

การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน

นางสาวชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST  
TETRACYCLINE

Miss Chompoonik Kanchanabanca

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตและลักษณะสมบัติของโม่โนโคลนอลแอนติบอดีต่อ  
เตตราไซคลิน

โดย

นางสาวชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ดร. นันทิกา คงเจริญพร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ชมพูนิกซ์ กาญจนพงศ์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน.  
(PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST  
TETRACYCLINE) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. นันทิกา คงเจริญพร, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
: ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, 90 หน้า.

เตตราไซคลิน (TC) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ในวงกว้างในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคนิคมแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์และมนุษย์ เนื่องจากการตกค้างของ TC ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์สามารถเป็นสาเหตุของการดื้อยาในมนุษย์ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC เพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA โดยทำการเชื่อม TC กับโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของวัวที่ถูกเติมประจุบวกและใช้เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว หนูทดลองทุกตัวตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อ TC และมีระดับแอนติบอดี 1:64000 ถึง 1:512000 เพื่อสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่หลั่งแอนติบอดีต่อ TC จึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยโอโลมา NSI พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC จำนวน 3 โคลน คือ 7-C4, 12-3F และ 5-9H จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าเป็นไอโซไทป์ชนิด IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> และ IgG<sub>1</sub> ตามลำดับ มีความไวซึ่งคำนวณในรูปของค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 2, 16 และ 56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) ตามลำดับ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความจำเพาะต่อสารในกลุ่ม TCs ที่นำมาทดสอบ คือ ออกซิเตตราไซคลิน (OTC) คลอเตตราไซคลิน (CTC) ดอกซีไซคลิน (DC) และโรลิเตตราไซคลิน (RTC) อยู่ในช่วง 2 ถึง 307 เปอร์เซ็นต์ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มอื่นๆที่นำมาทดสอบ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้นี้จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบโดยหลักการภูมิคุ้มกันสำหรับตรวจวัด TC ได้

สาขาวิชา... เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....  
ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่ออ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 497 22687 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: TETRACYCLIN / HYBRIDOMA / ELISA

CHOMPOONIK KANCHANABANCA : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TETRACYCLINE. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : NANTHIKA KONGCHAREONPORN, Ph.D., THESIS COADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 90 pp.

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 responded 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<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>1</sub>, 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.

Field of study:.....Biotechnology.....

Academic year:.....2008.....

Student's signature:.....

Principal advisor's signature:.....

Co-advisor's signature:.....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวพร ลงยันต์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้บริหาร และอาจารย์ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณพี่ๆนักวิจัย โดยเฉพาะคุณทรงจันทร์ ภูทอง คุณอนุมาศ บัวเขียว และคุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในทุกๆเรื่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้ให้กำเนิด คุณย่า และทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาตลอด ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจเสมอมา

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย .....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเตตราไซคลิน .....	4
2.1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมี ลักษณะ และสมบัติของสารในกลุ่ม TCs .....	5
2.1.3 การเปลี่ยนแปลงของ TC เมื่อเข้าสู่ร่างกาย .....	6
2.1.4 พิษของสารตกค้าง TC .....	8
2.1.5 มาตรฐานสารตกค้าง TC .....	8
2.1.6 ปัญหาสารตกค้างในกลุ่ม TC ในประเทศไทย.....	10
2.1.7 วิธีการตรวจติดตามสารตกค้าง TC .....	12
2.1.8 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	14
2.1.9 หลักการ ELISA .....	21
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26

บทที่	หน้า
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	30
3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู.....	30
3.4.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย TC-cBSA .....	32
3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC .....	33
3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้.....	36
3.4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	37
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	40
4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง.....	40
4.2 ผลการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ TC .....	44
4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC .....	47
4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	48
4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	48
4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ.....	49
4.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC.....	50
4.5 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	57
5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ .....	64
รายการอ้างอิง .....	66
ภาคผนวก .....	69
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ข.....	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	7
2.2	9
2.3	10
2.4	16
2.5	18
3.1	26
3.2	26
3.3	27
4.1	41
4.2	41
4.3	43
4.4	43
4.5	46
4.6	47
4.7	48
4.8	48
4.9	49
4.10	52
4.11	54

ตารางที่	หน้า
4.12 ค่า $IC_{50}$ และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-9H ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่ม โดยวิธี indirect competitive ELISA.....	56
4.13 ผลสรุปการหาไอโซไทป์ การศึกษาความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารต่างๆของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี .....	57
4.14 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ให้บริสุทธิ์ .....	59
4.15 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE .....	60
4.16 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง โมโนโคลนอลแอนติบอดีและ TC-OVA ที่ใช้เคลือบกันหลุมของจาน ELISA โดยวิธี indirect ELISA .....	61
4.17 การเปรียบเทียบความไวของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ต่อ TC ระหว่างก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect competitive ELISA .....	62
ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA.....	70
ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน cBSA โดยวิธี BCA.....	71
ก.3 ผลของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA .....	72
ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H โดยวิธี indirect competitive ELISA .....	72
ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA.....	73
ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 12-3F กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA.....	74
ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 5-9H กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA.....	75
ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน7-4C, 12-3F และ5-9H กับสารนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA .....	76
ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 492 นาโนเมตร.....	77

ตารางที่	หน้า
ก.10 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA.....	78
ก.11 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยใช้วิธี BCA.....	79
ก.12 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี BCA .....	79
ก.13 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของสารละลายแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA.....	79
ก.14 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยใช้วิธี indirect competitive ELISA ...	80
ก.15 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA .....	81
ก.16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน7-4C หลังถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect competitive ELISA.....	82

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	5
2.2	7
2.3	15
2.4	16
2.5	20
2.6	21
2.7	23
4.1	40
4.2	42
4.3	43
4.4	41
4.5	45
4.6	50
4.7	51
4.8	53
4.9	55
4.10	58
4.11	60
4.12	62
ก.1	70

รูปที่	หน้า
ก.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน cBSA โดยวิธี BCA .....	71
ก.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA .....	78
ก.4 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA .....	80
ก.5 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE .....	81

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	Absorbance
ADI	Acceptable daily intake
AOZ	3-Amino-2-oxazolidinone
APS	Ammoniumpersulfate
BCA	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
cBSA	Cationized bovine serum albumin
CAP	Chloramphenicol
CD	Cluster of differentiation
C <sub>H</sub>	Constant region of heavy chain
C <sub>L</sub>	Constant region of light chain
CTC	Chlortetracycline
Da	Dalton (g/mol)
DC	Doxycycline
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDA	Ethylenediamine
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylene diamine tetraacetate
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
FZD	Furazolidone
GAM-HRP	Anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase
H	Heavy chain
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography

HRP	Horseradise peroxidase
IC <sub>50</sub>	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
L	Light chain
LC-MS	Liquid chromatography/mass spectrometry
LOD	Limit of detection
M	Molar (mol/l)
MAb	Monoclonal antibody
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MHC	Major histocompatibility complex
MRLs	Maximum residue limits
MW	Molecular weight
N	Normal
OPD	o-phenylenediamine
OTC	Oxytetracycline
OVA	Ovalbumin
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline နှင့် 0.05% Tween20
PEG	Polyethylene glycol
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
R <sub>f</sub>	Relative mobility
RTC	Rolitetracycline
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis
TC	Tetracycline
TCs	Tetracyclines

TEMED	N,N,N,N -tetramethy-ethylenediamine
T <sub>H</sub>	Helper T cell
TK	Thymidine kinase
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid
UV	Ultraviolet
V	Volt
V <sub>H</sub>	Variable region of heavy chain
V <sub>L</sub>	Variable region of light chain
g	gram
k	kilo
l	liter
m	milli
n	nano
ppb	part per billion
ppm	part per million
v	volume
w	weight
μ	micro
%	percent



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เตตราไซคลิน (Tetracyclines; TCs) เป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ประกอบด้วยสารเช่น เตตราไซคลิน (Tetracycline; TC) ออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline; OTC) และ คลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline; CTC) เป็นต้น มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการจับของ rRNA บนไรโบโซมของเชื้อทำให้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์อย่างแพร่หลาย เช่น ในสุกร โค ไก่ และฟุ้ง แต่อย่างไรก็ตามที่การนำสารเหล่านี้ไปใช้ในทางที่ไม่ถูกต้อง โดยนำมาผสมกับอาหารเพื่อให้สัตว์รับประทานติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันนานเพื่อเป็นการป้องกันโรค ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี แต่จากการใช้ยาเป็นระยะเวลาอันนานจะมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ได้ เช่น ในเนื้อ ไข่ นม หรือน้ำผึ้ง จากการสำรวจของสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1993 ตรวจพบ TC ตกค้างอยู่ในสัตว์ถึง 4% ของสัตว์ที่มียาตกค้างอยู่ (Lee และคณะ, 2001) การตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้น อาจก่อให้เกิดการเป็นพิษหรือการแพ้ในผู้บริโภค รวมถึงการเกิดการดื้อยาในเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะเชื้อแกรมลบได้ (De Wasch และคณะ, 1998) จากสาเหตุดังกล่าว ทำให้แต่ละประเทศหันมาเน้นเรื่องความปลอดภัยของอาหารโดยมีการตรวจสอบการตกค้างของสาร TC ในผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ รวมทั้งประเทศไทยอาหารที่จัดได้ว่าได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขต้องพบปริมาณสาร TC ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ ได้แก่ กล้ามเนื้อ ตับ ไต ไข่ และ นม น้อยกว่า 0.1, 0.3, 0.6, 0.2 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm) ตามลำดับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2544) และไม่อนุญาตให้ตกค้างในน้ำผึ้งเกิน 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สุรตีวดี ภาคอุทัย และกนกวรรณ ศรีงาม, 2547) ในสหรัฐอเมริกาได้กำหนดค่าปริมาณที่มากที่สุดที่สามารถตกค้างได้ (Maximum Residue Limit; MRL) สำหรับ TC ในกล้ามเนื้อ ตับ และ ไต เป็น 0.2, 0.6 และ 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Zhang และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของ TC ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้วงปฏิบัติการซึ่งมีหลายวิธี เช่น ใช้วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) การตรวจโดยวิธีเหล่านี้สามารถหาปริมาณสารตกค้างได้ถูกต้องและแม่นยำสูง แต่เครื่องมือมีราคาแพง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการ

วิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการของวิธี colorimetric method (แพรวพรรณ ห้องทองแดง ตรีณี กอเชาะ และ มนวิภา จารุตามระ, 2548) โดยปฏิกิริยาการเกิดสีที่แตกต่างกันระหว่างน้ำยาทดสอบกับยาแต่ละชนิด มีวิธีการไม่ยุ่งยาก ราคาถูก ใช้งาน ให้ผลรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือปริมาณต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ค่อนข้างสูง (ระดับ ppm) เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่ประหยัด รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถหาสารตกค้างปริมาณน้อยได้ถึงระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) การตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้ เป็นวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบตัวอย่างเบื้องต้นได้เป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างก่อนที่จะนำไปตรวจโดยการใช้เครื่องมือทางเคมี เช่น LC-MS จึงทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบนี้ลดลง

ในปัจจุบันประเทศไทยนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA จำนวนมากสำหรับตรวจหาสารตกค้าง ซึ่งมีราคาสูงประมาณ 20,000 บาทต่อชุด สามารถตรวจตัวอย่างได้ประมาณ 40 ตัวอย่าง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปใช้เองจึงช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้ ซึ่งการเตรียมชุดตรวจสอบนั้น ต้องมีการเตรียมแอนติบอดีซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชุดตรวจสอบ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ TC และมีลักษณะสมบัติเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจหาสารตกค้าง TC โดยใช้วิธี ELISA ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ผลิตโมโนโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC
- 2) ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- 2) เตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู
- 3) ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ TC
- 4) หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

- 5) ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่ได้
- 6) ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
- 7) วิเคราะห์สรุปผลการทดลองและเขียนวิทยานิพนธ์

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมนโคลอนที่ผลิตโมนโคลอนอลแอนติบอดีต่อ TC และทราบลักษณะสมบัติของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

##### 2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC)

สารกลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracyclines; TCs) เป็นสารที่ผลิตขึ้นเพื่อให้ออกฤทธิ์ในวงกว้างทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สารในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นมาจากเชื้อราในตระกูล *Streptomyces* สารตัวแรกที่ค้นพบคือคลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline; CTC) ค้นพบในปี 1948 โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* อีก 2 ปีต่อมาก็ค้นพบออกซิเตตราไซคลิน (Oxytetracycline; OTC) โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี 1952 สามารถผลิตสารกลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้ โดยการดัดเอาอะตอมของคลอรีนออกจาก CTC สารที่ผลิตได้ใหม่นี้จะเรียกว่าเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC) เหมือนชื่อกลุ่มสาร ในปัจจุบันนี้ได้มีการผลิตสารในกลุ่มนี้ตัวใหม่ขึ้นมาใช้อีกหลายตัว ได้แก่ดอกซีไซคลิน (Doxycycline; DC) ดีมีคลอไซคลิน (Demeclocycline; DMC) เมธาไซคลิน (Methacycline; MC) และโรลิตเตตราไซคลิน (Rolitetracycline; RTC) (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

กลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม TC สามารถเกิดได้หลายแบบ ดังนี้

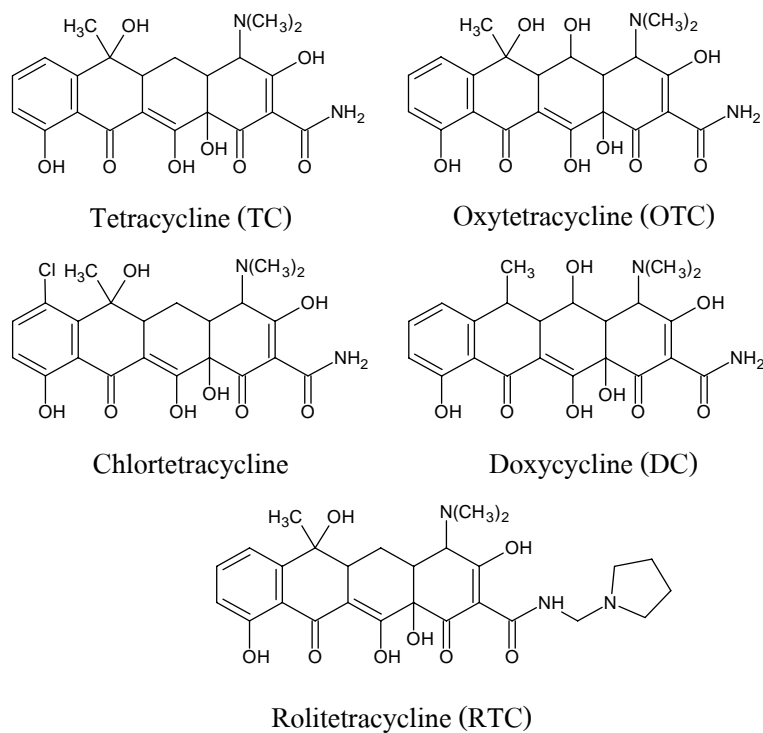
- 1) Active chelation ของไอออนบวก (cation) โดยจะไปเกาะกับแมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียม ยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ร่างกายสัตว์
- 2) ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเป็น โดย CTC จะยับยั้งเอนไซม์ organic nitroreductase ของเซลล์แบคทีเรีย
- 3) ขัดขวางการสร้างโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังเจริญแบ่งเซลล์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

ขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม TCs แบ่งออกได้ดังนี้

- 1) ออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและแบ่งเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารในกลุ่มนี้ได้แก่  $\beta$ -hemolytic Streptococci, nonhemolytic Streptococci, Clostridium, Brucella, Hemophilus และ Klebsiella
- 2) ออกฤทธิ์ทำลาย pathogenic agent บางชนิดที่สารปฏิชีวนะชนิดอื่นทำลายไม่ได้ เช่น Rickettsiae, ไวรัสขนาดใหญ่ เช่น Psittacosis ในสัตว์ และ Lymphogranuloma venereum ในคน
- 3) ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ Mycoplasma, Spirochete และ Actinomycetes
- 4) ถ้าให้ปริมาณสูงๆจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ โปรโตซัวได้

#### 2.1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมี ลักษณะ และสมบัติของสารในกลุ่ม TCs

สารทุกตัวในกลุ่ม TCs จะมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือ hydronaphthacene 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 จึงอาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่สามารถถูกดูดซึมในทางเดินอาหารได้ฤทธิ์ของสารที่ให้กินจึงขึ้นกับสารส่วนที่ไม่จับกับไอออนของโลหะเนื่องจากจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ตามปกติ pH ของทางเดินอาหารและ pKa ของสารกลุ่มนี้เหมาะสำหรับการที่สารจะถูกดูดซึมเข้าไปออกฤทธิ์ในร่างกาย (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

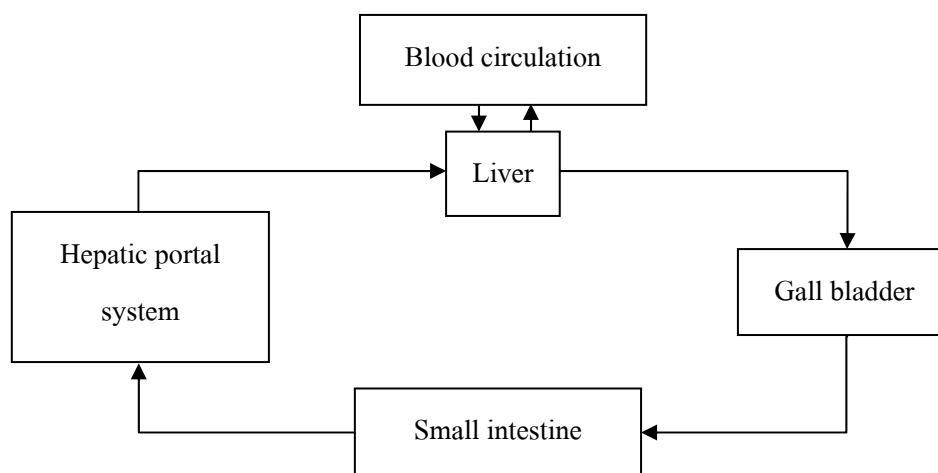
สารในกลุ่ม TCs ที่นิยมใช้ในทางสัตวแพทย์ ได้แก่

- 1) Tetracycline hydrochloride (TC-HCl) มีชื่อทางการค้าตามบริษัทที่ผลิตได้แก่ Achromycin, Panmycin และ Polycycline เป็นต้น มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น และละลายน้ำได้ดี ถูกทำลายได้ง่ายโดยสารละลายด่างแก่ และสารละลายกรดที่มี pH ต่ำกว่า 2
- 2) Oxytetracycline hydrochloride (OTC-HCl) มีชื่อทางการค้าว่า Terramycin มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง มีรสขม และไม่มีกลิ่น ละลายได้ดีในน้ำและสารละลายอินทรีย์ นิยมให้โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ
- 3) Chlortetracycline hydrochloride (CTC-HCl) มีชื่อทางการค้าว่า Aureomycin มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น มีรสขม และละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย มีลักษณะเป็นกรดสูงเมื่ออยู่ในรูปสารละลายจึงไม่แนะนำให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพราะจะทำให้กล้ามเนื้อเกิดการระคายเคืองและเกิดเนื้อตายได้
- 4) Doxycycline monohydrate (DC) เป็นสารที่ดูดซึมได้ดีและขับถ่ายออกช้ากว่าสารในกลุ่ม TCs ตัวอื่นๆ จึงทำให้สารออกฤทธิ์ได้นาน มีค่ากึ่งชีวิตในกระเลือดนานถึง 19-20 ชั่วโมง ขนาดสารที่ให้จึงน้อยกว่าและไม่ต้องให้บ่อยเหมือนสารตัวอื่นในกลุ่ม

### 2.1.3 การเปลี่ยนแปลงของ TC เมื่อเข้าสู่ร่างกาย

ในพวกสัตว์กินเนื้อภายหลังจากให้สารในกลุ่ม TCs สารจะถูกดูดซึมได้ดีในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น สารกลุ่มนี้จะเกาะกับโปรตีนในพลาสมาแบบไม่ถาวร จะแพร่กระจายไปทั่วร่างกายโดยพบปริมาณเข้มข้นสูงสุดที่ ไต ตับ ม้าม และปอด สามารถ

แพร่กระจายผ่านรกไปยังลูกอ่อนจึงสามารถตรวจพบสารในเลือดไข่มูกและไข่มูกได้ ภายหลังจากที่ดูดซึมแล้วสารบางส่วนจะไปอยู่ที่ตับแล้วขับออกมากับน้ำดีและถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กอีก เรียกว่าการเกิด enterohepatic recycling (รูปที่ 2.2) จึงยังมีสารบางส่วนคงอยู่ในเลือดเป็นเวลานาน ซึ่งต่างจากสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆที่ขับถ่ายออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว โดยจะสามารถขับถ่ายได้ ทั้งทางปัสสาวะโดยผ่านไต ทางอุจจาระ และทางน้ำนม สารกลุ่ม TCs มีการเปลี่ยนแปลงหลายระดับ แต่ที่พบส่วนใหญ่ในปัสสาวะ อุจจาระ และในเนื้อเยื่อจะอยู่ในรูป TC ดั้งเดิม ในอุจจาระจะพบสาร TC ในรูปเดิมไม่เปลี่ยนแปลงอยู่ถึง 30% (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)



รูปที่ 2.2 การเกิด enterohepatic recycling ของสารกลุ่ม TCs

ถึงแม้สารจะถูกขับถ่ายออก แต่ก็มีสารบางส่วนที่ตกค้างอยู่ในร่างกายสัตว์ได้ เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการกำหนดระยะเวลาที่หยุดให้สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ก่อนส่งโรงฆ่า (withdrawal time) ดังตัวอย่างแสดงในตาราง 2.1

ตาราง 2.1 ระยะเวลาที่หยุดให้ให้สารปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs ก่อนส่งโรงฆ่าของสัตว์ชนิดต่างๆ

สาร	ระยะเวลาที่หยุดให้สารก่อนส่งโรงฆ่า (วัน)		
	โค	สุกร	ไก่
TC-HCl	5	4	-
OTC-HCl	7	26	0
CTC-HCl	3	5	1

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) ไม่มีรายงาน

ที่มา: กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547

#### 2.1.4 พิษของสารตกค้าง TC

การเกิดการตกค้างของสาร TCs ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว เนื่องจากการที่สารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงกับขนาดที่ใช้รักษาโรค จึงไม่ทำให้เชื้อโรคที่มีในร่างการตายแต่กลับทำให้เชื้อโรคนั้นปรับตัวและคือต่อยา ทำให้เกิดปัญหาการรักษาโรคในภายหลังได้ และถ้าตรวจพบในระดับ 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจทำให้เกิดอันตรายต่อร่างการของผู้บริโภคได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง 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)

#### 2.1.5 มาตรฐานสารตกค้าง TC

องค์กรต่างๆ เช่น EU, โครงการมาตรฐานอาหารเอฟ เอ โอ /ดับลิว เอช โอ (Joint FAO/WHO Food Standard Programme; Codex), FDA (Food and Drug Administration) และ Japanese Ministry of Health ได้มีการกำหนดมาตรฐานปริมาณของสารกลุ่ม TCs ที่มนุษย์จะรับได้ในแต่ละวัน (acceptable daily intake; ADI) และระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) (ตารางที่ 2.2) เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค



ตารางที่ 2.2 มาตรฐานปริมาณของสารกลุ่ม TCs ที่มนุษย์จะรับได้ในแต่ละวัน (ADI) และระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (MRLs)

ผลิตภัณฑ์ อาหาร	ADI	MRLs (mg/kg)			
		Codex <sup>1</sup>	U.S. tolerance <sup>1</sup>	EU <sup>2</sup>	ประเทศไทย <sup>3</sup>
กลัมน้ำเนื้อ	3 µg/kg ต่อ น้ำหนัก ตัวผู้บริโภค	0.2	2	0.1	0.1
ตับ		0.6	6	0.3	0.3
ไต		1.2	12	0.6	0.6
ไข่		0.2	-	0.2	0.2
นม		0.1	0.3	0.1	0.1
น้ำผึ้ง		-	-	-	0.025

หมายเหตุ 1: TC

2: ผลรวมของสารในกลุ่ม TCs

3: OTC

ที่มา: กระทรวงสาธารณสุข, 2544; สุรตีวดี ภาคอุทัย และกนกวรรณ ศรีงาม, 2547; Baynes, (n.d.); Pastor-Navarro และคณะ, 2007

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารที่สำคัญของโลก ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาและยกระดับผู้ผลิตของไทยให้สามารถผลิตสินค้าเกษตรและอาหารที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคให้ได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงเห็นสมควรจัดทำมาตรฐานเรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอ้างอิงมาตรฐานและหลักเกณฑ์ที่ประกาศโดยองค์การมาตรฐานระหว่างประเทศ ได้แก่ Codex สำนักงานเลขานุการอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention; IPPC) และองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) และมาตรฐานของประเทศคู่ค้าที่สำคัญ ประกอบกับข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง

คณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ได้ประกาศข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารในการประชุมเมื่อวันที่ 7 ธันวาคม 2548 โดยให้นิยามคำว่ายาสัตว์ตกค้างว่าหมายถึงสารประกอบตั้งต้น (parent drug) และหรือสารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และรวมถึงสารอื่นๆ ที่ติดมากับยาสัตว์ (associated impurities) ที่ตกค้างในอวัยวะหรือผลิตผลของสัตว์ที่บริโภคได้ และให้ข้อกำหนดว่าสินค้าเกษตร

และอาหารสามารถตรวจพบยาสัตว์ตกค้างที่เกิดจากการใช้ยาสัตว์ที่ขึ้นทะเบียนอย่างถูกต้องตาม  
กฎหมายได้ไม่เกินค่า MRL ที่กำหนดไว้ดังตารางที่ 2.3 (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและ  
อาหารแห่งชาติ [มกอช.], 2548)

ตารางที่ 2.3 ข้อกำหนดยาสัตว์ในกลุ่ม TCs ตกค้างที่ประกาศโดยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้า  
เกษตรและอาหารแห่งชาติในปี 2548

รายการสินค้า	ชนิดยาสัตว์ตกค้าง (detection of residue)	MRL (mg/kg)
เนื้อสัตว์แช่เย็น/แช่แข็ง	TC, OTC, CTC อย่างหนึ่งอย่างใด หรือผลรวม ของสารทั้ง 3 ชนิด	0.2
เนื้อสัตว์ผ่านความร้อน	TC, OTC, CTC อย่างหนึ่งอย่างใด หรือผลรวม ของสารทั้ง 3 ชนิด	0.2
กุ้งแช่เย็น/แช่แข็ง	OTC	0.2

ที่มา: มกอช., 2548

#### 2.1.6 ปัญหาสารตกค้างในกลุ่ม TC ในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศส่งออกสินค้าอาหารทั้งในรูปสด กึ่งแปรรูป แปรรูป จาก  
ข้อมูลการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ระหว่างเดือนมกราคม - ธันวาคม 2550 ของกรมปศุสัตว์ พบว่ามี  
มูลค่ารวมถึง 91,715 ล้านบาท (กรมปศุสัตว์, 2550) โดยประเทศผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศใน  
กลุ่มประชาคมยุโรป สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น แต่ประเทศไทยต้องเผชิญกับปัญหาการกีดกันทาง  
การค้าของเกือบทุกประเทศที่เป็นคู่ค้ากับไทย โดยประเทศผู้นำเข้าสินค้าอาหารส่วนใหญ่ได้ใช้  
มาตรการในการคุ้มครองสุขภาพอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภคมาเป็นข้ออ้าง ดังตัวอย่าง  
ในอดีตได้แก่ ประเทศญี่ปุ่นประสบปัญหาเรื่องสารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลงในไก่แช่แข็ง  
ประเทศสหรัฐอเมริกาตรวจพบสารเจือปนในอาหารที่ประเทศสหรัฐอเมริกาไม่อนุญาตให้ใช้  
ประเทศอิตาลีปฏิเสธการรับซื้อปลาหมึกแช่แข็งจากไทยเนื่องจากตรวจพบแคดเมียมปนเปื้อนหลาย  
ครั้ง และประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรปห้ามใช้สาร EDTA (ethylene diamine tetraacetate) ใน  
อาหารทะเลกระป๋องเป็นต้น เป็นผลให้ประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้ถึงปีละกว่าหนึ่งพันล้านบาท  
(ดานิส ทวีดิยานนท์ และทัศนีย์ ลือชัยเวช, 2539)

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบโดยตรงในการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค ได้ตระหนักถึงความสำคัญของยาสัตว์ตกค้างในอาหารซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค ซึ่งจากผลการตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้างในเนื้อสัตว์ของกรมปศุสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ.2533-2542 พบปัญหา ยาสัตว์ตกค้างในอาหารทั้งปริมาณที่เกินกำหนดค่า MRL ของ Codex และปัญหาชนิดของยาสัตว์ตกค้างในอาหารที่ยังไม่มีกำหนดไว้ใน Codex โดยพบการตกค้างในอาหารของสารในกลุ่ม TCs ถึงร้อยละ 40 (วารุณี เสนสุภา และปราณี เกียรติสุระยานนท์, 2543) ส่งผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศเป็นอย่างมาก

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ การแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ในตัวอ่อนสัตว์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายทำให้ตัวอ่อนสัตว์ตาย ทำได้โดยการใช้สารปฏิชีวนะ เช่น TC ซึ่งทำให้มีสารตกค้างอยู่ในน้ำเลี้ยงเป็นเหตุก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้า จึงเกิดกระแสการต่อต้านการใช้ยาปฏิชีวนะในการบำบัดและป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียขึ้น และประเทศผู้ซื้อผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้เกิดการตื่นตัวตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในน้ำเลี้ยงทั้งหมดที่นำเข้าจากประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทยด้วย (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย [สกว.], 2546)

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs ที่นิยมนำไปใช้อย่างไม่ถูกต้องโดยใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตโดยใช้ผสมในอาหารสัตว์ ได้แก่ CTC และ OTC ทำให้สัตว์ที่ได้รับสารเหล่านั้น ปริมาณน้อยๆ ติดต่อกันเป็นเวลานานเกิดการดื้อยาได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้ปริมาณเกินที่กำหนดหรือไม่หยุดใช้ยาตามระยะเวลาที่กำหนดก่อนส่งโรงฆ่า เป็นสาเหตุให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์ในระดับที่สูงกว่าค่า MRL ปัจจุบันได้ประกาศห้ามนำยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดรวมทั้ง CTC และ OTC มาผสมในอาหารสัตว์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545)

ในปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ในระบบฟาร์มมาตรฐาน เกษตรกรต้องดูแลฟาร์มไม่ให้มีการใช้ยาที่ห้ามใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จึงไม่สามารถรู้ได้ว่า อาหารสัตว์ ยาสัตว์ หรือปัจจัยการผลิตต่างๆที่นำไปใช้เลี้ยงสัตว์มีสารที่ห้ามใช้หรือไม่ เนื่องจากไม่มีเครื่องมือในการตรวจสอบที่จะสามารถทำได้ในเบื้องต้น แม้ว่าการตรวจสอบสินค้าก่อนการส่งออกนั้นเป็นสิ่งจำเป็น แต่ต้องใช้การลงทุนที่สูงมาก การควบคุมการใช้ยาในสัตว์โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากสัตว์มาตรวจในห้องปฏิบัติการนั้นมีขีดจำกัดที่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง บุคลากรต้องมีประสบการณ์และความชำนาญสูง ลิ่นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลามาก ดังนั้นการใช้วิธีการตรวจสอบที่ง่าย รวดเร็ว และราคาถูกจึงมีความจำเป็นในการตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่าง (screening test) ในพื้นที่ก่อนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ประเทศไทยได้มีการนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA จำนวน

มากสำหรับตรวจหาสารตกค้าง ซึ่งมีราคาสูงประมาณ 20,000 บาทต่อชุด สามารถตรวจตัวอย่างได้ประมาณ 40 ตัวอย่าง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปใช้เองจึงช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้

## 2.1.7 วิธีการตรวจติดตามสารตกค้าง TC

### 2.1.8.1 วิธีทางเคมี

#### 2.1.7.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC การตรวจโดยวิธีนี้สามารถหาปริมาณสารตกค้างได้ถูกต้องและแม่นยำสูง Pena และคณะ (2005) ใช้เทคนิค HPLC ที่ใช้เครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนส์ เพื่อตรวจสอบ TC และ OTC ในน้ำผึ้ง ปริมาณ TC และ OTC ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 21 และ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb) ตามลำดับ แต่เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ดังนั้นเทคนิคจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้ในงานประจำ

#### 2.1.7.1.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

การใช้ LC-MS เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถตรวจสอบเพื่อยืนยันระบุชื่อสารในระดับน้อยมากๆ ได้แม่นยำสูง และยังใช้สารตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นวิธีการนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่ม TC ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดี Koesukwiwat, Jayanta และ Leepipatpiboon (2007) ได้ใช้เทคนิค LC-MS สำหรับตรวจสอบการตกค้างของ TC, OTC และ CTC ในน้ำนมโค พบว่าปริมาณสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.67, 0.65 และ 2.64 ppb ตามลำดับ และสามารถตรวจสอบแบบปริมาณวิเคราะห์ได้น้อยที่สุดที่ 0.95, 1.03 และ 8.64 ppb แต่เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก และยังต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญการ โดยเฉพาะ ดังนั้นเทคนิคจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้ในงานประจำเช่นเดียวกับวิธี HPLC

### 2.1.7.1.3 ชุดตรวจสอบทางเคมี

ใช้หลักการของ colorimetric method โดยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างน้ำยาทดสอบกับยาแต่ละชนิดเกิดสีที่แตกต่างกัน มีวิธีการไม่ยุ่งยาก ราคาถูก ใช้งานง่าย ให้ผลรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ค่อนข้างสูง (ระดับ ppm) เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ โดยกรมปศุสัตว์ได้ผลิตชุดตรวจสอบสาร CTC และ OTC มีชื่อว่า Tetra Test Kit ซึ่งสามารถตรวจ CTC และ OTC ได้ระดับต่ำสุดที่ 6 และ 5.36 ppm ตามลำดับ (แพรวพรรณ ห้องทองแดง และคณะ, 2548)

### 2.1.8.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunological method)

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น radioimmunoassay (RIA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่ทำให้เกิดความยุ่งยากในการจัดเก็บสารกัมมันตภาพรังสี และ Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) ที่เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างในสัตว์เลี้ยงและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใส่แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่ประหยัดรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถหาสารตกค้างปริมาณน้อยได้ถึงระดับ ppb ในงานวิจัยของ Aga และคณะ (2005) ที่ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวัด TC ในดินระหว่างการใช้ ELISA และ LC-MS พบว่าการใช้วิธี ELISA สามารถตรวจวัด TC ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ในขณะที่ LC-MS ตรวจสอบได้เพียงบางชนิดเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2004) ที่พบว่าวิธี LC-MS ไม่สามารถตรวจสอบ CTC ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของ TC ที่มีปริมาณน้อยในน้ำได้ การตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้เป็นวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบตัวอย่างเบื้องต้นได้เป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างก่อนที่จะนำไปตรวจโดยใช้เครื่องมือ เช่น LC-MS จึงทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบนี้ลดลง ตัวอย่างชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่าย เช่น MaxSignal™ Tetracycline ELISA Test Kit ใช้ตรวจสอบ TC ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ สามารถตรวจสอบปริมาณที่ต่ำที่สุดถึง 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb)

## 2.1.8 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

### 2.1.8.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

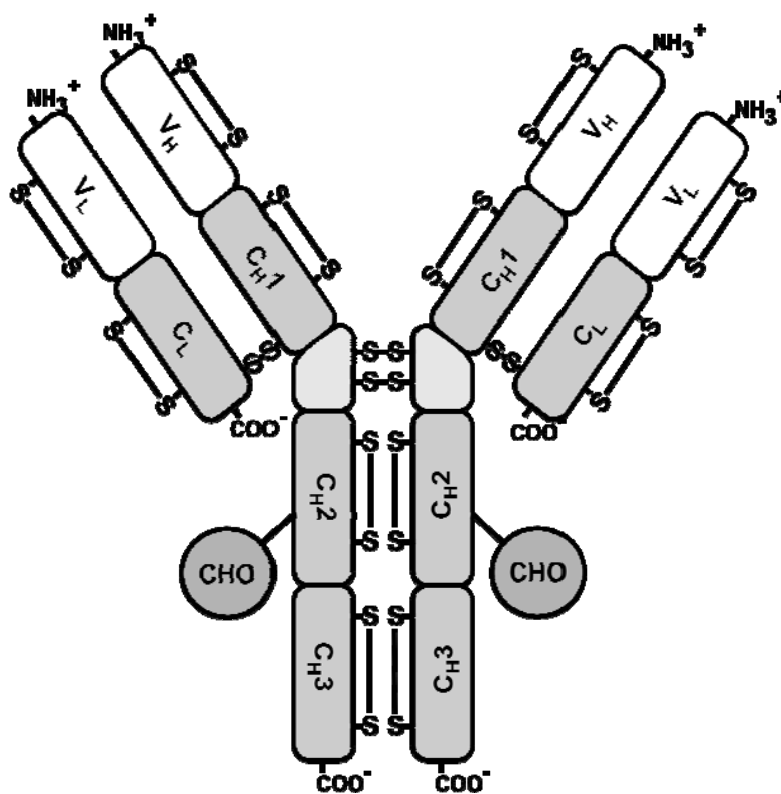
แอนติเจน คือ สารที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาจับแบบจำเพาะกับองค์ประกอบต่างๆของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แอนติบอดีหรือตัวรับบนผิวเซลล์ สารที่มีสมบัติเป็นแอนติเจนเกือบทุกชนิดจะมีสมบัติการเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะได้ ยกเว้นสารที่มีโมเลกุลเล็กที่เรียกว่า แฮปเทน (hapten) ซึ่งมีเฉพาะสมบัติของแอนติเจนแต่จะไม่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ กระบวนการทางทางเคมีเชื่อมแฮปเทนกับโปรตีนขนาดใหญ่เรียกว่าโปรตีนพาหะ (carrier protein) ทำให้ได้สารเชิงซ้อนที่มีสมบัติเป็นอิมมูโนเจนสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

### 2.1.8.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนตรงบริเวณจำเพาะของโมเลกุลแอนติเจนที่เรียกว่าอีพิโทป (epitope) สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์ แอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู่กระแสเลือดจะทำหน้าที่เป็นตัวจักรสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity)

โครงสร้างของแอนติบอดี (รูปที่ 2.3) 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  $\kappa$  หรือ  $\lambda$  สายยาวเป็นชนิด  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  หรือ  $\epsilon$  โครงสร้างทุติยภูมิของแอนติบอดีเกิดจากการพับทบกันไปมาของสายเพปไทด์แบบ  $\beta$ -pleated sheet เสถียรภาพของโครงสร้างนี้เกิดจากพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายที่เชื่อมระหว่างสายเพปไทด์ที่พับไปมา ซึ่งสายเพปไทด์ม้วนทับเป็นโครงสร้างตติยภูมิอัดแน่นเป็นก้อน (globular domain) และส่วนของโดเมนที่อัดแน่นเป็นก้อนต่างๆของสายสั้นและสายยาวอย่างละ 2 สายรวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิซึ่งประกอบกันเป็นบริเวณที่จับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ และแสดงปฏิกิริยาทางชีวภาพได้

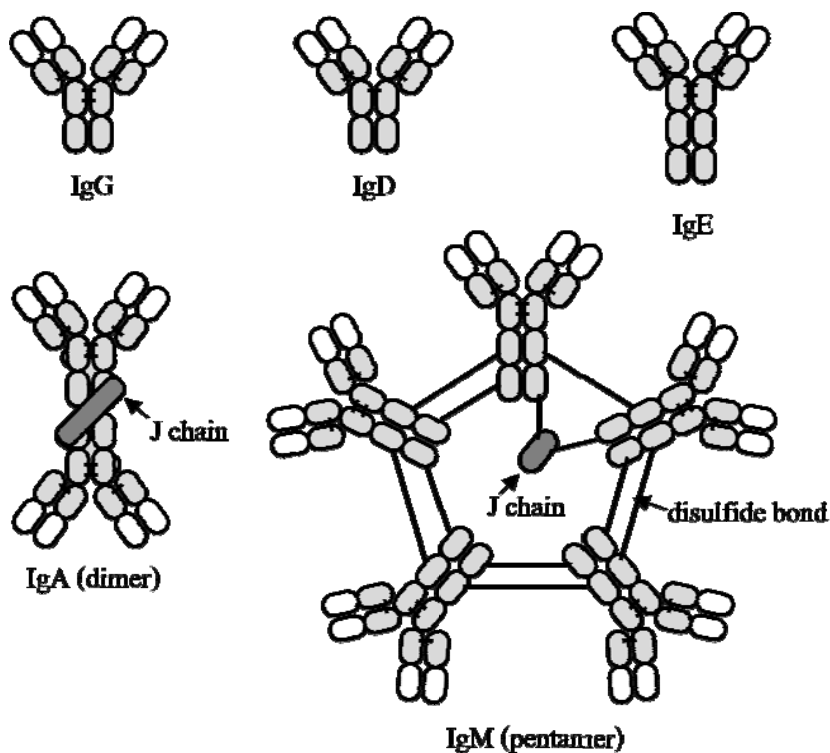
ไอโซไทป์ (isotype) หรือคลาส (class) ของ Ig ชนิดต่างๆ ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE เกิดจากความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนสายยาว บริเวณคองที่ (ตารางที่ 2.4) ทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้าง (รูปที่ 2.4) และบทบาทการทำงานแตกต่างกันไป โดยบทบาทการทำงานของแต่ละไอโซไทป์เกิดจากปฏิกริยาระหว่างส่วนของโปรตีนสายยาวกับองค์ประกอบต่างๆของโปรตีนในซีรัมหรือตัวรับบนผิวเซลล์ ในหนูเม้าส์ (mouse) โปรตีนสายยาวชนิด  $\gamma$  สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (subclass) ได้แก่  $\gamma_1$ ,  $\gamma_{2a}$ ,  $\gamma_{2b}$  และ  $\gamma_3$  เกิดเป็นไอโซไทป์ IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> และ IgG<sub>3</sub> ตามลำดับ ซึ่งจะแตกต่างกันตรงขนาดของข้อพับ จำนวน และตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในสายระหว่างโปรตีนสายยาว (ไพศาล ลีทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแอนติบอดี

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของโปรตีนสายสั้นและสายยาวของ Ig โยโซไทป์ต่างๆ

ไอโซไทป์	สายยาว	สายสั้น	กลุ่มย่อย	สูตรโมเลกุล
IgG	$\gamma$	K หรือ $\lambda$	ในมนุษย์ $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ หรือ $\gamma_4$ ในหนูเมาส์ $\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}$ หรือ $\gamma_3$	$\gamma_1 K_2$ $\gamma_1 \lambda_2$
IgA	$\alpha$	K หรือ $\lambda$	$\alpha_1$ หรือ $\alpha_2$	$(\alpha_2 K_2)_n$ $(\alpha_2 \lambda_2)_n$ n = 1, 2, 3 หรือ 4
IgM	$\mu$	K หรือ $\lambda$	ไม่มี	$(\mu_2 K_2)_n$ $(\mu_2 \lambda_2)_n$ n = 1 หรือ 5
IgD	$\delta$	K หรือ $\lambda$	ไม่มี	$\delta_1 K_2$ $\delta_1 \lambda_2$
IgE	$\epsilon$	K หรือ $\lambda$	ไม่มี	$\epsilon_1 K_2$ $\epsilon_1 \lambda_2$



รูปที่ 2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์



### 2.1.8.3 การกระตุ้น บี-เซลล์ ให้สร้างแอนติบอดี

เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี ได้แก่ บี-ลิมโฟไซท์ (B-lymphocyte) หรือ บี-เซลล์ (B-cell) ความจำเพาะของบี-เซลล์เกิดจากการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์หรือแอนติบอดีที่ติดอยู่บนเซลล์เมมเบรน (membrane bound antibody) ซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนที่มีลักษณะเฉพาะเท่านั้น เมื่อบี-เซลล์มีการจับกับแอนติเจนที่เหมาะสมตรงบริเวณที่จับ (binding site) ของแอนติบอดีบนผิวเซลล์ และเมื่อแอนติเจนที่อยู่ร่วมกับ โมเลกุล MHC (major histocompatibility complex) class II บนผิวของเซลล์นำเสนอแอนติเจนถูกที-เซลล์ (T-lymphocyte; T-cell) ที่มีการแสดงออกของไกลโคโปรตีนชนิด CD4 ทำหน้าที่เป็น T-helper ( $T_H$ ) ตรวจจับและหลั่งไซโทไคน์ออกมา บี-เซลล์จะถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและพัฒนาเป็นเซลล์ความจำ (memory B-cell) และบางส่วนพัฒนาเป็นพลาสมาเซลล์ทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเหมือนกับแอนติบอดีบนผิวเซลล์และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ในเซลล์ความจำซึ่งมีอายุยืนยาวจะทำหน้าที่ตรวจจับแอนติเจนเมื่อได้รับแอนติเจนเดิมอีก การตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีจะรวดเร็วกว่าการสัมผัสแอนติเจนครั้งแรก (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

### 2.1.8.4 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำการกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆของบีเซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทป เป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดที่จำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปที่รวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb) แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัมบางครั้งอาจลดประสิทธิภาพ หรือก่อให้เกิดปัญหาในการใช้ในร่างกาย เช่น ในการวินิจฉัย การรักษา หรือในงานวิจัยต่างๆ เนื่องจากปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ปนเปื้อนอยู่ในซีรัมที่ใช้นั้นมีอยู่หลายชนิด หรือการตอบสนองต่อสารต่างๆที่สัตว์ได้รับการกระตุ้น การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAAb) ที่สร้างจากโคลนต้นกำเนิดเพียงโคลนเดียวของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจนจะสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำเกิดการทำปฏิกิริยาข้ามได้กับสารอื่นๆ ได้	ความจำเพาะสูงเนื่องจากจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวเท่านั้น
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอีพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้อีพิโทปเดียว
ความเข้มข้นแอนติบอดีที่ผลิต	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100-200 µg/ml เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบปั่นกวาน
ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 100 ml จากซีรัมของกระต่าย	ปริมาณไม่จำกัด
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจนที่ผลิต	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้น จึงจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะกับอีพิโทปเดียวจึงไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาที่ใช้ในการผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในเวลาเริ่มต้น
ข้อดีหลัก	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต	มีความจำเพาะสูง ผลิตได้ไม่จำกัด
ข้อเสียหลัก	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาและแรงงานในการผลิตมาก

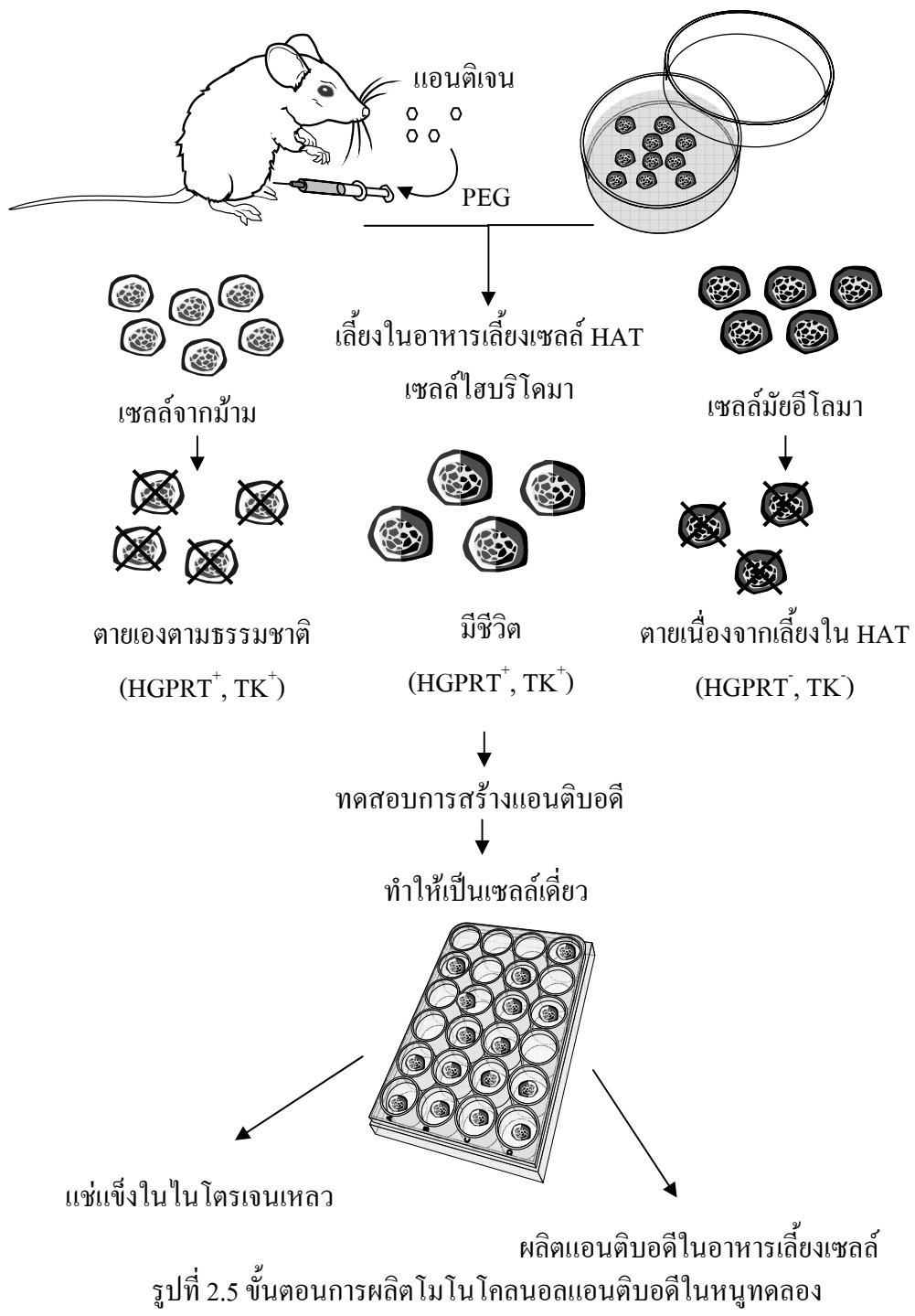
#### 2.1.8.5 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้หลักการ somatic hybridization

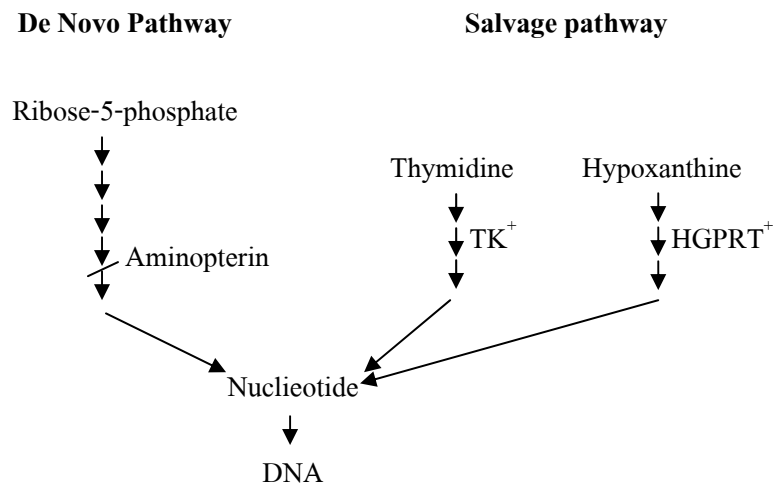
การใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากพอลิโคลนอลแอนติบอดีทำได้ยากมาก แต่ในปี ค.ศ.1975 George Kohler และ Cesar Milestein หาแนวทางในการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ ซึ่งได้กลายเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญทางภูมิคุ้มกัน จากการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมารวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือมัยอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) กลายเป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่จำกัดของเซลล์มะเร็งสามารถสร้างแอนติบอดีได้ ทำให้สามารถผลิตโคลนของไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้จำนวนมาก

และไม่จำกัดปริมาณ เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและใช้ในงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทำให้ Kohler และ Milestein ได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ.1984 (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

#### 2.1.8.6 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

นำบี-เซลล์จากสัตว์ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาชักนำให้เกิดการหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมาไฮบริโดมาโดยใช้โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) (รูปที่ 2.5) ในทางปฏิบัติไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเอง ไม่หลอมรวมกัน และไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกให้มีเพียงแค่เซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ โดยการใช้เซลล์มัยอิมาที่ถูกทำให้มีความบกพร่องของเอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) ที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน Salvage pathway (รูปที่ 2.6) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งมี hypoxanthine, aminopterin และ thymine ผสมอยู่ aminopterin จะไปขัดขวาง de novo pathway ซึ่งเป็นอีกกระบวนการพื้นฐานในการสร้างนิวคลีโอไทด์ ส่วน hypoxanthine และ thymine ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ Salvage pathway ดังนั้นเซลล์มัยอิโลมาที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองที่ขาดเอนไซม์ HGPRT และ TK จะตายในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เพราะไม่สามารถใช้ Salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ จึงมีเพียงเซลล์ที่เป็นไฮบริโดมาเท่านั้นที่มีชีวิตรอด ส่วนบี-เซลล์หรือเซลล์อื่นที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆ และจะตายไปเอง เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาแล้วจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง ไฮบริโดมาจำนวนมากผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนอื่นๆที่ไม่ต้องการจึงจำเป็นต้องคัดออก วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไป ได้แก่ ELISA และ immunoassay ต่างๆ





รูปที่ 2.6 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ De Novo และ Salvage pathway

หลังจากสามารถพิสูจน์ทราบว่าได้ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะที่ต้องการแล้ว จำเป็นต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวจริง และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาณที่ต้องการต่อไป

#### 2.1.9 หลักการ ELISA

การตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน คือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ enzyme immunoassay (EIA) ซึ่งใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดพื้นผิว และตรวจวัดสัญญาณจากปฏิกิริยากับแอนไซม์ที่ติดฉลากบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี วิธี ELISA ได้พัฒนาต่อมาจาก radioimmunoassay (RIA) โดยเปลี่ยนจากการติดฉลากด้วยสารรังสี เป็นการติดฉลากด้วยแอนไซม์ แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารที่เป็นสารตั้งต้นของแอนไซม์และเปลี่ยนสีได้เมื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนจากสารรังสีมาเป็นแอนไซม์นี้ทำให้การตรวจมีความสะดวกมากขึ้น ไม่ต้องใช้รังสีที่มีอันตราย ทั้งของเสียได้ง่ายขึ้น และชุดตรวจมีอายุการใช้งานได้นานเพราะไม่มีการหมดอายุของสารรังสี การพัฒนา ELISA รูปแบบต่างๆทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่าง (ธารารักษ์ ธารากุล, 2545)

เทคนิค ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งตามหลักการได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

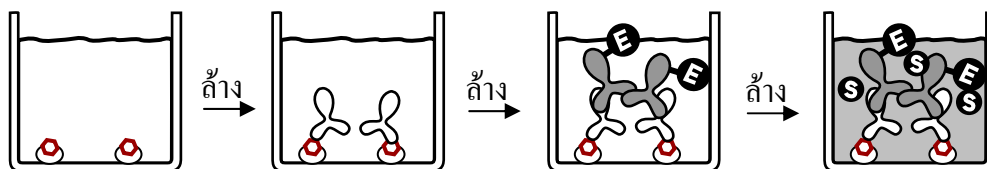
#### 1) Indirect ELISA

วิธี indirect ELISA ใช้ในการคัดเลือกไฮบริโดมาโคลนในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทำได้โดยเติมซีรัมหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนลงในหลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนในงานหลุม 96 หลุม ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแล้วล้างแอนติบอดีไม่จับกับแอนติเจนออก จากนั้นตรวจสอบแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อชนิดของแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีอิสระออก เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ (รูปที่ 2.6) ปริมาณสีที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถวัดได้โดย microplate reader ที่ออกแบบสำหรับอ่านงานหลุม 96 หลุม ซึ่งจะสามารถทราบผลค่าการดูดกลืนแสงจากทั้ง 96 หลุมภายในเวลาไม่ถึงนาที

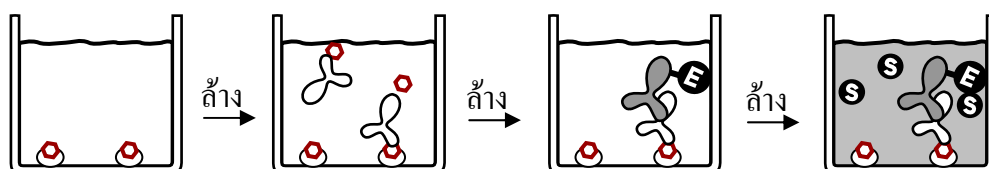
#### 2) Competitive ELISA

วิธี competitive ใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะและความไวของแอนติบอดีต่อแอนติเจน โดยจะนำแอนติบอดีผสมกับตัวอย่างแอนติเจนมาตรฐานหรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจ จากนั้นเติมลงในงานหลุม 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนเหมือนในกรณีของ indirect ELISA ซึ่งถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารมากแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนที่กั้นหลุมจะมีน้อยลง ดังนั้นหลังจากเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์และมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีอิสระออกแล้วเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ (รูปที่ 2.7) ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าหลุมที่มีความเข้มข้นแอนติเจนต่ำ

## Indirect ELISA



## Competitive ELISA



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการทำ indirect ELISA และ competitive ELISA

- ⊙ : แอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ
- : แอนติเจนอิสระ
- ∩ : แอนติบอดี
- ∩<sup>E</sup> : แอนติบอดีที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์
- ⊙<sup>S</sup> : สารตั้งต้นของเอนไซม์

## 2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

Pena และคณะ (2005) ใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนส์ เพื่อตรวจสอบสารเตตราไซคลิน TC และ OTC ในน้ำผึ้งโดยสกัดสารตัวอย่างที่ตกค้างด้วย  $\text{Na}_2\text{-EDTA-Mcllvaline}$  buffer, pH 4.0 และ solid-phase extraction (SPE) ที่แตกต่างกัน mobile phase ที่เหมาะสมคือสารละลาย acetonitrile และ oxalate buffer ในอัตราส่วน 20:80 pH 2 ความ

เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้คอลัมน์  $C_{18}$  Nucleocil ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ TC และ OTC ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.050 และ 0.049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

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 ทำให้ 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

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

Pastor-Navarro และคณะ (2007) ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำผึ้งโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วยสารในกลุ่ม TCs ที่ถูกทำให้เป็นสารอนุพันธ์ของ 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 และสามารถใช้น้ำผึ้งตัวอย่างได้ %recovery อยู่ระหว่าง 79 ถึง 108 เปอร์เซ็นต์

Zhang และคณะ (2007) ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำนมโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วย TC ที่ใช้วิธีใน



การเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะที่แตกต่างกัน 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

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนู Mouse สายพันธุ์ 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
กระบอกฉีดขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Germany
เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (vortex)	Scientific 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

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
ชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส	Bio-Rad, USA
ตู้ดูดควัน	Theera Trading co., Thailand
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation, USA
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co.,Ltd., 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
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumpersulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ; APS)	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 <sup>TM</sup> protein assay kit	Pierce, USA
Beta-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	Fluka, China
Citric acid	Merck, Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie brilliant blue R-250	Pierce, USA
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Diethyl ether	Merck, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka, Switzerland
di-Sodium hydrogenphosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Germany
Doxycycline (DC)	Sigma-Aldrich, USA
1-ethy-3-(3-diamethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich, USA
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
Glycine	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	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

สารเคมี	แหล่งที่มา
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
Picrylsulfonic acid (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; TNBS)	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol HYBRI-MAX <sup>®</sup> (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
Rolitetraacycline (RTC)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Germany
Salbotamol	Sigma-Aldrich, USA
Skim milk	Anline, Thailand
Sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carlo Erba, USA
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Germany
Tetracycline hydrochloride (TC)	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N,N -Tetramethy-Ethylenediamine (TEMED)	Pierce, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trizma base)	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 คือโปรตีนที่ทำการเพิ่มหมู่เอมีนโดยทำการเชื่อมไคเอมีนเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีน 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-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กวนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปทำ dialysis ด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 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<sup>TM</sup> 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 เติมฟอร์มาลดีไฮด์ (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) กรดไบคาร์บอโรนิก (bicinchoninic acid) และโซเดียมทาร์เทรต (sodium tartrate) อยู่) และสารละลาย B (คอปริกซัลเฟต (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 นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อนำมาคำนวณเป็นกลับปริมาณโปรตีน

### 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 จากนั้นเติมสารละลาย 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

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น} = \frac{A_{355} \text{ ของ cBSA} - A_{355} \text{ ของ BSA}}{A_{355} \text{ BSA}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้} = \frac{A_{355} \text{ ของ cBSA} - A_{355} \text{ ของ TC-cBSA}}{A_{355} \text{ ของ cBSA}}$$

### 3.4.1.5 การหาอัตราส่วนโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นและ TC ที่เชื่อมติดโดยวิธี MALDI-TOF MS

หาอัตราส่วน โมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นและสารที่เชื่อมติดด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อหามวลโมเลกุลของสาร โดยคำนวณจาก

$$\text{จำนวน โมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้น} = \frac{\text{มวล โมเลกุลของ cBSA} - \text{มวล โมเลกุลของ BSA}}{\text{มวล โมเลกุลของเอมีน}}$$

$$\text{จำนวน โมเลกุลของสารที่เชื่อมติด} = \frac{\text{มวล โมเลกุลของ TC-cBSA} - \text{มวล โมเลกุลของ cBSA}}{\text{มวล โมเลกุล TC}}$$

### 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 อีสระได้หรือไม่โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ TC-OVA ที่เตรียมได้จากวิธีเดียวกับการเตรียม TC-cBSA ในข้อ 3.4.1.2 แต่เปลี่ยนโปรตีนพาหะจาก cBSA เป็น ovalbumin (OVA) มาเคลือบบนจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA จากนั้นเลือกหนูตัวที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดและสามารถจับกับ TC อีสระได้ไปทำต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วัน ฉีดกระตุ้นหนูด้วย TC-cBSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมที่ไม่ผสม Freund's adjuvant



### 3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

#### 3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอ์โลมา

นำเซลล์มัยอ์โลมา NS-I เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 10% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอ์โลมาให้อยู่ในระยะ เอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในวันหลอมรวมเซลล์นับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนมากกว่า  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์มัยอ์โลมาไปปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับ เซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

#### 3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

เตรียมได้จากนำหนูทดลองที่เลือก (ข้อ 3.4.2) แล้วว่าสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC ทำการสลบหนูโดยใช้ไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้ต่อไป ทำการเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธีปลอดเชื้อ ใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บน ตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด เมื่อได้ เซลล์ม้ามแล้วนำไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วจึงเติม อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอ์โลมาที่เตรียมไว้

#### 3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์ของม้ามหนูจากข้อ 3.4.3.2 มารวมกับเซลล์มัยอ์โลมาจากข้อ 3.4.3.1 ใน อัตราส่วน 1:3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆ ก่อนหยด โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ที่มี มวลโมเลกุล 3000-3700 คาลตัน ความเข้มข้น 50% (v/v) ที่เป็นสารช่วยหลอมเซลล์ลงไปพร้อมการ หมุนหลอดซ้ำๆ ความคุมการหยด PEG (มวลโมเลกุล 3000 ถึง 3700 คาลตัน) ให้หมดภายใน 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร คูดขึ้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทำเช่นนี้ 2 ครั้งเพื่อเพื่อล้าง PEG ออกจากเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นเปิดเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 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 เติมนมผงปราศจากไขมัน (skim milk) เข้มข้น 5% (w/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำแอนติบอดีทุติยภูมิ 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 เติมน้ำสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย OPD และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ละลายในฟอสเฟตซิเตรตบัฟเฟอร์ (phosphate citrate buffer) pH 5.0 ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกรดซัลฟิวริก (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 ที่ผ่านการเติมนมผงปราศจากไขมันและล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ (หรือซีรัมหนู) จากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกราก (ข้อ 3.4.3.4.1) ลงไปผสมกับสารละลาย TC นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติม TC อิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่เติม TC อิสระ แสดงว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุม

ดังกล่าวมีแอนติบอดีที่สามารถจับกับ TC ในรูปอิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาแยกให้ได้โคลนเดี่ยว โดยวิธี limiting dilution

#### 3.4.3.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเดียวกัน นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระจากการคัดเลือกระดับที่ 2 มาทำให้เป็นโคลนเดี่ยวโดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์เจริญเป็นโคลนเดี่ยวในหลุม นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาว่ายังคงมีแอนติบอดีต่อ TC หรือไม่ ถ้าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีต่อ TC ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ จากนั้นนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

#### 3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บ มาเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FCS เข้มข้น 10% (v/v) ให้อยู่ในช่วงเอกซ์โพเนนเชียลมาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาเก็บเซลล์ที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 10% (v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสติกเจอร์บิลเปิดดูชิ้นลงเบาๆ 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<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, 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 ครั้งเติมสารละลายสับสเตรคที่ประกอบด้วย OPD และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ละลายในฟอสเฟตซีเตรทบัฟเฟอร์ 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 ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่บนหลุม มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า %B/B<sub>0</sub> และแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ และคำนวณค่า LOD ได้จากสูตรเพื่อนำมาเทียบกับกราฟได้เป็นความเข้มข้น

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

เมื่อ B, B<sub>0</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีหรือไม่มีแอนติเจนตามลำดับ  
SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

ความจำเพาะของแอนติบอดีจะรายงานอยู่ในค่าของการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับ สารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่มหรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ทำได้โดย แอนติบอดีที่ความเจือจางที่เหมาะสมมาผสมรวมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$ - $10^4$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในสารละลายกับสาร ที่เคลือบอยู่บนหลุม มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า  $\%B/B_0$  และแกน X เป็นค่าล็อกการิทึมของความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ โดยค่าความเข้มข้น ของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% of inhibition concentration;  $IC_{50}$ ) หาได้จาก การนำค่าที่ 50% ของ  $B/B_0$  มาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้น และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ ได้มาหาค่า  $IC_{50}$  ของสารแต่ละตัวที่ใช้เป็นตัวแข่งขัน

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

### 3.4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี FCS เข้มข้น 10% ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกววนขนาด 1 ลิตร เก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยด้วยโครมาโทกราฟีแบบ สัมพรรคภาพ (affinity chromatography column) โดยใช้โปรตีนจี

#### 3.4.5.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี (Wikströms, 2005)

นำโปรตีนจีเซฟาโรส (Protein G sepharose) 5 มิลลิลิตรที่อยู่ในภาชนะที่มี เอทานอลเข้มข้น 20% (v/v) เปลี่ยนให้อยู่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเตรียมคอลัมน์โปรตีนจีให้เข้าสู่ภาวะสมดุลโดยปรับอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ลงในคอลัมน์ โปรตีนจี ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้ไกลซีน ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (glycine-HCl) pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พร้อมกับเก็บสารละลายที่ ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตรในหลอดที่เก็บที่มีทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) pH 9

เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 65 ไมโครลิตรอยู่เพื่อปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และทำ indirect ELISA เพื่อนำมาวัดเป็นโครมาโตแกรม แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีแอนติบอดีมารวมกัน นำไปทำ dialysis ด้วย PBS ที่มี 0.01% Thimerosal อยู่เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ลิตร ก่อนนำหาปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดีต่อไป

#### 3.4.5.2 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการทำให้ ELISA

หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์และแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของแอนติบอดี นำมาทำ indirect ELISA สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

#### 3.4.5.3 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

##### 3.4.5.4.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

ทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) โดยเตรียม 10% separating gel ที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว (polymerization) อย่างสมบูรณ์ เมื่อเจลแข็งตัวแล้วเทน้ำกลั่นส่วนบนทิ้ง เท 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel และใส่หัว (comb) ที่เป็นแม่พิมพ์หลุมเจล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว (ข้อ ข.6 ภาคผนวก ข)

#### 3.4.5.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัมและมีปริมาตรไม่เกิน 60 ไมโครลิตรต่อหลอดของเจล ผสมกับสารละลายสีย้อมที่มี SDS,  $\beta$ -mercaptoethanol และ bromophenol blue (SDS staining dye) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปเปิดในหลุมเจล (ข้อ ข.6 ภาคผนวก ข)

#### 3.4.5.4.3 การทำอิเล็กโทรโฟเรซิส

ทำการแยกแอนติบอดีโดยนำเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบเข้ากับเครื่องทำอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis chamber) ที่มี SDS ในไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (running buffer) ทั้งส่วนบนและล่างของเครื่อง นำสารละลายตัวอย่างมาเปิดในหลุมเจลไม่เกินหลุมละ 60 ไมโครลิตร ส่วนหลุมของ marker ให้เปิดปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 V เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue (staining solution) เป็นเวลา 15 นาที และล้างในสารละลายของเมธานอลและกรดแอสซิติค (destaining solution) จนกว่าจะเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน (ข้อ ข.6 ภาคผนวก ข)

#### 3.4.5.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความไวด้วยวิธี indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.2

## บทที่ 4

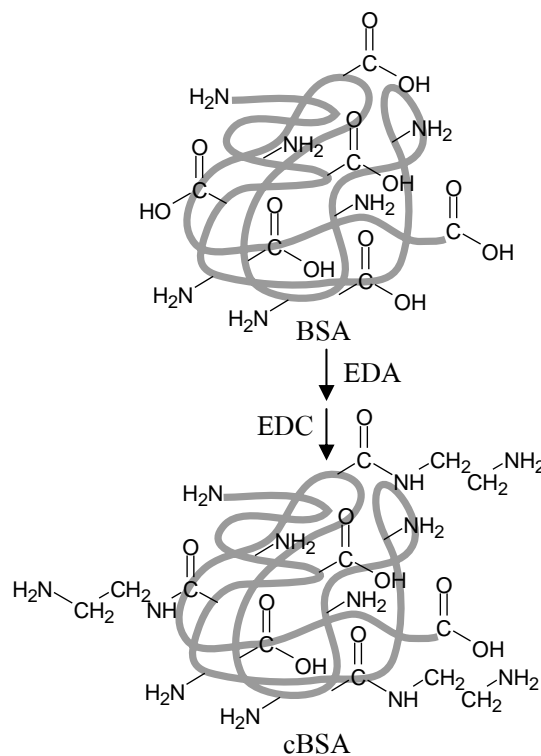
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 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 ได้ความเข้มข้นของโปรตีน 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

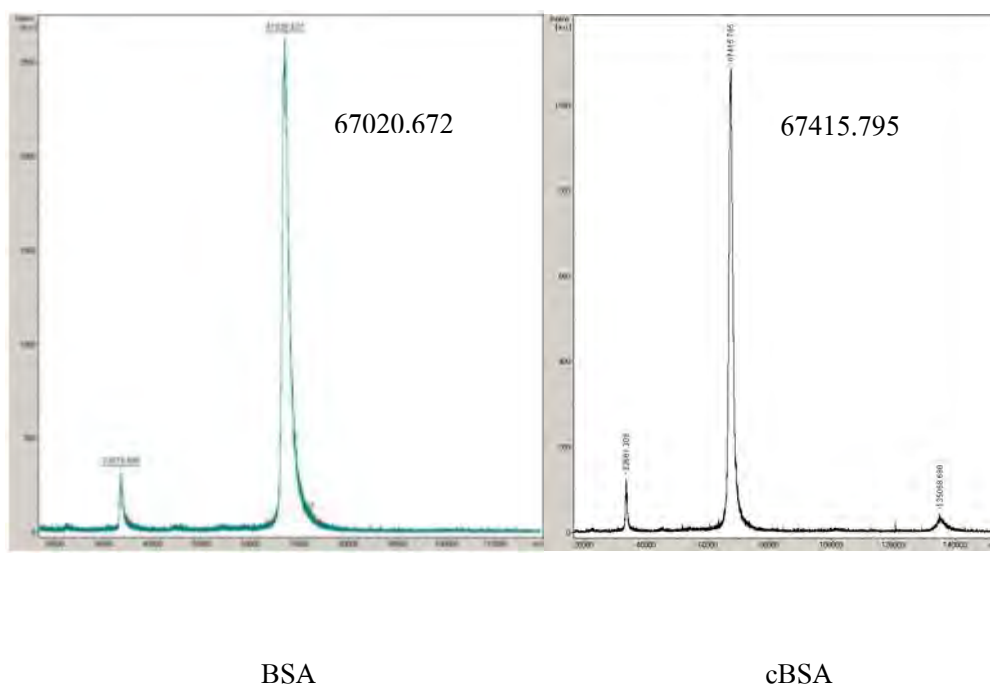
จากการนำโปรตีน cBSA ไปหาโมเลกุลของหมู่เอมีนที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี TNBS โดยสาร TNBS เมื่อจับกับหมู่เอมีนอิสระแล้วจะเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีส้มที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่าหมู่เอมีนบนโมเลกุลของ BSA มีเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 8.06 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2 ผลทดสอบการเพิ่มหมู่เอมีนในโมเลกุลของโปรตีน BSA โดยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A <sub>355</sub> ของโปรตีน BSA	A <sub>355</sub> 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 มีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น นั่นคือ cBSA และใช้เป็นโปรตีนพาหะ ส่งผลให้โอกาสในการเชื่อมติดกับ

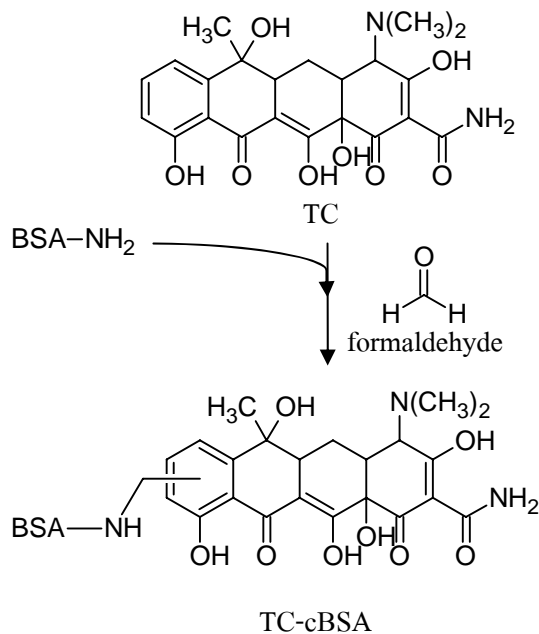
แอปเทนมีมากขึ้น ซึ่งจากรายงานของ Muckerheide และคณะ (1987) พบว่าการใช้ cBSA เป็นโปรตีนพาหะ ช่วยทำให้ประสิทธิภาพของการกระตุ้นในสัตว์ทดลองเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกระตุ้นการแบ่งตัวของที-เซลล์ โดยเฉพาะ  $T_H$  ได้ไวกว่าโปรตีนในรูปแบบเดิม (native form)



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมของมวลโมเลกุลของโปรตีน BSA และ cBSA โดยวิธี MALDI-TOF MS

#### 4.1.2 ผลการเตรียม TC เชื่อมกับ cBSA

จากการเตรียมแอนติเจนที่จะนำมาฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนู โดยทำการเชื่อมต่อ TC กับโปรตีนพาหะ cBSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich ซึ่งจะมีการเติมฟอร์มัลดีไฮด์ทำให้เกิดปฏิกิริยาควมแน่นระหว่างหมู่เอมีนของโปรตีนพาหะกับวงฟีนอลของ TC โดยจะเกิดตัวเชื่อมเมทิลลีนขึ้นระหว่างสองโมเลกุล (รูปที่ 4.3) นำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรที่ความเจือจางต่างๆ เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ cBSA (ตารางที่ ก.2 และรูปที่ ก.2, ภาคผนวก ก) 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

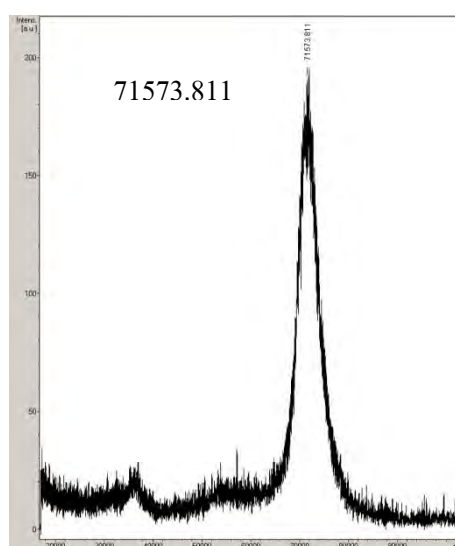
ค่าความเจือจาง	A <sub>562</sub>	ความเข้มข้นของ โปรตีน (mg/ml)
1:5	0.537	2.45
1:10	0.299	2.73
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		2.59

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

ความเข้มข้น โปรตีน (mg/ml)	A <sub>355</sub> ของ cBSA	A <sub>355</sub> ของ TC-cBSA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อม ติด
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 จากโครมาโตแกรมที่ได้พบว่าโปรตีน cBSA มีมวลโมเลกุล 67415.80 ดาลตัน (จากรูป 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 ในขณะที่ผลของการเชื่อม 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

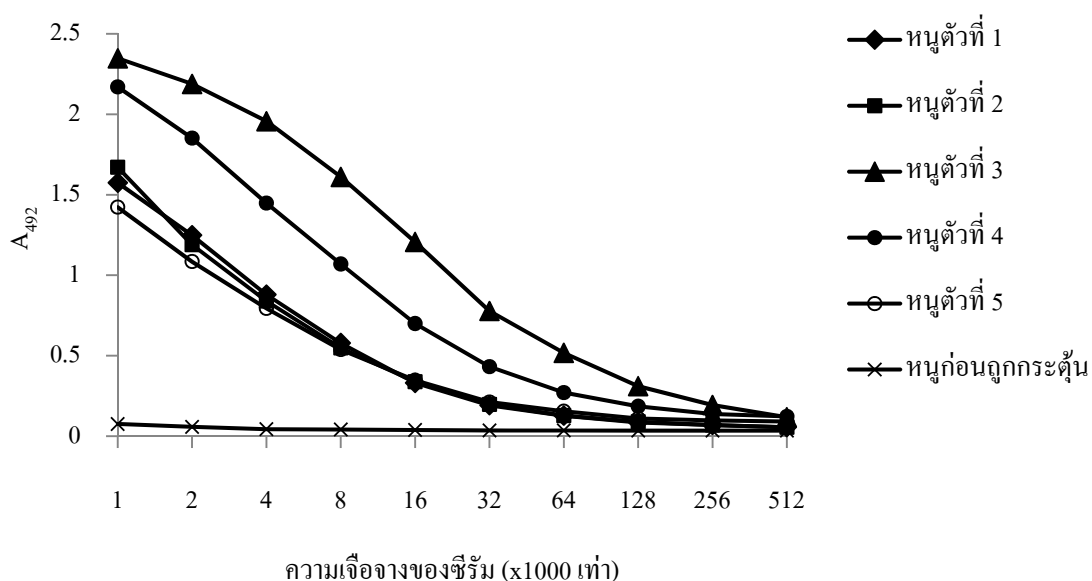
รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมของมวลโมเลกุลของ TC-cBSA โดยวิธี MALDI-TOF MS

#### 4.2 ผลการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ TC

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

#### 4.2.1 การหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น

จากการทดสอบหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.5 โดยเลือกระดับแอนติบอดีคือความเจือจางของซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC-cBSA โดยมีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 1:64000, 1: 64000, 1:512000, 1:256000 และ 1:64000 ตามลำดับ



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

ตารางที่ 4.5 การทดสอบระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA จำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA

ความเจือจาง ของซีรัม	A <sub>492</sub>					
	ซีรัมหนู ก่อนถูก กระตุ้น	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

#### 4.2.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ

จากการทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.6 พบว่าแอนติบอดีจากหนูทั้ง 5 ตัวสามารถจับกับ TC ในรูปอิสระได้ เนื่องจากเมื่อมี TC เป็นตัวแข่งขันค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของการทำ competitive ELISA ลดลงเมื่อเทียบกับค่าที่ไม่มีสารอิสระลงไป โดยจะมีค่าลดลงเป็น 68.0-91.4 เปอร์เซ็นต์ และแอนติบอดีจากหนูทั้ง 5 ตัวไม่จำเพาะต่อส่วนของ BSA เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อใช้ BSA เป็นแอนติเจนแข่งจับ

ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนอิสระของซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับ การฉีดกระตุ้นด้วย TC-cBSA

ซีรัม	ความเจือจาง	A <sub>492</sub>			%A <sub>492</sub> ที่ลดลง เมื่อเติม 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 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกรหัสไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นกับเซลล์มะเร็ง NSI ทั้งหมด 5 ครั้ง หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ ตรวจสอบเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพบเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะเป็นโคโลนีขนาดเล็กในหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่พบไฮบริโดมาทำการคัดกรองโดยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA (ตารางที่ ก.3 ภาคผนวก ก) ได้ผลดังตารางที่ 4.7 ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 5 ครั้งทำให้ได้ไฮบริโดมาเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC อิสระทั้งหมด 3 หลุม นำแต่ละหลุมมาทำการแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาจากต้นกำเนิดเดียวกันและยังคงสร้างแอนติบอดีต่อ TC อิสระอยู่ โดยตั้งเป็นรหัสจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1,4 และ 5 คือ 7-4C, 12-3F และ 5-9H ตามลำดับ ต่อมาจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการตรวจสอบลักษณะสมบัติต่อไป ส่วนผลจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ไม่พบเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ TC อาจเนื่องมาจากการที่ได้จำนวนเซลล์ไฮบริโดมาน้อย จึงส่งผลให้โอกาสที่จะได้เซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการมีน้อยตามไปด้วย และผลจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 พบเซลล์ไฮบริโดมา 2 หลุมที่สามารถผลิตบอดีต่อแอนติเจนในรูปแบบที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะที่เคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA แต่ไม่สามารถจับกับ TC อิสระในการคัดเลือกรหัสที่ 2 ได้ จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 4.7 ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 5 ครั้ง

ครั้งที่	ระดับ หนูตัว ที่	ระดับ		เซลล์ ไฮบริ โคมาที่ เจริญ	จำนวนหลุมที่ ผลิต แอนติบอดี	จำนวนหลุมที่ผลิต แอนติบอดีต่อสาร อิสระ TC	รหัส โคลนที่ ได้
		แอนติบอดี ในซีรัม ก่อนการ หลอมรวม	จำนวน หลุมตั้งตั้ง ต้น				
1	1	1:64000	1152	461	1	1	7-4C
2	2	1:64000	1152	29	0	0	-
3	3	1:512000	1152	393	2	0	-
4	4	1:256000	1152	468	1	1	12-3F
5	5	1:64000	1152	760	1	1	5-9H

#### 4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

##### 4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนโดยวิธี indirect ELISA antigen capture โดยใช้แอนติบอดีมาตรฐาน IgG<sub>3</sub> เป็นตัวควบคุม (ตารางที่ 4.8) พบว่าโคลน 7-4C และ 5-9H มีไอโซไทป์ IgG<sub>1</sub> และโคลน 12-3F มีไอโซไทป์ IgG<sub>2a</sub>

ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

รหัสโคลน	A <sub>492</sub>					
	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	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



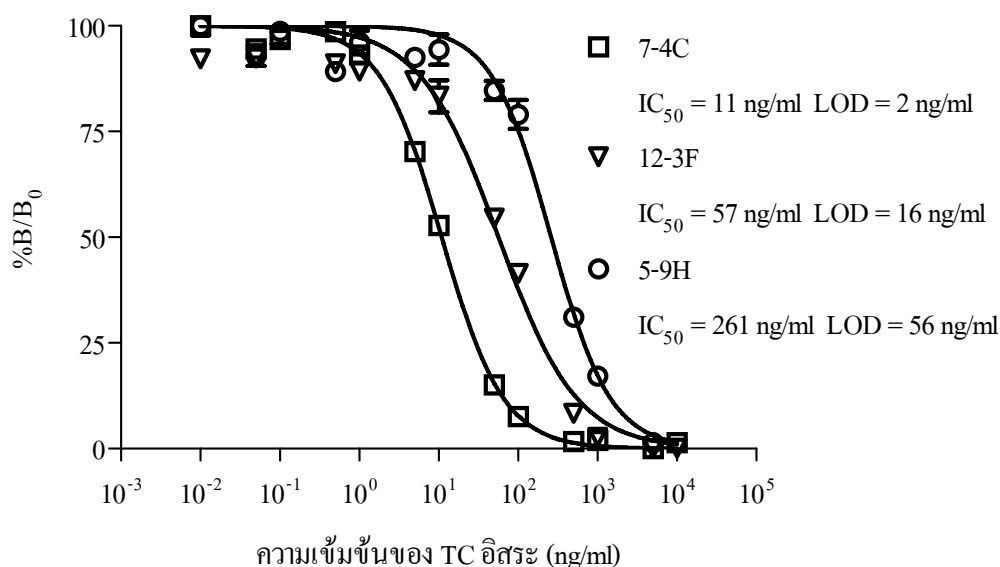
#### 4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ

การหาความเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการนำไปทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TC โดยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.9 เลือกความเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 ได้ความเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H คือ 1:20, 1:800 และ 1:10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 ค่าความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ที่เหมาะสมโดยวิธี

indirect ELISA					
ความเจือจางของ		ความเจือจางของ		ความเจือจางของ	
7-4C	$A_{492}$	12-3F	$A_{492}$	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 (ตารางที่ ก.4 ภาคผนวก ก) 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)

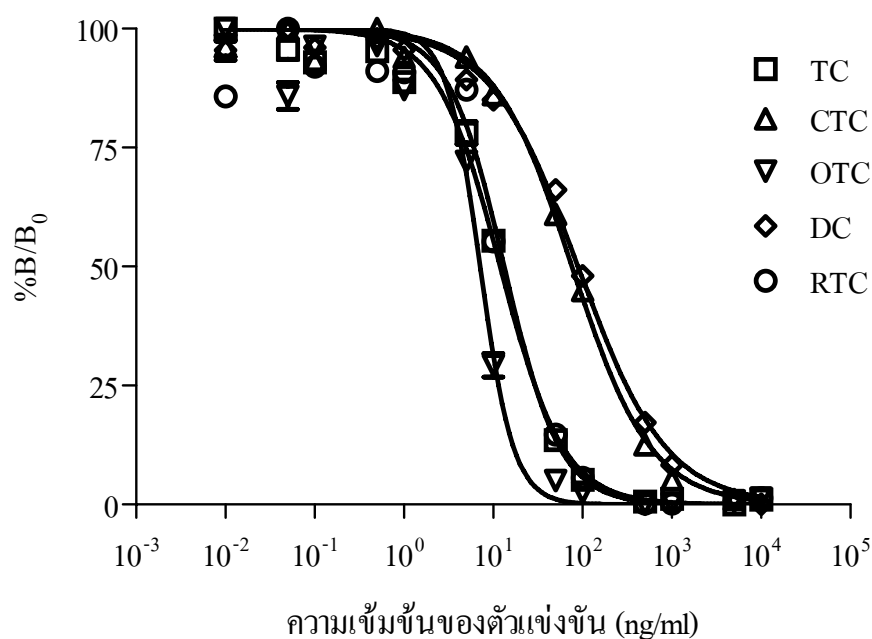


รูปที่ 4.6 การหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ต่อ TC โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H เจือจาง 1:20, 1:800 และ 1:10 ตามลำดับ แข่งขันกับ TC อิสระ  $10^{-3}$ -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

#### 4.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC

ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากทั้ง 3 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs ได้แก่ OTC, CTC, DC และ RTC และสารนอกกลุ่ม TCs จำนวนโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4 ได้ผลดังรูปที่ 4.7, 4.8 และ 4.9 (ตารางที่ ก.4, ก.6, ก.8 และ ก.8 ภาคผนวก ก) และตารางที่ 4.10, 4.11 และ 4.12 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 TCs แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะกับสารในกลุ่ม TCs สูง คาดว่าเนื่องจากสารในกลุ่ม TCs มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Pastor-Navarro และคณะ (2007) ซึ่งได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs ทุกตัว โดยเฉพาะ RTC มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และในงานวิจัย

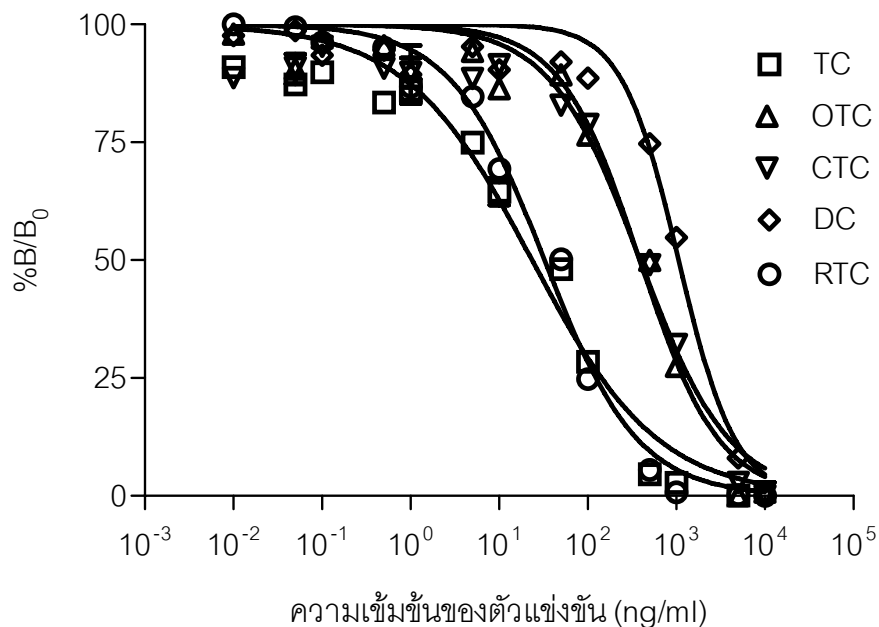
ของ Zheng และคณะ (2007) ได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ CTC ถึง 112 เปอร์เซ็นต์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้คาดว่าสามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี ELISA ได้ แต่ไม่สามารถใช้ตรวจแบบจำเพาะเฉพาะ TC ได้ ดังนั้นจึงเลือกแอนติบอดีที่ได้จากโคลนรหัส 7-4C มีความไวมากที่สุด และมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่าค่า MRL ของ TC ที่ต่ำที่สุดที่ถูกกำหนดไว้คือ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ศึกษาต่อไป



รูปที่ 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 อีสาระ ที่มีความเข้มข้น 10<sup>-3</sup>-10<sup>4</sup> นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.10 ค่า  $IC_{50}$  และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมนิโคลนอลแอนติบอดี 7-4C ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่ม โดยวิธี indirect competitive ELISA

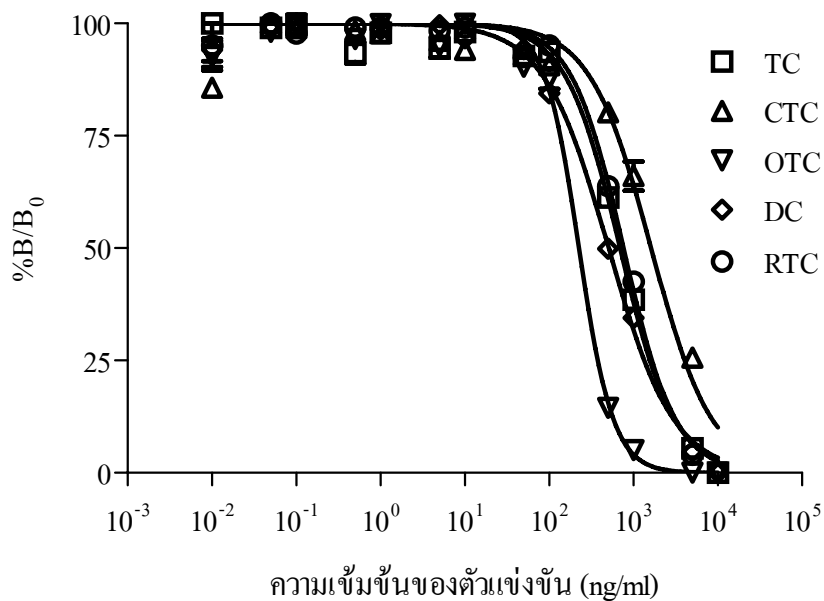
	ตัวแข่งขัน	$IC_{50}$ (ng/ml)	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม
TCs	Tetracycline (TC)	12	100
	Oxytetracycline (OTC)	76	16
	Chlortetracycline (CTC)	7	168
	Doxycycline (DC)	89	13
	Rolitetracycline (RTC)	13	90
Antibiotics	Norfloxacin	>10000	<0.01
	Enrofloxacin	>10000	<0.01
	Streptomycin	>10000	<0.01
	Kanamycin	>10000	<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	
$\beta$ -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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 12-3F เจือจาง 1:1600 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10<sup>-3</sup>-10<sup>4</sup> นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.11 ค่า IC<sub>50</sub> และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 12-3F ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่ม โดยวิธี indirect competitive ELISA

	ตัวแข่งขัน	IC <sub>50</sub> (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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 5-9H เจือจาง 1:10 แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มีความเข้มข้น 10<sup>-3</sup>-10<sup>4</sup> นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.12 ค่า IC<sub>50</sub> และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมนิโคลนอลแอนติบอดี 5-9H ต่อสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่ม โดยวิธี indirect competitive ELISA

	ตัวแข่งขัน	IC <sub>50</sub> (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



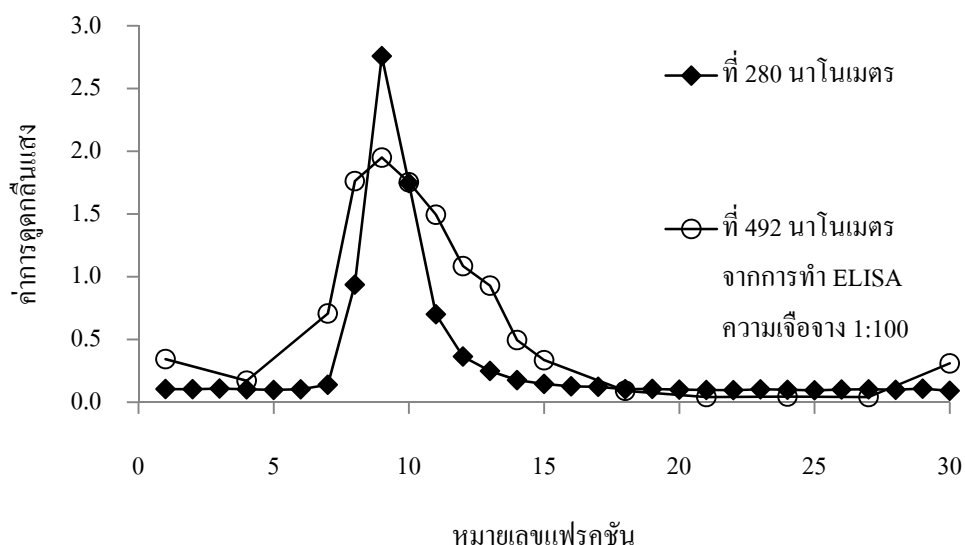
ตารางที่ 4.13 ผลสรุปการหาไอโซไทป์ การศึกษาความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สิ่งที่ตรวจ		7-4C	12-3F	5-9H
ไอโซไทป์		IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>1</sub>
IC <sub>50</sub> (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

#### 4.5 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

##### 4.5.1 ผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ของโคลน 7-4C มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบสมรรถภาพ (affinity chromatography) ซึ่งมีโปรตีนจีเซฟารอส (Protein G sepharose) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 7-4C มีไอโซไทป์เป็น IgG<sub>1</sub> ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีนจี แอนติบอดีจึงสามารถจับกับโปรตีนจีที่อยู่ในคอลัมน์ได้ และถูกชะออกมาโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH 2.7 นำแต่ละแฟรคชัน (fraction) ที่เก็บได้ไปตรวจหาโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบการมีแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ความเจือจางของแต่ละแฟรคชันเท่ากับ 1:100 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร (ตารางที่ ก.9 ภาคผนวก ก) ได้ผลดังรูปที่ 4.10 พบว่าในแฟรคชันที่ 8-13 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 492 นาโนเมตรสูง ซึ่งแสดงว่าเป็นช่วงที่แอนติบอดีถูกชะออกมา จึงนำแฟรคชันเหล่านั้นมารวมกันและนำไปทำการไดอะไลซิสเพื่อขจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะออก และทำให้แอนติบอดีอยู่ใน PBS pH 7.4



รูปที่ 4.10 โครมาโตแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร อะนติบอดีด้วยกลอสินไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 30 แฟรคชัน แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร

#### 4.5.2 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์

นำแอนติบอดีที่ได้และอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA (ตารางที่ ก.10, ก.11 และ ก.12 และรูปที่ ก.3 ภาคผนวก ก) พบว่าแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นของโปรตีน 1.38 และ 4.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ หาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติบอดีที่สร้างจากแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์และทราบความเข้มข้นแล้ว (ตารางที่ ก.13, ก.14 และ ก.15 และรูปที่ ก.4 ภาคผนวก ก) พบว่ามีความเข้มข้นของแอนติบอดี 1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นของแอนติบอดี 45.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

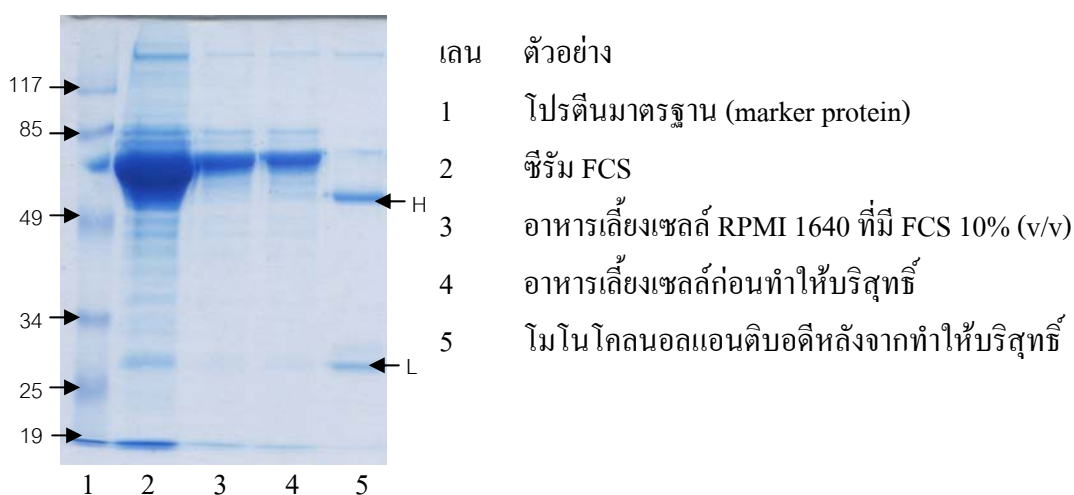
นำค่าปริมาณของโปรตีนและแอนติบอดีที่ได้มาคำนวณหา %recovery พบว่าเท่ากับ 56.9 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเป็นค่าความบริสุทธิ์ (%purity) ของแอนติบอดีในโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 93.1 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ให้บริสุทธิ์

การทำให้ บริสุทธิ์	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA		ปริมาณแอนติบอดีด้วย วิธี ELISA		%recovery	%purity
		ความเข้มข้น	รวม	ความเข้มข้น	รวม		
		(mg/ml)	(mg)	( $\mu$ g/ml)	(mg)		
ก่อน	600	4.26	2557.8	45.14	21.71	-	1.06
หลัง	12	1.38	16.54	1284.87	15.42	56.9	93.3

#### 4.5.3 ผลการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์

หามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 7-4C หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 4.11) เมื่อเปรียบเทียบค่า relative mobility ( $R_r$ ) จากอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่โปรตีนตัวอย่างเคลื่อนที่กับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (marker protein) ที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของสายพอลิเพปไทด์ของแอนติบอดีได้ดังตารางที่ 4.15 พบว่าเมื่อทำให้แอนติบอดีผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แลบโปรตีนที่ได้จะลดน้อยลงเหลือเพียงสองแลบของแอนติบอดี คือ แลบของโปรตีนสายยาว (heavy chain) และโปรตีนสายสั้น (light chain) ซึ่งเมื่อนำไปเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ก.5 ภาคผนวก ก) พบว่ามีมวลโมเลกุล 62.6 และ 26.9 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่กล่าวว่ามีมวลโมเลกุลของโปรตีนสายยาวและสายสั้นของ IgG มีค่าประมาณ 55 และ 25 กิโลดาลตัน (Harlow และ Lane, 1988) ส่วนแถบจางๆของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 78.3 กิโลดาลตัน ที่ปรากฏนอกเหนือจากแลบของโปรตีนสายยาวและสายสั้นคาดว่าเป็นแลบของโปรตีนจากสารละลายซีรัม FCS ที่ปนเปื้อนจากหลอดข้างเคียง ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีแถบที่เข้มมากในเลนที่ 2-4 ของรูปเจล



รูปที่ 4.11 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ตารางที่ 4.15 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีน	มวลโมเลกุล (kDa)	Relative mobility
$\beta$ -galactocidase	117	0.18
BSA	85	0.27
OVA	49	0.49
Carbonic anhydrase	34	0.27
$\beta$ -lactoglobulin	25	0.18
Lysozyme	19	1.00
Heavy chain	62.6	0.43
Light chain	29.9	0.82
Unknown	78.3	0.32

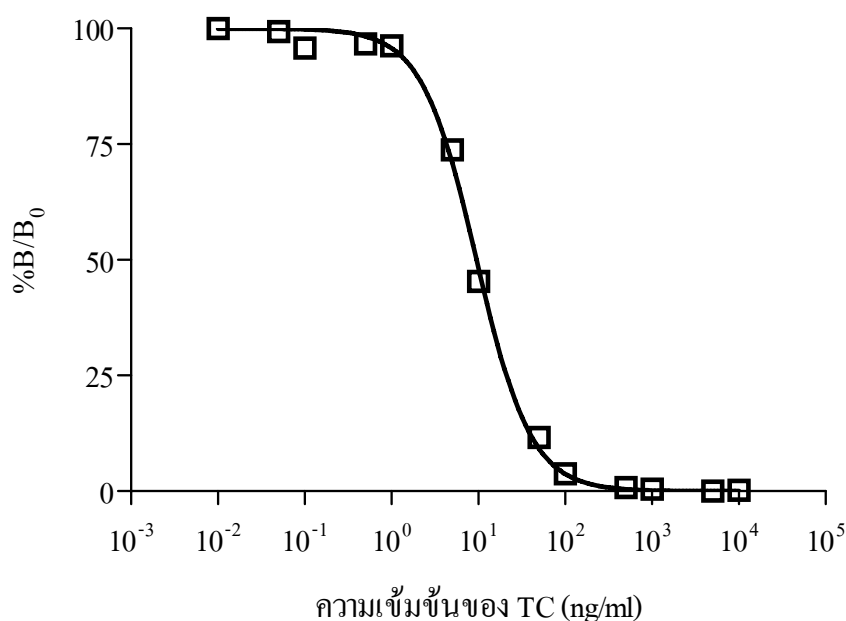
#### 4.5.4 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วกับ TC-OVA ที่ใช้เคลือบกันหลุมของจาน ELISA ด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.16 เลือกความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับ TC-OVA คือ 1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ตารางที่ 4.16 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและ TC-OVA ที่ใช้เคลือบกันหลุมของจาน ELISA โดยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี ( $\mu\text{g/ml}$ )	แอนติเจน TC-OVA ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0.125	0.25	0.5	1	2
0.25	0.057	0.050	0.270	0.591	0.893
0.5	0.049	0.050	0.345	0.855	1.314
1	0.067	0.055	0.508	1.101	1.587
2	0.055	0.054	0.701	1.376	1.790
4	0.062	0.065	0.905	1.567	1.986
8	0.070	0.086	1.116	1.735	2.091

นำแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการทดสอบความไวต่อ TC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังรูปที่ 4.12 (ตารางที่ ก.16 ภาคผนวก ก) พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  เป็น 9.55 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า LOD เป็น 2.67 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ



รูปที่ 4.12 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ต่อ TC หลังทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แข่งขันกับ TC, OTC, CTC, DC และ RTC อิสระ ที่มี ความเข้มข้น  $10^{-3}$ - $10^4$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เปรียบเทียบความไวของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ต่อ TC ระหว่างก่อนและหลัง การทำให้บริสุทธิ์ ได้ผลดังตารางที่ 4.17 พบว่าความไวต่อ TC ในรูปอิสระมีค่าใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบความไวของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ต่อ TC ระหว่างก่อนและหลัง การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect competitive ELISA

แอนติบอดี	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	LOD (ng/ml)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	11	2
หลังทำให้บริสุทธิ์	10	3

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีที่ได้จากโคลน 7-4C มีความจำเพาะต่อ TC และให้ค่าปริมาณของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ต่ำกว่าค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ที่ประกาศโดยกระทรวงสาธารณสุข คือ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ TC โดยวิธี ELISA ต่อไปได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

ทำการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง โดยเชื่อม TC เข้ากับโปรตีนพาหะ cBSA ที่เตรียมได้จากการเพิ่มหมู่เอมีนบนโปรตีน BSA พบว่ามีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น 8.06 เปอร์เซ็นต์เมื่อวัดโดยวิธี TNBS และ เมื่อเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลจากก่อนและหลังการเพิ่มหมู่เอมีนโดยเทคนิค MADI-TOF MS พบว่าโปรตีน cBSA ที่ได้มีมวลโมเลกุล 67415.795 คาลตัน เพิ่มขึ้น 395.13 คาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีน BSA พบว่ามีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น 24 โมเลกุลในโปรตีนแต่ละโมเลกุล จากการเชื่อม TC กับ cBSA โดยปฏิกิริยา Mannich ได้เป็น TC-cBSA พบว่ามีการใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมติดคิดเป็น 24.42 เปอร์เซ็นต์ และจากการเปรียบเทียบมวลโมเลกุลจากการใช้เทคนิค MADI-TOF MS พบว่าแอนติเจน TC-cBSA ที่ได้มีมวลโมเลกุล 71573.811 สามารถคำนวณได้ว่าโปรตีน cBSA แต่ละโมเลกุลจะมีการเชื่อมติดของ TC ถึง 9 โมเลกุล จากนั้นจึงทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองทั้ง 5 ตัวด้วย TC-cBSA พบว่าซีรัมของหนูทดลองมีระดับแอนติบอดี 1:64000-1:512000 และสามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับ TC ในรูปอิสระได้ทุกตัว หลังจากหลอมรวมเซลล์ม้ามหนูกับเซลล์ไมอีโลมา NSI ทั้งหมด 5 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ TC จำนวน 3 โคลน คือ โคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H ซึ่งมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1, 4 และ 5 ตามลำดับ หลังจากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 3 โคลน พบว่าแอนติบอดีจากโคลน 7-4C และ 5-9H มีไอโซไทป์ IgG<sub>1</sub> และ 12-3F มีไอโซไทป์ IgG<sub>2a</sub> เมื่อทดสอบความไวต่อ TC ในรูปอิสระและการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs และสารนอกกลุ่ม TCs พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 7-4C มีความไวต่อ TC ในรูปอิสระมากที่สุดโดยมีค่า IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> และ LOD เท่ากับ 261 และ 56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs มากไปน้อยดังนี้ CTC, DC, RTC และ OTC โดยมีค่า 307, 148, 90 และ 43 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร



นอกกลุ่ม TCs (ปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงเลือกแอนติบอดีที่มีความไวมากที่สุดคือจากโคลน 7-4C มีทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีเซฟาโรสคอลัมน์ ได้แอนติบอดีที่บริสุทธิ์ขึ้น 93.7 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของแอนติบอดีโดยการทำให้ SDS-PAGE พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์มาก และพบว่ามวลโมเลกุลของแอนติบอดีสายยาวและสายสั้นมีขนาด 62.8 และ 27.1 กิโลดาลตันตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความไวต่อ TC ในรูปอิสระของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าความไวไม่ต่างจากเดิมคือ  $IC_{50}$  และ LOD เป็น 9.55 และ 2.67 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสามารถตรวจวัดสาร TC ในรูปอิสระได้ต่ำกว่าค่าปริมาณยาสัตว์ตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ที่ประกาศโดยกระทรวงสาธารณสุข คือ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-4C มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสารในกลุ่ม TCs ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาในอนาคตต่อไปได้

#### ข้อเสนอแนะ

จากค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA พบว่าเมื่อนำไปเทียบกับชุดตรวจสอบ ELISA สำเร็จรูปที่ออกจำหน่ายโดยต่างประเทศ ได้แก่ MaxSignal™ Tetracycline ELISA Tase Kit ที่สามารถตรวจ TC ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าแอนติบอดีจากงานวิจัยนี้มีค่าความไวที่สูงกว่าโดยในอนาคตอาจเพิ่มความไว และความสะดวกในการใช้ชุดตรวจสอบ โดยการเปลี่ยนรูปแบบเป็น direct competitive ELISA ที่เป็นรูปแบบที่นิยมใช้ทั่วไปซึ่งอาจเชื่อมแอนติบอดีกับเอนไซม์ HRP การเพิ่มสัญญาณให้แอนติบอดีโดยเชื่อมแอนติบอดีกับไบโอติน หรือพัฒนาเป็นแถบตรวจวัด (test strip) ต่อไป

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. 2545 พระราชบัญญัติอาหารสัตว์ ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนด ชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะ คุณภาพและมาตรฐานของอาหารสัตว์ พ.ศ. 2545 [online]. แหล่งที่มา: [http://www.nsr.u.ac.th/e-learning/animal/lesson9\\_7.php](http://www.nsr.u.ac.th/e-learning/animal/lesson9_7.php) [19 มิถุนายน 2551]
- ดานิส ทวีดิยานนท์ และทัศนีย์ ล้อชัยเวช. 2539 การศึกษาปริมาณสารตกค้างกลุ่ม Tetracyclines ในเนื้อไก่และตับไก่ [online]. แหล่งที่มา: <http://elib.fda.moph.go.th/library/ref/AnimalMedic.htm>[5 กันยายน 2551]
- ธารารัตต์ ธารากุล. 2545. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน. กรุงเทพมหานคร: บางกอกบลู๊ค.
- ปริญญา มาสวัสดิ์. 2550. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินที่ตกค้างในนมโดยวิธี On-line SPE-FIA. LAB.TODAY 6 (สิงหาคม): 41-48.
- ปศุสัตว์, กรม. 2550 สรุปมูลค่าการนำเข้า/ส่งออกสินค้าปศุสัตว์ ประจำปี 2550 [online]. แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th/ict/yearly/yearly50/imex/imex1.xls>[3 กันยายน 2551]
- แพรวพรรณ ห้องทองแดง, ครุณี กอเซาะ และ มนวิภา จารุตามระ. 2548. การพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดยาในอาหารสัตว์ ยาสัตว์ Tetra Test Kit. ธุรกิจอาหารสัตว์ 100 (22): 50-61.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- วารุณี เสนสุภา และปราณี เกียรติสุระยานนท์. 2543 การพัฒนามาตรการในการควบคุม การผลิตนำเข้า และส่งออก: ข้อกำหนดทางกฎหมายอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [online]. แหล่งที่มา: <http://elib.fda.moph.go.th/library/ref/AnimalMedic.htm>[5 กันยายน 2551]
- สาธารณสุข, กระทรวง. 2544 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 231) พ.ศ.2544 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [online]. แหล่งที่มา: <http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntfmoph/ntf231.htm>[20 มกราคม 2550]
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2546. สมุนไพรบำบัดโรคผื่น. สมุนไพรเพื่อสุขภาพ 4 (กันยายน): 41-48.

- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2543 การพัฒนามาตรการในการควบคุมการผลิต นำเข้า และส่งออก: ข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร [online]. แหล่งที่มา: <http://vph.vet.ku.ac.th/CAI/ClinicMeat/GMPandOther.pdf>[2551, September 4]
- สุรจิตติ ภาคอุทัย และกนกวรรณ ศรีงาม. 2547 การวิเคราะห์คุณภาพ และสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ ผึ้ง [online]. แหล่งที่มา: <http://www.thaibeas.com/papers/paper005.php>[2551, September 8]

### ภาษาอังกฤษ

- Aga, D.S.; O'Conner, S.; Ensley, S.; Payero, J.O.; Snow, D.; and Tarkalson, D. 2005. Determination of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assays and liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53: 7165-7171.
- Baynes, R.E. (n.d.) Establishing MRLs or Tolerances for Veterinary Drug and Chemical Residues in Food Animals [online]. Available from: [www.fda.gov/cvm/Documents/Baynes.ppt](http://www.fda.gov/cvm/Documents/Baynes.ppt) [2551, September 5]
- 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.
- De Wasch, K.; Okerman, L.; Croubels, S.; De Brabander, H.; Van Hoof, J.; and De Backer, P. 1998. Detection of residues of tetracycline antibiotic in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests. Analyst 123(12): 2737-2741.
- 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.
- Hermanson, G.T. 1996. Bioconjugate Techniques. San Diego: Academic Press.
- Harlow, E., and Lane, D.P. 1988. Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold spring harbor laboratory.
- Johnstone, A., and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in Practice. London: Blackwell Scientific Publication.

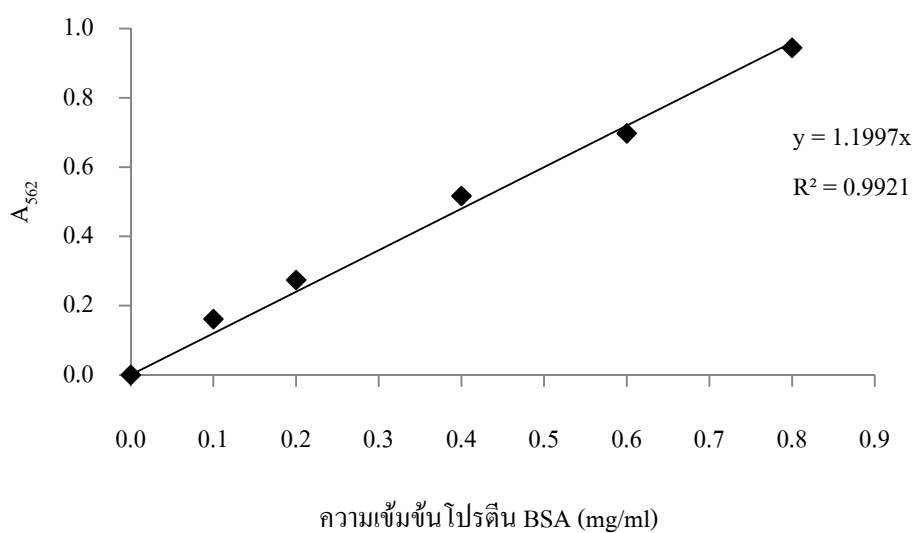
- Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; and Leepipatpiboon, N. 2007. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracycline, and pyrimethamine in milk. Journal of Chromatography A 1140:147-156.
- Kumar, K.; Thompson, A.; Singh, A.K.; Chander, Y.; and Gupta, S.C. 2004. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. Journal of Environmental Quality 33: 250-256.
- 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.
- 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 Chimica 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.
- Wikströms. 2005. Instruction 71-7083-00 AG: Protein G Sepharose 4 Fast Flow. Sweden: Printed matter. (Mimeographed)
- 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.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

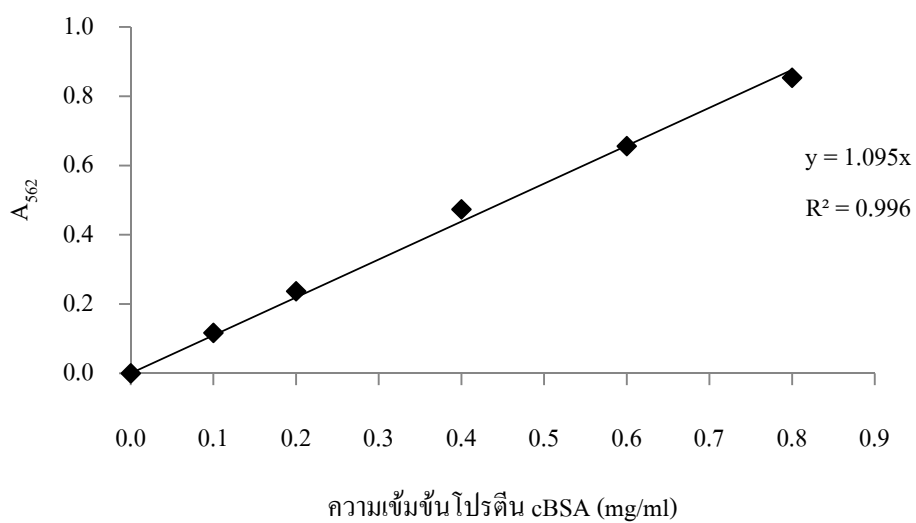
ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	$A_{562}$
0	0
0.1	0.162
0.2	0.274
0.4	0.517
0.6	0.698
0.8	0.945



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน cBSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้น โปรตีน 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 ผลของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

ครั้งที่หลอมรวมเซลล์	โคลน	A <sub>492</sub>	
		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

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

TC (ng/ml)	A <sub>492</sub>		
	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.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน (ng/ml)	A <sub>492</sub>				
	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.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 12-3F กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน (ng/ml)	A <sub>492</sub>				
	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.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 5-9H กับสารในกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตัวแข่งขัน (ng/ml)	$A_{492}$				
	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.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-4C, 12-3F และ 5-9H กับสารนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี indirect competitive ELISA

	ตัวแข่งขัน (10 µg/ml)	A <sub>492</sub>		
		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
β-agonists	3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	1.230	1.416	1.822
	Clenbuterol	1.348	1.449	1.872
	Salbutamol	1.342	1.465	1.818

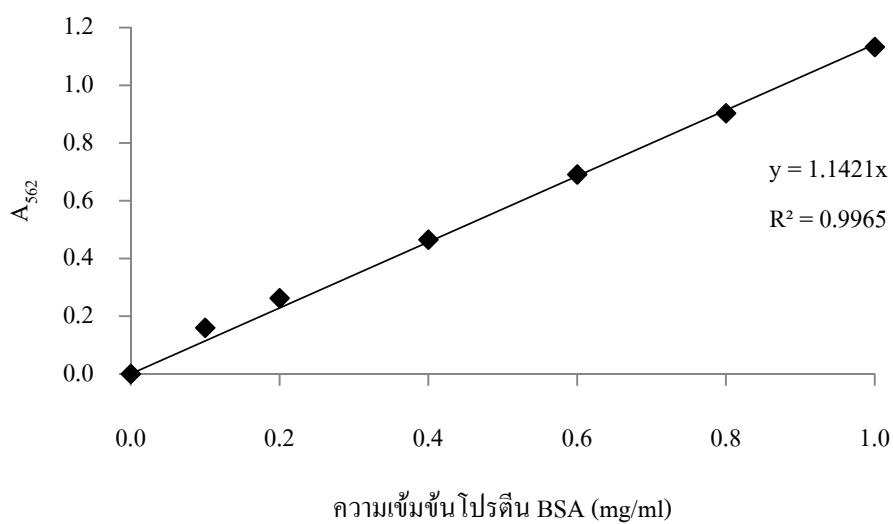
ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 492 นาโนเมตร

หมายเลข fraction	A <sub>280</sub>	A <sub>492</sub>	หมายเลข fraction	A <sub>280</sub>	A <sub>492</sub>
1	0.105	0.344	16	0.127	-
2	0.104	-	17	0.123	-
3	0.109	-	18	0.104	0.091
4	0.103	0.171	19	0.106	-
5	0.098	-	20	0.100	-
6	0.103	-	21	0.098	0.041
7	0.139	0.707	22	0.096	-
8	0.937	1.763	23	0.103	-
9	2.758	1.950	24	0.099	0.045
10	1.747	1.753	25	0.095	-
11	0.701	1.495	26	0.101	-
12	0.364	1.085	27	0.103	0.041
13	0.249	0.929	28	0.099	-
14	0.176	0.496	29	0.108	-
15	0.146	0.335	30	0.091	0.310

หมายเหตุ เครื่องหมาย (-) ไม่ได้นำมาทำ indirect ELISA

ตารางที่ ก.10 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	$A_{562}$
0	0
0.1	0.160
0.2	0.263
0.4	0.465
0.6	0.691
0.8	0.903
1.0	1.133



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.11 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยใช้วิธี BCA

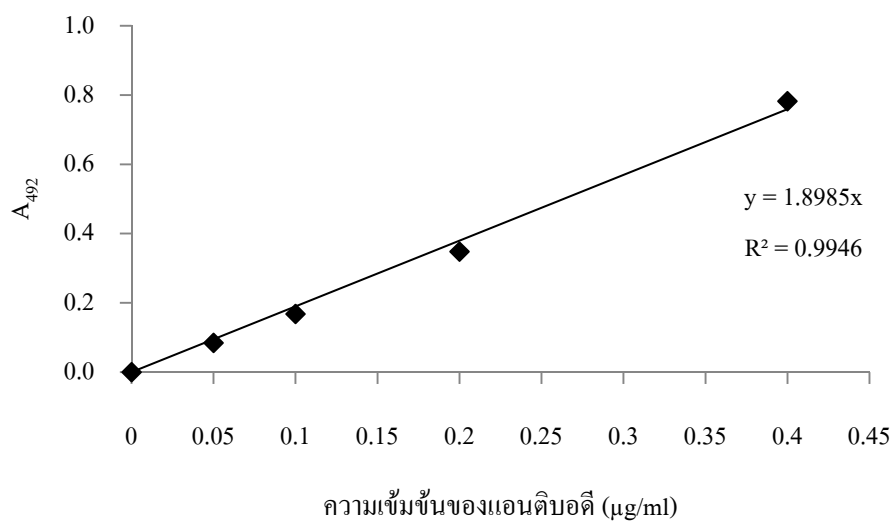
ค่าความเจือจางของแอนติบอดี	$A_{562}$	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	0.085	1.34
1:5	0.340	1.42
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		1.38

ตารางที่ ก.12 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี BCA

ค่าความเจือจางของอาหารเลี้ยง เซลล์	$A_{562}$	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:5	0.920	4.03
1:10	0.494	4.32
1:20	0.254	4.44
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		4.26

ตารางที่ ก.13 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของสารละลายแอนติบอดี โดยวิธี  
indirect ELISA

ความเข้มข้นโปรตีนของแอนติบอดี (ng/ml)	$A_{492}$
0	0
0.05	0.085
0.1	0.168
0.2	0.348
0.4	0.782



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน TC-OVA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-4C ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วความเข้มข้น 0-0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แข่งขันกับ TC อิสระ  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

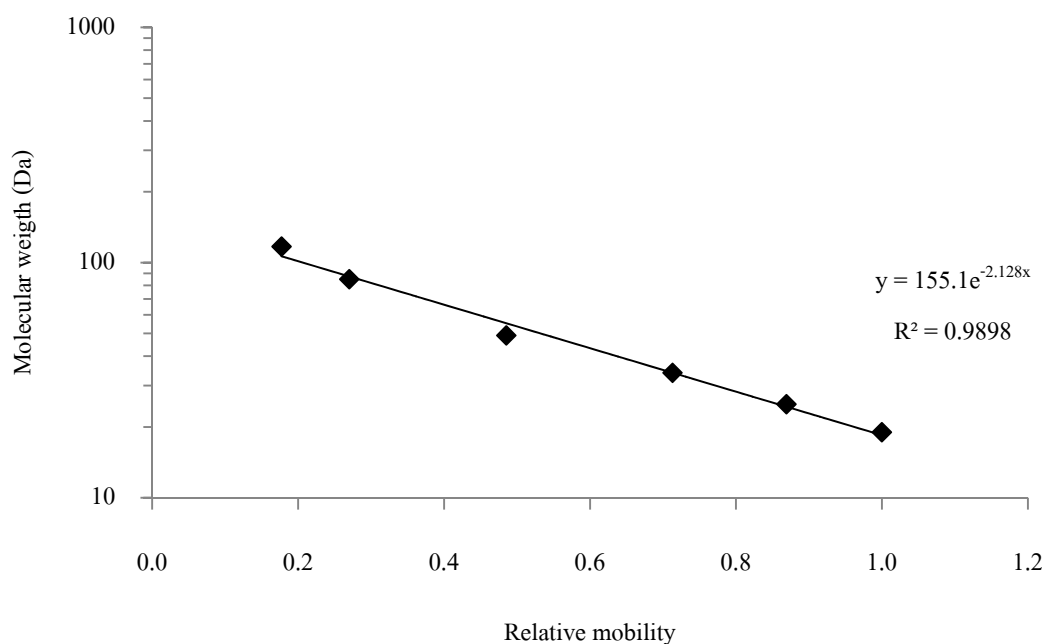
ตารางที่ ก.14 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธี indirect competitive ELISA

ค่าความเจือจางของแอนติบอดี	A <sub>492</sub>	ความเข้มข้นของแอนติบอดี (mg/ml)
1:4000	0.589	1.24
1:8000	0.314	1.32
1:16000	0.154	1.29
ความเข้มข้นแอนติบอดีเฉลี่ย		1.28



ตารางที่ ก.15 ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA

ค่าความเจือจางของอาหารเลี้ยงเซลล์	A <sub>492</sub>	ความเข้มข้นของแอนติบอดี (µg/ml)
1:160	0.553	46.61
1:320	0.310	52.25
1:640	0.109	36.58
ความเข้มข้นแอนติบอดีเฉลี่ย		45.14



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยมีโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่  $\beta$ -galactosidase (MW 117 kDa), BSA (MW 85 kDa), OVA (MW 49 kDa), Carbonic anhydrase (MW 34 kDa),  $\beta$ -lactoglobulin (MW 25 kDa) และ Lysozyme (MW 19 kDa) มีที่มาจาก E.coli, bovine plasma, chicken gee white, bovine erythrocyte, bovine milk และ chicken egg white ตามลำดับ

ตารางที่ ก.16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน7-4C หลังถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect competitive ELISA

TC (ng/ml)	$A_{492}$			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
0	1.150	1.153	1.139	1.147
0.01	1.186	1.193	1.191	1.190
0.05	1.166	1.200	1.184	1.183
0.1	1.167	1.112	1.147	1.142
0.5	1.181	1.153	1.122	1.152
1	1.145	1.140	1.157	1.147
5	0.888	0.875	0.908	0.890
10	0.535	0.592	0.570	0.566
50	0.175	0.183	0.182	0.180
100	0.086	0.092	0.093	0.090
500	0.056	0.057	0.056	0.056
1000	0.047	0.053	0.057	0.052
5000	0.045	0.047	0.050	0.047
10000	0.053	0.052	0.045	0.050

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการเตรียมโปรตีนพาหะ BSA ให้เป็น cBSA

0.1 M Sodiumphosphate buffer pH 7.4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (MW 358.14) 21.94 กรัม

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (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

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  3.18 กรัม

$\text{NaHCO}_3$  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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.6	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	71.63	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MW 141.96)	9.5	กรัม
Citric acid (MW 192.13)	7.3	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 6) Substrate OPD

O-phenylenediamine	40	มิลลิลิตร
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7) 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Stopping reagent)

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	256	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	744	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ 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

หมายเหตุ 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 0 องศาเซลเซียส

## 3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	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	70	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	20	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

## ข.5 การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

## 1) 20 mM Sodium phosphate pH 7.0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.77	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

## 2) 0.1 M glycine-HCl pH 2.7

Glycine-HCL	7.51	กรัม
Conc. HCl	2.42	มิลลิลิตร
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 2.7 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

## 3) 1 M Tris HCl buffer, pH 9.0

Trizma base	121.14	กรัม
Conc. HCl	6.41	มิลลิลิตร
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

## ข.6 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

### 1) 10% Separating gel (1 แผ่น ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	3.836	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	2	มิลลิลิตร
10% SDS	80	ไมโครลิตร
10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	80	ไมโครลิตร
TEMED	40	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน โดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการ polymerization

### 2) 5% Stacking gel (1 แผ่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	1.204	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	250	ไมโครลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	504	ไมโครลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	20	ไมโครลิตร
TEMED	2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน โดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการ polymerization

### 3) SDS staining dye

SDS dye	900	ไมโครลิตร
$\beta$ -mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร

### 4) Running buffer

Trizma base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร



## 5) Staining solution

Coomassie brilliant blue R 250	5	กรัม
95% Ethanol	450	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

## 6) Destaining solution

Methanol	250	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	680	มิลลิลิตร

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ เกิดเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549 เสนอผลงานเรื่องการผลิตและลักษณะสมบัติของ โมนาโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อวันที่ 14-15 มีนาคม 2551