	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	744	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

<u>หมายเหตุ</u> ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรดเนื่องจากจะเกิดความร้อนขึ้น

ข.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

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 um แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> Aminopterin จะละลายยาก ให้นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียสจนกว่าจะละลาย

2) 100X HT

Hypoxanthine	0.1361	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	0.0388	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้ง 2 สารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 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

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 90 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 90 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) 50% PEG (Polyethylene glycol)

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

7) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	90	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)