การผลิตและการหาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน

นายภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CIPROFLOXACIN

Mr. Parkpoom Nuntanidvorakul

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 2011
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการหาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน
โดย	นายภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์)

ภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล : การผลิตและการหาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CIPROFLOXACIN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร, 92 หน้า.

ยาปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) เป็นสารปฏิชีวนะสังเคราะห์ในกลุ่มของฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ซึ่งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาให้ใช้ในการรักษาอาการติดเชื้ออันเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียทั้งในคนและสัตว์ อย่างไรก็ตามได้มีรายงานเป็นจำนวนมากแสดงถึงการตกค้างของซิโพรฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ซึ่งส่งผลต่อมนุษย์ ดังนั้นสหภาพยุโรป และประเทศไทยจึงได้มีการกำหนดค่าสารตกค้างสูงสุด (MRL) ในผลิตภัณฑ์จากกล้ามเนื้อ และตับ ในโค และสุกรไว้ที่ 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในเรื่องการผลิตและการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต่อไป โดยได้ทำการเชื่อมต่อซิโพรฟลอกซาซินกับ อัลบูมินจากซีรัมของวัวและใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c และ ICR โดยหนูทดลองทุกตัวตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน และมีระดับแอนติบอดี 1:8000 ถึง 1:2048000 เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน จึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยอีโลมา P3X พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน จำนวน 4 โคลน คือ 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 และ 11-5A1 จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าเป็นไอโซไทป์ชนิด IgG_1 ทั้ง 4 โคลน มีความไวในรูปของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 63, 37, 45 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.97 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 4 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 มีความไวสูงที่สุดและเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นในกลุ่มควิโนโลน ที่ทำการทดสอบต่ำกว่า 0.5% และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ทำการทดสอบ ดังนั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 ที่ได้นี้จึงเหมาะสมในการนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบโดยอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับตรวจวัดซิโพรฟลอกซาซินต่อไป

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5272476523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : CIPROFLOXACIN / FLUOROQUINOLONE / MONOCLONAL ANTIBODY

PARKPOOM NUNTANIDVORAKUL : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CIPROFLOXACIN. ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO-ADVISORS : NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., 92 pp.

Ciprofloxacin is a synthetic fluoroquinolone antibiotic approved by the U.S. FDA to treat a variety of infections in both human and animals. However, many research reported that ciprofloxacin residues in the animal products cause adverse effects on human. Thus, The European Union (EU) and Thailand have regulated its maximum residue level (MRL) in muscle and liver products of both bovine and porcine at 100 µg/kg and 200 µg/kg, respectively. This research concentrated on the production and characterization of monoclonal antibodies against ciprofloxacin for the development of ELISA test kit. Cirpofloxacin was conjugated to bovine serum albumin and then used as an antigen to immunize BALB/c and ICR mice. Antisera from all mice gave high antiserum titers ranged from 1:8000 to 1:2048000. To produce monoclonal antibodies, fusions of splenocytes and P3X myeloma cells were performed yielding four monoclones, 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 and 11-5A1. Characterization of monoclonal antibodies showed that the isotype of all clones was IgG_1. Their sensitivities calculated as the limit of detection were 63, 37, 45 ng/ml and 0.97 pg/ml, respectively. Among the four monoclonal antibodies clones obtained, monoclonal antibody 11-5A1 was the most sensitive one. Its cross-reactivity to other tested quinolone was less than 0.5% and it did not cross-reacted to other groups of substances tested. Consequently, the obtained monoclonal antibody 11-5A1 is suitable for the development of an immunoassay-based test kit for detecting ciprofloxacin.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature .....
Academic Year : 2011 Advisor's Signature .....
Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จ โดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ และ อาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้บริหาร และอาจารย์ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศรกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ทำวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณ คุณอณุมาศ บัวเขียว และ คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำตั้งแต่เริ่มต้นการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา โครงการมหาวิทยาลัยวิจัย (AM1023A) และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาตลอด อีกทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฐ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ด

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4

2.1.1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน 4

2.1.1.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน 4

บทที่

2.1.1.2 ซิโพรฟลอกซาซิน 4

2.1.1.3 ผลข้างเคียงจากการใช้สารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน.....6

2.1.2 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....8

2.1.2.1 แอนติเจน (Antigen, Ag) 8

2.1.2.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab).....10

2.1.2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody, MAb).....12

2.1.2.4 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี
และพอลิโคลนอลแอนติบอดี.....12

2.1.2.5 การผลิตโมโนโลนอลแอนติบอดี 16

2.1.2.6 หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.....18

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....21

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....24

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย.....24

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 24

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....26

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย 29

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA.....29

3.4.2 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองด้วยแอนติเจน.....31

บทที่

3.4.3 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน.....32

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....36

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....38

3.4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....41

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....42

4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA.....42

4.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ CPFX.....45

4.3 ผลของการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา.....46

4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....50

4.5 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์บางส่วน.....60

4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....65

5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....68

รายการอ้างอิง.....70

ภาคผนวก.....74

ภาคผนวก ก.....75

ภาคผนวก ข.....84

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่า MRL ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรปสำหรับซิโพรฟลอกซาซินที่ตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ.....7

2.2 การเปรียบเทียบระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....15

2.3 โครโมจีนิกสับสเตรทสำหรับ HRP.....19

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย.....24

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....24

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....26

4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน CPFX-BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี BCA.....42

4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของ BSA กับ CPFX ด้วยวิธี TNBS.....43

4.3 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน CPFX-OVA ด้วยวิธี BCA.....44

4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของโปรตีน OVA กับ CPFX โดยวิธี TNBS.....44

4.5 ค่าไตเตอร์แอนติบอดี และ % การแข่งขัน ของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPFX-BSA...45

4.6 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมาเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต
โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระ.....48

4.7 ค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ทดสอบโดยวิธี
indirect ELISA.....49

4.8 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยชุดตรวจสอบ isotyping kit...51

ตาราง หน้า

4.9 ระดับการเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA และใช้ CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบก้นหลุม.....52

4.10 สรุปค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA 55

4.11 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มควิโนโลนและสารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA 57

4.12 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ให้บริสุทธิ์.....62

4.13 ค่า R_f และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....65

4.14 การเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 11-5A1 ต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย ใช้แอนติเจน CPFX-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม.....67

ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลาย BSA มาตรฐานด้วยวิธี BCA.....75

ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลาย OVA มาตรฐานด้วยวิธี BCA.....76

ตาราง หน้า

ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 4 โคลนต่อ CPFX ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA 5 µg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA 77

ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและ450 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISAของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ที่ทำให้บริสุทธิ์.....78

ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA.....79

ก.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี BCA.....80

ก.7 ผลการหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี BCA.....80

ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโครนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี indirect ELISA.....81

ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 หลังถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA.....83

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน 4

2.2 โครงสร้างซิโพรฟลอกซาซินและสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน 5

2.3 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 11

2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์ 12

2.5 แนวทางการสังเคราะห์ DNA การยับยั้งของ aminopterin ในการสังเคราะห์ DNA ใน de novo pathway 17

2.6 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA 20

2.7 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA 20

3.1 การเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับโปรตีนพาหะ โดยใช้ NHS และ EDC 29

4.1 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5-7F12 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:10 53

4.2 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 7-7G9 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:640 53

4.3 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 7-5A1 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:640 54

4.4 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 11-5A1 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1 54

ภาพที่ หน้า

4.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-7F12 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 5-7F12 เจือจาง1:10 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซิน ที่มีความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml 58

4.6 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-7G9 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-7G9 เจือจาง 1:640 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซิน ที่มีความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml 58

4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-5A1 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-5A1 เจือจาง 1:640 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซิน ที่มีความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml 59

ภาพที่ หน้า

4.8 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 เจือจาง 1:640 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซิน ที่มีความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml 59

4.9 โครมาโตแกรมที่ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 11-5A1 ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรสและชะโมโนโลนอลแอนติบอดีด้วย 0.1M glycine-HCl pH 2.7 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที 61

4.10 แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE 64

4.11 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 11-5A1 ต่อ CPFX อิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุมและใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์เข้มข้น 2 µg/ml 66

ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA 75

ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย OVA ด้วยวิธี BCA 76

ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA 79

ภาพที่ หน้า

ก.4 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 81

ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 82

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	Absorbance
APS	Ammoniumpersulfate
B	Absorbance obtained from ELISA with competitors
B_0	Absorbance obtained from ELISA without competitors
BCA	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
CAP	Chloramphenicol
C_H	Constant region of heavy chain
C_L	Constant region of light chain
CPFX	Ciprofloxacin
Da	Dalton (g/mol)
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDC	*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochoride
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum

FIA	Freund's incomplete adjuvant
g	Gram
HAT	Hypoxanthine, aminopterin and thymidine
HCl	Hydrochloric acid
HT	Hypoxanthine and thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HRP	Horseradish peroxidase
HPLC	High performance liquid chromatography
IC_{50}	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
LOD	Limit of detection
M	Molar (mol/l)
MAb	Monoclonal antibody
µg	Microgram
ml	Millilite
MRLs	Maximum residue limits
MW	Molecular weight

N	Normal
ng	Nanogram
NHS	*N*-Hydroxysuccinimide
OVA	Ovalbumin
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20
PEG	Polyethylene glycol
pg	Pictogram
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
R_f	Relative mobility
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresi
TEMED	N,N,N,N-tetramethyl-ethylenediamine
T_H	Helper T cell
TK	Thymidine kinase
TMB	3,3', 5,5" –tetramethylbenzidine

TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid
UV	Ultraviolet

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin ; CPFX) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ใช้สำหรับรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อตามส่วนต่างๆของร่างกายซึ่งสามารถออกฤทธิ์โดยฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และ แกรมลบจึงเป็นที่นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อต่างๆ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสวะ ระบบทางเดินหายใจ โดย ซิโพรฟลอกซาซินเป็นยาที่ใช้ง่ายมีทั้งแบบเม็ดใช้รับประทานและแบบน้ำ ใช้สำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อจึงเป็นที่นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งในคนและใน การปศุสัตว์ โดย จากการศึกษาในสัตว์พบว่าสารปฏิชีวนะ ซิโพรฟลอกซาซินส่งผลทำให้เกิดความผิดปรกติต่อตัวอ่อนในครรภ์ (Schaefer และคณะ, 1996) นอกจากนี้สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน นี้อาจทำให้เกิด ผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระคายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว อ่อนเพลีย และบางครั้งอาจเกิดอาการเศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก เป็นต้น

ในปัจจุบันจากการที่มีการใช้สารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซินในการทำปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ทำให้สารเหล่านี้อาจตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ รวมทั้งเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยาซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ในสัตว์นั้นสามารถจะถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ซึ่งเป็นอันตรายอย่างมากต่อสุขภาพมนุษย์ (Kummerer, 2004) อย่างไรก็ตามซิโพรฟลอกซาซินยังคงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในสหภาพยุโรป และหลายประเทศในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทย จึงได้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างใน อาหารบริโภค โดยสหภาพยุโรปได้มีการกำหนดค่า MRL (maximum residue limit) ของ CPFX ใน โค กระบือสุกร กระต่าย แพะ และสัตว์ปีกไว้ที่ 100-300 µg/kg ขึ้นกับชนิด และเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่งในกล้ามเนื้อ และไขมันของ โค กระบือ สุกร กระต่าย แพะ และสัตว์ปีก มีค่า MRL เท่ากับ 100 µg/kg เป็นต้น

(European Commission Regulation, 2002) และที่สำคัญที่สุดคือ ห้ามไม่ให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวในสัตว์ที่ผลิตไข่สำหรับบริโภค ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CPFX ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ซึ่งมีหลายวิธีเช่น ใช้วิธีการทางเคมีด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) (Gorla และคณะ, 1997) เทคนิค Turbulent flow chromatography/tandem mass spectomertry (TFC-MS/MS) (Krebber และคณะ, 2009) และเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) (Barron และคณะ, 2001) ซึ่งการตรวจวัดหาปริมาณ CPFX ด้วยวิธีทางเคมีเหล่านี้มีความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพงและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์และไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น ได้มีการพัฒนาเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ประหยัด รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง ค่าใช้จ่ายต่ำ และเหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรอง (screening Test) ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมี แต่ในประเทศไทยนั้น เนื่องจากชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA มีราคาสูง และต้องทำการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปใช้เองจึงช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้ ซึ่งการเตรียมชุดตรวจสอบนั้น ต้องมีการเตรียมแอนติบอดีซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชุดตรวจสอบ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ CPFX และศึกษาลักษณะสมบัติของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซิโพรฟลอกซาซิน
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เตรียมแอนติเจนโดยการเชื่อมซิโพรฟลอกซาซินกับโปรตีนพาหะ
3. ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน
4. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซิโพรฟลอกซาซินด้วยวิธี ELISA
5. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้
   - 5.1 การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน
   - 5.2 การทดสอบความไว (sensitivity)
   - 5.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มควิโนโลน
   - 5.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน และทราบลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

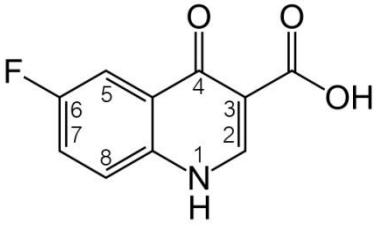
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone)

2.1.1.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (Quinolone)

สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งเป็นกลุ่มที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนนั้นเป็นสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมีหมู่คีโตนตรงตำแหน่งที่ 4 และหมู่คาบอกซิลิคตรงตำแหน่งที่ 3 ซึ่งโครงสร้างของสารนี้ทำให้มีผลยับยั้ง การทำงานของดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) (Holtzapple และคณะ, 2001) ของแบคทีเรียแกรมลบ และยับยั้งดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรส (DNA topoisomerase) IV ในแบคทีเรียแกรมบวก (Bertino และ Fish, 2000) หากในตำแหน่งที่ 6 นั้นมีธาตุฟลูออรีนจะทำให้สารในกลุ่มนี้ถูกแยกออกเป็นกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Hernandez-Arteseros และคณะ, 2002)

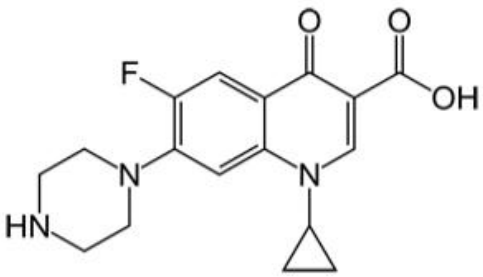


รูปที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน

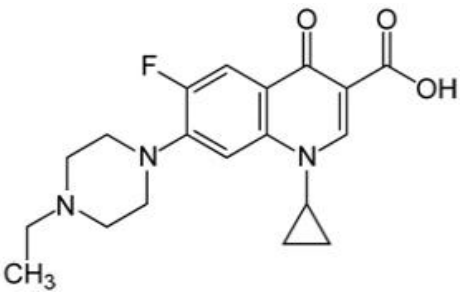
2.1.1.2 ซิโพรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin)

ซิโพรฟลอกซาซิน หรือ 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-quinoline-3-carboxylic acid เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ มีฤทธิ์ฆ่าจุลชีพโดยการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ ใช้มากในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และ

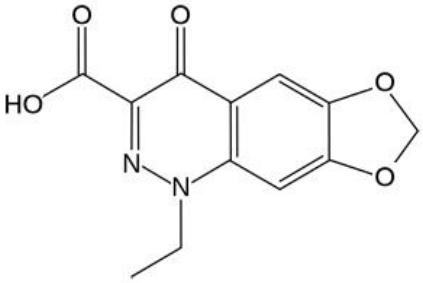
ระบบทางเดินอาหารในสัตว์ เช่น โค สุกร และสัตว์ปีก นอกจากนั้นแล้วยังมีการใช้ในแกะ แพะ และกระต่ายอีกด้วย



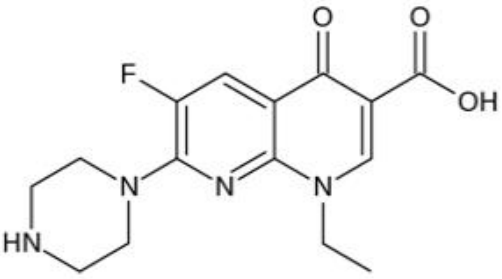
Ciprofloxacin



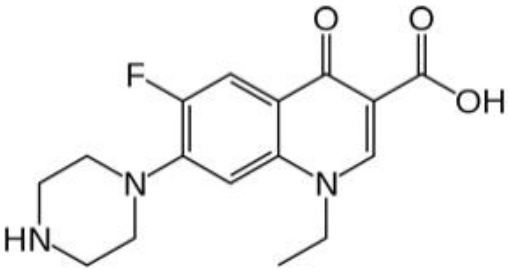
Enrofloxacin



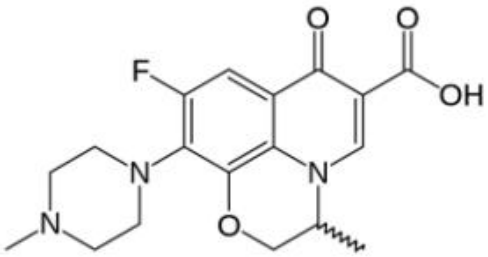
Cinoxacin



Enoxacin



Norfloxacin



Ofloxacin

รูปที่ 2.2 โครงสร้างซิโพรฟลอกซาซินและสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน

2.1.1.3 ผลข้างเคียงจากการใช้สารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน

จากการที่มีการใช้สารปฏิชีวนะกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในการรักษาอาการติดเชื้อทั้งในมนุษย์และการปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้มีประกาศแจ้งเตือนถึงผลข้างเคียงจากการใช้สารปฏิชีวนะกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนซึ่งรวมถึง ซิโพรฟลอกซาซิน เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระคายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว อ่อนเพลีย และบางครั้งอาจเกิดอาการเศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน ชัก และสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนยังเพิ่มความเสี่ยงที่จะทำให้ผู้ใช้ยา มีอาการเส้นเอนอักเสบ หรือเกิดการฉีกขาดของเส้นเอ็นได้ โดยจะมีความเสี่ยงสูงต่อผู้บริโภคที่มี อายุมากกว่า 60 ปี และผู้ที่ได้รับการผ่านตัดเปลี่ยนอวัยวะ เช่น ไต หัวใจ และปอด และผู้บริโภคที่ใช้ยากลุ่ม สเตอร์รอยด์ ร่วมด้วย (FDA, 2008) นอกจากนี้การใช้ซิโพรฟลอกซาซินในการปศุสัตว์ยังส่งผลในทางอ้อมทำให้สารเหล่านี้อาจตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ รวมทั้งเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยาซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ในสัตว์นั้นสามารถจะถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ซึ่งเป็นอันตรายอย่างมากต่อสุขภาพมนุษย์ (Kummerer, 2004)

อย่างไรก็ตามสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซินยังคงสามารถใช้ได้ในประเทศสหรัฐอเมริกาสหภาพยุโรป และหลายประเทศในเอเชียรวมถึงประเทศไทย สหภาพยุโรปจึงได้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างในอาหารบริโภค หรือ MRL (maximum residue limit) ในสุกร โค และสัตว์ปีก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งในโค กระบือสุกร กระต่าย แพะ และสัตว์ปีกไว้ที่ 100-300 µg/kg ขึ้นกับชนิด และเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่งในกล้ามเนื้อ และไขมันของ โค กระบือสุกร กระต่าย แพะ และสัตว์ปีก มีค่า MRL เท่ากับ 100 µg/kg เป็นต้น และที่สำคัญที่สุดคือห้ามไม่ให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวในสัตว์ที่ผลิตไข่สำหรับบริโภค (European Commission Regulation, 2002)

ตารางที่ 2.1 ค่า MRL ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรปสำหรับซิโพรฟลอกซาซินที่ตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ

ชนิดสัตว์	MRLs(µg/kg)**	เนื้อเยื่อเป้าหมาย	หมายเหตุ
โค, แกะ, แพะ	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	300	ตับ	
	200	ไต	
	100	นม	
หมู, กระต่าย	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	200	ตับ	
	300	ไต	
สัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ	ห้ามให้ใช้ในสัตว์ที่ผลิตไข่สำหรับบริโภค
	100	หลังและไขมัน	
	200	ตับ	
	300	ไต	
สัตว์ทุกชนิดยกเว้น โค, แกะ, แพะ, หมู , กระต่าย และ สัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	200	ตับ	
	200	ไต	

**ค่าที่แสดงเป็นผลรวมระหว่างสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซิน

2.1.2 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

2.1.2.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

แอนติเจน คือ สารที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการเป็นแอนติเจน หมายถึง ความสามารถของสารที่จะทำปฏิกิริยาจับแบบจำเพาะกับองค์ประกอบแบบต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แอนติบอดีหรือตัวรับบนผิวเซลล์ สารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนเกือบทุกชนิดจะมีคุณสมบัติการเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ ไม่ว่าจะเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated immune response) หรือการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immune respone) ส่วนแอนติเจนที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนที่เรียกว่า แฮปเทน ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กและมีสมบัติเป็นแอนติเจน แต่โดยตัวสารนั้นไม่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นเมื่อต้องการทำการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดีต่อสาร จึงมักทำกระบวนการทางเคมีเชื่อมติดระหว่างแฮปเทนกับโปรตีนพาหะ เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนที่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้

โดยสมบัติของอิมมูโนเจนที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมี 4 ประการ ได้แก่ ความแปลกปลอม ขนาดของโมเลกุล องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมี และความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ที่นำเสนอหรือ ผิวของเซลล์อื่น ๆ (antigen presenting cell)

1. ความแปลกปลอม

การที่สารจะตอบสนองต่อการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันได้นั้นสารนั้นจะต้องถูกตรวจจับโดยระบบภูมิคุ้มกันว่ามีองค์ประกอบแตกต่างกับองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ความสามารถในการตรวจจับดังกล่าวเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาการของลิมโฟไซต์ โดยโมเลกุลที่ไม่เคยสัมผัสกับลิมโฟไซต์ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature lymphocyte) ในช่วงระยะเวลาระหว่างการพัฒนา ซึ่งต่อมาเมื่อได้รับแอนติเจนนั้นเข้าสู่ร่างกายจะถูกตรวจจับโดยระบบภูมิคุ้มกันว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งระดับของการเป็นอิมมูโนเจนขึ้นอยู่กับระดับความแปลกปลอม ในบางกรณี ระบบภูมิคุ้มกันอาจมีการตอบสนองต่อองค์ประกอบของตนเอง ซึ่งก่อให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันต่อตนเอง (autoimmunity หรือ autoallergy) ขึ้นได้

2. ขนาดของโมเลกุล

ขนาดของโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับการเป็นอิมมูโนเจนโดยตรงโดย อิมมูโนเจนที่กระตุ้นการตอบสนองที่มีประสิทธิภาพสูงมีขนาดประมาณ 1000,000 ดาลตัน และโดยทั่วไปขนาดโมเลกุลประมาณ 5,000-10,000 ดาลตัน จะมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมมูโนเจนต่ำ และโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำจะมีสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำ เพราะเนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกฟาโกไซโทซิสได้ง่าย

3. องค์ประกอบ และความซับซ้อนทางเคมี

แอนติเจนที่มีโครงสร้างซึ่งมีความซับซ้อนทางเคมี (complex) จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ในกรณีของแอนติเจนที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีการซ้ำของโมโนเมอร์หากเป็นพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์ (co-polymer) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีมอโนเมอร์มากกว่า 2 ชนิดขึ้นไปเป็นองค์ประกอบจะมีความเป็นอิมมูโนเจนที่ดีกว่าพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ (homo-polymer) เนื่องจากความหลากหลายของหน่วยย่อยจะมีมากกว่า

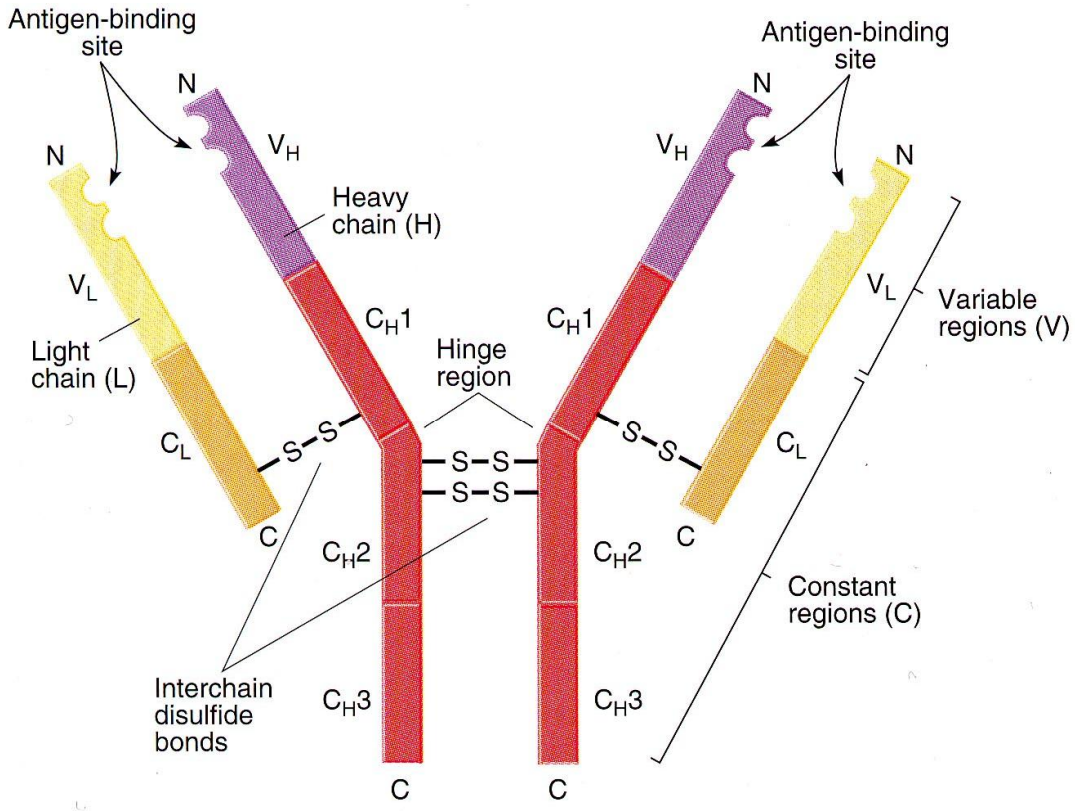
4. ความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ที่นำเสนอหรือผิวของเซลล์

พัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดีและภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต้องการ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างที-เซลล์ กับ แอนติเจนที่ถูกแปรรูป โดยแอนติเจนจะถูกนำเสนอร่วมกับโปรตีนบนผิวเซลล์ที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) โดยแอนติเจนถูกนำเสนอร่วมกับ class II MHC บนผิวของเซลล์นำเสนอต่อ Helper T cells (T_H) หรือแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปถูกนำเสนอร่วมกับ class I MHC นำเสนอต่อ Cytotoxic T cells (T_c) กรณีของโมงเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้เมื่อถูกนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC จะมีความเป็นอิมมูโนเจนต่ำ

โดยความสามารถในการเป็นแอนติเจนนั้นนอกจากความแปลกปลอม ขนาดของโมเลกุล องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมี และความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ แล้วนั้นยังขึ้นอยู่กับสมบัติทางชีววิยาของสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง เช่น จีโนไทป์ของสัตว์ ปริมาณแอนติเจน เส้นทางได้รับแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย การผสมและไม่ผสมแอดจูแวนท์ อีกด้วย (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

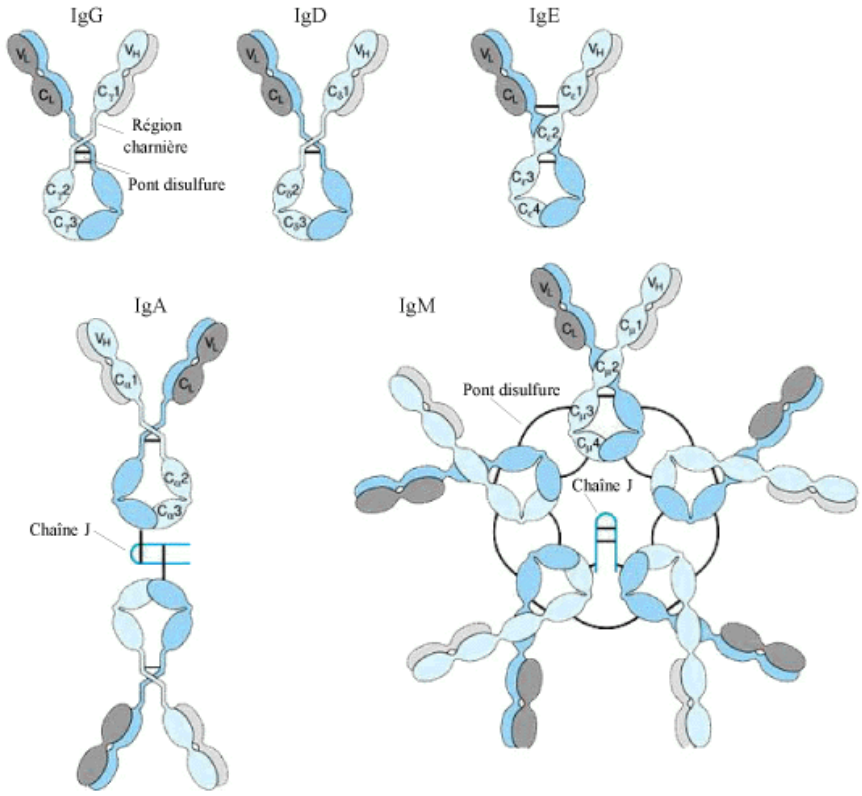
2.1.2.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin , Ig) เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่นๆสร้างขึ้น ซึ่งมีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์ สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันคือ แอนติเจน โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีอยู่ในรูปตัววาย (Y shape) ดังรูปที่ 2.3 ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) 4 สาย คือ ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า Heavy (H) chain 2 สาย และส่วนที่น้ำหนักโมเลกุลเบาเรียกว่า Light (L) chain 2 สาย โดยในโมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินมีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ทั้งภายในสายพอลิเปปไทด์ และระหว่างสายโพลิเปปไทด์ ใน L chain พบว่ามีพันธะ ไดซัลไฟด์ 2 แห่ง ส่วนใน H chain จะมีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ 4 แห่ง พันธะแต่ละแห่งจะทำให้สายพอลิเปปไทด์ขดเป็นห่วง (loop) จึงทำให้ L chain มี 2 โดเมน (domain) และใน H chain มี 4 โดเมน จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนทั้งในส่วน H chain และ L chain พบว่า กรดอะมิโนลำดับที่ 1-100 ตัวแรกจากปลาย N (N-terminal) ซึ่งเป็นโดเมนแรกจะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนสูงมาก จึงเรียกส่วนนี้ว่า บริเวณแปรปรวน (Variable region) ซึ่งแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่จับแอนติเจน ถ้าเป็น L chain ก็เรียกว่า V_L ถ้าเป็น H chain ก็เรียกว่า V_H ส่วนที่เหลือเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยมาก เรียกว่า บริเวณคงที่ (constant region) ถ้าเป็น L chain ก็เรียก C_L ถ้าเป็น H chain ก็เรียก C_H ดังนั้น H chain 1 เส้น จึงประกอบด้วย V_H, C_H1, C_H2 และ C_H3 นอกจากนี้ส่วนบริเวณคงที่จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน กรณีของ L chain พบมีอยู่ 2 ชนิดคือ kappa (κ) และ lambda (λ) ส่วนของ H chain มีอยู่ 5 ชนิดคือ α, μ, γ, δ และ ε จึงทำให้สามารถแบ่งอิมมูโนโกลบูลินออกเป็น 5 คลาสคือ IgA, IgM, IgG, IgD และ IgE ดัง รูปที่ 2.4 นอกจากนี้โปรตีนสาย H chain ชนิด γ, δ และ α จะมีบริเวณข้อพับ (hinge region) ประกอบด้วยกรดอะมิโนโพรลีน (proline) จำนวนมาก ในกรณีของ μ และ ε ไม่พบบริเวณข้อพับ แต่ละโมเลกุลจะยาวขึ้นอีก 1 โดเมน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

(แหล่งที่มา : http://homepage.usask.ca/~kmj127/antibody.jpg)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์

(แหล่งที่มา : http://www.ibs.fr\ext\labos\LIM\Myriam.BEN-KHALIFA\fig14.htm\files)

2.1.2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody, MAb)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมา ซึ่งกำเนิดมาจาก บี ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมาได้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งความจำเพาะต่อเอพิโทป (epitope) ของแอนติเจน และด้านขององค์ประกอบของอิมมูโนโกลบูลินซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้นซึ่งในภาวะปกติร่างกายจะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเรียกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) แต่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวเมื่อมีพยาธิสภาพเป็นโรคมะเร็งของบี ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์พลาสมา เช่น โรค multiple myeloma โดยที่เซลล์พลาสมาปกติหนึ่งเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ว และเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบบไม่หยุดยั้ง และสร้างแอนติบอดีชนิดเดียวกันจำนวนมากออกมาทำให้สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ในซีรัม (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)

โดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1975 โดย George Kohler และ Cesar Milstein ซึ่งได้พัฒนาเทคนิคการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ ต่อมาจึงได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างๆ มากมาย (G.,Kohler และ C.,Milstein, 1975)

2.1.2.4 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และพอลิโคลนอลแอนติบอดี

ทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดี และพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่างก็เกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์ และสัตว์เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยแอนติเจนเมื่อมองถึงในระดับโมเลกุลแล้วพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้น คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆชนิดรวมกันนั้นเอง โดยแอนติบอดีทั้งสองชนิดมีความแตกต่างหลักอยู่ 4 ประการ คือ

1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตได้ด้วยวิธีการ somatic hybridization หรือวิธีทางพันธุวิศวกรรม โดยทั้งสองวิธีต้องอาศัยเทคโนโลยีที่จำเพาะ และต้องใช้ขบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนจนเกิดการสร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในกระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัมของสัตว์ทดลอง จึงเป็นผลให้การผลิต พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า และสดวกต่อการผลิตมากกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่ขอเสียของวิธีการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีคือ แม้ในสัตว์ทดลองชนิดเดียวกันแต่คนละตัวกันก็อาจได้ผลที่มีความแตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพของแอนติบอดี ดังนั้นในการผลิตแต่ละครั้งจึงต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นแตกต่างกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัด และคงไว้ซึ่งปริมาณ และคุณภาพในทุกๆการผลิต เนื่องจากทั้งยีน และเซลล์ที่ผลิตนั้นมีความเสถียรสูง

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen specificity)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเอพิโทปชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นเอพิโทปที่จำเพาะหรือเอพิโทปที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactive epitope) ก็ได้ส่วน

พอลิโคลนอลแอนติบอดี ประกอบไปด้วยแอนติบอดีหลายๆ ชนิดที่แต่ละชนิดจำเพาะต่อเอพิโทปที่แตกต่างกัน ทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ไม่แน่นอนต่อเอพิโทปบนโมเลกุลของแอนติเจน

3. สัมพรรคภาพ (affinity) ของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพ คือ ค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง (binding site) ซึ่งเป็นคุณสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลกำหนดโดยบริเวณแปรผัน (variable region) โดยในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถคัดเลือกแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพสูงต่อแอนติเจนได้ โมโนโคลนอลที่มีสัมพรรคภาพนี้จะสามารถนำไปใช้ได้ในความเจือจางสูง ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวนในการทดลองได้ และสามารถนำไปใช้ในการทำแอนติเจนให้บริสุทธิ์ได้อีกด้วย

4. Effector function

คือคุณสมบัติที่จะถูกกำหนดด้วยส่วนบริเวณคงที่ (constant region) ของ H chain เป็นคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเม้นต์ การจับกับ Fc ของอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แตกต่างไปในแต่ละ ไอโซไทป์และสับคลาสของอิมมูโนโกลบูลินนั้นๆ ซึ่งจะกำหนดคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ให้มีคุณสมบัติทางชีวภาพในด้านต่างๆ แตกต่างกัน ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกๆด้านเนื่องจากอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีหลายๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน (สุทธิพันธ์ และคณะ ,2537)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

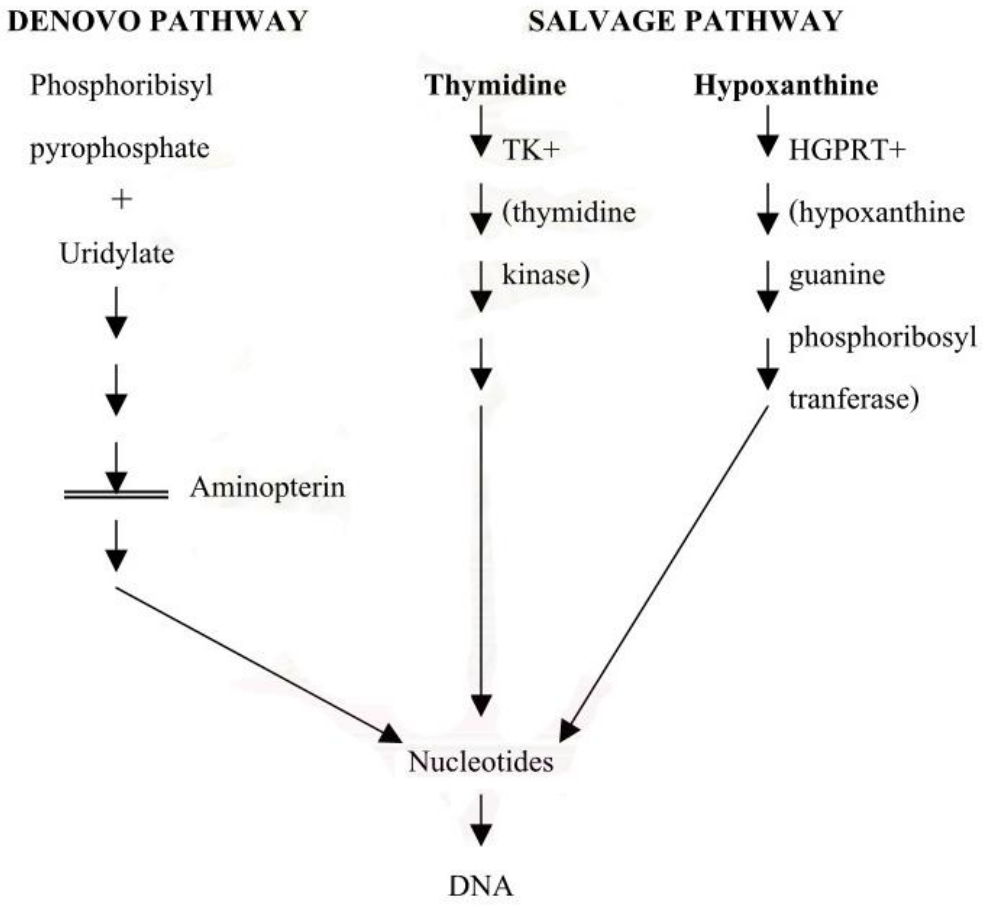
คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี (PAb)	โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb)
ความจำเพาะ (Specificity)	- พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม - มักไม่มีความจำเพาะสูง	- คงที่ สามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐาน - มีความจำเพาะสูง
สัมพรรคภาพ (Affinity)	- ไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เจาะเลือดสัตว์ทดลอง	- คงที่ โดยสามารถทำการคัดเลือกได้สูงหรือต่ำตามความต้องการในระหว่างขั้น ตอนการทำให้ได้เซลล์เดี่ยว (cloning)
ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้	- ประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	- ประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเซลล์เพาะเลี้ยง - ประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน ascitic fluid
ปริมาณแอนติบอดีชนิดอื่นที่ปนเปื้อน	- อาจสูงถึง 100%	- ไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง - พบประมาณ 10% ใน ascitic fluid
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	- ต้องใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์มาก หรือทำ serum absorption	- ใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์พอสมควร
ต้นทุนผลิต	- ต่ำ	- สูง โดยเฉพาะเวลาเริ่มต้นในการผลิต

2.1.2.5 การผลิตโมโนโลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นการผลิตโดยการนำบีเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมาหรือเซลล์มัยอีโลมา (myeloma celll) โดยการใช้ PEG (polyethylene glycol) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวของเซลล์เมมเบรนเข้าด้วยกันก่อนที่จีโนมของเซลล์จะผ่านเข้าสู่ซัยโตพลาสซึม (cytoplasm) ของอีกเซลล์หนึ่ง โดยเซลล์ที่ได้จะเป็นเซลล์ที่มีสองนิวเคลียสหรือมากกว่า เมื่อเซลล์แบ่งตัวนิวเคลียสจึงรวมตัวกัน และเกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) หรือเซลล์ ไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอมตะของเซลล์มะเร็ง และสามารถสร้างแอนติบอดีได้ เนื่องจากเซลล์ไมอิโลมาจะให้คุณสมบัติความเป็นอมตะ ในขณะที่บีเซลล์ซึ่งมีอายุจำกัดให้คุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามต้องการ ในทางปฏิบัติไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่มีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมี ไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาสภาพที่เลือกให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญได้ วิธีที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การใช้เซลล์มัยอีโลมาที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับแนวทางการสังเคราะห์ นิวคลีโอไทด์ใน salvage pathway ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญใน HAT medium (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) ซึ่งเป็น selective medium โดยเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ดังนั้นจึงมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างเซลล์ไมอิโลมากับบีเซลล์เท่านั้นที่มีชีวิตรอดเพราะได้เอนไซม์ใน salvage pathway จาก บีเซลล์ ส่วนบีเซลล์ที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆ และตาย (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การคัดเลือกของ HAT medium เป็นการใช้พื้นฐานจากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 แนวทาง คือ de novo payhway และ salvage pathway ในกรณีของ de novo pathway มีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งโดย aminopterin (folic acid analog) ดังนั้นเมื่อ de novo pathway ถูกยับยั้ง เซลล์ก็จะหันมาใช้ salvage pathway โดยการเปลี่ยนพิวลีน (purine) หรือไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรง เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอนเอ เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway ได้แก่ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) การผ่าเหล่าของเอนไซม์

ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการใช้ salvage pathway เนื่องจากใน HAT medium ส่วนของ aminopterin ใช้ขัดขวาง de novo pathway ส่วน hypoxanthine และ thymine ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ใน salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะตายใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สำหรับสร้างดีเอ็นเอหรืออาร์เอนเอ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.5 แนวทางการสังเคราะห์ DNA การยับยั้งของ aminopterin ในการสังเคราะห์ DNA ใน de novo pathway เนื่องจาก anminopterin เป็นสารคล้าย (analog) ของ dihydrofolic acid ซึ่งสามารถจับกับเอนไซม์ dihydrofolate reductase ด้วย affinity สูงจึงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์พิวรีน (purine) ซึ่งกรณีนี้เซลล์ปกติยังสามารถสร้าง DNA จาก salvage pathway ได้ (Abul และคณะ, 1994)

เทคโนโลยีของการผลิตไฮบริโดมามักจะใช้เซลล์มัยอีโลมาที่ผ่าเหล่า 2 ประการ (double mutants) คือเอนไซม์ HGPRT บกพร่อง ($HGPRT^-$) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Ig^- mutant) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมาถอดรหัสมาจากยีนของเซลล์ม้าม (spleen cell) โดยเซลล์ไมอิโลมาเพียงแต่ทำให้เซลล์เป็นอมตะเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่เฉพาะที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เช่นวิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) เมื่อสามารถพิสูจน์ได้ว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการแล้วจากนั้นจึงทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียวกัน และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.1.2.6 หลักการของ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

เทคนิค ELISA มีที่มาจากระบบที่มีการพัฒนาขึ้นโดย Berson และ Yalow ในช่วงปี 1960 ซึ่งการพัฒนาในช่วงแรกอาศัยการตรวจวัดรังสีไอโซโทปในการตรวจวิเคราะห์จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า Radioimmunoassay (RIA) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีการใช้กันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน จึงมีแนวโน้มในการพยามลดการใช้สารรังสีไอโซโทป เนื่องจากความกังวลด้านความปลอดภัย ต้นทุนในการทำการทดลองและต้นทุนในการกำจัดของเสียที่สูง อีกทั้งยังมีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งสามารถทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการเท่านั้น อย่างไรก็ตามหลักการของ RIA ถูกพัฒนามาเป็นเทคนิค ELISA โดยเปลี่ยนจากการตรวจวัดสารกัมมันตภาพรังสีเป็นปฏิกริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทในการตรวจหาการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งแอนติบอดีจะเชื่อมต่อกับเอนไซม์ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ติดแอนติบอดีที่ใช้ในเทคนิค ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase (AP) และ horseradish peroxidase (HRP) เป็นต้น โดยเอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (chromogenic substrate) โดยที่สับสเตรทของ HRP เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide, H_2O_2) (ธนาภัทร ปาลกะ, 2553)

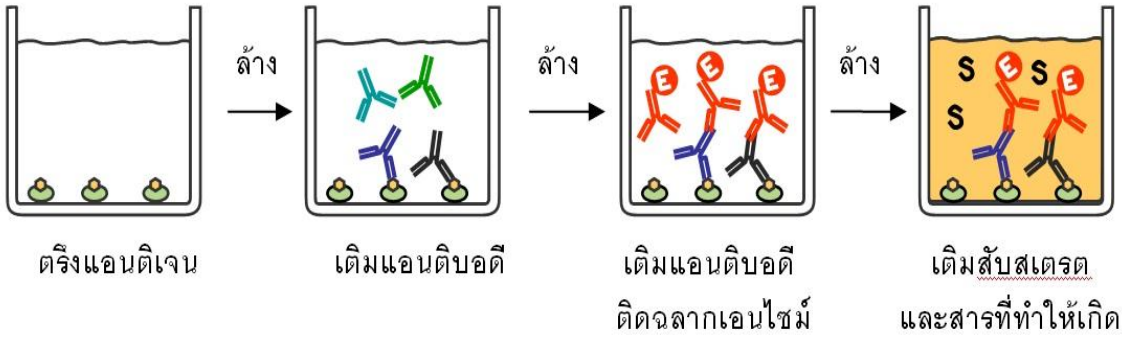
ตารางที่ 2.3 โครโมจีนิกสับสเตรทสำหรับ HRP

สารเคมี	สีที่เกิดเมื่อใส่กรดเพื่อหยุดปฏิกิริยา	วัดค่าการดูดกลืนแสงที่
2, 2'-azinodi-[ethylbenzthiazoline] sulfonate (ABTS)/H_2O_2	เขียว	405 nm
O-phenylene diamine (OPD)/ H_2O_2	น้ำตาล	492 nm
3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB)/ H_2O_2	เหลือง	450 nm

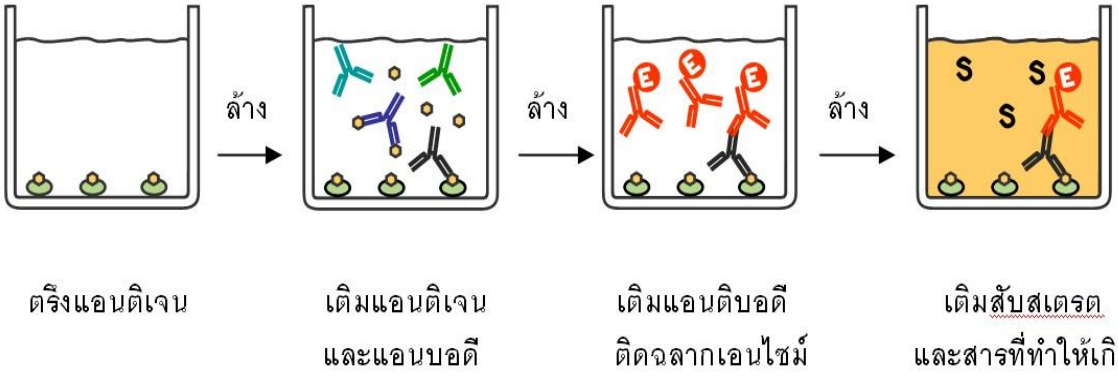
เทคนิค ELISA รูปแบบต่างๆอาศัยหลักการการตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนพื้นผิวของแข็ง (coating) การบล็อคพื้นผิวนั้น (blocking) การล้างเพื่อกำจัดการจับกันแบบไม่จำเพาะ (washing) และปฏิกิริยาเอนไซม์และสับสเตรท เพื่อตรวจปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดี

โดยเทคนิคของ ELISA ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งเป็น 2 แบบคือ

1. Indirect ELISA ใช้สำหรับตรวจสอบแอนติบอดี เช่น การคัดเลือกไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจน หรือตรวจแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในซีรัม วิธีนี้เหมาะสำหรับแอนติเจนบริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณน้อยระดับมิลลิกรัม วิธีนี้เริ่มด้วยการตรึงแอนติเจนในหลุม จากนั้นทำการบ่มแต่ละหลุมด้วยสารละลายที่มีแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบและล้างแอนติบอดีที่ไม่จับทิ้งไป จากนั้นทำการเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีของสัตว์ที่ใช้ (เช่น แอนติบอดีตัวแรกมาจากหนู แอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์จะเป็น anti-mouse Ig จากสัตว์ต่างๆ เช่น กระต่าย แพะ แกะ เป็นต้น) หลังจากบ่มและล้าง เติมสารละลายสับสเตรต และสารหยุดปฏิกิริยา (stop solution) ความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับแอนติเจนที่ตรึงอยู่ในหลุม (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA

(หมายเหตุ คือแอนติบอดี, คือแอนติเจนม คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์,

S คือสับสเตรต)

2. indirect competitive ELISA เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัม หรือแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาว่า แอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปอิสระได้หรือไม่ และสามารถนำไปวัดปริมาณแอนติเจนที่ต้องได้ในกรณีมีแอนติเจนที่ทราบปริมาณเป็นแอนติเจนมาตรฐาน ขั้นตอนในการตรวจสอบคล้ายกับวิธี indirect ELISA เพียงแต่ในขั้นตอนการเติมแอนติบอดีนั้นจะเติมแอนติเจนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ หรือสารละลายแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณลงในหลุมที่มีการตรึงแอนติเจนไว้แล้ว พร้อมกับเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นในความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำไปบ่มกับ

แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธี indirect ELISA โดยวิธีนี้จะเป็นการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่ตรึงอยู่ที่ก้นหลุมกับแอนติเจนในสารละลายที่เติมลงไปในการแย่งจับกับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bucknall และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน และฟลูออโรควิโนโลน คือ ซิโพรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน เอนโรฟลอกซาซิน ฟลูเมควิน และกรดนาลิดิซิก โดยใช้ ovalbumin เป็นโปรตีนพาหะ แล้วทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแกะ และทำการหาค่า LOD (Limiting of Detection) ของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ซึ่งมีค่า LOD ต่อซิโพรฟลอกซาซินน้อยกว่า 6 ng/ml เอนโรฟลอกซาซิน 3.1 ng/ml ฟลูเมควิน 4 ng/ml และกรดนาลิดิซิก 2ng/ml และมีค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารเอนโรฟลอกซาซิน 69.8% และ นอร์ฟลอกซาซิน 44.6%

Christodoulou และคณะ (2007) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนจำนวน 10 ชนิด รวมถึงซิโพรฟลอกซาซิน ที่ตกค้างในเนื้อไก่ และไข่แดง โดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 ชนิด reverse phase และใช้สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ประกอบด้วย น้ำ และ acetronitrile ในอัตราส่วน 85:15 (v/v) แล้วทำการติดตามด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด UV ความยาวคลื่น 255 และ 275 นาโนเมตร โดย สามารถวัดสารปริมาณน้อยที่สุดในกล้ามเนื้อไกลได้เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม และในไข่แดงเท่ากับ 8 นาโนกรัมต่อกรัม นอกจากนั้นยังมีการใช้เทคนิค LC-MS โดยการใช้ C18 reversed phase column เช่นเดียวกัน ทำการตรวจวัดปริมาณสารในตัวอย่างนมโค โดยสารละลายตัวพาที่ใช้คือ acetronitrile และ เมทานอล ในอัตราส่วน 60:40 (v/v) โดยสามารถวัดสารปริมาณน้อยที่สุดได้เท่ากับ 0.064 นาโนกรัมต่อกรัม

Yuan และคณะ (2001) ได้ทำการตรวจวัดสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน ที่ตกค้างในเนื้อหมู ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) (515 HPLC pump,

2487 dual UV absorbance detector and M [32] workstation, Waters, USA) ต่อกับรีเวิร์สเฟสคอลัมน์ (Nova-Pak ODS reverse phase colimn, 3.9 mm x 150 mm 4 µm, Waters, USA) โดยใช้สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ประกอบด้วย triethylamine และ acetonitrile ในอัตราส่วน 87:13 อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการติดตามด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด UV ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร พบว่าค่าต่ำสุดที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดคือ 10 ถึง 5120 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเปอร์เซ็นต์ recovery เท่ากับ 80.58%

Duan และคณะ (2001) ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการเชื่อมต่อโมเลกุลของซิโพรฟลอกซาซิน กับ โปรตีนพาหะ BSA (bovine serum albumin) และ HSA (Human serum albumin) ด้วยวิธีกระตุ้นหมู่เอสเทอ โดยอาศัย *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) และ *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochoride (EDC) และทำการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand เพศผู้จำนวน 8 ตัว (น้ำหนัก 2 กิโลกรัม) ด้วย CPFX-BSA และ CPFX-HSA (ปริมาณ 25 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเก็บ พอลิโคลนอลแอนติบอดีจากซีรัมของกระต่าย พบว่า จากการนำซีรัมของกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ใช้ทดสอบแต่มีปฏิกิริยากับสาร เอนโรฟลอกซาซิน และ นอร์ฟลอกซาซิน โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามเท่ากับ 69.8 และ 44.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถตรวจวัดได้ในช่วงตั้งแต่ 1.6 ถึง 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Kun Hu และคณะ (2010) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้เป็นชนิด IgG_{2a} และมีค่าสัมพรรคภาพ (affinity) ต่อสารปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน $3.75x10^{10}$ mol/l โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 245.86 ng/ml และ 45.25 ng/ml ตามลำดับ และมีค่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารเอนโรฟลอกซาซิน 84.6%

มนัสพงศ์ ชูศรี (2005) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน ซึ่งมีความจำเพาะอย่างสูงต่อเอนโรฟลอกซาซินโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 150 – 190 pg/ml มีค่า LOD อยู่ในช่วง 1.4 – 2.9 pg/ml มีปฏิกิริยาข้ามต่อสารปฏิชีวนะอื่นๆในกลุ่มควิโนโลน และฟลูออโรควิโนโลนน้อยกว่า 0.01%

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
1. หนูเมาส์ สายพันธุ์ BALB/c และ ICR	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. เซลล์มัยอีโลมา P3X 63AG8	ได้รับอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen (Germany)
2. เครื่องผสมด้วยแรงหมุน	Sientific Industries, Inc. (USA)
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	BIO-TEK Instrument, Inc. (USA)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส	Metter Toledo (USA)
5. เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
6. ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation (USA)
7. ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply co.,Ltd. (Thailand))

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
8. ตู้ -70 องศาเซลเซียส	ธเนศพัฒนา (Thailand)
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Udono-RII Memmert (Japan)
10. อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)
11. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
12. ปั๊มลม	Iwaki (Japan)
13. ชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส	Bio-Rad (USA)
14. ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
15. ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson (France)
16. เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro (Thailand)
17. กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
18. ขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน	Techne Incorporated (USA)
19. จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
20. จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม 48 หลุมและ 24 หลุม	Corning Incorporated (USA)
21. จานเลี้ยงเซลล์	Corning Incorporated (USA)
22. หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
23. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP (USA)
24. หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (cryotube)	Nunc (Denmark)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
1. Acrylamide gel	Sigma-Aldrich (USA)
2. Aminopterine	Sigma-Aldrich (USA)
3. Ammoniumpersulfate (APS)	Sigma-Aldrich (USA)
4. Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Sigma-Aldrich (USA)
5. BCA™ protein assay kit	Pierce (USA)
6. Beta-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
7. Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (USA)
8. Bromophenol blue	Sigma-Aldrich (USA)
9. Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (USA)
10. Cinoxacin	Sigma-Aldrich (USA)
11. Ciprofloxacin (CPFX)	Sigma-Aldrich (USA)
12. Citric acid	Merck (Germany)
13. Clenbuterol	Sigma-Aldrich (USA)
14. Coomassie Brilliant blue R-250	Pierce (USA)
15. D-glucose	Sigma-Aldrich (USA)
16. Diethyl ether	Sigma-Aldrich (USA)

17. Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich (USA)
18. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluke (Switzerland)
19. di-Sodium hydrogenphosphate	Merck (Germany)
20. Enrofloxacin	Sigma-Aldrich (USA)
21. Fetal calf serum (FCS)	PAA (Austria)
22. Freund's complete adjuvant	Sigma-Aldrich (USA)
23. Freund's incomplete adjuvant	Sigma-Aldrich (USA)
24. Furazolidone	Sigma-Aldrich (USA)
25. Glycine	Pacific science (Thailand)
26. Hydrochloric acid (HCl)	Merck (Germany)
27. Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Fluka (Switzerland)
28. Hypoxanthine	Sigma-Aldrich (USA)
29. Isotyping kit	Sigma-Aldrich (USA)
30. L-glutamine	Sigma-Aldrich (USA)
31. Norfloxacin	Sigma-Aldrich (USA)
32. *N*-Hydroxysuccinimide (NHS)	Sigma-Aldrich (USA)
33. *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochoride (EDC)	Sigma-Aldrich (USA)
34. Ofloxacin	Sigma-Aldrich (USA)

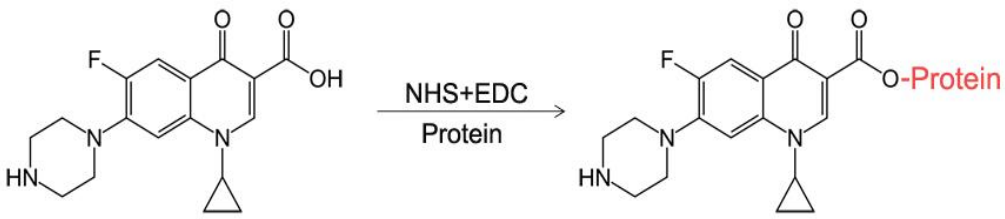
35. Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich (USA)
36. Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich (USA)
37. Pyruvic acid	Sigma-Aldrich (USA)
38. RPMI 1640 medium	Biochrom AG (Germany)
39. Skim milk (นมพร่องมันเนย)	Anline (Thailand)
40. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich (USA)
41. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck (Germany)
42. Sodium chloride (NaCl)	Merck (Germany)
43. Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Carlo Erba (USA)
44. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma-Aldrich (USA)
45. Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich (USA)
46. Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck (Germany)
47. Tetracycline hydrochloride	Sigma-Aldrich (USA)
48. 3,3', 5,5" –tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich (USA)
49. N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	Pierce (USA)

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลองและสำหรับทำ ELISA

3.4.1.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง

ทำการเชื่อมติดซิโพรฟลอกซาซิน กับ Bovine serum albumin (BSA) โดยการนำซิโพรฟลอกซาซิน 5 มิลลิกรัม และ N-Hydroxysuccinimide (NHS) ในอันตราส่วน 1:2 (w/w) มาละลายด้วย Dimethylformamide (DMF) และทำการเติมN-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochoride (EDC) ในอัตราส่วน 1:2 (w/w) กวนเบาๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการเติมสารละลาย BSA 10 มิลลิกรัม ที่ละลายอยู่ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (Sodium carbonate buffer, pH 9.4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ หยดด้วยปริมาตรน้อยๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน จากนั้นทำการกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการนำสารละลายที่ได้ไปไดอะลิซิสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline) เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสออกจากตะกอนสีขาว นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับแอนติเจนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของ CPFX-BSA ด้วยวิธี 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองต่อไป



รูปที่ 3.1 การเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับโปรตีนพาหะ โดยใช้ NHS และ EDC

3.4.1.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับทำ ELISA

ทำการเชื่อมติดซิโพรฟลอกซาซิน กับ Ovalbumin (OVA) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.1

3.4.1.3 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับแอนติเจน

ทำการหาปริมาณโปรตีนหลังจากเชื่อมต่อซิโพรฟลอกซาซินกับโปรตีนพาหะด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA assay) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย PBS และสารตัวอย่างที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:40 จากนั้นเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) แล้วเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและ สารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรกับค่าความเข้มเข้นของโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและทำการคำนวณกลับเพื่อหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างที่ได้

3.4.1.4 การวัดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอมีนอิสระ

ทำการเตรียมโปรตีนมาตรฐาน และสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างในโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (sodium bicarbonate buffer, pH 8.5) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.05% (w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม SDS เข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตามด้วยกรด

ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดสารจากสูตร เพื่อทำให้ทราบถึงเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดของโปรตีนพาหะและ ซิโพรฟลอกซาซิน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้} = \frac{A_{335}\text{โปรตีนพาหะ} - A_{335}\text{โปรตีนที่เชื่อมกับซิโพรฟลอกซาซิน}}{A_{335}\text{โปรตีนพาหะ}} \times 100$$

3.4.2 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองด้วยแอนติเจน

3.4.2.1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน

ทำการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c หรือ ICR เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ด้วยซิโพรฟลอกซาซินที่ถูกเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA (CPFX-BSA) โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งโดยผสม CPFX-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) กับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วฉีดเข้าภายในช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนู จากนั้นทำการฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยผสมแอนติเจนปริมาณ 100 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) กับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) หลังจากการฉีดกระตุ้น 7 วัน ทำการเก็บเลือดหนูจากปลายหาง (tail bleeding) เพื่อแยกเอาซีรัมมาทำการทดสอบหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) จากนั้นเลือกหนูทดลองตัวที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงและสามารถจับกับซิโพรฟลอกซาซินอิสระได้มาทำการฉีดกระตุ้นหนูครั้งสุดท้ายด้วย CPFX-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมที่ไม่มีการผสมกับ Freund's adjuvant ก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วัน

3.4.2.2 การเตรียมซีรัม

นำเลือดหนูที่เก็บได้จากปลายหางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30-60 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2.3 การทำ indirect ELISA เพื่อวัดไตเตอร์แอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินในซีรัม

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย CPFX-OVA และ OVA ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี Tween20 (PBS-T) ที่มีความเข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ใน PBS มีความเข้มข้น 5% (w/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมซีรัมที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยเจือจางตั้งแต่ 1:1000 -1:1024000 ด้วยสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (Anti-Mouse IgG) ที่ถูกเชื่อมกับเอนไซม์ horse radish peroxidase (GAM-HRP) อัตราการเจือจาง 1:10000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย สับสเตรตของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3', 5,5" – tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายอยู่ใน ซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer,pH 4.0) ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานทดสอบชนิด 96 หลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader

3.4.3 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโมโลมา P3X เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 20% (v/v) โดยประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในวันหลอมรวมเซลล์ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นล้างด้วยด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

ทำการสลบหนูด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้ต่อไป ทำการเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยใช้กรรไกรตัดส่วนไขมันออกจากม้าม และตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดบนตะแกรงลวดตาถี่ โดยใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์ม้ามละเอียดแล้ว นำเซลล์ม้ามที่ได้ไปปั่นล้างในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์ม้ามที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3.2 มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา P3X ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3.1 ในอัตราส่วนเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยอีโลมาเป็น 1:3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อให้เซลล์ทั้งสองรวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ได้ปริมาตรเป็น 30 มิลลิลิตร นำไป ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆให้เซลล์ผสมกัน เติม 50% PEG (v/v) ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยควบคุมการหยดของ PEG ให้หมดภายในเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายขึ้นลงเบา เพื่อให้เซลล์กระจายไม่จับเป็นก้อน และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้าง PEG ส่วนที่ตกค้างออกจากเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นปิเปตสารละลายที่มีเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ

200 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา

เมื่อเซลล์มีการเจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน หรือไม่ตามวิธีในข้อ 3.4.3.4

3.4.3.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน

3.4.3.4.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย CPFX-OVA (ที่เตรียมได้ในข้อ 3.4.1.2) เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01M phosphate buffer saline (PBS) pH7.4 ที่มี tween20 (PBS-T) เข้มข้น 0.05% (w/v) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) เข้มข้น 5% (w/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PSB-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase เชื่อมอยู่ (GAM-HRP) หลุ่มละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.3.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับซิโพรฟลอกซาซินที่อยู่ในรูปอิสระ โดย ปิเปตสารละลายซิโพรฟลอกซาซิน เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร

ลงในจานหลุม ELISA ที่เคลือบด้วย CPFX-OVA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนยและล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์หรือซีรัมจากหนูจากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกในการคัดเลือกขั้นแรก (ข้อ 3.4.3.4.1) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารละลาย ซิโพรฟลอกซาซิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติมซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าหลุมที่ไม่มีการเติม ซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระแสดงให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่สามารถจับกับซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ จากนั้นทำการแยกเซลล์ ไฮบริโดมาจากหลุมนั้นให้ได้เป็นโคลนเดี่ยว โดยวิธี limiting dilution

3.4.3.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเพียงเซลล์เดียว นำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 (ข้อ 3.4.3.4.2) มาทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม ด้วยอาหาร HT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) เมื่อเซลล์เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ มาตรวจหาว่าเซลล์ยังคงมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน และสามารถจับกับ ซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ จากนั้นจึงทำการเลี้ยงขยายขนาดเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บ มาเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% (v/v) ให้อยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด (log phase) มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้งและเติมน้ำตาเก็บเซลล์แช่แข็งที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้น 10% (v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็ง ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปแช่แข็งที่

อุณภูมิ -70 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นจึงย้ายลงไปเก็บในถังในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว ทำการละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทันทีที่น้ำยาเก็บเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v)

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบ

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยชุดตรวจสอบ isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไอโซไทป์ (Isotyping specific antibody) ชนิด IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM มาเจือจางด้วย PBS ให้มีอัตราการเจือจาง 1:6000 เท่า ลงในจาน ELISA ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบไอโซไทป์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มีเอนไซม์ HPR เชื่อมอยู่ โดยที่แอนติบอดีทุติบภูมิมีความจำเพาะกับ Fab (HRP-Rabbit anti mouse IgG Fab specific) ของ IgG ของหนู ที่เจือจาง 1:2000 เท่าใน PBS บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (50% of inhibition concentration; IC_{50}) เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เทียบกับที่ไม่ใส่สารแข่งขัน และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการเติมลงไปผสมกับสาร CPFX ที่มีความเข้มข้น $5x10^{-7}$ – $1x10^{-2}$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และสารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่าล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ และคำนวนค่า LOD โดยคำนวณจากการนำค่า B_0-3SD เมื่อ B และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่มีการเติมแอนติเจนและไม่เติมแอนติเจน ตามลำดับ และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน มาเปรียบเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (% cross reactivity) กับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มของควิโนโลน โดยจะทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้กับสารอื่นๆ ทั้งในกลุ่มและนอกกลุ่มควิโนโลนด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเจือจางที่เหมาะสม และเติมลงไปผสมกับ ซิโพรฟลอกซาซิน และตัวแข่งขันอื่นที่ต้องการทดสอบซึ่งเป็นสารกลุ่มควิโนโลน จำนวน 5 ชนิด คือ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และโอฟลอกซาซิน และสารนอกกลุ่มอีก 4 ชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูแรน ฟูราโซลิโดน เททราไซคลิน และ คลอแรมเฟนิคอล ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y

เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่าล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่ง หรือ ค่า IC_{50} หาได้จากการนำค่า 50% B/B_0 มาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้น จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่สารแข่งขันแต่ละตัวมาหาค่า IC_{50} และคำนวนหาเปอร์เซนต์ปฏิกิริยาข้ามจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของซิโพรฟลอกซาซิน } X\ 100}{IC_{50} \text{ ของสารที่ต้องการตรวจสอบ}}$$

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต่อซิโพรฟลอกซาซินมาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวน (spinner flask) ขนาด 1 ลิตร โดยปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที และบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ โปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column)

3.4.5.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) 5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในเอทานอลเข้มข้น 20% (w/v) มาล้างด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 เพื่อปรับภาวะคอลัมน์ให้เข้าสู่ภาวะสมดุลโดยการปรับอัตราการไหล (flow rate) ให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 แล้วลงในคอลัมน์โปรตีนจีปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทำการล้างโปรตีนอื่นที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายจากขั้นตอนนี้ไว้ประมาณ 1 มิลลิลิตร โดยสารละลายนี้ถือว่าเป็น unbound fraction จากนั้นทำการแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โดยใช้ 0.1 M glycine-HCl pH 2.7 โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจาก

คอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยในหลอดเก็บสารละลายจะมี 1 M tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 65 ไมโครลิตร เพื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างจากสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ให้เป็นกลาง จากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำมาตรวจสอบหาแอนติบอดีในแต่ละหลอดด้วยวิธี Indirect ELISA จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียน โครมาโทแกรม แล้วเก็บหลอดที่มีแอนติบอดีที่ต้องการมารวมกันเพื่อนำไปไดอะไลซิสด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.4.5.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

ทำการหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS และเจือจางสารตัวอย่างในอัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:40 และทำการทดสอบตามข้อ 3.4.1.3

3.4.5.3 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ELISA

3.4.5.3.1 การหาปริมาณแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

การหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ได้จากการทำไดอะไลซิสไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโมเมตร และคำนวนหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์เอกซ์ทิงชัน (extinction coefficient) จากสูตร

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

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

3.4.5.3.2 การหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์

ทำการหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาทำ indirect ELISA และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีและค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้เพื่อหาปริมาณ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์

3.4.5.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.5.4.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรสิสแบบเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) โดยเตรียม 10% separating gel ที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.2 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียม 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel และใส่หวีลงในส่วน stacking gel เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ของหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว 30 นาที

3.4.5.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายสีย้อมที่มี SDS, beta-mercaptoethanol และ bromophenol blue (SDS staining dye) อัตราส่วน 1:1 (v/v) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปิเปตลงในหลุมเจล

3.4.5.4.3 การทำอิเล็กโทรฟอเรซิส

ทำการแยกแอนติบอดีโดยนำเจลที่เตรียมได้ในข้อ 3.4.5.4.1 ประกอบเข้ากับเครื่องทำอิเล็กโทรฟอเรซิส (electrophoresis chamber) ทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (running buffer) ทั้งส่วนบนและส่วนล่างของเครื่อง นำสารตัวอย่างปิเปตในหลุมเจล หลุมละไม่เกิน 60 ไมโครลิตร ส่วนหลุมของ protein marker เติมลงไปด้วยปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ต่อขั้วไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนที่ไปจนถึงปลายสุดของเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า และนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสี coomassie blue (staining solution) เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยสารละลาย เอทานอลที่มีกรดอะซิติดผสมอยู่ (destaining solution) จนกว่าเจลจะใสและเห็นสีของแถบโปรตีนชัดเจน

3.4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความไวด้วยวิธี indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.2

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA

ในการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนโดยการหลั่งแอนติบอดีต่อสารแอนติเจนชนิดนั้น สารที่จะเป็นแอนติเจนนั้นต้องมีขนาดโมเลกุลมากกว่า 5000 ดาลตัน จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) เนื่องจากซิโพรฟลอกซาซินมีขนาดโมเลกุลเล็กที่เรียกว่า แฮปเทน (hapten) ซึ่งไม่สามารถใช้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองได้ จึงต้องรวมกับโปรตีนพาหะ (carrier-protein) ให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่พอที่จะเป็นแอนติเจนได้ ดังนั้นจึงทำการเชื่อมต่อ ซิโพรฟลอกซาซินกับโปรตีนขนาดใหญ่ก่อนนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

4.1.1 ผลการเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการเชื่อมต่อซิโพรฟลอกซาซินกับโปรตีน BSA โดยใช้ NHS และ EDC ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.1 จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับซิโพรฟลอกซาซินด้วยวิธี BCA ดังตารางที่ 4.1 โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร มาทำการเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานของ BSA (ตารางที่ ก.1) จากผลการทดลองพบว่า CPFX-BSA มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน CPFX-BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:10	0.327	1.75
1:20	0.225	1.67
1:40	0.171	1.40
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		1.60

เมื่อทราบความเข้มข้นของ CPFX-BSA โดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของโปรตีน BSA กับซิโพรฟลอกซาซิน โดยนำ CPFX-BSA มาทำการหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของหมู่เอมีนของโปรตีน BSA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ CPFX ด้วยวิธี TNBS พบว่าหมู่เอมีนของโปรตีน BSA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ ซิโพรฟลอกซาซิน คิดเป็น 37.1 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของ BSA กับ CPFX ด้วยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{335} ของ BSA	A_{335} ของ CPFX-BSA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ
1.00	1.741	1.091	37.3
0.50	1.092	0.679	37.8
0.25	0.801	0.511	36.2
ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของ CPFX-BSA เฉลี่ย			37.1

4.1.2 ผลการเตรียมแอนติเจนสำหรับทำ ELISA

ทำการเชื่อมต่อโปรตีน OVA กับ ซิโพรฟลอกซาซินเพื่อใช้ในการเคลือบบนก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.2 จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อต่อกับซิโพรฟลอกซาซินด้วยวิธี BCA ดังตารางที่ 4.3 โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร มาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ OVA (ตารางที่ ก.2) จากผลการทดลองพบว่า CPFX-OVA มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน CPFX-OVA โดยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:10	0.410	1.89
1:20	0.314	1.73
1:40	0.263	1.43
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		1.68

เมื่อทราบความเข้มข้นของ CPFX-OVA โดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของโปรตีน OVA กับซิโพรฟลอกซาซิน โดยนำ CPFX-OVA มาทำการหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของหมู่เอมีนของโปรตีน OVA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ CPFX ด้วยวิธี TNBS พบว่าหมู่เอมีนของโปรตีน OVA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ ซิโพรฟลอกซาซิน คิดเป็น 31.5 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของโปรตีน OVA กับ CPFX โดยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{335} ของ OVA	A_{335} ของ CPFX-OVA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ
1.00	2.012	1.44	28.4
0.50	1.605	1.11	30.8
0.25	1.471	0.95	35.4
ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของ CPFX-OVA เฉลี่ย			31.5

4.2 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองทั้งหมด 13 ตัว โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1-3 ใช้หนู สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ และกลุ่มที่ 4 ใช้หนู สายพันธุ์ ICR (outbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัว โดยหนูทั้งหมดทำการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน CPFX-BSA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อตัว จำนวน 4 ครั้ง หลังจากทำการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และแยกซีรัมมาหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA เพื่อคัดเลือกหนูทดลองที่มีระดับแอนติบอดีสูงอย่างน้อย 1000 (Liddell และ Cryer, 1991) และสามารถจับกับ ซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระได้ โดยพบว่าหนูทดลองทั้ง 13 ตัว หลังจากการฉีดกระตุ้นครบทั้ง 4 ครั้ง มีระดับการสร้างแอนติบอดีในช่วง 8,000-2,048,000 โดยมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันในการแย่งจับของซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระอยู่ในช่วง 37-65 % แสดงดังตารางที่ 4.5 จากนั้นจึงทำการ หลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 4.5 ระดับการเจือจางของแอนติบอดี และ เปอร์เซ็นต์การแข่งขัน ของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPFX-BSA

หนูกลุ่มที่	หนูตัวที่	ระดับการเจือจางของแอนติบอดี	เปอร์เซ็นต์แข่งขัน (%)
1	1	1:16,000	47
	2	1:16,000	51
	3	1:8,000	51
2	4	1:128,000	45
	5	1:8,000	57
	6	1:64,000	37

ตารางที่ 4.5 ระดับการเจือจางของแอนติบอดี และ เปอร์เซ็นต์การแข่งขัน ของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPFX-BSA

3	7	1:64,000	56
	8	1:8,000	42
	9	1:128,000	51
	10	1:64,000	65
4	11	1:512,000	58
	12	1:2,048,000	61
	13	1:2,048,000	61

ในหนูกลุ่มที่ 4 ซึ่งเป็นหนูสายพันธุ์ ICR เพศเมีย นั้นพบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซินในซีรัมของหนูเป็นจำนวนมากอาจเกิดได้จากการที่หนูสายพันธุ์ IRC ซึ่งเป็นหนูเอ้าท์เบรด (outbred strain) เนื่องจากหนูแต่ละตัวแม้อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีภูมิหลังทางพันธุ์กรรมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสารพันธุกรรมที่ได้รับจากฝ่ายพ่อและแม่ ดังนั้น ปัจจัยด้านความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณการสร้างแอนติบอดีได้

4.3 ผลของการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา

เมื่อทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองครบ 4 ครั้ง และทำการตรวจสอบระดับแอนติบอดีในซีรัมจากเลือดหนูแล้วพบว่าหนูมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน หลังจากนั้นจึงทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยอีโลมา โดยการหลอมรวมทั้ง 13 ครั้ง ใช้เซลล์มัยอีโลมาชนิด P3X โดยนำเซลล์ม้ามของหนูทดลองมาผสมกับเซลล์มัยอีโลมา แล้วนำไปปั่นเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกมารวมกัน จากนั้นใช้ 50% PEG (v/v) ในขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์ จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมในอาหาร

HAT เพื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โดยในแต่ละครั้งของการหลอมรวมเซลล์ได้แบ่งเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 960 หลุม ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ประมาณ 10 วัน ทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญ ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมนั้นมาทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และแอนติบอดีมีความสามารถจับกับ ซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA ตามลำดับ โดยผลการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 13 ครั้ง แสดงดังตาราง 4.6 ซึ่งส่วนมากพบว่าหลังจากทำการย้ายโคลนที่ผ่านการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม และทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระอีกครั้งด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า มีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวนหลายโคลนไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากการถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม หรือ สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถเจริญได้หลังถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม มักจะไม่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินที่อยู่ในรูปอิสระ อาจเนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความไม่คงตัว ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ไฮบริโดมาบางส่วนไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอด ส่วนเซลล์ไฮบริโดมากลุ่มที่มีชีวิต อาจเกิดการกำจัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินออกจากดีเอ็นเอของเซลล์ ทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซิน

ตารางที่ 4.6 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมาเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ครั้งที่	ระดับการเจือจางแอนติบอดีก่อนหลอมรวม	จำนวนหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญ	1^0 screening	2^0 screening	จำนวนโคลนที่ได้
1	1:16,000	175	21	3	0
2	1:16,000	203	17	2	0
3	1:8,000	193	25	9	0
4	1:128,000	371	80	5	0
5	1:64,000	590	33	12	2
6	1:8,000	430	47	2	0
7	1:128,000	805	312	21	5
8	1:64,000	796	103	6	0
9	1:64,000	810	62	11	2
10	1:8,000	647	46	5	0
11	1:2,048,000	625	320	42	7
12	1:2,048,000	725	121	9	2
13	1:512,000	837	96	15	0

จากผลการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 15 ครั้ง หลังผ่านการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA เพื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถดังกล่าวจำนวน 18 โคลน จึงทำการถ่ายเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุม และทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA อีกครั้ง พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระเหลืออยู่จำนวน 4 โคลนจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ในแต่ละหลุมมาทำการแยกเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution

ตารางที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ทดสอบโดยวิธี indirect ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดี	แอนติเจนที่ตรึง	
	CPFX-OVA (5µg/ml)	BSA (5µg/ml)
5-7F12	1.092	0.078
7-7G9	1.537	0.137
7-5A1	1.204	0.051
11-5A1	1.711	0.076
C-*	0.075	0.081
C+**	1.387	1.437

หมายเหตุ * อาหารเลี้ยงเซลล์ ** ซีรัมของหนูที่ตอบสนองต่อการฉีดกระตุ้น

เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ในแต่ละโคลนมาจากต้นกำเนิดเดียวกันและยังคงสามารถผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ ซึ่งรหัสของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จำนวน 4 โคลนคือ 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 และ 11-5A1 (ตาราง 4.7) จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละโคลนมาทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อนำเซลล์ไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีในแต่ละโคลนที่ได้มาทำการตรวจสอบคุณลักษณะของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

ไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจสอบได้โดยชุดตรวจสอบ iso typing kit ขอบบริษัท Sigma-Aldrich เพื่อช่วยในการยืนยันว่าเซลล์ ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเพียงเซลล์เดียว นอกจากนั้นในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบ สัมพรรคภาพจำเป็นต้องทราบกลุ่มย่อยของ IgG เพื่อที่จะได้เลือกใช้ชนิดของคอลัมน์ให้เหมาะสม เนื่องจากกลุ่มย่อยของ IgG แต่ละชนิด มีความสามารถในการจับกับโปรตีนเอ หรือ โปรตีนจี ด้วย affinity ต่างกัน จากการทดสอบ ไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 ดังตาราง 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยชุดตรวจสอบ isotyping kit

โมโคโคลนอลแอนติบอดี	A_{450}					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
5-7F12	2.100*	0.652	0.091	0.092	0.103	0.109
7-7G9	2.095*	0.672	0.088	0.089	0.151	0.308
7-5A1	2.112*	0.669	0.093	0.090	0.104	0.295
11-5A1	2.236*	0.433	0.125	0.347	0.134	0.420
ตัวควบคุมบวก IgG_{2b}	0.247	0.777	2.285*	0.358	0.202	0.729

หมายเหตุ * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่สูงสุดความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซินอิสระ

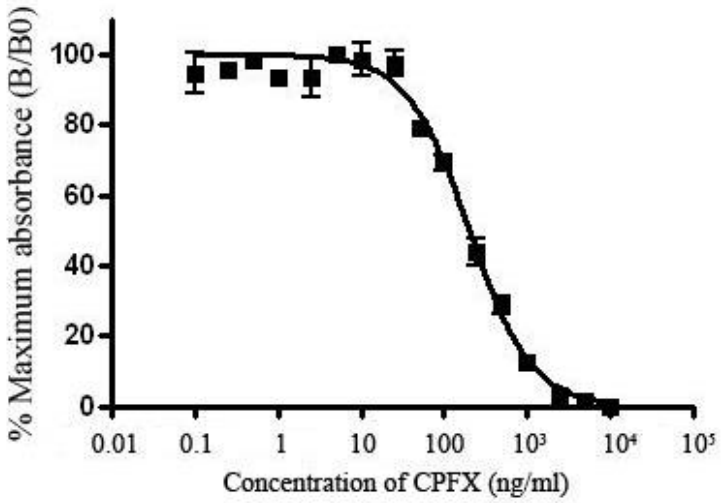
ในการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นต้องทำการหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA เนื่องจากในแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แตกต่างกัน จึงทำให้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในสารละลายแตกต่างกัน จึงจำเป็นที่ต้องหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป ในการหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA จะทำการเลือกค่าระดับความเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง ประมาณ 1 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่า แต่ละโคลนต้องใช้การเจือจางที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1:10 และ 1:640 ดังแสดงในตารางที่ 4.9 โดยใช้ CPFX-OVA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเคลือบก้นหลุมจานทดสอบ ELISA

ตารางที่ 4.9 ระดับการเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA และใช้ CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบก้นหลุม

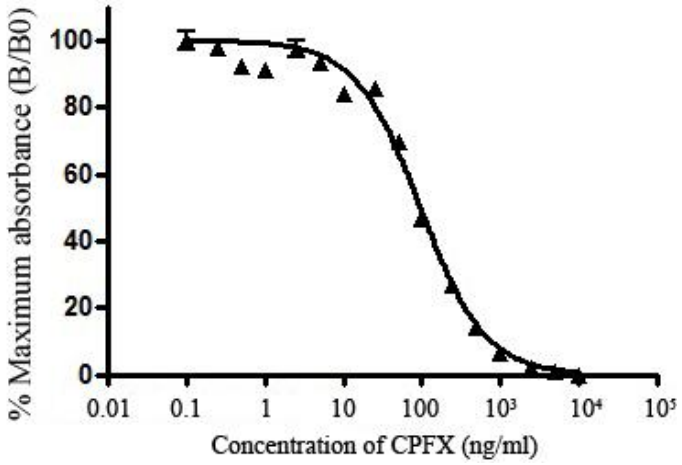
ระดับการเจือจางของแอนติบอดี	A_{450}			
	5-7F12	7-7G9	7-5A1	11-5A1
ไม่เจือจาง	1.221	1.846	1.816	1.786
1:10	1.162*	1.839	1.838	1.801
1:20	0.915	1.906	1.686	1.841
1:40	0.847	1.777	1.537	1.757
1:80	0.641	1.752	1.736	1.669
1:160	0.539	1.586	1.577	1.635
1:320	0.335	1.375	1.448	1.488
1:640	0.199	1.076*	1.099*	1.162*

หมายเหตุ * แสดงค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

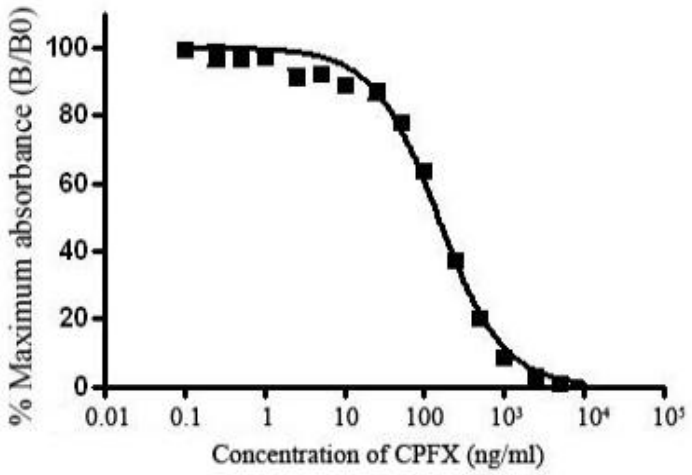
ผลจากการหาระดับการเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมของโคลน 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 และ11-5A1 คือ 1:10, 1:640, 1:640 และ 1:640 ตามลำดับ จากนั้นทำการหาความไวของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทำการหาค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 4 โคลน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้สารแข่งขันเป็นซิโพรฟลอกซาซินที่อยู่ในรูปอิสระ ความเข้มข้น 10^{-6}-10^{7} พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.1-4.4 (ตารางที่ ก.3)



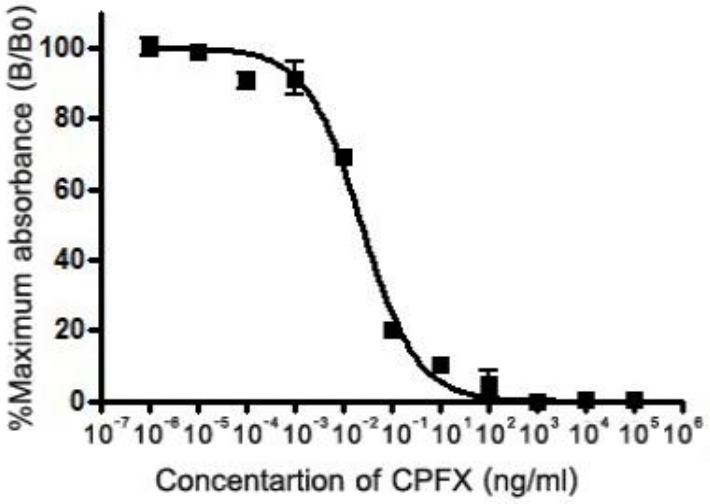
รูปที่ 4.1 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5-7F12 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:10 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 201.70 ng/ml และ LOD เท่ากับ 63 ng/ml



รูปที่ 4.2 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 7-7G9 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:640 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 95.24 ng/ml และ LOD เท่ากับ 37 ng/ml



รูปที่ 4.3 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 7-5A1 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:640 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 148.40 ng/ml และ LOD เท่ากับ 45 ng/ml



รูปที่ 4.4 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 11-5A1 ต่อ CPFX อิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดี 1:640 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.358×10^{-2} ng/ml และ LOD เท่ากับ 9.655×10^{-4} ng/ml

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 4 โคลน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 และ11-5A1 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 201.7, 95.24, 148.4 ng/ml และ 23.58 pg/ml ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 63, 37, 45 ng/ml และ 0.97 pg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 11-5A1 มีความไวสูงที่สุดจึงทำการคัดเลือกเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.10 สรุปค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

รหัสโคลน	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
5-7F12	201.70	63
7-7G9	95.24	37
7-5A1	148.40	45
11-5A1	$2x10^{-2}$	$9x10^{-4}$

4.4.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

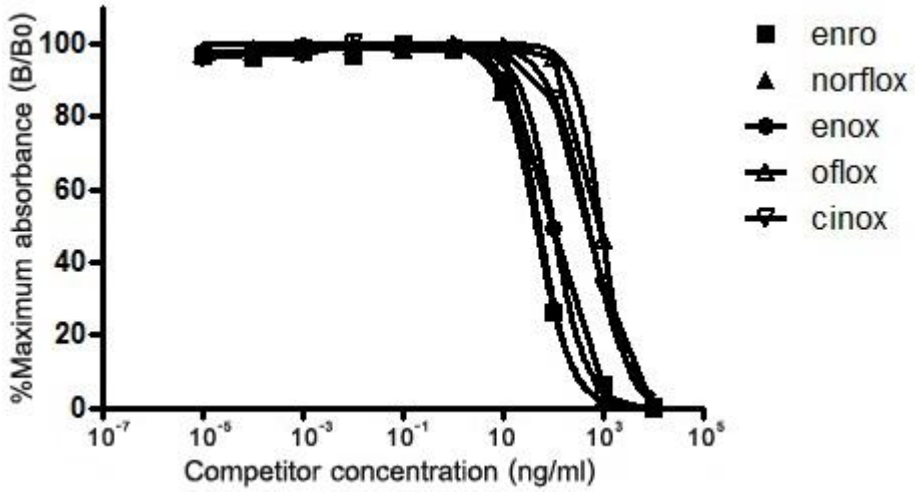
ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ตัวแข่งขันเป็นสารในกลุ่มควิโนโลน จำนวน 5 ชนิด คือ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และโอฟลอกซาซิน และสารนอกกลุ่มอีก 4 ชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน เททราไซคลิน และ คลอแรมเฟนิคอล นำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณโดยใช้ โปรแกรม graph pad prism 4 เพื่อหาค่า IC_{50} ของแต่ละสาร โดยปฏิกิริยาข้ามของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารต่างๆ สามารถหาได้จากเปอร์เซ็นของ IC_{50} ของ ซิโพรฟลอกซาซินต่อค่า IC_{50} ของสารอื่นๆ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของซิโพรฟลอกซาซิน } X\ 100}{IC_{50} \text{ ของสารที่ต้องการตรวจสอบ}}$$

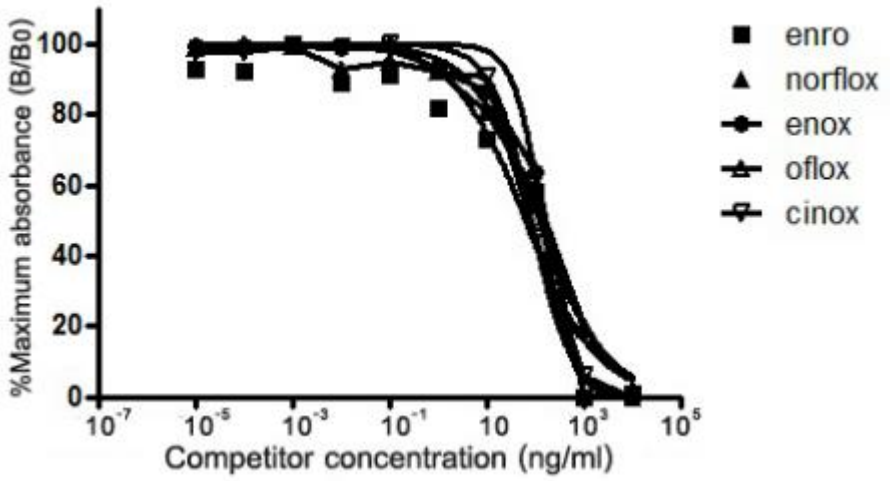
จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนที่ใช้ในการทดสอบ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม สรุปดังตารางที่ 4.11 ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะมีความจำเพาะสูง แต่แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดหนึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งปฏิกิริยาข้ามอาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณีคือ กรณีที่แอนติเจนอาจมี อิพิโทปบางส่วนเหมือนกัน และกรณีที่แอนติบอดีอาจจะจับกับอิพิโทปอื่นที่มีโครงสร้างหรือมีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงคาดว่าเนื่องจากสารภายในกลุ่มควิโนโลนด้วยกันจะมีโครงสร้างของโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน หากนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kun และคณะ (2010) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPFX เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม เช่นเดียวกัน โดยเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ เอนโรฟลอกซาซิน 84% (Kun และคณะ, 2010)

ตารางที่ 4.11 ค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารกลุ่มในควิโนโลน และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA

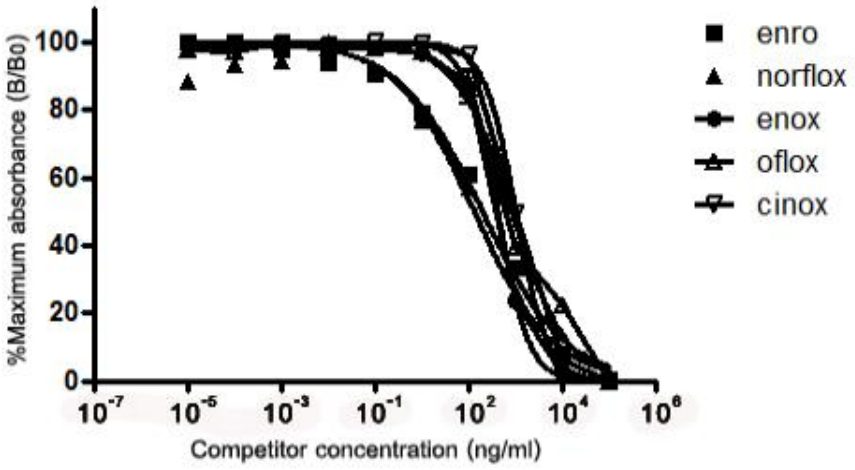
สารแข่งขัน	5-7F12		7-7G9		7-5A1		11-5A1	
	IC_{50} (ng/ml)	% CR	IC_{50} (ng/ml)	% CR	IC_{50} (ng/ml)	% CR	IC_{50} (ng/ml)	% CR
Quinolone								
Ciprofloxacin	201.7	100	95.24	100	148.4	100	$2.3x10^{-2}$	100
Enrofloxacin	45	448	62.7	152	19.37	766	374.30	<0.01
Norfloxacin	51.2	394	118	81	13.1	1133	5.36	0.44
Enoxacin	98.7	204	137.3	70	41	362	9.93	0.24
Cinoxacin	505.4	40	81.1	117	66.3	224	410.0	<0.01
Ofloxacin	898.5	22	123.7	77	81.7	182	387.1	<0.01
Other group								
Nitrofurantoin	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01
Furazolidone	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01
Tetracycline	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01
Chloramphenicol	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01	>100,000	<0.01



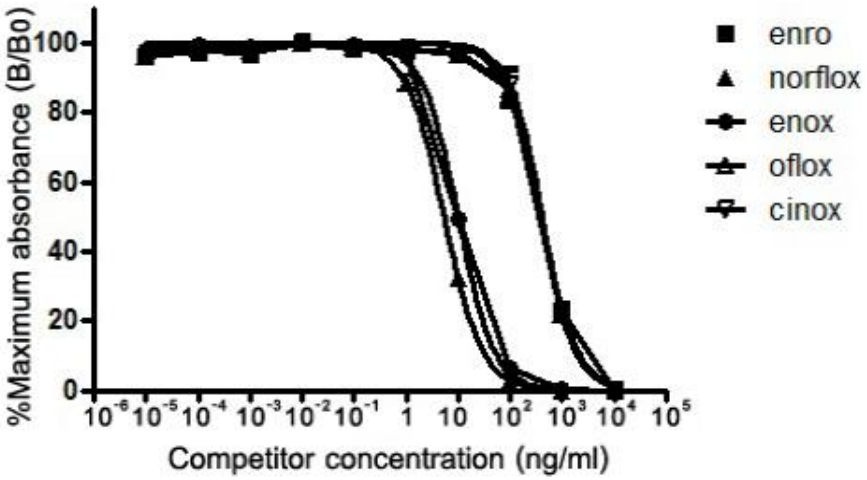
รูปที่ 4.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5-7F12 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 5-7F12 เจือจาง 1:10 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซินที่มี ความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml



รูปที่ 4.6 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-7G9 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-7G9 เจือจาง 1:640 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซินที่มี ความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml



รูปที่ 4.7 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-5A1 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 7-5A1 เจือจาง 1:640 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซินที่มี ความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml



รูปที่ 4.8 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 โดยวิธี indirect competitive ELISA ต่อสารกลุ่มควิโนโลน โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml เคลือบที่ก้นหลุม และแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 เจือจาง 1:640 แข่งขันกับ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และ โอฟลอกซาซินที่มี ความเข้มข้น 10^{-5}-10^{4} ng/ml

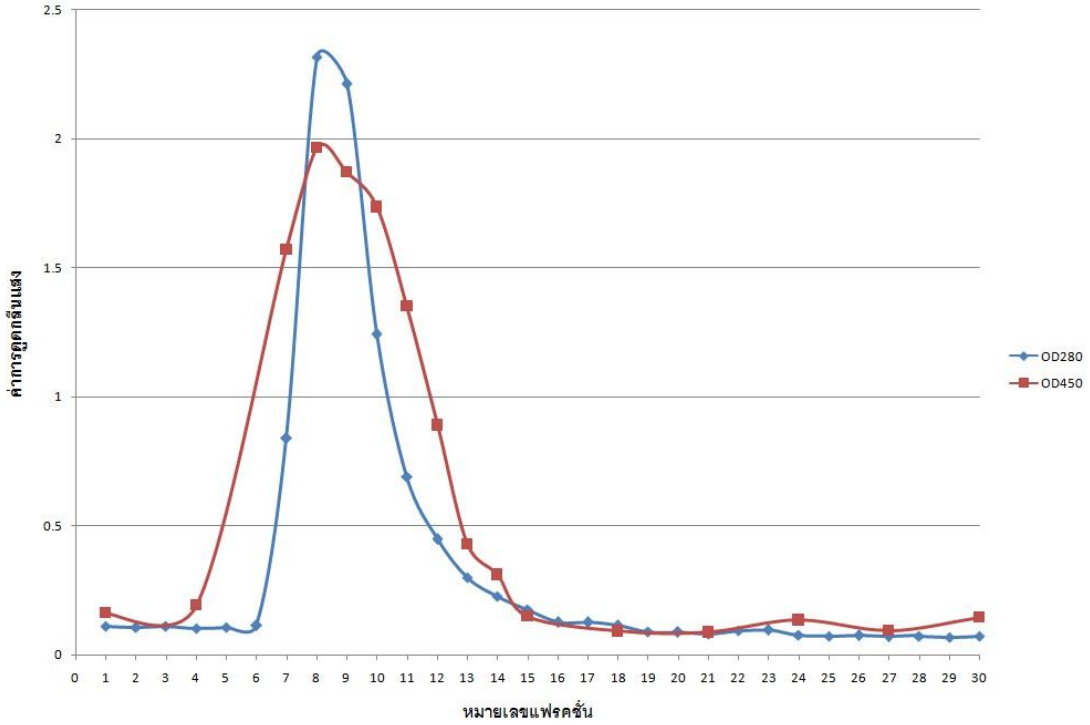
ซึ่งพบว่าโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 11-5A1 มีความจำเพาะต่อซิโปรฟลอกซาซินสูงที่สุด โดยมีปฏิกิริยาข้ามกับสาร นอร์ฟลอกซาซิน และ อีนอกซาซิน 0.44 และ

0.24 เปอร์เซ็น ตามลำดับ และจากการทดสอบกับสารนอกกลุ่ม ควิโนโลนอีก 4 ชนิด มีค่า IC_{50} มากว่า IC_{50} ของ ซิโพรฟลอกซาซินเกิน 1,000 เท่า จึงมีปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01% ดังตารางที่ 4.11 รูปที่ 4.8

4.5 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.5.1 ผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีเซฟาโรส

ทำการเลี้ยงเซลล์ 11-5A1 และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพโดยใช้โปรตีนจี ที่พบได้บนผนังเซลล์ของ β-hememolytic Streptococci strain C และ G โดยโปรตีนชนิดนี้สามารถจับกับส่วน Fc ของแอนติบอดีชนิด IgG (Abul และคณะ, 1994) การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้อาศัยหลักการโครมาโทกราฟี เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 11-5A1 มีไอโซไทป์เป็น IgG1 ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงกับโปรตีนจี ดังนั้นแอนติบอดีจึงถูกยึดจับติดกับคอลัมน์ และถูกชะออกมาโดยบัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 โดยนำแต่ละส่วน (fraction) ได้มาตรวจหาโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจว่าโปรตีนที่ได้เป็นแอนติบอดีที่ยังสามารถทำงานได้อยู่หรือไม่ ด้วยวิธี indirect ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (ตารางที่ ก.4, ภาคผนวก ก) โดยใช้ความเจือจางของแต่ละส่วนที่ 1:10,000 ได้ผลดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.9 โครมาโตแกรมที่ได้จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 11-5A1 ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส และชะโมโนโลนอลแอนติบอดีด้วย 0.1M glycine-HCl pH 2.7 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากโครมาโตแกรมพบว่าส่วนที่ 7-14 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 450 นาโนเมตร สอดคล้องกันจึงนำส่วนนั้นๆมารวมกัน และทำการไดอะไลซีสเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ออกจากสารละลายที่ได้ ซึ่งแอนติบอดีที่ได้จะอยู่ใน pH 7.4 เพื่อเป็นการรักษาสภาพของแอนติบอดีทำให้สามารถเก็บแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วได้เป็นเวลานาน

4.5.2 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธ์แล้วมาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA (รูปที่ ก.3, ภาคผนวก ก) เพื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน BSA โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และหลังทำให้บริสุทธุ์แล้วมีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 6.10 และ 2.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ ก.5) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์นั้น มีความเข้มข้นของโปรตีนมากกว่าหลังการทำ

ให้บริสุทธิ์ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมีการเติมซีรัมเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงทำให้มีโปรตีนมากมายปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แต่เมื่ออาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะเหลือแต่โปรตีนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนจีในคอลัมน์เท่านั้น ส่วนโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะกับโปรตีนจีในคอลัมน์ก็จะถูกกำจัดไป

การหาปริมาณแอนติบอดีในรูปของ IgG หลังทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) จากการวัดความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร โดยอาศัยหลักการที่ว่า โมเลกุลของแอนติบอดีมีกรดอะมิโน tyrosine และ tryptophan ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้ จึงสามารถนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของแอนติบอดีได้ พบว่ามีความเข้มข้นของแอนติบอดี 1.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาณแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติบอดีที่สร้างจากแอนติบอดีที่ผ่านการให้บริสุทธิ์และทราบค่าความเข้มข้นแล้ว (รูปที่ ก.4) พบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นของแอนติบอดี 6.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.8) และนำค่าปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีที่ได้มาคำนวณหา % recovery และคำนวณเป็นค่าความบริสุทธิ์ (% purity) ของแอนติบอดีในโปรตีนทั้งหมดหลังการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 9.60% และ 76.53% ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.12 โดยผลของค่า % recovery ค่อนข้างต่ำอาจเนื่องจากในขั้นตอนการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านคอลัมน์มีอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อาจเป็นอัตราการไหลที่เร็วเกินไป จึงคาดว่าแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่สามารถจับกับโปรตีนจีที่อยู่ในคอลัมน์ได้ทั้งหมด เป็นผลให้สูญเสียแอนติบอดีบางส่วนไป มีผลทำให้ได้ % recovery ค่อนข้างต่ำ

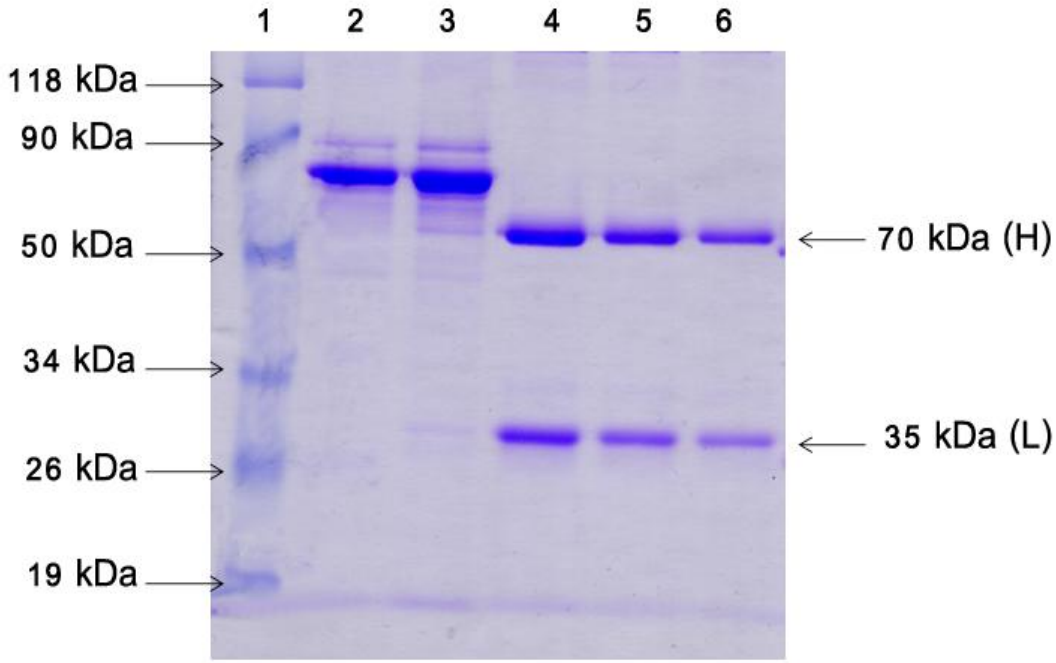
ตารางที่ 4.12 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ให้บริสุทธิ์

การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีน		ปริมาณแอนติบอดี		%purity	%recovery
		ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)	ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)		
ก่อน	400	6.10	2440	0.34	136.0	5.57	-
หลัง	8	2.13	17.04	1.63	13.04	76.53	9.60

4.5.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์

การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 ภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์ว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด และมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่หรือไม่ ด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีแยกโปรตีนตามขนาด เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีระหว่างก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ จะเห็นว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์จะมีโปรตีนจากซีรัมปนอยู่มาก แต่เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วโปรตีนชนิดอื่นถูกกำจัดออกไป โดยช่องโมโนโคลนอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะพบแถบโปรตีน 2 แถบ เนื่องจากการทำ SDS-PAGE มีการเติม 2-mercaptoethanol เข้าไปด้วย ซึ่งสารนี้จะเข้าไปตัดพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้โปรตีนสายยาว (heavy chain) และโปรตีนสายสั้น (light chain) แยกออกจากกัน

โดยมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถหาได้จากความสัมพันธ์ของค่าลอกการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ (relative mobility; R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ก.5) แล้วนำระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนสายสั้น และโปรตีนสายยาวไปเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่กับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน จากการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 พบว่า มวลโมเลกุลของโปรตีนสายยาว (H) และสายสั้น (L) เท่ากับ 70 และ 35 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.10 แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE

โดยช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

2 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS

3 อาหารเลี้ยงเซลล์ 11-5A1 ก่อนทำให้บริสุทธิ์

4-6 อาหารเลี้ยงเซลล์ 11-5A1 หลังทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 5 3 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.13 ค่า R_f และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

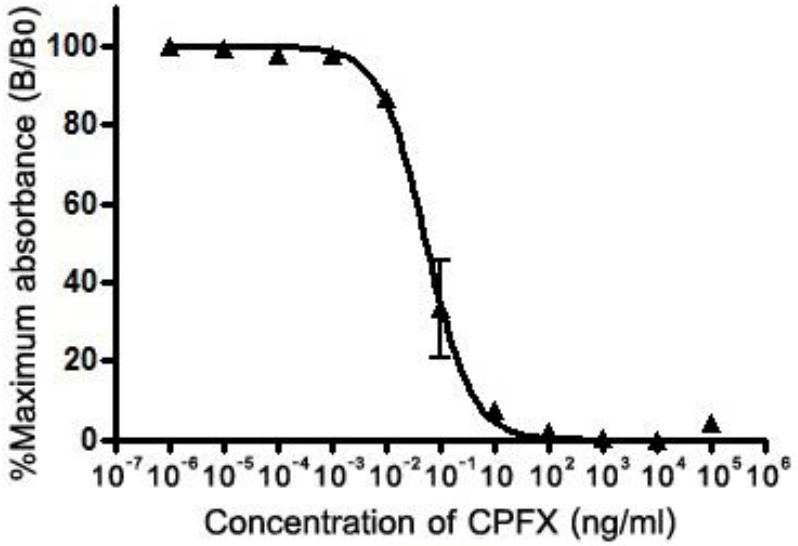
โปรตีน	มวลโมเลกุล (kDa)	Relative mobility (R_f)
β-galactosidase	118	0.15
BSA	90	0.22
OVA	50	0.41
Carbonic anhydrase	34	0.61
β-lactoglobulin	26	0.76
Lysozyme	19	1
Heavy chain	70	0.40
Light chain	35	0.70

4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

4.5.1 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจากโคลน 11-5A1 กับ แอนติเจน CPFX-OVA โดยทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์กับแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยวิธี indirect ELISA โดยเลือกความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจน CPFX-OVA ที่เคลือบก้นหลุมเท่ากับ 2 µg/ml และ 5 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.16 จากนั้นทำการหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการหาค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้

ซิโพรฟลอกซาซินที่อยู่ใน รูปอิสระ ความเข้มข้น 10^{-6}-10^{7} pg/ml พบว่า มีค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 54.20 และ 0.763 pg/ml ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.11 (ตารางที่ ก.9)



รูปที่ 4.11 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 11-5A1 ต่อ CPFX อิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุม และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ เข้มข้น 2 µg/ml มีค่า IC_{50} และ ค่า LOD เท่ากับ 54.20 และ 0.76 ng/ml ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบความไวของแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน ระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ พบว่า แอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 หลังทำให้บริสุทธิ์มีความไวต่อ ซิโพรฟลอกซาซินใกล้เคียงกับค่าเดิมดังตาราง ที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 การเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 11-5A1 ต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย ใช้แอนติเจน CPFX-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม

แอนติบอดี	IC_{50} (pg/ml)	LOD (pg/ml)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	23.58	0.97
หลังทำให้บริสุทธิ์	54.20	0.76

จากผลการทดลองหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ที่มีความจำเพาะต่อซิโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระ โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ต่ำกว่าค่าที่สหภาพยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ ว่าให้มีปริมาณตกค้างของ ซิโพรฟลอกซาซิน ในโค กระบือสุกร กระต่าย แพะ และสัตว์ปีก ได้ไม่เกิน 100-300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 จึงเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็น ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน โดยวิธี ELISA ต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการเชื่อมต่อซิโพรฟลอกซาซินกับ BSA เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนของซิโพรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ได้เท่ากับ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดสอบการเชื่อมติดโดยวัดการใช้หมู่เอมีน ด้วยวิธี TNBS พบว่า BSA มีการใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมต่อกับซิโพรฟลอกซาซินคิดเป็น 37.1 เปอร์เซ็นต์ และได้นำ CPFX-BSA เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองจำนวน 4 กลุ่ม โดยใช้หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c ในหนูทดลองกลุ่มที่ 1-3 และสายพันธุ์ ICR ในหนูทดลองกลุ่มที่ 4 โดยฉีดกระตุ้นหนูทดลองทั้งหมด 13 ตัว เมื่อนำซีรัมของหนูทดลองมาหาระดับแอนติบอดีพบว่า ให้ระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง 1:8,000 ถึง 1:2,048,000 จากนั้นจึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์มัยอีโลมาชนิด P3X โดยการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 13 ครั้ง พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาส่วนใหญ่ที่มีชีวิตรอดมักจะสูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อซิโพรฟลอกซาซินหรือไม่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ ซิโพรฟลอกซาซินที่อยู่ในรูปอิสระได้ โดยจากการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 13 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน จำนวน 4 โคลน ได้แก่ 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 และ 11-5A1 จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ จากการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 4 โคลน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 และเมื่อทดสอบความไวของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน ได้แก่ 5-7F12, 7-7G9, 7-5A1 และ 11-5A1 ให้ ค่า IC_{50} เท่ากับ 201.70, 95.24, 148.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 23.58 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 63, 37, 45 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.97 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 11-5A1 มีความไวสูงที่สุด จากนั้นทำการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม ควิโนโลนจำนวน 5 ชนิด คือ เอนโรฟลอกซาซิน นอร์ฟลอกซาซิน อีนอกซาซิน ซินอกซาซิน และโอฟลอกซาซิน และสารนอกกลุ่มอีก 4 ชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน เททราไซคลิน และคลอแรมเฟนิคอล พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 5-7F12, 7-7G9 และ 7-5A1 มีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนที่ทำการทดสอบ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11-5A1 มีปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับ

สารในกลุ่ม ควิโนโลนสองชนิด คือ นอร์ฟลอกซาซิน และ อีนอกซาซิน โดยเปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาข้ามเท่ากับ 0.44 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม จากนั้นจึงนำแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 11-5A1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพโดยใช้โปรตีน จีเซฟาโรสคอลัมน์ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 76 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการทดสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์ และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11-5A1 ของโปรตีนสายยาว และสายสั้น เท่ากับ 70 และ 35 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาทดสอบความไวอีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบกับความไวของแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีความไวต่อ ซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระ ใกล้เคียงกับแอนติบอดีก่อนผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 54.20 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.76 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากงานวิจัยนี้พบว่า โมโนโคนอลแอนติบอดี 11-5A1 มีความจำเพาะต่อซิโพรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระ โดยความไวของแอนติบอดีที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่สหภาพยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ ว่าให้มีปริมาณตกค้างของ ซิโพรฟลอกซาซิน ในโคกระบือสุกร กระต่าย แพะ และสัตว์ปีก ได้ไม่เกิน 100-300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-5A1 จึงเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน โดยวิธี ELISA ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนต่อไปควรนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะซิโพรฟลอกซาซิน ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง โดยศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ เช่น วิธีการสกัดสารออกจากตัวอย่าง ปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมอย่างละเอียด เพื่อเพิ่มความไว ยืดอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ และความสะดวกในการใช้งานของชุดตรวจสอบในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธนาภัทร ปาลกะ. เทคโนโลยีทางภูมิคุ้มกันวิทยา. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

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

มนัสพงศ์ ชูศรี. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

วิทยาศาสตร์การแพทย์, กรม. 2555. สถาณการณ์เชื้อดื้อยาในประเทศไทย [online]. แหล่งที่มา : http://nih.dmsc.moph.go.th/fsheet/showimgpic.php?id=5 [23 มีนาคม 2555]

ศานิกานต์ เสนีวงศ์. ชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551.

สาธารณสุข, กระทรวง. 2533 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 39) พ.ศ. 2533 เรื่อง ยาที่ต้องแจ้งคำเตือนการใช้ยาไว้ในฉลากและที่เอกสารกำกับยา

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

ภาษาอังกฤษ

Abul K., Abbas, J.S.P., and Andrew, H. Cellular and Molecular Immunology. Pennsylvania, W.B. Saunders company, 1994.

Barron, D., Jimenez-Lozano, E., Cano, J. and Barbosa, J. (2001). Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B 759: 73-79.

Bertino, J., Jr. and Fish, D. (2000). The safety profile of the fluoroquinolones. Clinical Therapeutics 22: 798-817.

Bucknall, S., Silverlight, J., Coldham, N., Thorne, L. and Jackman, R. (2003). Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. Food Additives and Contaminants 20: 221-228.

Christodoulou, E., Samanidou, V. and Papadoyannis, I. (2007) Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. Journal of Chromatography B. 859: 246-255.

Duan, J. and Yuan, Y. (2001). Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 : 1087-1089.

Eleni, A., Victoria, F., and Ioannis, N. (2007). Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolone in chicken muscle and egg yolk. Journal of Chromatography B 859: 246-255

European Commission Regulation, No. 1181/2002/EC of 13 July 2002, Amending Annex I of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Official Journal of European Communities L 172/16, 2002, pp 4.

Gorla, N., Chiostri, E., Ugnia, L., Weyers, A., Giacomelli, N., Davicino, R. and Garcia, O.H. (1997). HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. Journal of Antimicrobial Agents 8: 253-256.

Hernandez-Arteseros, J. A., Barbosa, J., Compano, R. and Prat, M. D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. Journal of Chromatography A 945: 1-24.

Holtzapple, C.K., Buckley, S.A. and Stanker, L. H. (2001). Determination of fluoroquinolone in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography B 754: 1-9.

Johnstone, A. and Thorpe, R. Immunochemistry in practice. Blackwell Scientific Publication, 1982.

Kohler, G. and Milstein, C. (1975).Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497.

Kun, H., Xuanyun, H., Yousheng, J., Wei, F. and Xianle Y. (2010). Monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for the specific detection of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in fishery products. Aquaculture. 310: 8-12.

Krebber, R., Hoffend, A. and Ruttmann, F. (2009). Simple and rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in edible tissues by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC-MS/MS). Analytica Chimica Acta 637: 208-213.

Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy 54: 311-20.

Liddell, J. and Cryer, A. A practical guide to monoclonal antibodies. Wiley, 1991.

Schaefer, C. (1996). Pregnancy outcome after prenatal quinolone exposure: evaluation of a case registry of the European Network of Teratology Information Services (ENTIS). European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 69: 83-89

Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y. and Tsuji, A. (2001). Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. The Analyst 127: 98.

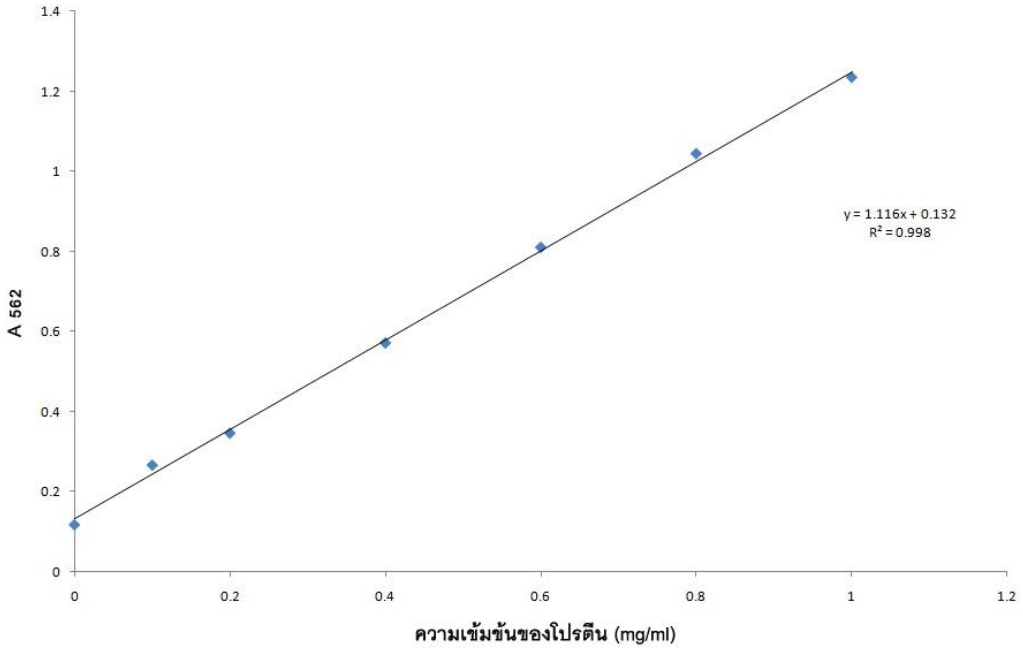
Yuan, Z., Duan, J., Fan, S. and Kong, K.(2001). Comparison of an ELISA and a HPLC for determination of ciprofloxacin residues in pork. Food and Agricultural Immunology. 13: 199-204.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA

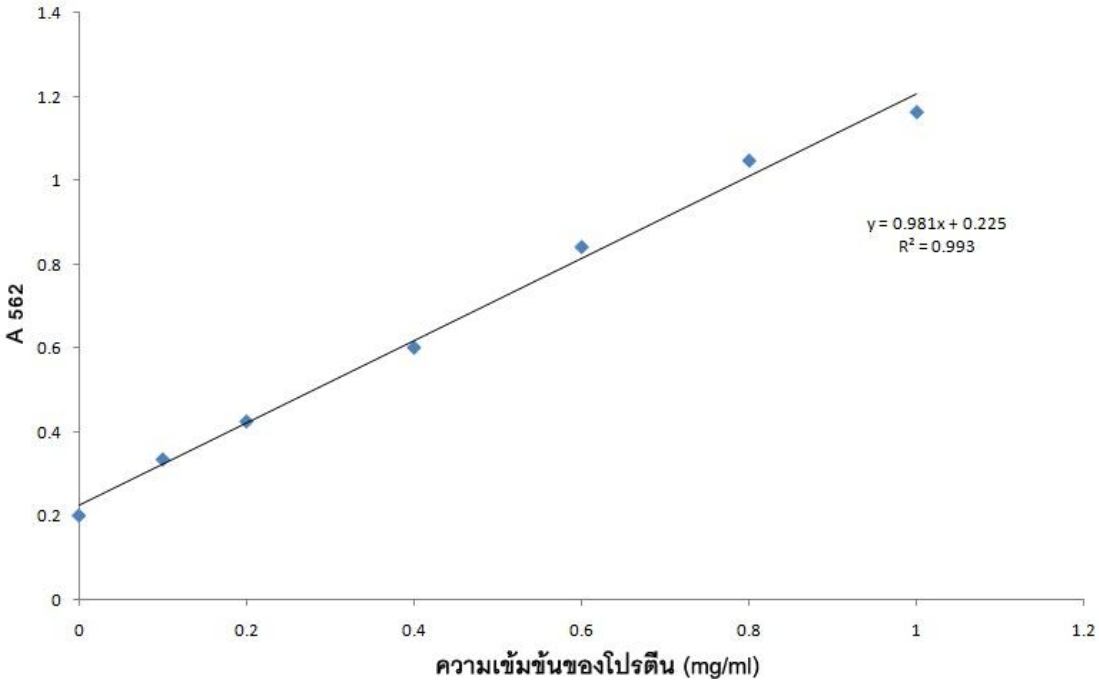
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน (mg/ml)	A_{562}
0	0.118
0.1	0.267
0.2	0.347
0.4	0.572
0.6	0.810
0.8	1.044
1.0	1.234



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย OVA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA

ความเข้มข้นสารละลาย OVA มาตรฐาน (mg/ml)	A_{562}
0	0.202
0.1	0.336
0.2	0.427
0.4	0.603
0.6	0.843
0.8	1.049
1.0	1.164



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย OVA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 4 โคลนต่อ CPFX ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA 5 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA

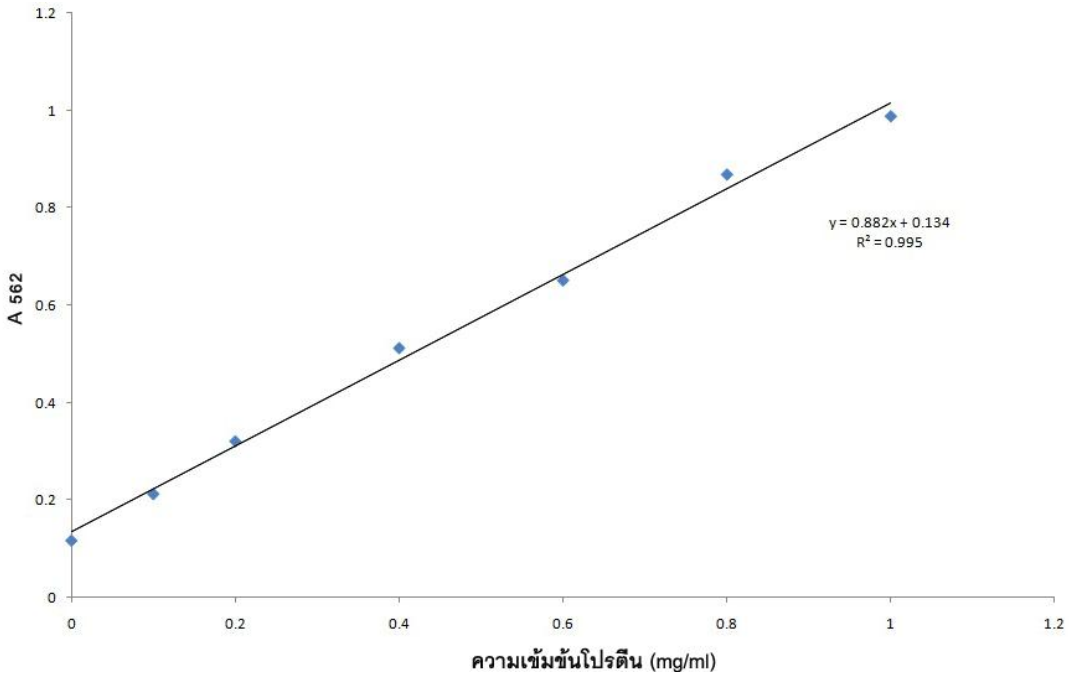
ความเข้มข้น CPFX (ng/ml)	A_{450}			
	5-7F12	7-7G9	7-5A1	11-5A1
0	1.449	1.205	1.563	1.644
0.1	1.309	1.267	1.564	0.422
0.5	1.413	1.175	1.520	0.324
1	1.376	1.163	1.526	0.250
5	1.433	1.163	1.451	0.102
10	1.426	1.185	1.404	0.159
50	1.155	0.899	1.236	0.088
100	0.987	0.621	1.019	0.076
500	0.446	0.233	0.369	0.076
1000	0.259	0.136	0.196	0.080
5000	0.111	0.069	0.080	0.092
10000	0.096	0.061	0.068	0.081

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ 450 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ที่ทำให้บริสุทธิ์

Fraction	A_{280}	A_{450}	Fraction	A_{280}	A_{450}
Unbound	0.113	0.320	-	-	-
1	0.110	0.161	16	0.126	-
2	0.106	-	17	0.125	-
3	0.110	-	18	0.112	0.091
4	0.103	0.192	19	0.089	-
5	0.105	-	20	0.086	-
6	0.112	-	21	0.092	0.087
7	0.838	1.570	22	0.096	-
8	2.316	1.965	23	0.075	-
9	2.212	1.870	24	0.073	0.134
10	1.242	1.735	25	0.074	-
11	0.690	1.352	26	0.069	-
12	0.448	0.890	27	0.075	0.092
13	0.299	0.427	28	0.073	-
14	0.227	0.310	29	0.068	-
15	0.175	0.150	30	0.072	0.144

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA

ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน (mg/ml)	A_{562}
0	0.117
0.1	0.213
0.2	0.321
0.4	0.513
0.6	0.652
0.8	0.869
1.0	0.989



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

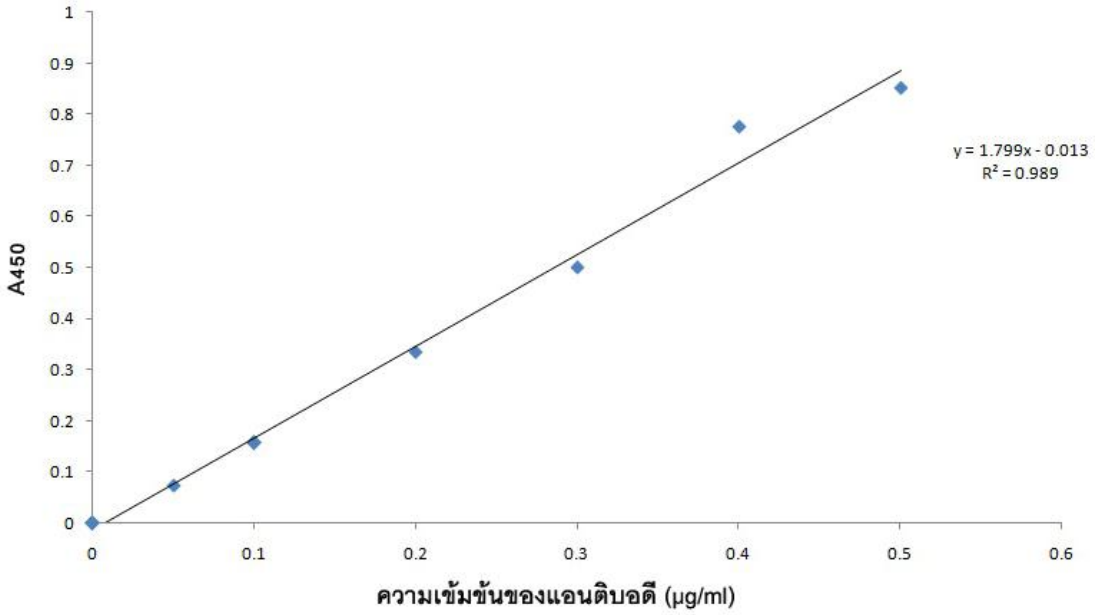
อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:10	0.639	5.720
1:20	0.382	5.612
1:40	0.284	6.780
1:80	0.204	6.304
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		6.104

ตารางที่ ก.7 ผลการหาค่าความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

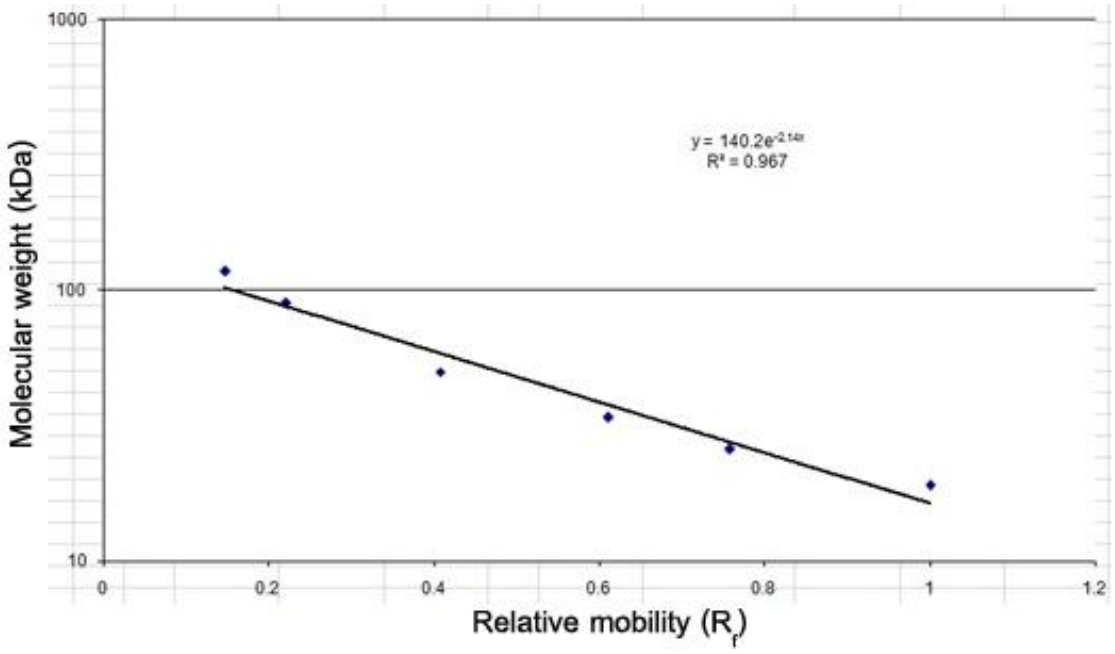
อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:10	0.355	2.506
1:20	0.237	2.336
1:40	0.170	1.646
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		2.130

ตารางที่ ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect ELISA

ความเข้มข้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ng/ml)	A_{450}
50	0.075
100	0.157
200	0.335
300	0.501
400	0.777
500	0.853



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-5A1 หลังถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน CPFX-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น CPFX (ng/ml)	A_{450}			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
0	1.601	1.660	1.734	1.665
10^{-7}	1.860	1.865	1.876	1.867
10^{-6}	1.798	1.830	1.928	1.852
10^{-5}	1.820	1.819	1.818	1.819
10^{-4}	1.798	1.803	1.850	1.817
10^{-3}	1.582	1.582	1.645	1.603
10^{-2}	0.458	0.461	0.488	0.469
10^{-1}	0.221	0.230	0.239	0.230
10	0.135	0.147	0.135	0.139
10^{2}	0.103	0.105	0.098	0.102
10^{3}	0.087	0.090	0.117	0.098
10^{4}	0.172	0.171	0.170	0.171

ภาคผนวก ข
การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลาย สำหรับการเชื่อมโปรตีนพาหะ BSA กับ CPFX

0.1 M Sodium carbonate buffer, pH 9.4

Na_2CO_3	3.18	กรัม
$NaHCO_3$	5.68	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.4 ด้วย 3 M HCl หรือ 3 M NaOH

ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ CPFX กับโปรตีนพาหะด้วยวิธี TNBS

1) 0.1 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

$NaCO_3$	3.18	กรัม
$NaHCO_3$	5.86	กรัม
น้ำกลั่น	1.00	ลิตร

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

2) 0.05% TNBS (Picrylsulfonic acid)

5% TNBS (w/v)	0.01	มิลลิลิตร
0.1 M Sodium bicarbonate pH 8.5	0.99	มิลลิลิตร

3) 10% SDS (Sodium dodecyl sulphate)

SDS	1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4) 1 N HCl

Conc.HCl	7.7	มิลลิลิตร

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย เป็น 250 มิลลิลิตร

ข.3 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในวิธี ELISA

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

NaH_2PO_4	27.60	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Na_2HPO_4	71.63	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

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

PB stock	1	ลิตร
NaCl	175	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4) 5% นมพร่องมันเนย (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

5) 0.2 M Citrate buffer pH 4.0

Potassium citrate	33.2	กรัม
Citric acid	21.54	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้ได้ pH 4.0

6) Substrate solution

3,3' ,5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	3.0	มิลลิกรัม
DMSO	300	มิลลิลิตร
0.2 M Citrate buffer	10	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	1.2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7) 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

<u>หมายเหตุ</u> ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรด เนื่องจากจะเกิดความร้อนขึ้น

ข.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) Stock HAT 100X

Hypoxanthine	136	มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Aminopterin	2	มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	39	มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวดๆ ละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ Aminopterin ให้นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส จนกว่าจะละลาย เนื่องจากสาร Aminopterin ละลายในน้ำกลั่นยาก

2) Stock HT100X

Hypoxanthine	136	มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	39	มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งสองมาผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวดๆ ละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำสารทุกอย่างมาละลายในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

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

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

ข.5 การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์

1) 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.77	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1.69	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรต $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ด้วย $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm

2) 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7

Glycine-HCl	7.51	กรัม ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
HCl (37%)	2.42	มิลลิลิตร		

ไตเตรต Glycine-HCl ด้วย HCl (37%) จนได้ pH 2.7 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm

3) 1 M Tris HCl buffer, pH 9.0

Trizma base	121.14	กรัม ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
HCl (37%)	6.41	มิลลิลิตร		

ไตเตรต Trizma base ด้วย HCl (37%)จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm

ข.6 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทำ SDS-PAGE

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

น้ำกลั่น	3.80	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	2	มิลลิลิตร
10% SDS	80	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2O_8$ (APS)	80	ไมโครลิตร
TEMED	40	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้าย เพื่อให้เกิดการ polymerization

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

น้ำกลั่น	1.20	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	250	ไมโครลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	504	ไมโครลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2O_8$	20	ไมโครลิตร
TEMED	2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้าย เพื่อให้เกิดการ polymerization

3) SDS staining dye

SDS dye	900	ไมโครลิตร
β-mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร

4) Running buffer

Trizma base	15.1	ไมโครลิตร
Glycine	94.0	กรัม
SDS	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	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

นายภาคภูมิ นันทนิตย์วรกุล เกิดเมื่อวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 เสนอผลงานเรื่อง PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CIPROFLOXACIN ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ (ASEAN Plus Three Graduate Research Congress (AGRC)) เมื่อวันที่ 1-2 มีนาคม 2555 ณ โรงแรม ดิ เอ็มเพรส เชียงใหม่โฮเต็ล จังหวัดเชียงใหม่