การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแร็กโทพามีน

นางสาว พรรัตน์ คงคาวิทูร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RACTOPAMINE

Miss Pornrat Kongkavitoon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน
โดย	นางสาวพรรัตน์ คงคาวิทูร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นันทิกา คงเจริญพร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรรัตน์ คงคาวิทูร : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RACTOPAMINE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.นันทิกา คงเจริญพร, 111 หน้า.

แร็กโทพามีนเป็นสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์และถูกยอมรับเป็นสารผสมอาหารสำหรับสุกรและโคกระบือโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา เพื่อกระตุ้นการเติบโตของสัตว์เลี้ยงเพื่อใช้เนื้อในการบริโภค เนื่องจากสารนี้มีผลทำให้ลดการสังเคราะห์ไขมันและเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยหลายฉบับได้กล่าวถึงการตกค้างของสารเบต้าอะโกนิสต์ในผลิตภัณฑ์สัตว์ซึ่งส่งผลเสียต่อมนุษย์ได้ ดังนั้นการใช้แร็กโทพามีนจึงถูกห้ามใช้ในสหภาพยุโรปและเอเชีย งานวิจัยนี้จึงมุ่งในการผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนเพื่อนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจด้วยวิธี ELISA โดยทำการเชื่อมแร็กโทพามีนกับโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของโคสำหรับใช้เป็นแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัว ซีรัมจากหนูทั้งสามตัวให้ค่าระดับแอนติบอดีสูง ซึ่งอยู่ระหว่าง 1:64000 ถึง 1:512000 ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน ทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์ไมอีโลมา ได้ผลผลิตเป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนจำนวน 5 โคลนคือ 10A4, 4B12, 10G3, 2H3 และ 3A6 จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า มีไอโซไทป์เป็น IgG, มีความไวซึ่งคำนวณอยู่ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 0.44, 15.41, 19.85, 29.25 และ 92.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) ตามลำดับ นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารที่นำมาทดสอบ จากทั้ง 5 โคลนที่ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 10A4 ให้ค่าความไวที่ดีที่สุดเมื่อหาค่า IC_{50} และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 มีค่าเท่ากับ 1.85 และ 0.29 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10A4 มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจแบบจำเพาะสำหรับตรวจสารแร็กโทพามีนได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....พรรัตน์.....คงคาวิทูร.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....นันทิกา คงเจริญพร

4972402423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: RACTOPAMINE / BETA-AGONIST/ MONOCLONAL ANTIBODY/ ELISA

PORNRAT KONGKAVITOON : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RACTOPAMINE. ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., COADVISORS : NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., 111 pp.

Ractopamine is a chemical substance in beta-agonist group and has been approved as a feed additive for swine and cattle by the U.S. FDA to promote growth of animals for meat production due to its effects in reducing fat deposition and enhancing protein synthesis. However, many research reported that beta-agonist residues in the animal products cause the adverse effects on human. Thus, the use of ractopamine has not been approved in the European Union (EU) and Asia. This research concentrated on the production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine for the development of ELISA test kit. Ractopamine was conjugated to bovine serum albumin for using as an antigen to immunize three BALB/c mice. Antisera from all mice gave high antiserum titers ranged from 1:64000 to 1:512000. To produce monoclonal antibodies against ractopamine, fusions of spleenocytes and myeloma cells were performed yielding five monoclones, 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 and 10G3. Characterization of monoclonal antibodies showed that isotype of these clones was identified as IgG_1. Their sensitivities calculated as limit of detection were 0.44, 15.41, 19.85, 29.25 and 92.19 ng/ml (ppb), respectively. In addition, these clones showed no cross-reactivity to all tested chemicals. Among the five clones obtained, monoclonal antibody 10A4 was the most sensitive clone. The IC_{50} value and limit of detection of the purified monoclonal antibody 10A4 were 1.85 and 0.29 ng/ml, respectively. Consequently, the obtained monoclonal antibody 10A4 could be used to develop a specific test for ractopamine detection.

Field of study: Biotechnology

Academic year: 2008

Student's signature.....Pornrat Kongkavitoon.....

Advisor's signature.....K. Komolpis.....

Co-Advisor's signature.....Nanthika K.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ดร.นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รวมทั้งคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำพร้อมทั้งความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณ หน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ คุณอณุมาศ บัวเขียว รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำแนวทางการดำเนินงานวิจัย รวมทั้งแง่คิดดีๆ ในการดำเนินชีวิต ตั้งแต่เริ่มทำการจนทดลองจนเสร็จสิ้น

และที่สำคัญอย่างที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้าและญาติพี่น้องที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอในเรื่องราวทุกอย่างที่ผ่านมาในการดำเนินชีวิต

สุดท้ายขอขอบคุณพระธรรมสิงหาบุราจารย์ (หลวงพ่อจรัญ ฐิตธมฺโม) สำหรับธรรมะดีๆ ที่เป็นหลักยึดเหนี่ยวในชีวิต ยามที่ท้อแท้หมดหวัง เสียใจ ทุกข์ใจ ทำให้มีเข้าใจถึงปัญหาทุกอย่างที่เกิดขึ้น และพร้อมเผชิญแก้ไขสิ่งต่างๆ อย่างถูกต้องและมีเหตุผลทั้งในปัจจุบันและภายภาคหน้าอย่างเข้มแข็งต่อไป

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฑ

บทที่ หน้า

1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4
2.1.1 สารเบต้าอะโกนิสต์ 4
2.1.1.1 พิษและผลข้างเคียงของสารเบต้าอะโกนิสต์ 5
2.1.1.2 กฎหมายเกี่ยวกับสารเบต้าอะโกนิสต์ในประเทศต่างๆ 6
2.1.2 แร็กโทพามีน 6
2.1.2.1 การออกฤทธิ์ของสารแร็กโทพามีน 8
2.1.2.2 มาตรฐานสารตกค้างของแร็กโทพามีน 9
2.1.3 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา 10
2.1.3.1 แอนติเจน 10
2.1.3.2 แอนติบอดี 11
2.1.3.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี 13
2.1.3.4 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 17
2.1.4 หลักการของ ELISA 19

บทที่ หน้า

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 25
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย 25
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 25
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 27
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย 33
3.4.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA 33
3.4.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดี
ต่อ RAC 37
3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต
โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC 39
3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 42
3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 44
3.4.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ 46
3.4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ 47
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 48
4.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA 48
4.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ RAC 54
4.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC 59
4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ 61
4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 72
4.6 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ 74
4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ต่อ RAC 76
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 80
รายการอ้างอิง 82
ภาคผนวก 86
ภาคผนวก ก 87
ภาคผนวก ข 103
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 111

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุดของแร็กโทพามีนที่ยอมรับให้มีได้ที่กำหนดโดยคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ 10
2.2 การเปรียบเทียบระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 15
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย 25
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 25
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 27
4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน RAC-BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี BCA 51
4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของ BSA กับ RAC ด้วยวิธี TNBSA 51
4.3 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน RAC-OVA ด้วยวิธี BCA 53
4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของโปรตีน OVA กับ RAC ด้วยวิธี TNBSA 53
4.5 ระดับแอนติบอดีในซีรัมที่ได้จากหนูทดลองด้วยวิธี indirect ELISA 55
4.6 การทดสอบความสามารถในการจับกับ RAC ในรูปอิสระของแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect competitive ELISA 58
4.7 ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเติม RAC ในรูปอิสระของแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect competitive ELISA 59
4.8 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอีโลมาเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ 60
4.9 ผลการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA 61
4.10 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 5 โคลน โดยชุดตรวจสอบ isotyping kit 62
4.11 ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับวิธี indirect ELISA ที่ใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml เคลือบก้นหลุม 63
4.12 ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับวิธี indirect ELISA ที่ใช้ แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml เคลือบก้นหลุม 64
4.13 ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุม 69

ตารางที่ หน้า

4.14 ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุม 70
4.15 สรุปผลการหาไอโซไทป์ ความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 5 โคลน เมื่อใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น10 µg/ml เคลือบก้นหลุม 71
4.16 สรุปผลการหาไอโซไทป์ ความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 5 โคลน เมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น1 µg/ml เคลือบก้นหลุม 71
4.17 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจีที่ได้จากโคลน 10A4 .. 74
4.18 ค่า R_f และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE 76
4.19 ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 และแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมด้วยวิธี indirect ELISA..... 77
4.20 การเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 ต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA และ RAC-OVAเคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA 96หลุม 78
ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลาย BSA มาตรฐานด้วยวิธี BCA 87
ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลาย OVA มาตรฐานด้วยวิธี BCA 88
ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 1 ด้วยวิธี indirect ELISA..... 89
ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 2 ด้วยวิธี indirect ELISA..... 90
ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 3 ด้วยวิธี indirect ELISA..... 91

ตารางที่ หน้า

ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ต่อ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA 10 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA 92
ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ต่อ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA 1 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA 93
ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ต่อสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA 10 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA..... 94
ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ต่อสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA 1 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA 95
ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ 96
ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA 97
ก.12 ผลการหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA.. 98
ก.13 ผลการหาค่าความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี BCA 98
ก.14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วย วิธี indirect ELISA 99
ก.15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 หลังถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA 101
ก.16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 หลังถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA 102

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างทางเคมีของแร็กโทพามีนและสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ชนิดต่าง ๆ 7
2.2 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 12
2.3 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์ 13
2.4 แนวทางการสังเคราะห์ดีเอนเอของ de novo pathway และการสังเคราะห์ดีเอนเอของ salvage pathway ในเซลล์ปกติ 18
2.5 ขั้นตอนการผลิตโมโคลนอลแอนติบอดี 19
2.6 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA 21
2.7 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA 21
3.1 การเชื่อมต่อระหว่าง RAC กับโปรตีนพาหะ BSA โดยใช้ isobutylchloroformate 35
4.1 แผนภูมิของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของ RAC เป็น Ractopamine-hemisuccinate 49
4.2 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของ RAC เป็น ractopamine-hemisuccinate เมื่อส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร 50
4.3 โครมาโทแกรมของมวลโมเลกุลของ BSA และ RAC-BSA ด้วยวิธี MALDI-TOF-MS 52
4.4 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของซีรัมจากหนูทดลองที่ระดับความเจือจางต่างๆ โดยใช้สาร RAC-OVA และ OVA เคลือบก้นหลุม 57
4.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลน ต่อ RAC อิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุมและใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 เป็น 1:20, 1:10, 1:20, 1:10 และ 1:5 ตามลำดับ 65
4.6 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลน ต่อ RAC อิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุม และใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 เป็น 1:20, 1:10, 1:80, 1:160 และ 1:80 ตามลำดับ 66
4.7 โครมาโทแกรมการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส ขนาด 1.5 X 5 เซนติเมตร และชะด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างจำนวน 31 แฟรคชัน แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร 73

รูปที่ หน้า

4.8 ผลการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 75
4.9 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 ต่อ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA และ RAC-BSA เคลือบก้นหลุม และความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 78
ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA 87
ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย OVA ด้วยวิธี BCA 88
ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA 97
ก.4 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์..... 99
ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับมวลโมเลกุล (kDa) ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	Absorbance
AMOZ	3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone
AOZ	3-Amino-2-oxazolidinone
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
Da	Dalton (g/mol)
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
HAT	Hypoxanthine, aminopterin and thymidine
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
LOD	Limit of detection
M	Molar (mol/l)
MAb	Monoclonal antibody

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MRLs	Maximum residue limits
MNZ	Metronidazole
MW	Molecular weight
N	Normal
OPD	o-Phenylenediamine
OVA	Ovalbumin
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20
PEG	Polyethylene glycol
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
RAC	Ractopamine
R_f	Relative mobility
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis
TEMED	N,N,N,N-tetramethyl-ethylenediamine
T_H	Helper T cell
TK	Thymidine kinase
TLC	Thin-layer chromatography
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid
UV	Ultraviolet
g	gram
m	milli
n	nano
v	volume
w	weight
µ	micro

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ด้วยปัจจุบันมีการนำสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (Beta-agonists) ซึ่งใช้เป็นยาในการขยายหลอดลมและแก้อาการหอบหืดในผู้ป่วย มาใช้ในกระบวนการเลี้ยงสัตว์ โดยนำสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์มาผสมลงในอาหารสัตว์ น้ำดื่ม และอื่นๆ สำหรับเลี้ยงสุกร ซึ่งเป็นการใช้ผิดวัตถุประสงค์ เนื่องจากผู้เลี้ยงสุกรต้องการใช้เพื่อให้เนื้อสุกรมีสีแดงและมีมันน้อย ซึ่งมีลักษณะเนื้อตรงตามความต้องการของผู้บริโภค แต่มีรายงานพบว่า หากสารดังกล่าวตกค้างในเนื้อสัตว์จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค ทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้อสั่น กระตุก หัวใจเต้นเร็ว นอกจากนี้ยังพบอาการทางจิตประสาท อาการปวดศีรษะ และปวดกล้ามเนื้อประกอบด้วย ดังนั้นจึงเป็นอันตรายอย่างยิ่งกับ ผู้ป่วยโรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคต่อมไทรอยด์ สตรีและทารกในครรภ์ ส่วนในสุกรที่ได้รับสารนี้มีผลทำให้ เจริญเติบโตช้า มีอาการเครียด กล้ามเนื้อสั่นเกร็ง และมักช็อคตายในขณะจับขาย (ธีระวัฒน์ รัตนพลแสน, 2549) โดยสารที่นิยมนำมาใช้ในประเทศไทยได้แก่ เคลนบูเทอรอล (Clenbuterol) ซัลบูทามอล (Salbutamol) และแร็กโทพามีน (Ractopamine) สำหรับในประเทศไทยพบว่า ผู้เลี้ยงสุกรมีการใช้แร็กโทพามีนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากแร็กโทพามีนได้รับการยอมรับเป็นสารผสมในอาหารสัตว์ (feed additive) ให้ใช้ในปศุสัตว์จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกาเมื่อปี 2003 นอกจากนี้สารแร็กโทพามีนยังสามารถใช้เป็นสารผสมในอาหารสัตว์อย่างถูกต้องตามกฎหมายใน 23 ประเทศ

แร็กโทพามีน เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเบต้าทูอะโกนิสต์ (β_2-agonists) เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์คล้ายการกระตุ้นของสารสื่อประสาท (neurotransmitters) ในระบบประสาทอัตโนมัติและมีผลต่อเบต้าทูรีเซบเตอร์ที่อยู่บนผิวเซลล์ของหลอดลม ตับอ่อน กล้ามเนื้อลาย และเนื้อเยื่อไขมัน ส่งผลให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว เพิ่มการหลั่งอินซูลิน สลายไกลโคเจนและสลายไขมัน ดังนั้นเมื่อผู้เลี้ยงสุกรนำสารกลุ่มนี้มาใช้ผสมในอาหารและน้ำดื่มสำหรับเลี้ยงสุกร ทำให้มีการเร่งสร้างเนื้อแดงได้ จึงนิยมเรียกสารนี้ว่า “สารเร่งเนื้อแดง” แต่เนื่องด้วยปี 2534 เป็นต้นมาได้พบว่า ผู้เลี้ยงสุกรในประเทศไทยเริ่มมีการใช้สารเร่งเนื้อแดงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยตรงของประชาชนคนไทยผู้บริโภค และยังส่งผลกระทบต่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ของประเทศอีกด้วย เนื่องจากกลุ่มประเทศคู่ค้า อาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่น กลุ่มสหภาพยุโรป และประเทศจีน ให้ความสำคัญในเรื่อง

คุณภาพสินค้าเหล่านั้นให้มีความปลอดภัยจากยา หรือสารพิษตกค้างต่างๆ ดังนั้นหลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงร่วมมือกันหาแนวทางในการแก้ไขและป้องกัน รวมทั้งกรมปศุสัตว์ได้ออกประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ห้ามใช้สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เป็นส่วนผสมในการผลิตและนำเข้าซึ่งอาหารสัตว์ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 และพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 แต่จากข้อมูลของห้องปฏิบัติการกรมปศุสัตว์ในการตรวจวิเคราะห์หาสารเร่งเนื้อแดงในปัสสาวะสุกรจากฟาร์มต่าง ๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2547 - กันยายน 2549 พบว่า ผู้เลี้ยงยังคงมีการลักลอบใช้สารเร่งเนื้อแดงเพื่อให้สุกรขายได้ราคาสูงและมีเนื้อแดงตามความนิยมของผู้บริโภคอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในเนื้อสัตว์ก่อนที่จะส่งออกผลิตภัณฑ์ที่ได้สู่ประเทศคู่ค้า

การตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของสารเร่งเนื้อแดงในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติการโดยวิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Surface plasma resonance biosensor (SPR) (Wang และคณะ, 2006 ; Shelver และ Smith, 2003) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลามาก ทำให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทำได้ไม่ครอบคลุม ส่วนเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างในสัตว์เลี้ยงและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจนโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน วิธีนี้เป็นวิธีการที่สามารถตรวจคัดตัวอย่างเบื้องต้นได้อย่างรวดเร็วประหยัด และมีความแม่นยำสูง แต่ชุดตรวจสอบที่ใช้ในปัจจุบันมีราคาแพง เพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยราคาขายปลีกภายในประเทศประมาณ 20,000 บาทต่อชุด ดังนั้นเพื่อทำให้ต้นทุนในการตรวจสารนี้ลดลง จึงทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารแร็กโทพามีน เพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบทดแทนการนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแร็กโทพามีน
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เตรียมแอนติเจนโดยการเชื่อมแร็กโทพามีนกับโปรตีนพาหะ
3. ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน

4. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแร็กโทพามีนด้วยวิธี ELISA
5. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้
    5.1 การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน
    5.2 การทดสอบความไว (sensitivity)
    5.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์
    5.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแร็กโทพามีนและทราบลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารเบต้าอะโกนิสต์ (Beta-adrenergic agonists)

สารเบต้าอะโกนิสต์ เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มยาอะดรีเนอจิก (adrenergic drugs หรือ sympathomimetics) ที่มีโครงสร้างคล้ายสารสื่อประสาทกลุ่มแคเทคโคลามีน (catecholamine) ดังนั้นสารเบต้าอะโกนิสต์จึงสามารถออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับชนิดเบต้า (beta-adrenergic receptor) บนผิวเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการกระตุ้น adenylyl cyclase ทำให้ระดับ c-AMP ภายในเซลล์สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น protein kinases ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ การตอบสนองที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับชนิดของโปรตีนและเอนไซม์ของแต่ละอวัยวะ เช่น ถ้าเกิดที่หัวใจจะส่งผลทำให้หัวใจทำงานมากขึ้น หรือทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว เป็นต้น โดยตัวรับชนิดเบต้าบนผิวเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ เบต้าวัน (β_1) และเบต้าทู (β_2) ตัวรับเบต้าวันจะพบที่ หัวใจและระบบประสาท ส่วนตัวรับเบต้าทูจะพบที่หลอดเลือด ท่อทางเดินอาหาร เซลล์ไขมันและเซลล์กล้ามเนื้อ (Blander และคณะ,1993) โดยสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์สามารถออกฤทธิ์ต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้คล้ายคลึงกัน แต่ทั้งนี้สารแต่ละตัวจะออกฤทธิ์ต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายแตกต่างกันไป ด้วยเหตุนี้การนำสารกลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาจึงขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารแต่ละตัวว่าออกฤทธิ์เจาะจงที่ตัวรับชนิดใด เช่น ถ้าออกฤทธิ์ที่ตัวรับชนิดเบต้าวัน จะกระตุ้นการเต้นหัวใจ ดังนั้นจึงนำมาใช้รักษากรณีหัวใจเต้นอ่อนหรือหยุดเต้น สำหรับสารบางตัวที่ออกฤทธิ์ต่อตัวรับเบต้าทู ซึ่งมีผลทำให้หลอดลมขยายตัวนั้น จึงนิยมนำมาใช้รักษาอาการหอบหืดและหลอดลมตีบในผู้ป่วยโรคหอบหืด โดยสารเบต้าทูอะโกนิสต์ที่นิยมใช้เป็นยาขยายหลอดลมได้แก่ เทอบูตาลีน (terbutaline) ฟีโนเทอรอล (fenoterol) และซัลบูทามอล (salbutamol) (สุพล เลื่องยศลือชากุล, 2534)

สำหรับการใช้สารกลุ่มเบต้าทูอะโกนิสต์ (β_2-agonists) ในสัตว์มักถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นการเติบโต โดยใช้สารกลุ่มที่ออกฤทธิ์ที่ตัวรับชนิดเบต้าทู ซึ่งจะทำให้ไขมันสลายตัวในเซลล์ไขมันมากขึ้น และทำให้กล้ามเนื้อขยายมากขึ้น เนื่องจากมีการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อโครงร่าง (Moloney,1990) ด้วยเหตุผลทั้งสองประการนี้ จึงทำให้มีผู้ลักลอบใช้สารกลุ่มเบต้าทูอะโกนิสต์กันมาก แม้ว่าจะผิดกฎหมายไม่เว้นแม้แต่ในประเทศที่พัฒนาแล้ว การใช้สาร

ดังกล่าวนี้จะใช้ติดต่อกันหลายวันในระยะขุนใกล้ส่งตลาด จึงทำให้มีการตกค้างในอวัยวะต่างๆ ในปริมาณสูง เนื่องจากมีการสะสมในร่างกาย โดยระดับที่ใช้ผสมอาหารสัตว์ประมาณ 2-8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) จึงจะทำให้ไขมันสันหลังบางลง สารเบต้าทูอะโกนิสต์ที่นิยมใช้เป็นสารผสมในอาหารสัตว์ในปัจจุบันได้แก่ เคลนบูเทอรอล (clenbuterol) แร็กโทพามีน (ractopamine) และไคมาเทอรอล (cimaterol)

2.1.1.1 พิษและผลข้างเคียงของสารเบต้าอะโกนิสต์

ผลข้างเคียงของสารเบต้าอะโกนิสต์ ส่วนใหญ่เกิดจากการออกฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ อาการหวาดกลัว กระวนกระวาย หัวใจเต้นถี่ หรือเต้นไม่เป็นจังหวะ นอนไม่หลับ มึนงง สับสน ความอยากอาหารลดลง คลื่นไส้อาเจียน กล้ามเนื้อสั่นโดยเฉพาะบริเวณมือและขา และบางกรณีอาจเกิดผลข้างเคียงต่อระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งขึ้นกับว่าสารนี้ไปกระตุ้นที่ตัวรับชนิดใด เช่น ในสารกลุ่มนี้บางตัวกระตุ้นตัวรับชนิดเบต้าวัน จะทำให้ความดันเลือดต่ำ เวียนศีรษะ เป็นลม หากได้รับสารนี้ในปริมาณมากๆ อาจทำให้เสียชีวิตทันที เนื่องจากการเต้นของหัวใจผิดปกติ นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับพิษของสารเบต้าอะโกนิสต์ในกรณีตกค้างในอาหาร เช่น เมื่อปีพ.ศ. 2533 ในประเทศฝรั่งเศส มีกรณีตัวอย่างการเกิดพิษของสารเบต้าอะโกนิสต์ จากประชาชนจำนวน 22 คน (8 ครอบครัว) ได้รับประทานตับวัว หลังจากนั้นประมาณ 1-3 ชั่วโมง มีอาการปวดศีรษะ กล้ามเนื้อสั่น มือสั่น หัวใจเต้นเร็ว เมื่อตรวจสอบหาสาเหตุพบว่า เกิดจากการบริโภคตับวัวที่มีปริมาณเคลนบูเทอรอลตกค้างอยู่ในปริมาณ 0.375-0.50 ppm ในตัวอย่างตับที่นำมาวิเคราะห์ และเมื่อปีพ.ศ. 2533 ประเทศสเปน มีรายงานถึงปัญหาจากการบริโภคตับวัวที่มีสารเบต้าอะโกนิสต์ตกค้างอยู่ โดยผู้ป่วยเกิดอาการใจสั่น หัวใจเต้นรัว ปวดศีรษะ คลื่นไส้ และกล้ามเนื้อกระตุก หลังจากการบริโภคเป็นเวลา 15 นาทีถึง 6 ชั่วโมง อาการคงอยู่นาน 90 นาทีถึง 6 วัน จากการวิเคราะห์ปัสสาวะผู้ป่วย และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างตับวัวพบสารดังกล่าวในปริมาณ 0.16-0.35 ppm นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2539 ประเทศอิตาลี มีรายงานถึงปัญหาสารเบต้าอะโกนิสต์ตกค้าง โดยมีประชาชนจำนวน 62 คน รับประทานเนื้อวัวแล้ว มีอาการหัวใจเต้นเร็ว ใจสั่น กล้ามเนื้อสั่น และมีอาการทางประสาทและคลื่นไส้ จากการตรวจวิเคราะห์เนื้อวัวพบว่ามี เคลนบูเทอรอลตกค้างอยู่ 0.8-7.45 ppm (สุพล เลื่องยศลือชากุล, 2534)

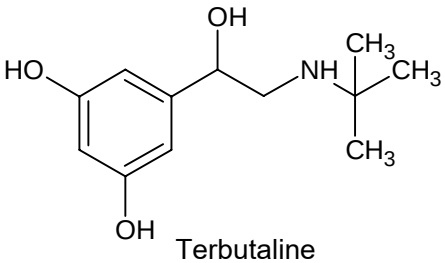
2.1.1.2 กฎหมายเกี่ยวกับสารเบต้าอะโกนิสต์ในประเทศต่างๆ

เนื่องจากผลข้างเคียงและพิษของการตกค้างสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ต่อร่างกายมนุษย์ ดังนั้นจึงมีหลายประเทศทั้งในยุโรป อเมริกา รวมทั้งเอเชีย มีการห้ามใช้สารเบต้าอะโกนิสต์กับสัตว์ที่ใช้เลี้ยงไว้เป็นอาหาร อาทิเช่น เบลเยี่ยม ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์และสหภาพยุโรป ฮ่องกง สิงค์โปร์ เป็นต้น แต่สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาได้ห้ามใช้เฉพาะเคลนบูเทอรอลและซัลบูตามอลเท่านั้นในการนำมาเลี้ยงสัตว์ที่ใช้ในการบริโภค สำหรับผู้ละเมิดการใช้สารต้องห้ามเหล่านี้มีโทษทั้งปรับและจำคุก

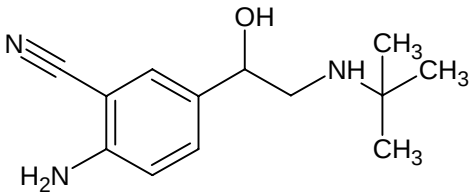
สำหรับประเทศไทย กรมปศุสัตว์ได้อาศัยอำนาจตาม พ.ร.บ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ออกประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ลงวันที่ 3 ธันวาคม 2525 ห้ามมิให้มีการนำเข้าอาหารสัตว์ทุกประเภทที่มีสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เป็นส่วนผสม และห้ามใช้สารเคมีกลุ่มดังกล่าวทุกชนิดเป็นวัตถุดิบที่เติมในอาหารสัตว์ที่ผลิตเพื่อขาย นอกจากนี้กรมปศุสัตว์ได้ออก พ.ร.บ.ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 โดยให้กฎหมายฉบับดังกล่าวมีอำนาจบังคับครอบคลุมถึงฟาร์มเลี้ยงสัตว์ด้วย จากเดิมที่ควบคุมเฉพาะผู้ผลิต ผู้ค้า และผู้นำเข้าอาหารสัตว์ เพื่อช่วยให้เจ้าหน้าที่สามารถเข้าไปตรวจสอบและควบคุมผู้เลี้ยงมิให้ใช้สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ในการเลี้ยงสัตว์และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 25 มีนาคม 2542

2.1.2 แร็กโทพามีน (Ractopamine)

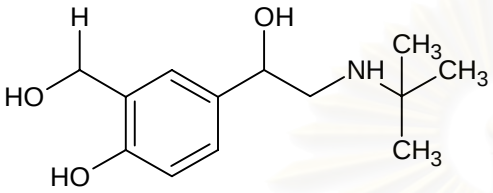
แร็กโทพามีน เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเบต้าทูอะโกนิสต์ มีชื่อทางเคมีคือ 4-Hydroxy-α-[[[3-(4-hydroxyphenyl)-1-methylpropyl]amino]methyl] benzenemethanol hydrochloride สูตรทางเคมีคือ $C_{18}H_{23}NO_3 \cdot HCl$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 337.85 มีลักษณะเป็นผงสีขาวถึงครีม ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว แร็กโทพามีนเป็นสารเคมีที่ได้รับการจดทะเบียนให้ใช้เป็นสารผสมในอาหารสัตว์ใช้ในปศุสัตว์จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกาเมื่อปี 2003 (FDA, 2003) โดยใช้ชื่อทางการค้าคือ เพย์ลีน (Paylean®) สำหรับใช้ในสุกร สำหรับใช้ในวัวจะมีชื่อเรียกว่า โอตาเฟรก (Optaflexx®) โดยโครงสร้างทางเคมีของแร็กโทพามีนและสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1



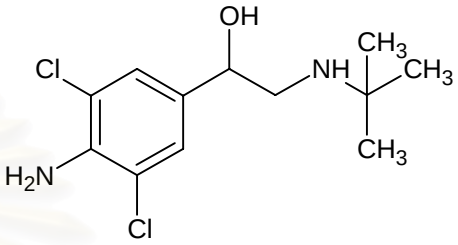
Terbutaline



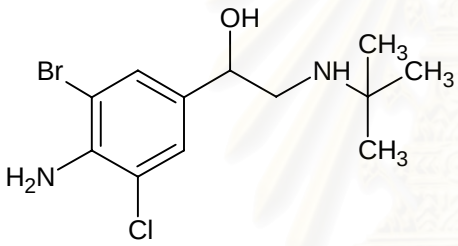
Cimbuterol



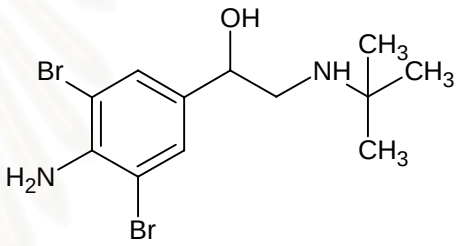
Salbutamol



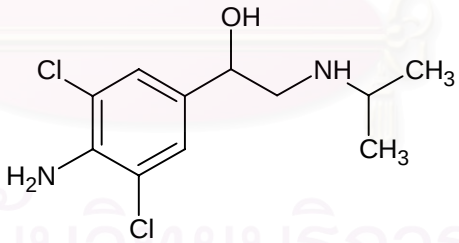
Clenbuterol



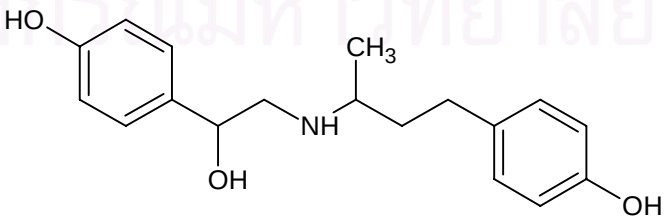
Bromchlorbuterol



Brombuterol



Clenproperol



Ractopamine

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของแร็กโทพามีนและสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ชนิดต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2.1 การออกฤทธิ์ของสารแร็กโทพามีน

สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์จะทำงานโดยจับรีเซบเตอร์ในเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยตรง และสามารถยับยั้งการทำงานของอินซูลิน (insulin) ด้วยการไปกระตุ้นการสังเคราะห์ dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP) ซึ่งมีผลให้อินซูลินเข้าจับรีเซบเตอร์ที่เซลล์ไขมันของสุกร โดยพบว่า dbcAMP สามารถลดการจับของอินซูลินได้ 40% และ 20% ที่ระดับของอินซูลิน 1.8 และ 25.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเนื้อเยื่อไขมันสุกร (Liu และ Mill,1989) และมีรายงานเพิ่มเติมว่า แร็กโทพามีนและเคลนบูเทอรอล จะไม่สามารถลดการจับของอินซูลินกับรีเซบเตอร์ได้ ในกรณีไม่มีเอนไซม์ adenosine deaminase อยู่ด้วย จึงสรุปว่า การทำงานของอินซูลินในการสร้างไขมัน จะถูกยับยั้งโดย dbcAMP จึงส่งผลทำให้กระบวนการสังเคราะห์ไขมันลดลง ทำให้กระบวนการสลายไขมันเพิ่มขึ้น (Liu และ Mill,1990) รายงานวิจัยของ Moloney และคณะ(1990) ได้ทำการศึกษาสารแร็กโทพามีนซึ่งเป็นสารเบต้าอะโกนิสต์ที่ออกฤทธิ์ต่อตัวรับชนิดเบต้าทูบนผิวเซลล์ว่ามีผลต่อกระบวนการสะสมไขมัน และกระบวนการสลายไขมัน

แร็กโทพามีนมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของกล้ามเนื้อโครงร่างด้วยดังในรายงานวิจัยของ Anderson และคณะ (1987) พบว่า การใช้แร็กโทพามีนที่ระดับ 20 ppm มีผลทำให้เกิดการขยายของกล้ามเนื้อ และพบว่า ปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อของส่วน semitendinosus muscle เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณ RNA ในกล้ามเนื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม ในส่วนอัตราการสังเคราะห์โปรตีนพบว่า ในกลุ่มที่ได้รับแร็กโทพามีนมีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่งผลทำให้อัตราการสะสมโปรตีนในกล้ามเนื้อสูงขึ้น ในทำนองเดียวกัน Bergen และคณะ (1987) ทำการทดลองในสุกร พบว่าการใช้แร็กโทพามีนที่ระดับ 20 ppm มีผลให้อัตราการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น ในขณะที่อัตราการสลายโปรตีนลดลง

นอกจากนี้มีงานวิจัยของ Armstrong และคณะ (2004) พบว่า การใช้แร็กโทพามีนในระดับ 20 ppm ร่วมกับอาหารและเลี้ยงเป็นเวลา 34 วัน สุกรที่เลี้ยง 34 วัน และได้รับแร็กโทพามีนที่ระดับ 20 ppm จะมีน้ำหนักซากสูงกว่าสุกรที่ได้รับแร็กโทพามีนที่ระดับ 10 ppm สำหรับการประเมินคุณภาพเนื้อ พบว่า เนื้อไม่ติดมัน ปริมาณเนื้อแดงสูง และเนื้อบริเวณซีกโครงสูงขึ้นเมื่อสุกรได้รับแร็กโทพามีนในระดับ 10 และ 20 ppm เป็นเวลา 34 วันตามลำดับ ในทำนองเดียวกันกับงานวิจัย Hancock และคณะ (1987) และ Prince และคณะ (1987) พบว่า การใช้แร็กโทพามีนระดับ 2.5-3.0 ppm ในสุกรช่วงน้ำหนักระหว่าง 60-102 กิโลกรัม พบว่า ความหนาไขมันสันหลังและปริมาณไขมันเปลวลดลง 0-14% และ 0-19% ตามลำดับ ในส่วนของพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันและ

ปริมาณเนื้อแดง พบว่า เพิ่มขึ้น 4-19% และ 2-6% ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ซากแตกต่างพบว่าเพิ่มขึ้น 0-1%

2.1.2.2 มาตรฐานสารตกค้างของแร็กโทพามีน

สำหรับประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป และจีนมีการห้ามไม่ให้ใช้สารแร็กโทพามีนกับสัตว์เลี้ยงเพื่อใช้สำหรับการบริโภค เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับผลข้างเคียงของสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ และรายงานเกี่ยวกับพิษของการตกค้างของสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในผลิตภัณฑ์สัตว์ จึงทำให้เกิดความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับอันตรายจากสารตกค้างเหล่านี้ ถึงแม้ว่าสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้อนุญาตให้ใช้สารนี้ผสมในอาหารสุกรและวัว รวมทั้งอีก 22 ประเทศด้วย อย่างไรก็ตามประเทศต่างๆ ได้ออกกฎหมายควบคุมระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ของแร็กโทพามีนในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ โดยปกติจะกำหนดเป็นขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุด ซึ่งเรียกว่าค่า MRLs (Maximum Residue Limits) แต่ค่า MRL ของแต่ละประเทศอาจไม่ตรงกัน ดังนั้นองค์การอาหารและเกษตรกับองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) จึงร่วมกันตั้งคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) ขึ้น เพื่อเสนอค่า MRL ที่เป็นสากลมากขึ้น ดังตารางที่ 2.1 สำหรับในประเทศไทย มีประกาศห้ามใช้สารเบต้าอะโกนิสต์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 269) พ.ศ. 2546 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ นอกจากนี้ได้มีประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2549 เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ได้กำหนดการตรวจวิเคราะห์ค่าปริมาณสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ รวมทั้งเกลือของสารและสารในกระบวนการสร้างและสลายที่ปนเปื้อนในอาหารต้องน้อยกว่า 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (1 ppb)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุดของแร็กโทพามีนที่ยอมรับให้มีได้กำหนดโดยคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ

ชนิดสัตว์	ชนิดอวัยวะสัตว์	MRLs (ppb)
โค	กล้ามเนื้อ	10
	ตับ	40
	ไต	90
	ไขมัน	10
สุกร	กล้ามเนื้อ	10
	ตับ	40
	ไต	90
	ไขมัน	10

แหล่งที่มา : Codex Alimentarius Commission, 2007 :24-25.

2.1.3 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

2.1.3.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

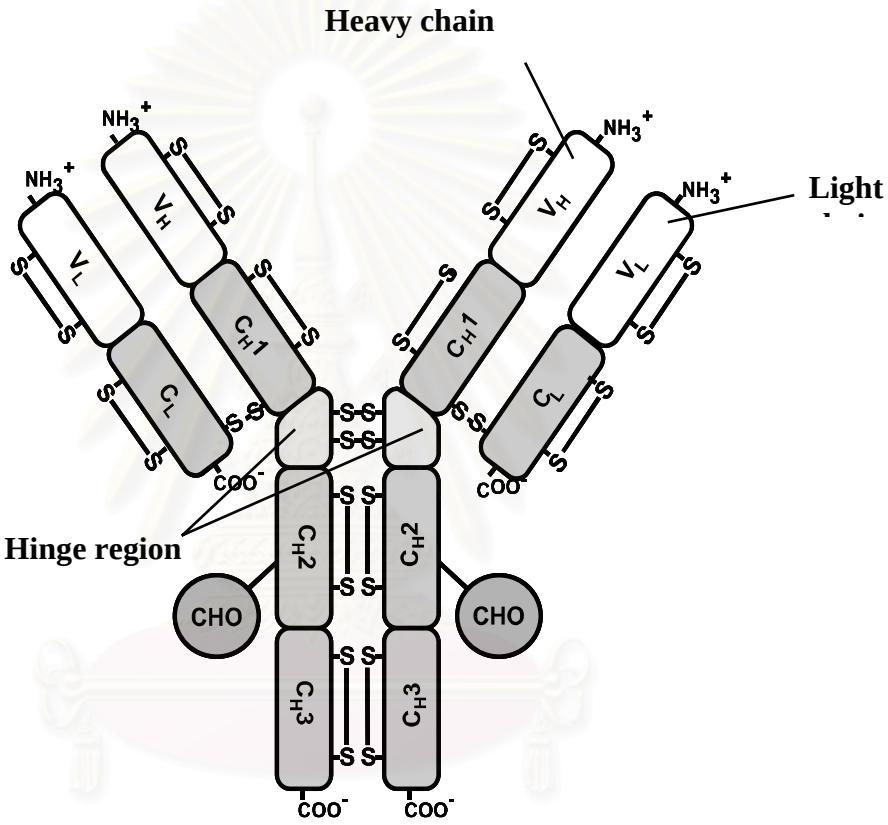
แอนติเจน คือ สารที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการเป็นแอนติเจน หมายถึง ความสามารถของสารที่จะทำปฏิกิริยาจับแบบจำเพาะกับองค์ประกอบแบบต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แอนติบอดีหรือตัวรับบนผิวเซลล์ สารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนเกือบทุกชนิดจะมีคุณสมบัติการเป็นอิมมูโนเจน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

สารนั้นไม่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นเมื่อต้องการทำการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดีต่อสาร จึงมักทำกระบวนการทางเคมีเชื่อมติดระหว่างแฮปเทนกับโปรตีนพาหะ เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนที่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนได้ โดยสมบัติของอิมมูโนเจนที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมี 4 ประการ ได้แก่ ความแปลกปลอม ขนาดของโมเลกุล องค์ประกอบและความซับซ้อนทางเคมี และความสามารถในการถูกแปรรูปของแอนติเจน เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ที่นำเสนอหรือผิวของเซลล์อื่น ๆ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.1.3.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

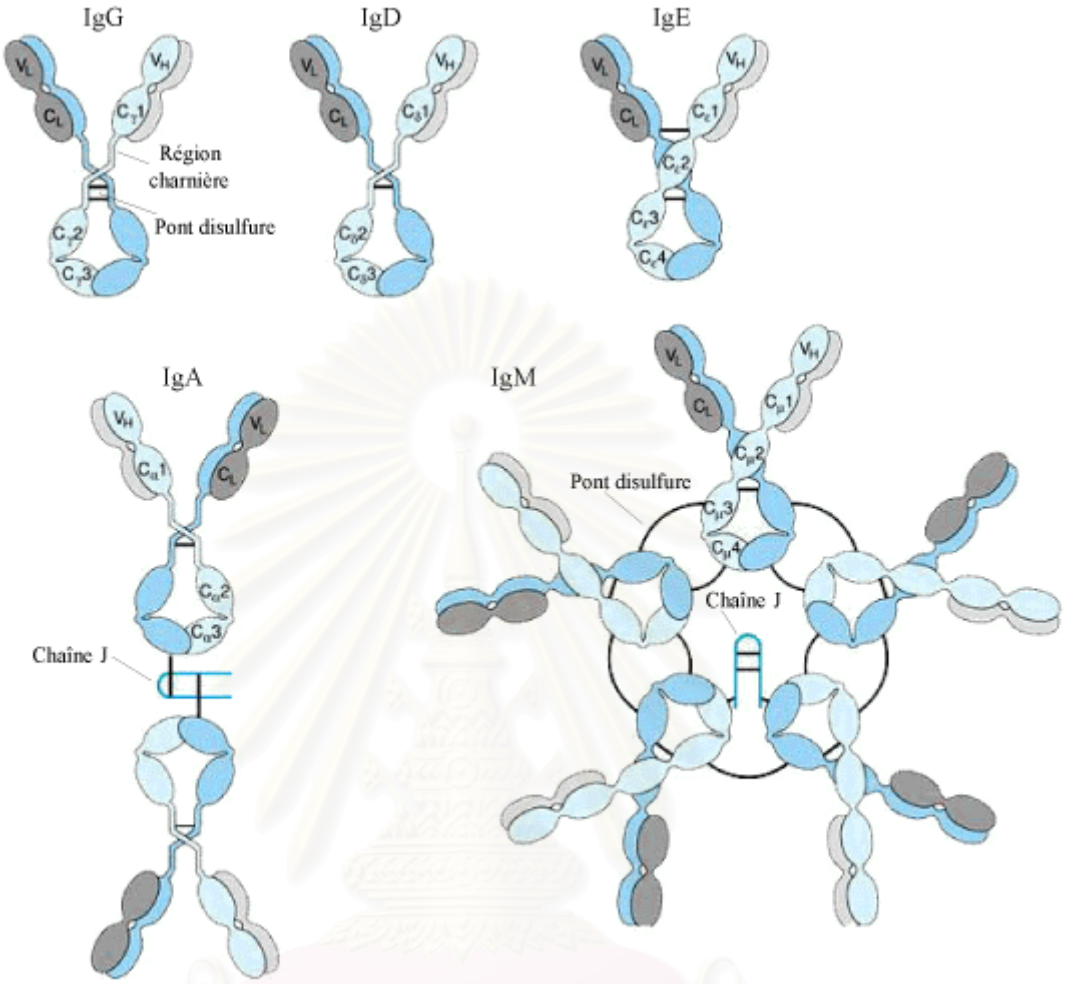
แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin , Ig) เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่นๆสร้างขึ้น ซึ่งมีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันคือ แอนติเจน โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีอยู่ในรูปตัววาย (Y shape) ดังรูปที่ 2.2 ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) 4 สาย คือ ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า Heavy (H) chain 2 สาย และส่วนที่น้ำหนักโมเลกุลเบาเรียกว่า Light (L) chain 2 สาย โดยในโมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินมีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ทั้งภายในสายพอลิเปปไทด์และระหว่างสายโพลิเปปไทด์ ใน L chain พบว่ามีพันธะไดซัลไฟด์ 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 cahin 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 ดังรูปที่ 2.3 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 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์

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

2.1.3.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody, MAb)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน ที่มีลักษณะสำคัญคือ MAb แต่ละชนิดจะเป็นกลุ่มของอิมมูโนโกลบูลินที่มีความเหมือนกัน (homogeneous) เพราะถูกสร้างมาจากเซลล์หรือโคลนชนิดเดียวกันและมีความจำเพาะสูงต่อเพียงอิพิโทปเดียวของโมเลกุลที่เป็นแอนติเจน เซลล์ที่สร้าง MAb นั้น สามารถเพาะเลี้ยงในภาชนะให้เจริญเติบโตแบ่งตัวและหลั่งแอนติบอดีออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถเก็บเซลล์นี้แช่แข็งในไนโตรเจน และนำกลับออกมาเพาะเลี้ยงได้อีก เพื่อให้เซลล์ผลิต MAb ได้อีกในปริมาณและในเวลาที่ต้องการ โดยเป็น

ชนิดเดิมไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งในอดีตจะเป็นการเตรียมแอนติบอดีแบบพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb) หรือการเตรียมแอนติบอดีในรูปแอนติซีรัม โดยโคลนต่างๆของบีเซลล์จำนวนมากที่สามารถตรวจจับแต่ละอิพิโทป เป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม ซึ่งเป็นการที่แอนติบอดีแต่ละชนิดจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัม การเตรียมแบบพอลิโคลนอลแอนติบอดี เป็นการยากที่จะให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง และมีคุณสมบัติเหมือนกันทางด้านสัมพรรคภาพ (affinity) คลาสของแอนติบอดี ความจำเพาะ (specificity) และต้องเตรียมแอนติเจนที่จะใช้ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้มีความบริสุทธิ์สูงมาก (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ชัยวัฒน์ กิตติกูล, 2545)

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี (PAb)	โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb)
ความจำเพาะ (Specificity)	- พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม - มักไม่มีความจำเพาะสูง	- คงที่ สามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐานได้ - มีความจำเพาะสูง
สัมพรรคภาพ (Affinity)	- ไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เจาะเลือดสัตว์ทดลอง	- คงที่ โดยสามารถทำการคัดเลือกได้สูงหรือต่ำตามความต้องการในระหว่างขั้นตอนการทำให้ได้เซลล์เดี่ยว (cloning)
ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้	- ประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	- ประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์เพาะเลี้ยง - ประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน ascitic fluid
ปริมาณแอนติบอดีชนิดอื่นที่ปนเปื้อน	- อาจสูงถึง 100%	- ไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง - พบประมาณ 10% ใน ascitic fluid
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	- ต้องใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์มากหรือทำserum absorption	- ใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์พอสมควร
ต้นทุนในการผลิต	- ต่ำ	- สูง โดยเฉพาะเวลาเริ่มต้นในการผลิต

ข้อดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ชัยวัฒน์ กิตติกูล, 2545)

1. ใช้แอนติเจนน้อยและไม่ต้องบริสุทธิ์มากในการฉีดกระตุ้น เนื่องจากสามารถเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนได้ระหว่างการทำให้ได้เซลล์เดี่ยว

2. มีความเป็นมาตรฐาน (standardization) สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีลักษณะเหมือนกัน เนื่องจากสามารถผลิตโมโคลนอลแอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัด

3. มีความจำเพาะสูง (high specificity) เนื่องจากโมโคลนอลแอนติบอดีจะเข้าทำปฏิกิริยากับอิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมาก

4. มี affinity สูง เนื่องจากขั้นตอนการผลิตสามารถทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูงต่อแอนติเจนได้ ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ได้ในความเจือจางสูง ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวน (background) ในการทดลองได้ นอกจากนี้สามารถนำไปใช้ในการทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์ได้อีกด้วย

5. การเก็บเซลล์ สามารถเก็บเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้เป็นเวลานานเป็นปีๆ ในไนโตรเจนเหลว และสามารถนำกลับมาเลี้ยงเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกเมื่อต้องการ

ข้อเสียของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ชัยวัฒน์ กิตติกูล, 2545)

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีกรรมวิธีค่อนข้างยุ่งยากในการผลิตเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากต้องใช้แรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายสูงในการผลิต

2. ความจำเพาะ ในกรณีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมมีความจำเพาะสูงเกินไปที่จะใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค

3. ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจน เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะที่สูงมาก จึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจนซึ่งเกิดขึ้นระหว่างที่แอนติเจนเกาะกับพื้นผิว หรือสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

4. คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงได้ง่ายระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากบางกรณีโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH, ionic strength และปัจจัยอื่นๆ ซึ่งพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้น้อยกว่า เนื่องจากว่าแอนติบอดีบางกลุ่มยังสามารถทำงานได้

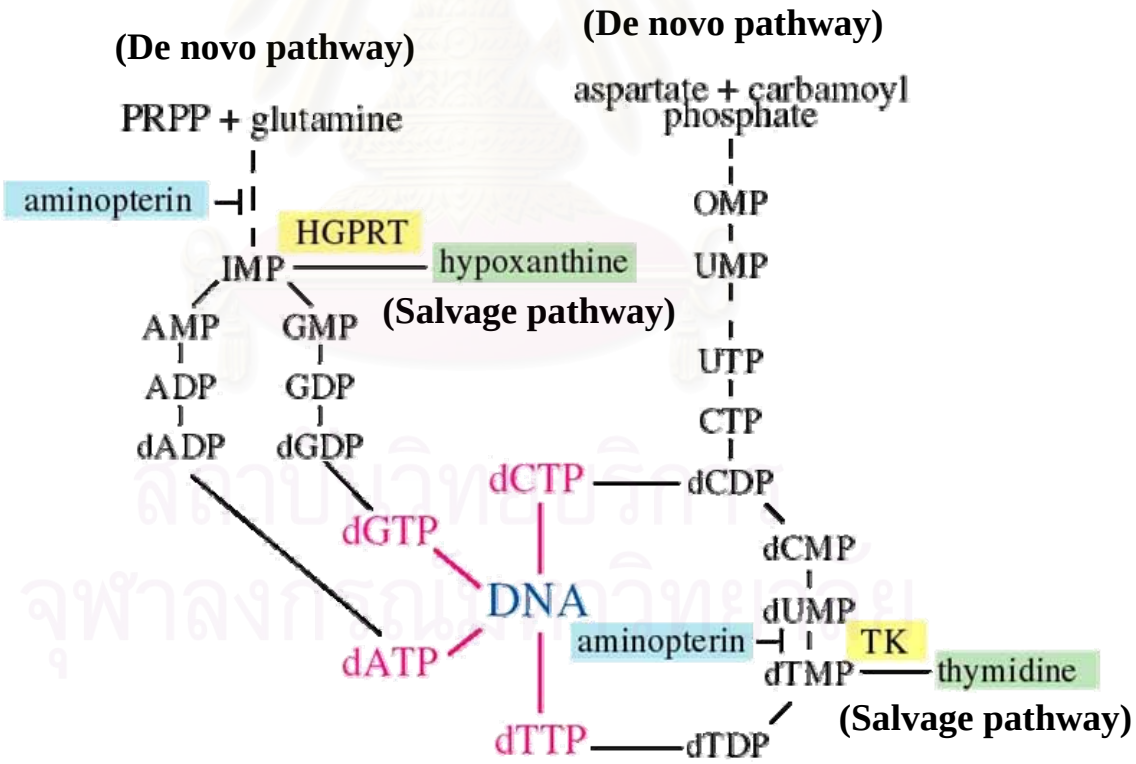
2.1.3.4 การผลิตโมโนโลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง พัฒนาโดย Köhler และ Milstein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการนำบีเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของเซลล์พลาสมาหรือเซลล์ไมอิโลมา (myeloma celll) โดยการใช้ polyethylene glycol กลายเป็นเซลล์ลูกผสมหรือเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอมตะของเซลล์มะเร็ง และสามารถสร้างแอนติบอดีได้ เนื่องจากเซลล์ไมอิโลมาจะให้คุณสมบัติความเป็นอมตะ ในขณะที่บีเซลล์ซึ่งมีอายุจำกัดให้คุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามต้องการ ในทางปฏิบัติไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่มีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาสภาพที่เลือกให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญได้ วิธีที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การใช้เซลล์ไมอิโลมาที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ (โดยการคัดเลือกหลังจากการทำให้ผ่าเหล่า) ที่เกี่ยวกับแนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน salvage pathway ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญใน HAT medium (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ดังนั้นจึงมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างเซลล์ไมอิโลมากับบีเซลล์เท่านั้นที่มีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ใน salvage pathway จากบีเซลล์ ส่วนบีเซลล์ที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆ และตายเอง (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การคัดเลือกของ HAT medium เป็นการใช้พื้นฐานจากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 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) การผ่าเหล่าของเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการใช้ salvage pathway เนื่องจากใน HAT medium ส่วนของ aminopterin ใช้ขัดขวาง de novo pathway ส่วน hypoxanthine และ thymine ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ใน salvage

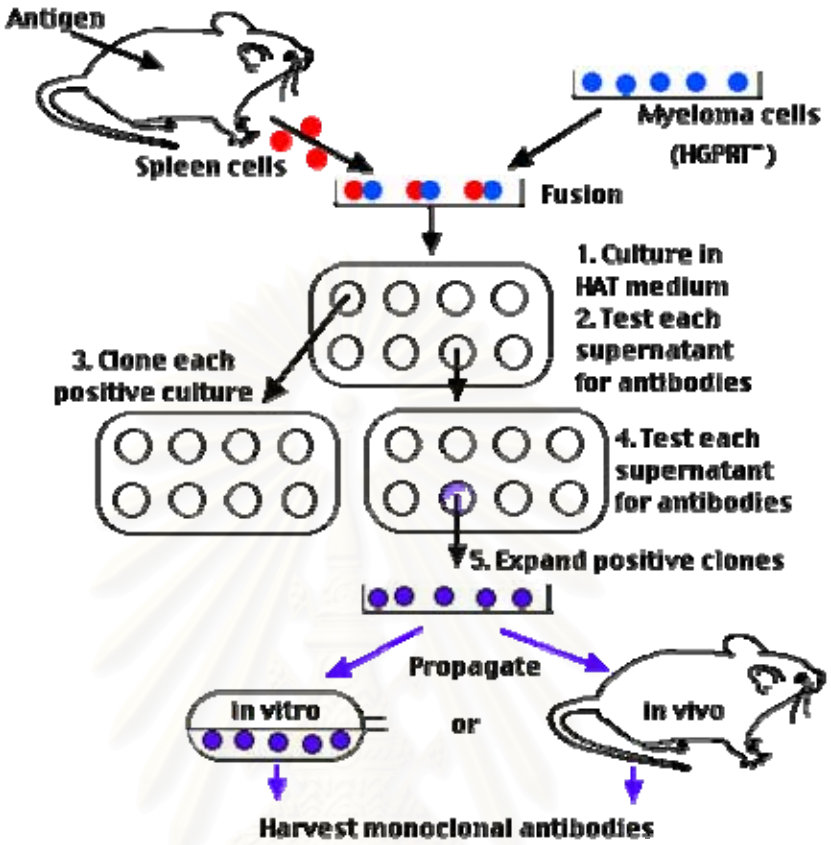
pathway ดังนั้นเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะตายใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สำหรับสร้างดีเอ็นเอหรืออาร์เอนเอ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

เทคโนโลยีของการผลิตไฮบริโดมามักจะใช้เซลล์ไมอิโลมาที่ผ่าเหล่า 2 ประการ (double mutants) คือเอนไซม์ HGPRT บกพร่อง ($HGPRT^-$) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Ig^- mutant) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมาถอดรหัสมาจากยีนของเซลล์ม้าม (spleen cell) โดยเซลล์ไมอิโลมาเพียงแต่ทำให้เซลล์เป็นอมตะเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่เฉพาะที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไป ได้แก่ ELISA และ Immunoassay ต่างๆ หลังจากสามารถพิสูจน์ทราบเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียวกัน และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.4 แนวทางการสังเคราะห์ดีเอนเอของ de novo pathway และการสังเคราะห์ดีเอนเอของ salvage pathway ในเซลล์ปกติ

(แหล่งที่มา : http://www.reactome.org/figures/denovo_UMP_synthesis.jpg)



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(แหล่งที่มา : http://www.biology.iupui.edu/biocourses/Biol540/6secondwavefullCSS.html)

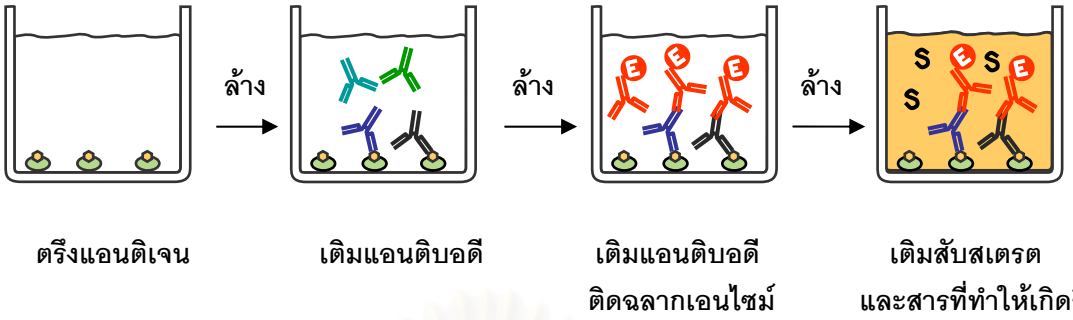
2.1.4 หลักการของ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ในการตรวจเพื่อต้องการทราบว่า สารเบต้าอะโกนิสต์มีอยู่หรือไม่ในเนื้อสัตว์จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันห้องปฏิบัติการหลายแห่งทั่วโลก รวมทั้งห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์จะใช้วิธี Enzyme immunoassay (EIA) และวิธี Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) โดยมักใช้การตรวจ EIA เป็นวิธีใช้สำหรับตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้น (screening test) เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างนั้นมีสารที่ต้องการตรวจสอบตกค้างในเนื้อสัตว์หรือไม่ ซึ่งทำให้สามารถพิสูจน์ได้ว่า ตัวอย่างนั้นปลอดภัยสำหรับการบริโภคหรือไม่ ส่วนวิธี GC-MS เป็นวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ในเนื้อสัตว์ที่มีปริมาณน้อยมากระดับหนึ่งในพันล้าน (ppb) แต่ใช้เวลาการวิเคราะห์นานกว่า จึงนิยมใช้เป็นวิธีที่ใช้ยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์

หลักการ ELISA หรือ EIA คล้ายกับ RIA (Radioimmunoassay) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เพียงแต่ใช้เอนไซม์แทนสารกัมมันตรังสีเชื่อมต่อกับแอนติบอดี เอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรตที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (chromogenic substrate) โดยทั่วไปเอนไซม์ต่างๆ ที่นิยมใช้ใน ELISA เช่น เอนไซม์ alkaline phosphatase เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน p-nitrophenylphosphate (pNPP) เป็น p-nitrophenol ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง หรือเอนไซม์ horseradish peroxidase ที่มีสับสเตรตหลายชนิด ได้แก่ 2,2'-azo-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), o-phenylenediamine (OPD) และ 3,3'5,5'- tetramethylbenzidine base (TMB) โดยจะเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียว สีส้ม และสีน้ำเงิน ตามลำดับ จากนั้นการแปลผลการทดสอบ จะขึ้นอยู่กับความเข้มสีหรือการดูดกลืนแสงที่เกิดจากการย่อยสับสเตรต (substrate) ที่เหมาะสมกันของเอนไซม์นั้นๆ โดยเทคนิคของ ELISA นั้นมีข้อดีคือ มีความจำเพาะและความไวสูงสามารถหาปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัมหรือหนึ่งในพันล้านส่วน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

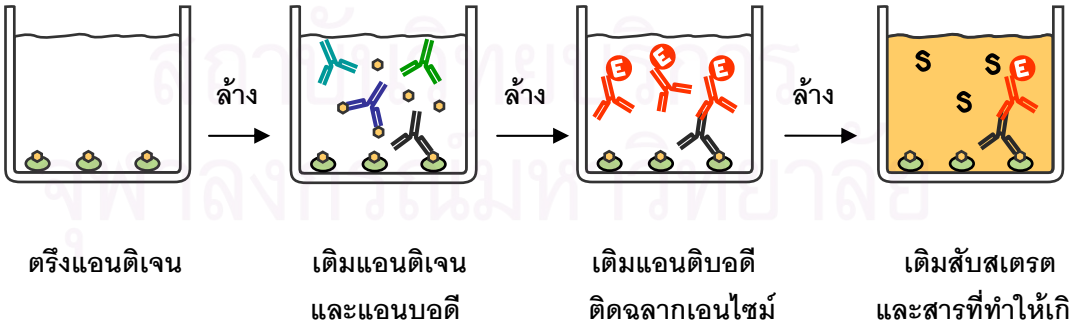
การพัฒนา ELISA รูปแบบต่างๆ ทำให้สามารถใช้ในเทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนหรือแอนติบอดีในแง่คุณภาพและปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณ เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่าง โดยเทคนิคของ ELISA ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งเป็น 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

2) indirect competitive ELISA เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัม หรือแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาว่า แอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปอิสระได้หรือไม่ และสามารถนำไปวัดปริมาณแอนติเจนที่ต้องได้ในกรณีมีแอนติเจนที่ทราบปริมาณเป็นแอนติเจนมาตรฐาน ขั้นตอนในการตรวจสอบคล้ายกับวิธี indirect ELISA เพียงแต่ในขั้นตอนการเติมแอนติบอดีนั้นจะเติมแอนติเจนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ หรือสารละลายแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณลงในหลุมที่มีการตรึงแอนติเจนไว้แล้ว พร้อมกับเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นในความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำไปบ่มกับแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธี indirect ELISA โดยวิธีนี้จะเป็นการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่ตรึงอยู่ที่ก้นหลุมกับแอนติเจนในสารละลายที่เติมลงไปในการแย่งจับกับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนในการตรวจสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Shelver และคณะ (2000) ได้ทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน จากการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัวด้วยแร็กโทพามีนที่เชื่อมเข้ากับโปรตีน Keyhole limpet hemocyanin (KLH) โดยการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะนำสารที่ได้มาผสมกับ Freund's complete adjuvant ปริมาณ 100 ไมโครกรัม จากนั้นทำการฉีดกระตุ้นซ้ำจำนวน 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 30 วัน โดยผสมสารกับ Freund's incomplete adjuvant ปริมาณ 100 ไมโครกรัม แล้วทำการเก็บเลือดหลังจากการกระตุ้นครั้งสุดท้ายประมาณ 10-14 วันพบว่า เมื่อนำเลือดหนูมาแยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมมาตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ด้วยแร็กโทพามีนที่เชื่อมกับโปรตีน BSA ค่าไตเตอร์ (titer) สูงถึง 1:16000 และทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยแร็กโทพามีนปริมาณ 50 ไมโครกรัมเข้าทางเส้นเลือดดำบริเวณหาง ก่อนวันหลอมรวมเซลล์เป็นเวลา 4 วัน ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายแล้วนำเซลล์ม้ามจากหนูมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมา Sp2/0Ag14 ด้วย PEG 1500 ซึ่งได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนจำนวน 4 โคลน คือ โคลนรหัส 4B7, 5G10, 7D12 และ 13B2 จากนั้นทำการคัดเลือกได้ใช้โคลน 5G10 ในการทดลอง พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็น $IgG_{1}\kappa$ ส่วนในการทำปฏิกิริยาแอนติบอดีจะจดจำตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และหมู่ฟีนอลของ N-butylphenol ของสารแร็กโทพามีน และแอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการตรวจวัดความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารแร็กโทพามีนเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบความสามารถในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

Wang และคณะ (2006) ได้ใช้เทคนิค HPLC และ ELISA เพื่อตรวจสอบการเจือปนของสารแร็กโทพามีนในอาหารเลี้ยงสุกร เมื่อตรวจวิเคราะห์อาหารเลี้ยงสุกรที่มีส่วนผสมสารแร็กโทพามีนอยู่ 50-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลได้ (recovery) อยู่ในช่วง 105.5-111.4% และ 89.1-92.9% ด้วยเทคนิค ELISA และ HPLC ตามลำดับ และสามารถตรวจวัดปริมาณสารที่ต่ำที่สุดด้วยวิธี ELISA และ HPLC ได้เท่ากับ 0.24 และ 0.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบระหว่างการตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC และ ELISA พบว่า เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไวและรวดเร็วในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิค HPLC ดังนั้นจึงนิยมนำเทคนิค ELISA มาตรวจสอบขั้นพื้นฐานหาสารแร็กโทพามีนในอาหารเลี้ยงสุกร ก่อนนำไปตรวจสอบหาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC

Li และคณะ (2007) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน โดยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแร็กโทพามีนที่เชื่อมกับโปรตีน human serum albumin ทำการตรวจสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เป็น IgG_{2a} และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มด้วย

Xu และคณะ (2007) ได้ใช้เทคนิค IAC (Immunoaffinity column) ในการแยกสารแร็กโทพามีนจากตัวอย่างให้บริสุทธิ์ก่อนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร โดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารแร็กโทพามีน ซึ่งพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ผลิตจากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยแร็กโทพามีนที่เชื่อมกับโปรตีน BSA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉีดกระตุ้นซ้ำโดยห่างกันเป็นเวลา 14 วัน หลังจากกระตุ้นครั้งที่ 3 ทำการเก็บเลือดจากกระต่ายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นทำการปั่นแยก นำเอาส่วนซีรัมที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี saturated ammonium sulfate และ ทำการผ่านคอลัมน์ protein A-Sepharose 4B จากนั้นนำเอาแอนติบอดีที่บริสุทธิ์มาเชื่อมกับ CNBr-activated sepharose จะได้คอลัมน์สำหรับการแยกแร็กโทพามีนจากตัวอย่าง แล้วทำการตรวจสอบแร็กโทพามีนในตัวอย่างพบว่า ความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างปัสสาวะสุกร และ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างเนื้อสุกรด้วยเทคนิค ELISA และเมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้พบว่า ไม่ทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ จากนั้นทำการยืนยันผลโดยใช้เทคนิค LC-MS พบความสัมพันธ์ในการตรวจสอบระหว่างเทคนิค ELISA กับ LC-MS สูงกว่า 0.89

ปิยะนุช เรืองศรีอรัญ (2548) ได้ผลิตเซลล์ไฮบริโดรมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเคลนบูเทอรอล ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ จากการฉีดกระตุ้นหนูด้วยสารเคลนบูเทอรอลที่เชื่อมเข้ากับโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ได้โมโนโคลนทั้งหมด 7 โคลน คือ โคลนรหัส 3/9B 1/7C 1/11G 3/9A 3/6C 6/11Dและ 6/11G โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดมีไอโซไทป์เป็น IgG_1 และมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 0.08-0.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้แอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการตรวจวัดความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารเคลนบูเทอรอล (Lower limit of detection; LOD) อยู่ระหว่าง 5-198 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกโคลน 3/9A เนื่องจากให้ค่า IC_{50} และ LOD น้อยสุด และเมื่อทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 3/9A บริสุทธิ์ขึ้น จะมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 4 และ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ทุกชนิด

ในปี 2551 สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ของกรมปศุสัตว์ ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์น้ำที่ปนเปื้อนสารเร่งเนื้อแดง 10 ชนิด ได้แก่ ซิมาเทอรอล (cimaterol) ซิมบูเทอรอล (cimbuterol) ซัลบูตามอล (salbutamol) แร็กโทพามีน (ractopamine) เคลนโพรเพอรอล (clenproperol) เคลนบูเทอรอล (clenbuterol) ริโตดีน (ritodrine) ไอโซซูพรีน (isoxsuprine) มาบิวเทอรอล (mabuterol) และ มาเพนเทอรอล (mapenterol) ด้วยวิธี LC-MS โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) อยู่ในช่วง 0.017-0.37 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.26-0.46 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
1. หนูเมาส์ สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. เซลล์ไมอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NS-I)	ATCC No: TIB 18

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. ตู้ดูดควัน	Theera Trading co. (Thailand)
7. ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation (USA)
8. ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply co.,Ltd. (Thailand))

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
9. ตู้ -70 องศาเซลเซียส	ธเนศพัฒนา (Thailand)
10. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Udono-RII Memmert (Japan)
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)
12. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
13. ปั๊มลม	Iwaki (Japan)
14. ชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส	Bio-Rad (USA)
15. ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
16. ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson (France)
17. เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro (Thailand)
18. กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
19. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
20. ขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน	Techne Incorporated (USA)
21. จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc (Denmark)
22. จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม 48 หลุมและ 24 หลุม	Corning Incorporated (USA)
23. จานเลี้ยงเซลล์	Corning Incorporated (USA)
24. หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
25. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP (USA)
26. หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (cryotube)	Nunc (Denmark)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
1. Acrylamide gel	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich (USA)
2. Aminopterine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)
3. 3-amino-5-Morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
4. 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
5. Ammonium hydroxide (NH_4OH)	เตรียมตัวทำละลาย TLC	Sigma-Aldrich (USA)
6. Ammoniumpersulfate (APS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich (USA)
7. BCA™ protein assay kit	ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน	Pierce (USA)
8. Beta-mercaptoethanol	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich (USA)
9. Bovine serum albumin (BSA)	โปรตีนมาตรฐานและใช้เชื่อมต่อกับแร็กโทพามีน	Sigma-Aldrich (USA)
10. Brombuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม	Witega (Germany)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
11. Bromchlorbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม	Witega (Germany)
12. Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	Sigma-Aldrich (USA)
13. Chloramphenicol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
14. Cimbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม	Witega (Germany)
15. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck (Germany)
16. Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
17. Clenproperol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม	Witega (Germany)
18. Coomassie Brilliant blue R-250	ใช้ย้อมเจล SDS-PAGE	Pierce (USA)
19. D-glucose	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)
20. Dichloromethane (CH_2Cl_2)	เตรียมตัวทำละลาย TLC	Sigma-Aldrich (USA)
21. Diethyl ether	ใช้สลบหนูทดลอง	Sigma-Aldrich (USA)
22. Dimethylformamide (DMF)	ตัวทำละลายแร็กโทพามีน	Sigma-Aldrich (USA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
23. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	Fluke (Switzerland)
24. Dioxane	ตัวทำละลาย	Sigma-Aldrich (USA)
25. di-Sodium hydrogenphosphate	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck (Germany
26. Fetal calf serum (FCS)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Invitromax (USA)
27. Freund's complete adjuvant	เตรียมแอนติเจน	Sigma-Aldrich (USA)
28. Freund's incomplete adjuvant	เตรียมแอนติเจน	Sigma-Aldrich (USA)
29. Glycerol	เตรียม Sample buffer	Merck (Germany)
30. Glycine	เตรียม Running buffer	Pacific science (Thailand)
31. Hydrochloric acid (HCl)	เตรียม Tris buffer	Merck (Germany)
32. Hydrogen peroxide (H_2O_2)	เตรียมสับสเตรต	Fluka (Switzerland)
33. Hypoxanthine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)
34. Isobutylchloroformate	เตรียมแอนติเจน	Merck (Germany)
35. Isotyping kit	ทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	Sigma-Aldrich (USA)
36. Kanamycin	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
37. L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
38. Methanol	เตรียมตัวทำละลาย TLC	BDH (England)
39. Metronidazole (MNZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
40. Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
41. O-phenylenediamine (OPD)	เตรียมสับสเตรต	Abkem Iberia L.S. (Spain)
42. Ovalbumin (OVA)	เตรียมแอนติเจน	Sigma-Aldrich (USA)
43. Penicilin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
44. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเทคนิค ELISA	Jackson Immuno Research (USA)
45. Picrylsulfonic acid	ใช้ในการตรวจวัดประสิทธิภาพการเชื่อมติด	Sigma-Aldrich (USA)
46. Polyethylene glycol (PEG)	ใช้ในการหลอมรวมเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)
47. Pyridine	สารกลางในการเปลี่ยนสาร	Carlo Erba (USA)
48. Pyruvic acid	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
49. RPMI 1640 medium	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Biochrom AG (Germany)
50. Ractopamine HCl (RAC)	ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	Sequoia Research Products Ltd. (UK)
51. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
52. Skim milk (นมพร่องมันเนย)	ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเทคนิค ELISA	Anline (Thailand)
53. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich (USA)
54. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และแอนติเจน	Merck (Germany)
55. Sodium chloride (NaCl)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck (Germany)
56. Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo Erba (USA)
57. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich (USA)
58. Sodium pyruvate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	แหล่งที่มา
59. Streptomycin	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
60. Succinic anhydride	เตรียมแอนติเจน	Sigma-Aldrich (USA)
61. Sulfamethazine	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
62. Sulfuric acid (H_2SO_4)	ใช้หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	Merck (Germany)
63. Tetracycline hydrochloride	ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม	Sigma-Aldrich (USA)
64. N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Pierce (USA)
65. Thymidine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich (USA)
66. Tributylamine	เตรียมแอนติเจน	Fluka (Germany)
67. Tris (hydroxymethyl) Aminomethane (Trizma base)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich (USA)
68. Tween 20	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Riedel-de Haën (UK)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA (U.S. Patent No. 6,274,334)

3.4.1.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของแร็กโทพามีน

ทำการเปลี่ยนแปลงแร็กโทพามีนเป็น ractopamine-hemisuccinate โดยนำสาร ractopamine HCl (RAC) ปริมาณ 34 มิลลิกรัม หรือ 0.1 มิลลิโมล มาทำปฏิกิริยากับสาร succinic anhydride ปริมาณ 12 มิลลิกรัม หรือ 0.1 มิลลิโมล ซึ่งละลายอยู่ใน pyridine ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ด้วยแท่งแม่เหล็ก ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำการกำจัด pyridine ออกโดยการระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจน และตรวจสอบผลการเกิดผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย 85% dichloromethane (CH_2Cl_2) : 15% methanolic NH_4OH (10%) จากนั้นทำการดูแถบของสาร pyridine, RAC, RAC-hemisuccinate ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร นำแถบที่ได้ไปคำนวณหาค่า R_f สูตรการคำนวณหาค่าดังนี้

$$\text{Relative mobility } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

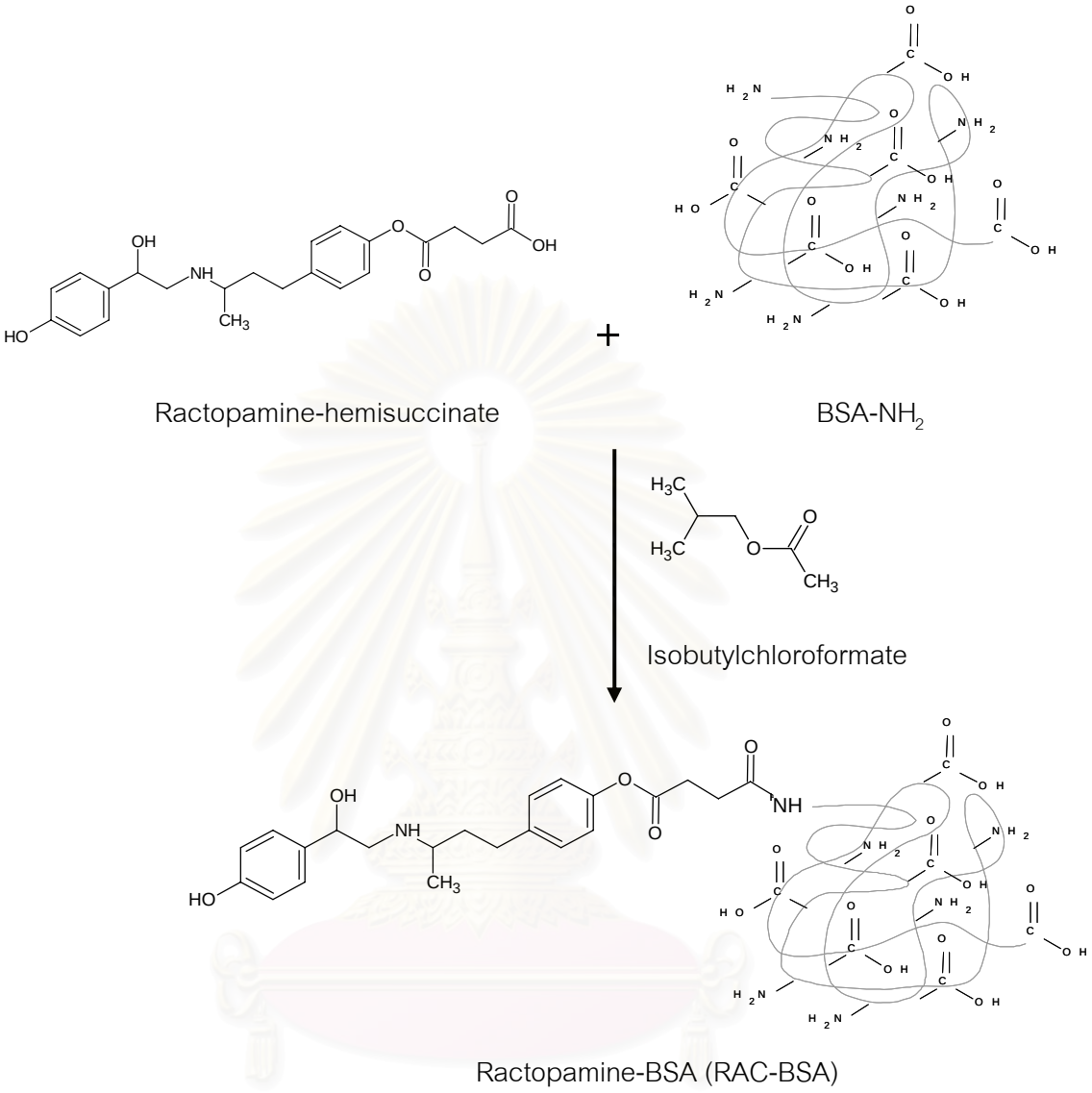
สาร ractopamine-hemisuccinate ที่เตรียมได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.1.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ bovine serum albumin (BSA) ดังรูปที่ 3.1 โดยการนำ ractopamine-hemisuccinate ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.1 มาละลายด้วยสารละลายผสมระหว่าง DMF:1,4-dioxane ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย tributylamine ปริมาตร 6.56 ไมโครลิตร หรือ 0.0275 มิลลิโมล กวนเบาๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 10 นาที บนน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย isobutylchloroformate ปริมาตร 3.60 ไมโครลิตร หรือ 0.0275 มิลลิโมล กวนเบาๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการเติมสารละลาย BSA ที่ละลายอยู่ใน

0.2 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (Sodium carbonate buffer) pH 9.0 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยค่อยๆ หยดด้วยปริมาตรน้อยๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน จากนั้นทำการกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการนำสารละลายที่ได้ไปไดอะลิซิสเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสออกจากตะกอนสีขาว นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับแอนติเจนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของ RAC-BSA ด้วยวิธี 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) และยืนยันผลการเชื่อมต่อด้วยการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปด้วยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 การเชื่อมต่อระหว่าง RAC กับโปรตีนพาหะ BSA โดยใช้ isobutylchloroformate

3.4.1.3 การเตรียมแอนติเจนสำหรับทำ ELISA

ทำการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ egg white albumin (OVA) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.2 โดยความเข้มข้นของ OVA ที่ใช้เท่ากับ 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

3.4.1.4 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับแอนติเจน

ทำการหาปริมาณโปรตีนหลังจากการเชื่อมต่อกับแร็กโทพามีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA assay) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.025, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย PBS และสารตัวอย่างถูกเจือจางในอัตราส่วนเจือจาง 1:10, 1:20 และ 1:40 จากนั้นเตรียม Working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับรีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) แล้วเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ประมาณ 30 วินาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำจานทดสอบชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างที่ได้

3.4.1.5 การวัดประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อของโปรตีนพาหะกับแอนติเจน

ทำการหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของโปรตีนพาหะกับแร็กโทพามีนด้วยวิธี TNBSA ซึ่งเป็นการวัดเปรียบเทียบจำนวนหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนก่อนและหลังการเชื่อมต่อ โดยทำการเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไบคาร์บอเนต pH 8.5 ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Picrylsulfonic acid (TNBS) ที่มีความเข้มข้น 0.05% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาเติม SDS ที่มีความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร (A_{335}) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ใช้ในการเชื่อมติดสารจากสูตร เพื่อทำให้ทราบถึงเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมของโปรตีนกับแร็กโทพามีน

เปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้ = $\frac{A_{335} \text{ ของโปรตีนพาหะ- } A_{335} \text{ของโปรตีนที่เชื่อมกับแร็กโทพามีน}}{A_{335} \text{ ของโปรตีนพาหะ}}$ X 100

3.4.1.6 การหามวลโมเลกุลของ RAC-BSA

ทำการหาอัตราส่วนโมโลกุลของแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA ด้วยวิธี MALDI-TOF-MS โดยดูจากมวลโมเลกุลของ BSA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่า มีแร็กโทพามีนเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA และนำค่ามวลโมเลกุลของโปรตีน BSA ที่เพิ่มขึ้นมาคำนวณหาจำนวนโมเลกุลของแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA 1 โมเลกุล จากสูตร

จำนวนโมเลกุลของแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อ = $\frac{\text{มวลโมเลกุลของ RAC-BSA – มวลโมเลกุลของ BSA}}{\text{มวลโมเลกุล RAC}}$

3.4.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ RAC

3.4.2.1 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย RAC-BSA

ทำการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ด้วยแร็กโทพามีนที่ถูกเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะเป็นการผสมแอนติเจนปริมาณ 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) นำเลือดที่ได้ไปแช่ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสที่เป็นซีรัมมาทำการทดสอบหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ตามวิธีข้อ 3.4.2.2 และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ RAC อิสระได้หรือไม่ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้ RAC-OVA ที่เตรียมได้มาเคลือบบนจานทดสอบชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA ตามวิธีข้อ 3.4.2.3 จากนั้นเลือกหนูทดลองตัวที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงและสามารถจับกับ RAC อิสระได้ไปทำต่อในข้อ 3.4.3 โดยทำการฉีดกระตุ้นหนูครั้ง

สุดท้ายด้วย RAC-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมที่ไม่มีการผสมกับ Freund's adjuvant ก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วัน

3.4.2.2 การหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ในซีรัมด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย RAC-OVA และ OVA ที่มีความเข้มข้น 3 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 เติมสารละลายตัวอย่างคือ ซีรัมจากเลือดหนูที่ถูกเจือจางด้วยสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เพื่อจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA) ในอัตราการเจือจางต่างๆ ตั้งแต่ 1:1000 -1:1024000 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (goat 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 เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายอยู่ในฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ (phosphate citrate buffer) pH 5.0 ที่มีความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานทดสอบชนิด 96 หลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader

3.4.2.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อแร็กโทพามีนในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

นำซีรัมหนูที่ได้มาทำการตรวจสอบดูว่า หนูทดลองมีการผลิตแอนติบอดีต่อสารแร็กโทพามีนที่อยู่ในรูปอิสระหรือไม่ ถ้าแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจับกับแร็กโทพามีนที่อยู่ในรูปอิสระได้ จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ indirect competitive ELISA ลดลง เนื่องจากเกิดการแข่งขันระหว่างแร็กโทพามีนในรูปอิสระและแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนที่ยึดติดที่ก้นหลุม ทำให้ปริมาณแอนติบอดีที่เหลืออยู่ในซีรัมไปจับกับแร็กโทพามีนก้นหลุมลดลง ทำการทดสอบโดย

เตรียมแร็กโทพามีนที่มีความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานทดสอบ ELISA ที่ถูกเคลือบด้วย RAC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนยและล้างด้วย PBS-T แล้วต่อจากนั้นนำซีรัมหนูที่ถูกเจือจางด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในหลุมที่มีสารละลายแร็กโทพามีน แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนในข้อ 3.4.2.2 เช่นเดียวกับวิธี indirect ELISA

3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC

3.4.3.1 การเตรียมสารสื่อในการหลอมรวมเซลล์

นำโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน 5 กรัม อุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ 50%PEG (v/v) แบ่งเก็บใส่หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (เตรียมโดยวิธีปลอดเชื้อ) จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้งานในครั้งต่อไป

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโลมาสายพันธุ์ NS-I มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 10% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 7 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ เพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากพอสำหรับการหลอมรวมเซลล์ ในวันที่หลอมรวมเซลล์นับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ให้มีจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.3.3 การเตรียมเซลล์ม้าม

นำหนู BALB/c ที่เลือกได้จากข้อ 3.4.2.2 และ 3.4.2.3 ที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงและสามารถผลิตแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนที่อยู่ในรูปอิสระ มาทำให้สลบด้วยไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) จากนั้นทำการเจาะเลือดจากหัวใจเพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้ต่อไป และทำการเปิดช่องท้อง

นำม้ามออกมาด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยใช้กรรไกรตัดส่วนไขมันออกจากม้าม และตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดบนตะแกรงลวดตาถี่ โดยใช้ยางปลายด้ามของที่ดันหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์ม้ามละเอียดพอแล้ว จากนั้นนำไปปั่นล้างในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.3.4 การหลอมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมา (Fusion)

นำเซลล์มัยอีโลมาที่ได้จากข้อ 3.4.3.2 มารวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3.3 ในอัตราส่วน 3:1 ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ได้ปริมาตรเป็น 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆให้เซลล์ผสมกัน เติม 50%PEG (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (โดยก่อนนำไปใช้ในการหลอมรวมเซลล์นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ลงไปพร้อมการหมุนหลอดอย่างช้า ๆ และควบคุมการหยด PEG ให้หมดภายในเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายขึ้นลงเบา เพื่อให้เซลล์กระจายไม่จับเป็นก้อน ก่อนนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสออก ทำเช่นนี้ซ้ำอีกครั้ง เพื่อล้าง PEG ออกจากเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นปิเปตสารละลายที่มีเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการผลิตแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนที่อยู่ในรูปอิสระหรือไม่ตามวิธีในข้อ 3.4.3.5

3.4.3.5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC

ทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ด้วยวิธี indirect ELISA เหมือนข้อ 3.4.2.2 แต่ในขั้นตอนนี้เป็นการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย RAC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติม

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญอยู่หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเมื่อได้หลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกด้วยวิธี indirect ELISA แล้ว นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมนั้นมาทำการคัดเลือกต่อด้วยวิธี indirect competitive ELISA เหมือนข้อ 3.4.2.3 แต่ในขั้นตอนนี้เป็นการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย RAC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญอยู่หลุมละ 25 ไมโครลิตรที่ผสมกับ RAC ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เมื่อได้หลุมที่เติม RAC ที่อยู่ในรูปอิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่เติม RAC ที่อยู่ในรูปอิสระ แสดงว่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีการผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับ RAC ที่ในรูปอิสระได้ จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาทำการแยกให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution

3.4.3.6 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้โคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.3.5 มาทำให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิดเดียวกัน โดยทำการเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี FCS 20% กระจายเซลล์ให้ได้เป็น 1 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้เจริญเป็นโคโลนีเดียวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุมแล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบว่ายังสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC อยู่หรือไม่ด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA จากนั้นนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้เซลล์ที่ได้มีความเสถียรและมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน ถ้าเซลล์ไฮบริโดมายังสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

3.4.3.7 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10%(v/v) ให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ต้องการเก็บมาเติมน้ำยาเก็บเซลล์ที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 10%(v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันได้ดีกับน้ำยาเก็บเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็งสำหรับเก็บเซลล์ (cryotube) ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปแช่แข็งที่

อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.8 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวแล้วกลับมาเลี้ยงใหม่

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว มาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทันทีที่น้ำยาเก็บเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง นำเซลล์ไฮบริโดมาไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นรอจนกว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตมีปริมาณมากพอจึงทำการขยายลงจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.4.1 การตรวจไอโซไทป์

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไอโซไทป์ (Isotyping specific antibody) ชนิด IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM มาเจือจางด้วย PBS ให้มีอัตราการเจือจาง 1:1000 แล้วนำไปเติมลงในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบลงในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มีเอนไซม์ HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (Anti-Mouse IgG (Fab specific) – HRP) ที่เจือจางด้วย PBS-T ให้มีอัตราการเจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ที่ละลายอยู่ในฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่มีความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำจานทดสอบชนิด 96 หลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader

3.4.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

ทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัด (limit of detection)ได้โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการนำแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมมาผสมกับแร็กโทพามีนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10^{-1} – 10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเป็นการแย่งจับกันระหว่างแร็กโทพามีนอิสระในสารละลายกับแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนที่เคลือบอยู่ในหลุม แล้วนำมาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และแกน X เป็นค่า log ของความเข้มข้นของแร็กโทพามีนในสารละลาย และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ได้จากสูตร

$$LOD = B_0 - 3SD$$

เมื่อ B, B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่มีแร็กโทพามีนหรือไม่มีแร็กโทพามีนตามลำดับ

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยค่า LOD ที่ได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งนำมาใช้แสดงถึงความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถตรวจวัดสารได้

3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานอยู่ในค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (%cross-reactivity) กับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มของแร็กโทพามีนด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเจือจางที่เหมาะสมมาผสมรวมกับสารที่ต้องการตรวจสอบที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการตรวจสอบในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ในหลุม ถ้าสารใดให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าครึ่งหนึ่งของค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ไม่มีสารแสดงว่า ค่า IC_{50} สูงกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าสารใดให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าครึ่งหนึ่งของค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ไม่มีสารแสดงว่า ค่า IC_{50} ต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำมาทำการแปรความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจสอบ เพื่อหาความเข้มข้นต่อไป โดยค่า IC_{50} (50% of inhibition concentration) เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจสอบที่ทำให้อัตราส่วน $\%\ B/B_0$ ในการ

ทำ Indirect competitive ELISA ลดลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งหาได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ผลจาก ELISA แล้วนำมาคำนวณตามสูตร

$$IC_{50} = 50\% \ B/B_0$$

เมื่อ B, B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่มีสารที่ต้องการตรวจสอบหรือไม่มีสารที่ต้องการตรวจสอบ

แล้วนำค่า IC_{50} มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) ได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของแร็กโทพามีน} \times 100}{IC_{50} \text{ ของสารที่ต้องการตรวจสอบ}}$$

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนจากขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาถ่ายเซลล์ลงในขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน (Spinner flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 600 มิลลิลิตร โดยปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที และบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ 7-10 วัน เพื่อให้เซลล์ไฮบริโดมาผลิตแอนติบอดีออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณมากที่สุด จากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำมาแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส (Protein G Sepharose) ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column)

3.4.5.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

ทำการล้างคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรสปริมาตร 5 มิลลิลิตรด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เพื่อปรับภาวะคอลัมน์ให้เข้าสู่ภาวะสมดุลโดยปรับอัตราการไหล (flow rate) ให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ และผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 จากนั้นนำมาผ่านลงในคอลัมน์ด้วยปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วทำการล้างโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ไว้ประมาณ 1 มิลลิลิตรโดยสารละลายนี้จะถือเป็น

unbound fraction ทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โดยใช้ไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยหลอดเก็บสารละลายจะมีทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 9 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 65 ไมโครลิตรอยู่ภายในหลอดเก็บ เพื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างจากสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ให้เป็นกลาง หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการเก็บคอลัมน์โดยอยู่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่มีสารละลาย Thimerasol ความเข้มข้น 0.01%(v/v) จากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำมาตรวจสอบหาแอนติบอดีในแต่ละหลอดด้วยวิธี Indirect ELISA จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนโครมาโทแกรม แล้วเลือกหลอดเก็บสารละลายที่มีแอนติบอดีที่ต้องการมารวมกันเพื่อนำไปไดอะไลซิสด้วย PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.4.5.2 การหาปริมาณโปรตีน

ทำการหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย PBS และเจือจางสารตัวอย่างด้วยอัตราการเจือจาง 4, 8 และ 16 เท่า แล้วทำการทดสอบตามข้อ 3.4.1.4

3.4.5.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ทำการหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้วไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ได้จากสูตร

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

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

3.4.5.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่อยู่ในหลุมด้วยวิธี Indirect ELISA และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของแอนติบอดี จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้เพื่อหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์

3.4.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) โดยทำการเตรียมเจลที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตรได้จากการเตรียมสารละลาย 10% separating gel และเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้จนกว่า separating gel เกิดการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการเทน้ำกลั่นส่วนบนทิ้งแล้วเติม 5% stacking gel ลงด้านบนของ separating gel และใส่หวีลงในส่วน stacking gel เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์หลุมเจลสำหรับการใส่สารละลายตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้จนกว่า stacking gel เกิดการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำชุดของเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบลงในเครื่องทำอิเล็กโทรฟอเรซิส (electrophoresis chamber) ที่มีอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ทั้งส่วนบนและส่วนล่างของเครื่อง โดยใช้ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มี SDS ผสมอยู่เป็น running buffer จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้โดยมีปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัม และมีปริมาตรไม่เกิน 60 ไมโครลิตรต่อหลุมเจลที่ผสมกับสารละลายสีย้อมที่มีองค์ประกอบเป็น beta-mercaptoethanol, SDS และ bromophenol blue ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ผ่านการนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเติมลงในหลุมเจล ส่วนหลุมของ marker เติมลงไปด้วยปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นทำการต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) และเริ่มแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายสุดของเจลจึงทำการหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยสารละลายเมธานอลที่มีกรดอะซิติกผสมอยู่ จนกว่าจะสามารถมองเห็นแถบของโปรตีนได้อย่างชัดเจน

3.4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความไวด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

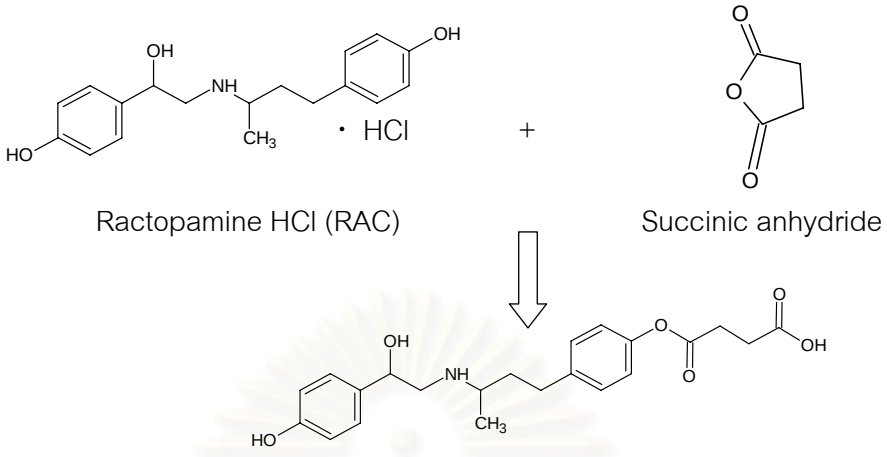
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูและสำหรับทำ ELISA

ในการฉีดแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายเพื่อกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนโดยการหลั่งแอนติบอดีต่อสารแอนติเจนชนิดนั้น สารที่จะเป็นแอนติเจนนั้นต้องมีขนาดโมเลกุลมากกว่า 5000 กรัมต่อโมล (ดาลตัน) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ เนื่องจากแร็กโทพามีนมีขนาดโมเลกุลเล็กที่เรียกว่า แฮปเทน (hapten) ซึ่งตัวมันเองไม่สามารถกระตุ้นหนูทดลองให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ จึงต้องรวมกับสารอื่นเป็นพาหะ (carrier) ให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่พอที่จะเป็นแอนติเจนได้ ดังนั้นจึงทำการเชื่อมแร็กโทพามีนกับโปรตีนขนาดใหญ่ก่อนนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง แต่เนื่องจากแร็กโทพามีนมีโครงสร้างที่ไม่พร้อมจับกับโครงสร้างของโปรตีนพาหะ ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของแร็กโทพามีนให้มีโครงสร้างพร้อมที่จะจับกับโปรตีนก่อน โดยทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของแร็กโทพามีน

เนื่องจากการเชื่อมต่อ RAC กับโปรตีนพาหะ เพื่อเกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลทั้งสองนั้นเป็นการเกิดพันธะเคมีของสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกกับสารที่หมู่เอมีน ดังนั้นเพื่อให้เกิดการเชื่อมต่อระหว่าง RAC กับโปรตีนพาหะ จึงทำการเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของ ractopamine HCl (RAC) ที่มีมวลโมเลกุล 337.85 กรัมต่อโมลเป็น ractopamine-hemisuccinate โดยใช้ succinic anhydride เป็นสารที่เติมหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ให้แก่ RAC ตรงบริเวณหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ได้เป็น ractopamine-hemisuccinate ที่มีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็น 437.92 กรัมต่อโมล ดังแสดงใน รูปที่ 4.1

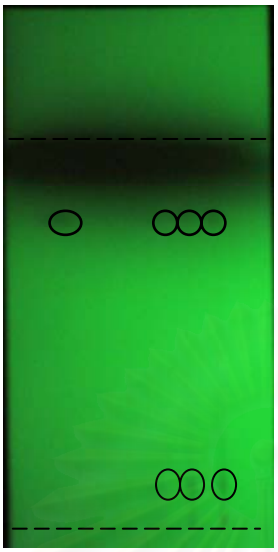


Ractopamine-hemisuccinate

รูปที่ 4.1 แผนภูมิของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของ RAC เป็น Ractopamine-hemisuccinate

จากนั้นทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยนำสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบด้วยวิธี Thin-layer chromatography พบว่า ในช่องที่ 1 แสดงให้เห็นจุดของ RAC ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.68 ส่วนช่องที่ 4 และ 5 แสดงจุดของสารละลายผสมตัวอย่างหลังทำปฏิกิริยาก่อนทำการกำจัด pyridine ออกจากระบบ ซึ่งสารละลายผสมตัวอย่างที่ได้จากทั้งสองช่องจะมีค่า R_f เท่ากับ 0.08 ส่วนช่องที่ 6 แสดงจุดของสารละลายผสมตัวอย่างหลังทำปฏิกิริยาและกำจัด pyridine ออกโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน มีค่า R_f เท่ากับ 0.08 เช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อนำค่า R_f ที่ได้จากช่องทั้งสี่มาทำการเปรียบเทียบ พบว่า ในช่องที่ 4, 5 และ 6 มีจุดของผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นและไม่ตรงกับจุดของสารตั้งต้น คาดว่าจุดที่เกิดขึ้นเป็น ractopamine-hemisuccinate แต่เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดอย่างไม่สมบูรณ์ จึงยังคงพบจุดของแร็กโทพามีนที่เป็นสารตั้งต้นอยู่บ้างเล็กน้อยเป็นจุดจางๆ บนช่องทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Lane 1 = Ractopamine
Lane 2 = Succinic anhydride
Lane 3 = Pyridine
Lane 4, 5 = Ractopamine-hemisuccinate (ก่อนกำจัด pyridine ออก)
Lane 6 = Ractopamine-hemisuccinate (หลังกำจัด pyridine ออก)

รูปที่ 4.2 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของ RAC เป็น ractopamine-hemisuccinate เมื่อส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร

4.1.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ในการเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองนั้นเป็นการเตรียมโดยการนำ ractopamine-hemisuccinate มาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA โดยมีสารตัวกลางในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสาร isobutylchloroformate ซึ่งเป็นตัวช่วยทำให้เกิดพันธะเพปไทด์ขึ้นระหว่าง ractopamine-hemisuccinate กับโปรตีน BSA จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ RAC ด้วยวิธี BCA ดังตารางที่ 4.1 และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร มาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA (ตารางที่ ก.1 และรูปที่ ก.1, ภาคผนวก ก) จากผลการทดลองพบว่า RAC-BSA มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน RAC-BSA โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี BCA

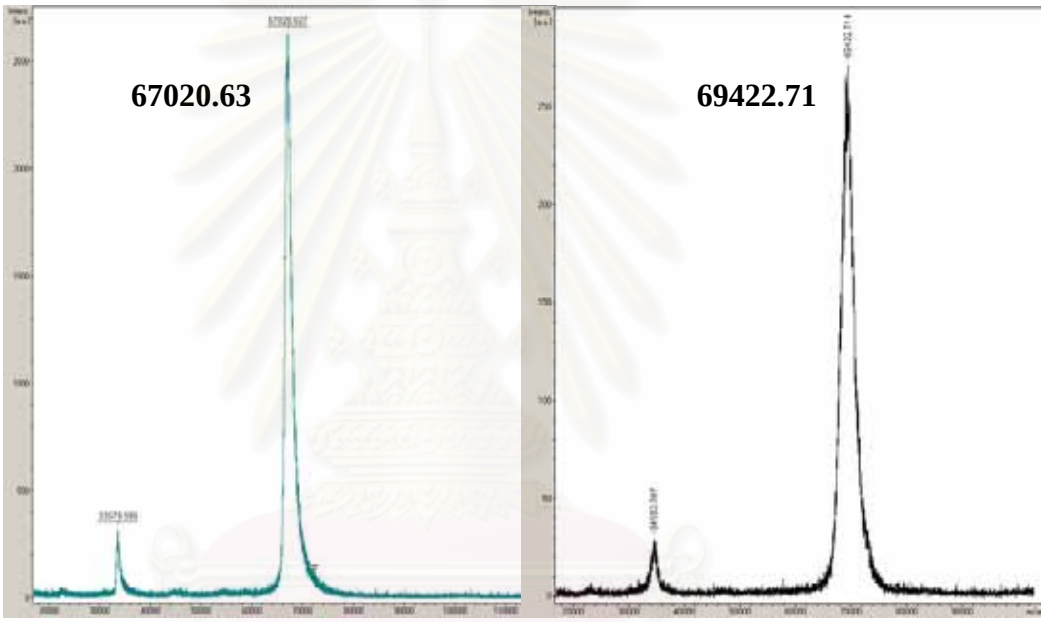
อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:10	0.266	2.48
1:20	0.144	2.68
1:40	0.067	2.50
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		2.55

เมื่อทราบความเข้มข้นของ RAC-BSA โดยเฉลี่ยเท่ากับ 2.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของโปรตีน BSA กับแร็กโทพามีน โดยนำ RAC-BSA มาทำการหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของหมู่เอมีนของโปรตีน BSA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ RAC ด้วยวิธี TNBSA พบว่าหมู่เอมีนของโปรตีน BSA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ RAC คิดเป็น 36.3 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของ BSA กับ RAC ด้วยวิธี TNBSA

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{335} ของ BSA	A_{335} ของ RAC-BSA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ
1.00	1.634	0.955	41.5
0.50	1.108	0.745	32.7
0.25	0.797	0.521	34.6
ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเชื่อมต่อของ RAC-BSA			36.3

จากนั้นทำการยืนยันผลการเชื่อมต่อของ RAC-BSA โดยหามวลโมเลกุลของ BSA และ RAC-BSA ด้วย MALDI-TOF-MS ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.3 พบว่า BSA มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 67,020.63 ดาลตัน และ RAC-BSA มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 69,422.71 ดาลตัน เมื่อนำค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนทั้งสองมาวิเคราะห์เปรียบเทียบจะเห็นได้ว่า มวลโมเลกุลของโปรตีน RAC-BSA ที่เตรียมได้มีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2,402.08 ดาลตัน สามารถคำนวณเป็นอัตราส่วนโมเลกุลของ RAC ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ BSA เท่ากับ 8:1 (โดยมวลโมเลกุลของ RAC มีค่าเท่ากับ 301.38 ดาลตัน)



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของมวลโมเลกุลของ BSA และ RAC-BSA ด้วยวิธี MALDI-TOF-MS

4.1.3 การเตรียมแอนติเจนสำหรับทำ ELISA

ในการเตรียมแอนติเจนที่นำมาใช้ในการเคลือบบนก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมนั้นเป็นการเตรียมโดยการนำ ractopamine-hemisuccinate มาทำการเชื่อมต่อกับ OVA โดยมีสารตัวกลางในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสาร isobutylchloroformate ในขั้นตอนของการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนพาหะ OVA กับ RAC เหมือนขั้นตอนของการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนพาหะ BSA กับ RAC จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ RAC ด้วยวิธี BCA และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรที่ได้ มาทำการ

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ OVA (ตารางที่ ก.2 และรูปที่ ก.2, ภาคผนวก ก) จากผลการทดลองพบว่า RAC-OVA มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของโปรตีน RAC-OVA ด้วยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
-	1.072	1.04
1:2	0.617	0.92
1:4	0.420	0.92
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		0.96

เมื่อได้ความเข้มข้นของ RAC-OVA โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของโปรตีนพาหะกับแร็กโทพามีน โดยนำ RAC-OVA มาทำการหาโมเลกุลของหมู่เอมีนของโปรตีน OVA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ RAC ด้วยวิธี TNBSA พบว่าหมู่เอมีนของโปรตีน OVA ที่ถูกนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับ RAC คิดเป็น 42.29 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมต่อของโปรตีน OVA กับ RAC โดยวิธี TNBSA

ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	A_{335} ของ OVA	A_{335} ของ RAC-OVA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ
0.50	1.806	1.071	40.69
0.25	1.684	0.945	43.88
ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเชื่อมต่อของ RAC-OVA			42.29

จากผลการทดลองในการเชื่อมต่อระหว่าง RAC และโปรตีนพาหะ (BSA หรือ OVA) พบว่า เมื่อนำความเข้มข้นของ RAC-BSA และ RAC-OVA มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้ของ RAC-BSA และ RAC-OVA มีค่า 5.1 และ 1.92 มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณ BSA และ OVA ตั้งต้นที่ใช้ในการเชื่อมต่อมีค่าเท่ากับ 25 และ 17 มิลลิกรัม ตามลำดับ จะเห็นว่า มีการสูญเสียโปรตีนไปจำนวนมากที่ไม่สามารถนำมาฉีดกระตุ้นหนูทดลองและทำการทดสอบวิธี ELISA ทั้งนี้เนื่องมาจากมีการเกิดตะกอนขาวขุ่นของโปรตีนพาหะขึ้นระหว่างการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนพาหะและ ractopamine-hemisuccinate จึงนำไปปั่นแยกตะกอนแล้วสารละลายส่วนใสมาทำการฉีดกระตุ้นหนูหรือทดสอบวิธี ELISA

4.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ RAC

หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 ในหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัวด้วยแอนติเจน RAC-BSA เพื่อให้หนูทดลองผลิตแอนติบอดีต่อ RAC นำส่วนที่เป็นซีรัมของหนูทดลองทั้งสามมาทำการหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี indirect ELISA และทำการทดสอบว่าแอนติบอดีในซีรัมที่ได้จากหนูทดลองสามารถจับกับ RAC ที่อยู่ในรูปอิสระได้หรือไม่ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ก่อนนำไปหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

4.2.1 การหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ในซีรัมที่ได้จากหนูทดลอง

จากการนำซีรัมมาทดสอบหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โปรตีน RAC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจนในการเคลือบบนก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA โดยเลือกระดับแอนติบอดีที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรมีค่าประมาณ 0.2 หรือสูงกว่า (ประมาณ 2 เท่าของค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบ) และพบว่า หนูทดลองทั้งสามให้ระดับแอนติบอดีอยู่ที่ระดับการเจือจาง 1:64000, 1:512000, 1:128000 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ระดับแอนติบอดีในซีรัมที่ได้จากหนูทดลองด้วยวิธี indirect ELISA

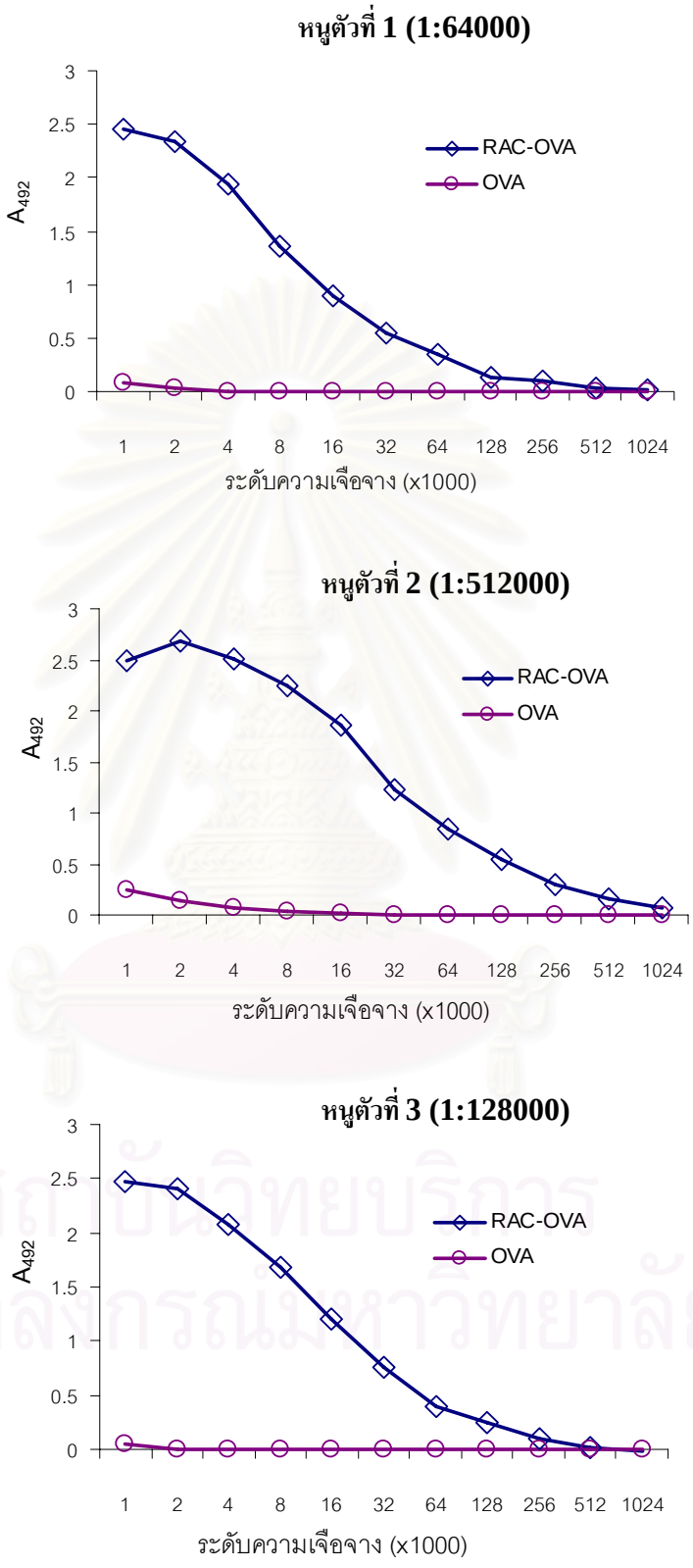
ระดับการเจือจางของซีรัม	A_{492}			
	ซีรัมหนูก่อนฉีดกระตุ้น	หนูตัวที่ 1	หนูตัวที่ 2	หนูตัวที่ 3
1:1000	0.089	2.601	2.515	2.508
1:2000	0.073	2.440	2.707	2.561
1:4000	0.057	2.037	2.531	2.386
1:8000	0.060	1.638	2.398	2.086
1:16000	0.066	1.195	2.058	1.653
1:32000	0.056	0.697	1.648	1.097
1:64000	0.080	0.394*	1.066	0.671
1:128000	0.066	0.176	0.657	0.368*
1:256000	0.054	0.085	0.424	0.137
1:512000	0.042	0.044	0.227*	0.062
1:1024000	0.053	0.054	0.119	0.044

หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรที่มีค่าน้อยที่สุดที่ยอมรับได้ (โดยมีค่าประมาณ 0.2 หรือสูงกว่า)

เมื่อนำผลทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกับ RAC-OVA มาเปรียบเทียบกับโปรตีน OVA ด้วยวิธี indirect ELISA (ตารางที่ ก.3, ก.4 และ ก.5, ภาคผนวก ก)

พบว่า ในซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 2 จะมีแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน OVA เพียงเล็กน้อย ส่วนแอนติบอดีในซีรัมของหนูตัวที่ 1 และ 3 ไม่มีการทำปฏิกิริยากับโปรตีน OVA จึงสามารถสรุปได้ว่า แอนติบอดีในซีรัมของหนูสามารถจับกับแอนติเจน RAC-OVA ได้สูง และสามารถจับกับ OVA เพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีที่หนูทดลองผลิตขึ้นนี้น่าจะสามารถจับกับ RAC ได้ ซึ่งจะทำการยืนยันโดยนำซีรัมมาทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA ต่อไปในข้อ 4.2.2 ดังรูปที่ 4.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของซีรัมจากหนูทดลองที่ระดับความเจือจางต่างๆ โดยใช้สาร RAC-OVA และ OVA เคลือบก้นหลุม

4.2.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อ RAC ในรูปอิสระ

จากผลการทดสอบหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลองพบว่า หนูทดลองทั้งสามตัวให้ระดับแอนติบอดีสูงเพียงพอที่จะนำมาทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไปได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA เพื่อยืนยันว่าหนูทดลองนั้นมีการผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับ RAC ในรูปอิสระได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถในการจับกับ RAC ในรูปอิสระของแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ซีรัมหนูทดลอง (ความเจือจาง)	A_{492}				
	ไม่เติม RAC	20 μg/ml RAC	5 μg/ml RAC	5 μg/ml BSA	5 μg/ml OVA
หนูตัวที่ 1 (1:32000)	0.872	0.266	0.296	0.883	0.842
หนูตัวที่ 2 (1:128000)	0.725	0.557	0.580	0.645	0.633
หนูตัวที่ 3 (1:64000)	0.767	0.202	0.208	0.770	0.760

นำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเติมสาร RAC ในรูปอิสระดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า เมื่อใช้ RAC ในรูปอิสระความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หนูตัวที่ 1, 2 และ 3 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลงเท่ากับ 69.50%, 23.17% และ 73.66 %ตามลำดับ ส่วนเมื่อใช้ RAC ในรูปอิสระความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หนูตัวที่ 1, 2 และ 3 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลงเท่ากับ 66.06%, 20.00% และ

72.88% ตามลำดับ และเมื่อใช้ตัวแข่งขันเป็นโปรตีน BSA และ OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเพียงเล็กน้อย ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า หนูทั้งสามตัวมีการผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับ RAC ในรูปอิสระได้ จึงเหมาะสมที่จะนำมาทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC อิสระ

ตารางที่ 4.7 ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเติม RAC ในรูปอิสระของแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ซีรัมหนูทดลอง	อัตราการเจือจาง	$\%A_{492}$ ที่ลดลงเมื่อเติม RAC	
		20 μg/ml RAC	5 μg/ml RAC
หนูตัวที่ 1	1:32000	69.50	66.06
หนูตัวที่ 2	1:128000	23.17	20.00
หนูตัวที่ 3	1:64000	73.66	72.88

4.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC

จากการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูเพื่อตรวจสอบก่อนนำมาหลอมรวมเซลล์พบว่า หนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน RAC-BSA นั้นสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระได้ ดังนั้นจึงนำหนูตัวที่ 3 และหนูตัวที่ 1 มาทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์ไมอีโลมาสายพันธุ์ NSI ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ตามลำดับ ส่วนหนูทดลองตัวที่ 2 นั้นไม่ได้นำมาทำการหลอมรวมเซลล์เนื่องจากหนูทดลองได้เสียชีวิตก่อนการนำมาหลอมรวมเซลล์ โดยหลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ประมาณ 12-14 วันทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมนั้นมาทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อสารแร็กโทพามีนอิสระด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA โดยผลการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 2 ครั้ง พบว่า การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 หลังจากทำการย้ายโคลนที่ผ่านการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุมและทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระอีกครั้ง

ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า มีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวนหลายหลุมไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากการถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถเจริญได้หลังถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม จะไม่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนที่อยู่ในรูปอิสระ เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความไม่คงตัว ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ไฮบริโดมาบางส่วนไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอด ส่วนเซลล์ไฮบริโดมากลุ่มที่มีชีวิต อาจเกิดการกำจัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระออกจากดีเอ็นเอของเซลล์ ทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดีต่อ RAC ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ส่วนการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 หลังผ่านการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ดังแสดงในตารางที่ 4.8 จะได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระจำนวน 47 โคลน จึงทำการถ่ายเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีนในรูปอิสระลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม และทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA อีกครั้ง พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระจำนวน 5 โคลนแล้วนำเซลล์ที่ได้ในแต่ละหลุมมาทำการแยกเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ในแต่ละโคลนมาจากต้นกำเนิดเดียวกันและยังคงสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระได้ และได้ทำการกำหนดรหัสของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จำนวน 5 โคลนคือ 2H3, 3A6, 4B12, 10A4 และ 10G3 จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละโคลนมาทำการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อนำเซลล์ไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละโคลนที่ได้มาทำการตรวจสอบคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอีโลมาเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ

ครั้งที่	หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดีก่อนหลอมรวม	เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญ	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดี	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดีต่อ RAC อิสระ	จำนวนโคลนที่ได้
1	3	1:128000	284	85	28	0
2	1	1:64000	454	150	47	5

ตารางที่ 4.9 ผลการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA

รหัสโคลน	A_{492}	
	ไม่เติม RAC	5 µg/ml RAC
2H3	0.870	0.107
3A6	1.534	0.227
4B12	1.534	0.129
10A4	0.665	0.053
10G3	1.186	0.487

4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

จากการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 5 โคลนโดยชุดตรวจสอบ isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG_1 ดังแสดงในตารางที่ 4.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 5 โคลน โดยชุดตรวจสอบ isotyping kit

รหัสโคลน	A_{492}					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgM	IgA
2H3	1.617*	0.268	0.688	0.771	0.697	0.245
3A6	1.295*	0.086	0.116	0.202	0.152	0.064
4B12	1.385*	0.246	0.607	0.869	0.572	0.230
10A4	1.346*	0.091	0.136	0.352	0.180	0.070
10G3	1.339*	0.177	0.303	0.302	0.254	0.140
ตัวควบคุมบวก IgG_3	0.523	1.317	1.096	2.546*	1.357	0.115

หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรที่ให้ผลบวก

4.4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อ RAC

เนื่องจากแอนติเจน RAC-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม พบปัญหาในขั้นตอนการเก็บรักษา โดยเมื่อนำ RAC-OVA ที่แบ่งเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสประมาณ 3 เดือนมาทำการเคลือบก้นหลุมในการทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าประสิทธิภาพของแอนติเจน RAC-OVA ลดลงมากจนไม่สามารถนำมาใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ได้ ดังนั้นในขั้นตอนงานวิจัยต่อไปจึงทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้แอนติเจน RAC-BSA และ RAC-OVA ในการเคลือบบนก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม เพื่อทดสอบว่า สามารถใช้แอนติเจน RAC-BSA แทนการเคลือบด้วยแอนติเจน RAC-OVA บนก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ได้หรือไม่ อย่างไรก็ตาม ในการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นต้องทำการหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA เนื่องจากในแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แตกต่างกัน จึงทำให้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในสารละลายแตกต่างกัน จึงจำเป็นที่ต้องหาระดับความเจือจางที่

เหมาะสมกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป ในการหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการทำ indirect ELISA จะทำการเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรประมาณ 0.8-1 ในจานทดสอบ 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจน พบว่า แต่ละโคลนต้องใช้การเจือจางที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1:5, 1:10 และ 1:20 ดังแสดงในตารางที่ 4.11 โดยแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมเป็น RAC-OVA และดังแสดงในตารางที่ 4.12 โดยมีแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมเป็น RAC-BSA

ตารางที่ 4.11 ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับวิธี indirect ELISA ที่ใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml เคลือบก้นหลุม

ระดับการเจือจางของแอนติบอดี	A_{492}				
	2H3	3A6	4B12	10A4	10G3
-	1.099	1.021	1.185	1.345	1.083
1:5	0.960	0.877	1.086	1.136	**0.871***
1:10	**0.999***	**0.894***	1.015	1.155	0.790
1:20	0.952	0.897	**1.131***	**1.227***	0.786
1:40	0.413	0.351	0.585	0.646	0.213
1:80	0.339	0.365	0.521	0.585	0.213
1:160	0.279	0.294	0.448	0.470	0.206
1:320	0.201	0.234	0.333	0.319	0.176
1:640	0.162	0.199	0.236	0.218	0.173

หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1

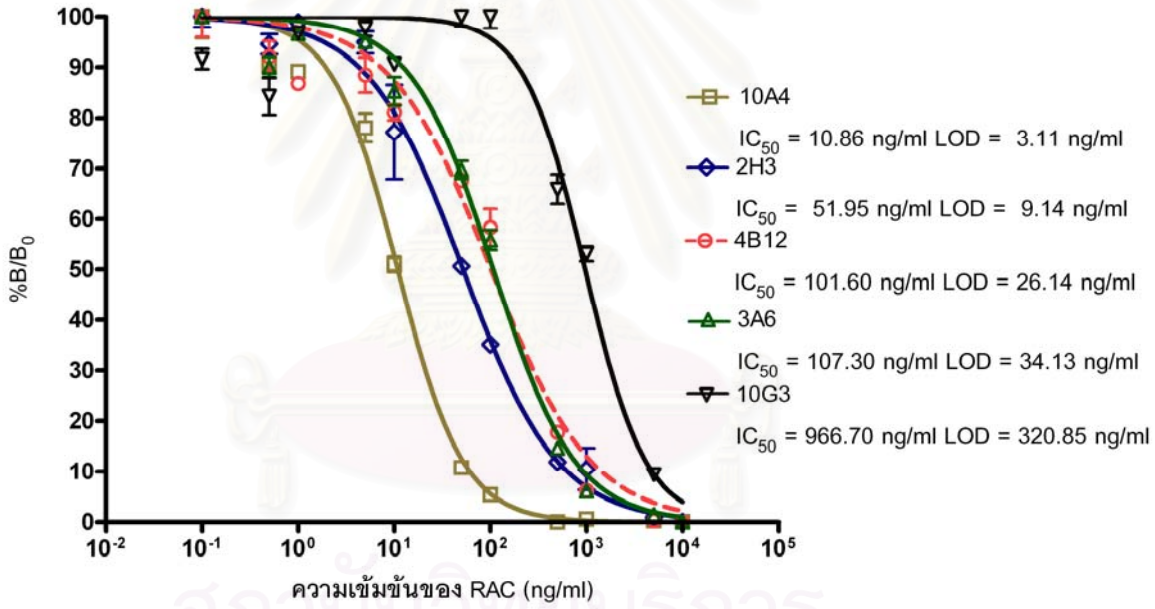
ตารางที่ 4.12 ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี สำหรับวิธี indirect ELISA ที่ใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml เคลือบก้นหลุม

ระดับการเจือจางของแอนติบอดี	A_{492}				
	2H3	3A6	4B12	10A4	10G3
-	1.551	1.437	1.529	1.640	1.479
1:5	1.430	1.469	1.337	1.340	1.370
1:10	1.320*	1.558	1.337	1.363	1.347
1:20	0.672	1.512	1.353	1.285*	1.217
1:40	0.564	1.527	1.355	1.022	1.221
1:80	0.484	1.408	1.237*	0.951	1.199*
1:160	0.347	1.267*	0.984	0.716	1.103
1:320	0.272	0.974	0.727	0.428	0.995
1:640	0.194	0.831	0.513	0.250	0.808
1:1280	0.131	0.614	0.319	0.149	0.570
1:2560	0.101	0.384	0.205	0.120	0.334

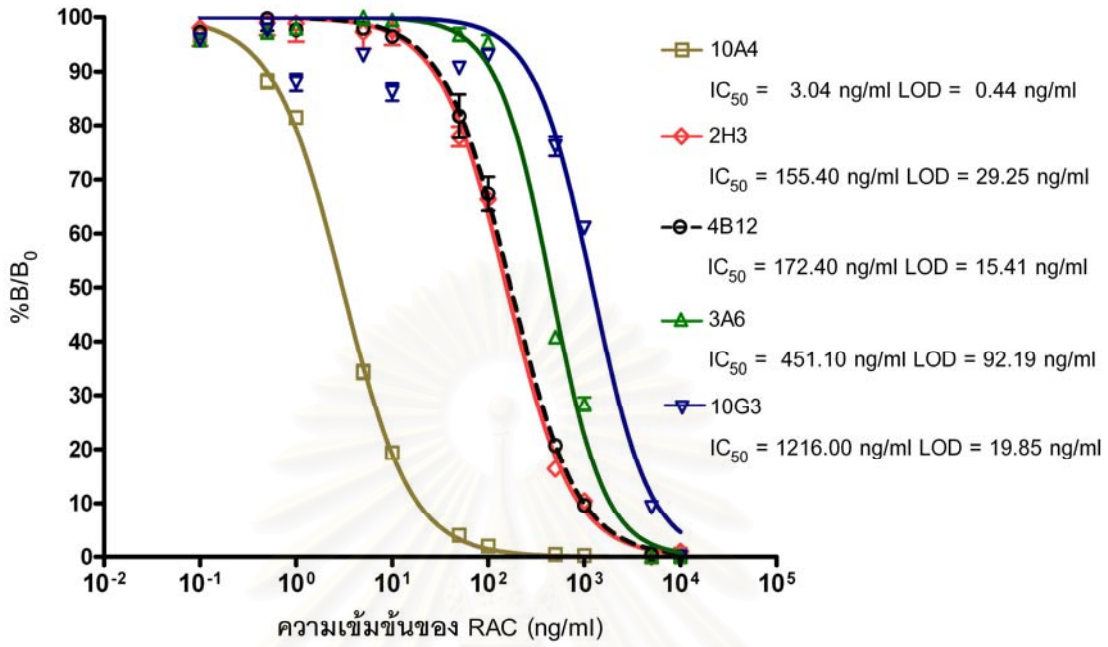
หมายเหตุ หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการหาระดับความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจน RAC-OVA ที่ใช้เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA ของโคลน 2H3, 3A6, 4B12, 10A4 และ 10G3 คือ 1:10, 1:10, 1:20, 1:20 และ 1:5 ตามลำดับ และเมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA ระดับความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมของโคลน 2H3, 3A6, 4B12, 10A4 และ 10G3 คือ 1:10, 1:160, 1:80, 1:20 และ 1:80 ตามลำดับ จากนั้นทำการหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทำการหาค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้สารแข่งขันเป็น RAC ที่อยู่ในรูปอิสระ ความเข้มข้น 10^{-1}- 10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงผลในรูปที่ 4.5-4.6 (ตารางที่ ก.6 และ ก.7, ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลนต่อ RAC อิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุมและใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 เป็น 1:20, 1:10, 1:20, 1:10 และ 1:5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลนต่อ RAC อิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุมและใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดีจากโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 ที่ใช้เป็น 1:20, 1:10, 1:80, 1:160 และ 1:80 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA ระหว่างใช้แอนติเจน RAC-OVA และ RAC-BSA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมพบว่า ในการใช้แอนติเจน RAC-OVA เคลือบก้นหลุม โมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.86, 51.95, 101.60, 107.30 และ 966.70 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 3.11, 9.14, 26.14, 34.13 และ 320.85 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA เคลือบก้นหลุม โมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 3.04, 155.40, 172.40, 451.10 และ 1216.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 0.44, 29.25, 15.41, 92.19 และ 19.88 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเรียงลำดับความไวในการจับกับ RAC ในรูปอิสระพบว่า 10A4 > 4B12 > 10G3 > 2H3 > 3A6 เมื่อใช้ RAC-BSA ในการเคลือบก้นหลุมและ 10A4 > 2H3 > 4B12 > 3A6 > 10G3

เมื่อใช้ RAC-OVA เคลือบก้นหลุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10A4 มีความไวสูงที่สุด

4.4.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

ทำการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยดูจากค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มได้แก่ clenbuterol, clenproperol, brombuterol, bromchlorbuterol, cimbuterol, salbutamol และ terbutaline-hemisulfate และสารนอกกลุ่มได้แก่ AMOZ, AOZ, MNZ, chloramphenicol, kanamycin, norfloxacin, penicillin G, streptomycin, sulfamethazine และ tetracycline HCl พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 5 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม เนื่องจากความเข้มข้นที่ใช้ในการแย่งจับกับแอนติบอดีระหว่างแอนติเจนที่เคลือบก้นหลุมของสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มคือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงที่ไม่เติมสารแข่งขัน ขณะที่เมื่อใช้ RAC อิสระที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจับกับแอนติบอดีหมด ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ได้ลดลงจนถึงค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการแย่งจับกับแอนติบอดีต้องมีค่ามากกว่า 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่ง ดังนั้นค่า IC_{50} ของสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มจะมีค่ามากกว่า 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงใช้ค่าความเข้มข้นนี้แทนค่า IC_{50} ของสารดังกล่าว นำค่า IC_{50} ของแต่ละโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มของ RAC พบว่า เมื่อใช้แอนติเจน RAC-OVA เคลือบก้นหลุม ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ 10G3 มีค่าน้อยกว่า 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.0% และ 9.9% ตามลำดับ และเมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA เคลือบก้นหลุม ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ10G3 มีค่าน้อยกว่า 0.03%, 1.55%, 1.72%, 4.51% และ 12.16% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.13-4.14 (ตารางที่ ก.8 และ ก.9, ภาคผนวก ก) จากผลค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของแต่ละโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีค่าไม่เท่ากัน เนื่องจากค่า IC_{50} ของ แต่ละโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่เท่ากัน และผลค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวมีค่าสูง เนื่องจากค่า IC_{50} ของสารที่นำมาทดสอบนั้นมาจากค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นถ้าใช้ความเข้มข้นของสารที่

นำมาตรวจสอบมากกว่า 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มน้อยกว่าค่าที่ปรากฏในตารางที่ 4.13-4.14 เช่น เมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA ในการเคลือบก้นหลุม โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่นำมาตรวจสอบเท่ากับ 100000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโคลน 10A4, 2H3, 4B12, 3A6 และ10G3 จะมีค่าน้อยกว่า 0.003%, 0.155%, 0.172%, 0.451% และ 1.216% ตามลำดับจากผลการทดสอบความจำเพาะสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลน มีความจำเพาะต่อ RAC ในรูปอิสระ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม แต่เมื่อพิจารณาผลที่ได้จากการทดสอบความไวและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 5 โคลนพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 10A4 มีความไวสูงที่สุดและมีความจำเพาะต่อ RAC ในรูปอิสระด้วย จึงทำการเลือกโคลน 10A4 มาทำการศึกษาต่อโดยนำไปผลิตแอนติบอดีและทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุม

ประเภทตัวแข่งขัน	ตัวแข่งขัน	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม				
		10A4	2H3	4B12	3A6	10G3
Beta-agonists	Ractopamine	100	100	100	100	100
	Clenbuterol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Clenproperol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Brombuterol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Bromchlorbuterol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Cimbuterol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Salbutamol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Terbutaline-hemisulfate	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
Antibiotics	AMOZ	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	AOZ	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	MNZ	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Kanamycin	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Norfloxacin	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Penicilin G	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Streptomycin	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Sulfamethazine	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Chloramphenicol	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66
	Tetracycline HCl	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66

ตารางที่ 4.14 ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุม

ประเภทตัวแข่งขัน	ตัวแข่งขัน	เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม				
		10A4	2H3	4B12	3A6	10G3
Beta-agonists	Ractopamine	100	100	100	100	100
	Clenbuterol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Clenproperol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Brombuterol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Bromchlorbuterol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Cimbuterol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Salbutamol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Terbutaline-hemisulfate	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
Antibiotics	AMOZ	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	AOZ	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	MNZ	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Kanamycin	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Norfloxacin	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Penicilin G	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Streptomycin	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Sulfamethazine	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Chloramphenicol	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16
	Tetracycline HCl	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 สรุปผลการหาไอโซไทป์ ความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 5 โคลน เมื่อใช้แอนติเจน RAC-OVA ความเข้มข้น 10 µg/ml เคลือบก้นหลุม

ชนิดการทดสอบ	10A4	2H3	4B12	3A6	10G3
ไอโซไทป์	IgG_1	IgG_1	IgG_1	IgG_1	IgG_1
IC_{50}	10.86	51.95	101.60	107.30	966.70
LOD	3.11	9.14	26.14	34.13	320.85
เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม	<0.10	<0.52	<1.01	<1.07	<9.66

ตารางที่ 4.16 สรุปผลการหาไอโซไทป์ ความไว และการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 5 โคลน เมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA ความเข้มข้น 1 µg/ml เคลือบก้นหลุม

ชนิดการทดสอบ	10A4	2H3	4B12	3A6	10G3
ไอโซไทป์	IgG_1	IgG_1	IgG_1	IgG_1	IgG_1
IC_{50}	3.04	155.40	172.40	451.10	1216.00
LOD	0.44	29.25	15.41	92.19	19.85
เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม	<0.03	<1.55	<1.72	<4.51	<12.16

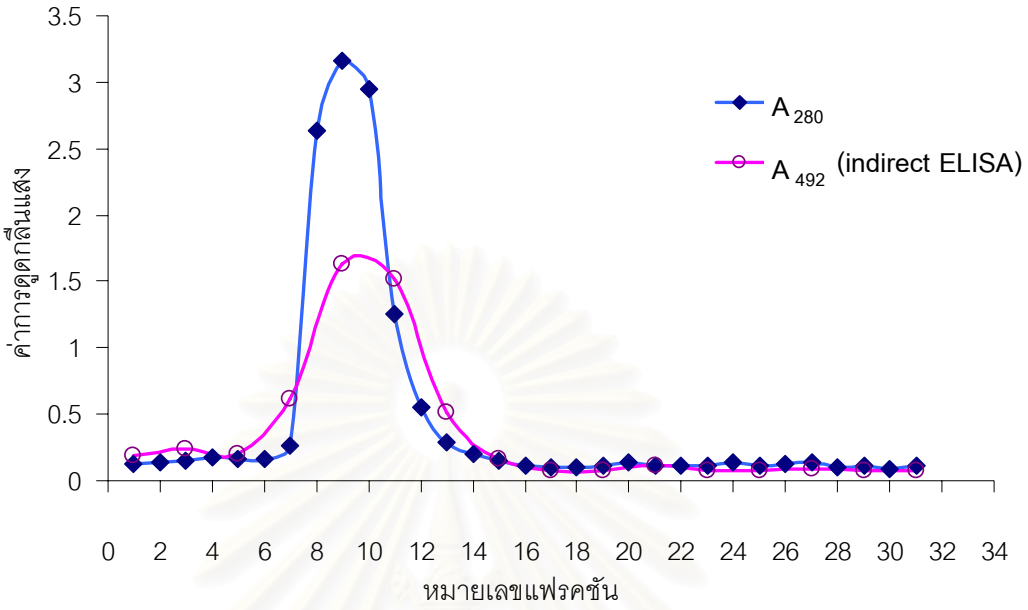
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้แอนติเจน RAC-BSA เคลือบก้นหลุมแทนแอนติเจน RAC-OVA ในการทดสอบความไวและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC อิสระให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มไปทางเดียวกัน โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติเจน RAC-BSA มาทำการเคลือบบนก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA

แทนแอนติเจน RAC-OVAได้ เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Shelver และคณะ (2000) ซึ่งได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นต่ำสุดของ RAC เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม และในงานวิจัย Li และคณะ (2007) ซึ่งได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวเท่ากับ 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10A4 มีความไวสูงกว่างานวิจัยที่ได้กล่าวข้างต้นและมีความจำเพาะสูงต่อ RAC ด้วยจึงคาดว่า สามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ RAC ได้ ดังนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.5.1 การเตรียมและทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

จากผลที่ได้ของการทดสอบความไวและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 5 โคลน จึงทำการเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 10A4 ที่มีความไวสูงที่สุดและมีความจำเพาะต่อ RAC ในรูปอิสระ มาทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จนได้แอนติบอดีสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณมาก จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) โดยมีโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10A4 มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 ซึ่งจะมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีนจีที่ pH 7.0 ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงสามารถจับกับโปรตีนจีในคอลัมน์ได้ และทำการชะโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 นำแต่ละแฟรคชัน (fraction) ที่เก็บได้ไปทำการหาปริมาณโปรตีนโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และติดตามหาแอนติบอดีในแต่ละแฟรคชั่นด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ระดับการเจือจางของแต่ละแฟรคชันเท่ากับ 1:2000 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ตารางที่ ก.10, ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 10A4 ให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส ขนาด 1.5 X 5 เซนติเมตร และชะด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างจำนวน 31 แฟรคชัน แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร

จากโครมาโทแกรมพบว่า แฟรคชันที่ 7-13 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสูง และเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรสูง แสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกชะออกมาอยู่ในช่วงแฟรคชันที่ 7-13 ดังนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ในแฟรคชันที่ 7-13 มารวมกัน แล้วนำไปไดอะไลซิสด้วย PBS เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ออกจากสารละลายที่ได้

4.5.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์มาทำการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA (ตารางที่ ก.11, ก.12, ก.13 และ รูปที่ ก.3, ภาคผนวก ก) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเท่ากับ 3.96 และ 1.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.5.3 การหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติบอดีที่สร้างจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และทราบความเข้มข้น (ตารางที่ ก.14 และรูปที่ ก.4, ภาคผนวก ก) พบว่า ปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์เท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะมีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำค่าปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีที่ได้มาทำการคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (%purity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในสารละลายโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 70.95 เปอร์เซ็นต์ และค่า % recovery เท่ากับ 34.99 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.17

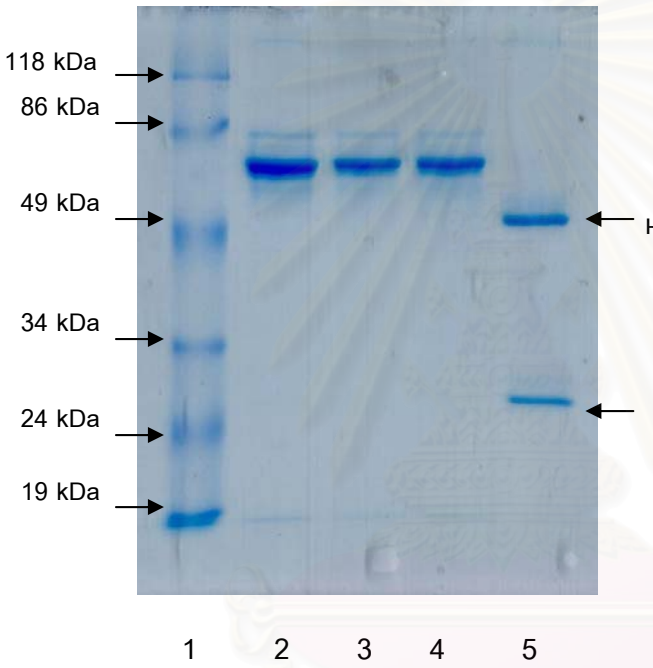
ตารางที่ 4.17 ผลสรุปของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจีที่ได้จากโคลน 10A4

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีน		ปริมาณแอนติบอดี		%purity	%recovery
		ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)	ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)		
ก่อน	300	3.96	1188.0	0.09	27.00	2.27	-
หลัง	7.05	1.89	13.32	1.34	9.45	70.95	34.99

4.6 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ที่ได้จากโคลน 10A4 ด้วยวิธี SDS-PAGE และนำมาทำการเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลแล้ว เพื่อทำให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของสายโพลิเพปไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยนำค่า relative mobility (R_f) ของสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปทำการเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ก.15, ภาคผนวก ก) พบว่า เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีระหว่างก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์จะเห็นว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์นั้น

จะมีโปรตีนจากซีรัมปนอยู่มากทำให้เห็นแถบเข้มที่ระยะทางเดียวกับช่อง 3 แต่เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์แล้วโปรตีนเหล่านี้ถูกกำจัดไป จึงทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเข้มข้นขึ้นจึงปรากฏแถบชัดขึ้น โดยสองแถบนี้เป็นแถบของโปรตีนสายยาว (heavy chain) และสายสั้น (light chain) โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 58.78 และ 27.52 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.18



ช่อง	ชนิดสารตัวอย่าง
1	โปรตีนมาตรฐาน (Standard protein marker)
2	ซีรัม (FCS)
3	อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS (v/v)
4	อาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์
5	โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์

รูปที่ 4.8 ผลการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.18 ค่า R_f และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีน	มวลโมเลกุล (kDa)	Relative mobility (R_f)
β-galactosidase	118	0.13
BSA	86	0.25
OVA	49	0.43
Carbonic anhydrase	34	0.66
β-lactoglobulin	24	0.81
Lysozyme	19	1
MAb Heavy chain	58.78	0.42
MAb Light chain	27.52	0.77

4.7 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ต่อ RAC

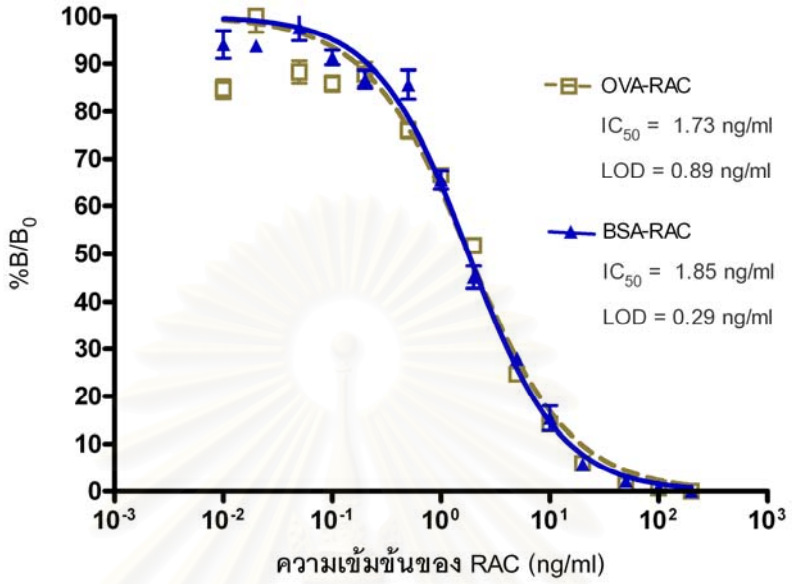
ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์กับแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยวิธี indirect ELISA โดยเลือกความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจน RAC-OVA ที่เคลือบก้นหลุมเท่ากับ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้แอนติเจนที่เคลือบก้นหลุมเป็น RAC-BSA จะได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจนเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.19 แล้วทำการหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการหาค่า IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้สารแข่งขันเป็น RAC ที่อยู่ในรูปอิสระ ความเข้มข้น 0.01– 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เมื่อใช้แอนติเจนเคลือบก้นหลุมเป็น RAC-OVA มีค่า

IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 1.73 และ 0.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้เมื่อใช้แอนติเจนเคลือบก้นหลุมเป็น RAC-BSA มีค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 1.85 และ 0.29 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.9 (ตารางที่ ก.15และ ก.16, ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.19 ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 และแอนติเจนที่ใช้เคลือบก้นหลุมด้วยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี (ng/ml)	A_{492}					
	RAC-OVA (µg/ml)			RAC-BSA (µg/ml)		
	3	5	10	0.5	1	2
25	0.056	0.060	0.342	0.277	0.640	1.200
50	0.067	0.154	0.576	0.322	0.877	1.355
100	0.071	0.201	0.906	0.510	1.020	1.568
150	0.104	0.222	**1.098***	0.698	**1.244***	1.703
250	0.094	0.342	1.256	0.897	1.446	1.889
500	0.121	0.487	1.436	1.033	1.672	1.988
1000	0.140	0.667	1.668	1.234	1.865	2.154

หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1



รูปที่ 4.9 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 ต่อ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA เมื่อใช้แอนติเจน RAC-OVA และ RAC-BSA เคลือบก้นหลุม และความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่าที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ต่อ RAC ในรูปอิสระในขั้นตอนก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.20 พบว่า ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ต่อ RAC ในรูปอิสระมีค่าสูงขึ้น

ตารางที่ 4.20 การเปรียบเทียบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์จากโคลน 10A4 ต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA และ RAC-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA 96 หลุม

โมโนโคลนอลแอนติบอดี	RAC-BSA		RAC-OVA	
	IC_{50}(ng/ml)	LOD(ng/ml)	IC_{50}(ng/ml)	LOD(ng/ml)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	3.04	0.44	10.86	3.11
หลังทำให้บริสุทธิ์	1.85	0.29	1.73	0.89

จากการเปรียบเทียบผลความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์จะเห็นว่า หลังการทำให้บริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ค่า LOD ที่ต่ำกว่าก่อนการทำให้บริสุทธิ์ อาจมาจากสาเหตุในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะช่วยลดการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นๆ ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งอาจมีผลในการรบกวนการเกิดปฏิกิริยาในการทดสอบของวิธี ELISA ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10A4 มีความ จำเพาะต่อ RAC ในรูปอิสระ และให้ค่าปริมาณของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้กว่าต่ำกว่าค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ที่ประกาศโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาไว้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb) จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต่อ RAC ในรูปอิสระต่อไปได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ทำการเชื่อมต่อแร็กโทพามีนกับ BSA เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง โดยนำแร็กโทพามีนไฮโดรคลอไรด์ มาทำการเปลี่ยนอนุพันธุ์ให้อยู่ในรูปสารแร็กโทพามีนเฮมิซัคซิเนต เมื่อทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี TLC ปรากฏสารผลิตภัณฑ์ซึ่งมีค่า R_f อยู่ที่ 0.08 จึงคาดว่า จุดที่เกิดขึ้นนี้เป็นสารแร็กโทพามีนเฮมิซัคซิเนท จึงนำสารที่ได้มาเชื่อมต่อกับ BSA โดยใช้สาร isobutylchloroformate พบว่า ปริมาณโปรตีนของสารแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อกับ BSA ได้เท่ากับ 2.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี TNBS พบว่า BSA มีการใช้หมู่เอมีนในการเชื่อมต่อกับแร็กโทพามีนคิดเป็น 36.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF-MS พบว่า มวลโมเลกุลของ BSA ที่ได้เท่ากับ 67,020.23 ดาลตันและมวลโมเลกุลของแร็กโทพามีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA เท่ากับ 69,422.71 ดาลตัน ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณเป็นอัตราส่วนในการเชื่อมต่อระหว่างโปรตีน BSA กับสารแร็กโทพามีนเท่ากับ 1:8 แสดงว่า BSA 1 โมเลกุลจะมีการเชื่อมต่อกับสารแร็กโทพามีนได้ถึง 8 โมเลกุล จากนั้นนำแอนติเจนที่เตรียมได้ไปฉีดกระตุ้นหนู BALB/c จำนวน 3 ตัว เมื่อนำซีรัมของหนูทั้งสามตัวมาหาระดับแอนติบอดีพบว่า ให้ระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง1:64,000 – 1:512,000 หลังจากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมกับสารแข่งขัน OVA, BSA และสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า แอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองทั้งสามสามารถจับกับสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระได้ หลังจากนั้นทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์ไมอีโลมาทั้งหมด 2 ครั้งได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระจำนวน 5 โคลน คือ โคลน 2H3, 3A6, 4B12, 10A4 และ10G3 ซึ่งมาจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 เท่านั้น หลังจากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 5 โคลน พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 เมื่อทำการทดสอบความไวต่อสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลนพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 10A4 มีความไวต่อสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระสูงสุด โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 3.04 และ 0.44 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลน พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลนไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารทั้งในกลุ่มและนอกกลุ่มของแร็กโทพามีน ดังนั้นจึงทำการเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ซึ่งมีความไวสูงที่สุด

และมีความจำเพาะต่อแร็กโทพามีนในรูปอิสระ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพโดยใช้โปรตีนจีเซฟาโรสคอลัมน์ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์จะมีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 71 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการทำ SDS-PAGE พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 หลังทำให้บริสุทธิ์ จะให้แถบของโปรตีนสายยาว (heavy chain) และสายสั้น (light chain) โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 58.78 และ 27.52 กิโลดาลตัน ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ต่อสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะมีความไวต่อสารแร็กโทพามีนในรูปอิสระมากขึ้น โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 1.85 และ 0.29 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าปริมาณสารปนเปื้อนในอาหารสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ที่ประกาศโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาไว้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มของแร็กโทพามีน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 จึงมีศักยภาพเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสารแร็กโทพามีนต่อไปในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อแร็กโทพามีน จึงควรนำแอนติบอดีที่ได้มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์แร็กโทพามีน เช่น อุณหภูมิ ปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม วิธีการสกัดสารจากตัวอย่าง เป็นต้น เพื่อเพิ่มความไว และความสะดวกในการใช้ของชุดตรวจสอบในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

การค้าต่างประเทศ, กรม. 2546. แนวทางการดำเนินการแก้ไขปัญหาการใช้สารเร่งเนื้อแดงหรือสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในสุกร [online]. แหล่งที่มา : http://www.thaigov.go.th/ [18 มีนาคม 2546]

ธีระวัฒน์ รัตนพลแสน. 2550. ประสิทธิภาพของ ractopamine ต่อการเจริญเติบโตลักษณะซากและคุณภาพของเนื้อสุกร [เอกสารนำเสนอในสัมมนาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น].

ปศุสัตว์, กรม. 2550. งานตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ เรื่องตรวจวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง [online]. แหล่งที่มา : http://www.dld.go.th/vrd_wp/stat/statbeta.htm [4 กันยายน 2550]

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

สุพล เลื่องยศลือชากุล. การใช้สารกลุ่ม Phenethanolamine ปรับปรุงคุณภาพซากสุกร : ประโยชน์และอันตราย. ในการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 18 สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย, หน้า 173-187. 4-6 พฤศจิกายน 2534.

สาธารณสุข, กระทรวง. 2546 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 269) พ.ศ. 2546 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ [online]. แหล่งที่มา : http://www.qmaker.com/fda/new/images/cms/top_upload/1143701409_ntf269-2546.pdf [23 เมษายน 2546]

อรอนงค์ มหัคฆพงศ์. 2550 การประชุมคณะกรรมการโคเด็กซ์สาขาสารตกค้างจากยาสัตว์ในอาหาร [online]. แหล่งที่มา : www.nfi.or.th/infocenter [25 กันยายน 2550]

ภาษาอังกฤษ

Anderson, D.B., Verhuizen, E.L., Paxton, R.E. and Young, S.S. 1987. The effect of dietary protein on nitrogen metabolism, growth performance and carcass composition of finishing pig fed ractopamine. Journal of Animal and Veterinary Advances. 46: 1021.

Antignac, J.P., Marchand, P., Bizec, B.L. and Andre, F. 2002. Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography positive electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 774: 59-66.

Armstrong, T.A., Ivers, D.J., Wagner, J.R., Anderson, D.B., Weldon, W.C. and Berg, E.P. 2004. The effect of dietary ractopamine concentration and duration of feeding on growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing pigs. American Society of Animal Science. 82: 3245-3253.

Council of the European Communities. 1986. Council Directive 86/ 469 /EEC of 16 September 1986. Office for Official Publications of the European Communities. L275: 36.

FAO and WHO. 2007. Methods of analysis for veterinary drug residues. The 29th Session of the Codex Alimentarius Commission. CL 2007/04-RVDF-Annex 1: 24-25.

FDA. 2000. New animal drugs for use in animal feeds; ractopamine hydrochloride. Federal Register. 65: 4111-4112.

FDA. 2003. New animal drugs; ractopamine. Federal Register. 68: 54658-54659.

Hancock, J.D., Peo, E.R., Lewis, Jr. and Parrott, J.C. 1987. Effect of dietary levels of ractopamine (a phenethanol-amine) on performance and carcass merit of finishing pigs. Journal of Animal Science. 65(1): 309.

He, P., Zhang, L. and Yang, T. 2008. Determination of ractopamine in swine feed and urine using an indirect competitive immunoassay. Journal of Animal and Veterinary Advances. 7(3): 268-275.

Li, M., Chen, Z. and Zhu, Q. 2007. Development and identification of monoclonal antibodies against ractopamine. Hybridoma. 26(3): 148-154.

Mills, S.E. and Liu, C.Y. 1990. Sensitivity of lipolysis and lipogenesis to dibutyryl-cAMP and β–adrenergic agonist in swine adipocytes in vitro. Journal of Animal Science. 68: 1017-1023.

Moloney, A.P. 1990. Influence of beta-adrenergic agonist and similar compounds on growth. Growth regulation in farm animals. 7: 455-514.

Qiang, Z., Shentu, F., Wang, B., Wang, J., Chang, J. and Shen, J. 2007. Residue depletion of ractopamine and its metabolites in swine tissues, urine, and serum. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 55(11): 4319-4326.

Ricke, E.A., Smith, D.J., Feil, V.J., Larsen, G.L. and Caton, J.S. 1999. Effects of ractopamine HCl stereoisomers on growth, nitrogen retention, and carcass composition in rats. Journal of Animal Science. 77: 701-707.

Shelver, W.L. “Monoclonal antibody, cell line and immunoassay for ractopamine”. U.S. Patent 6,274,334. Aug.14, 2001.

Shappell, N.W., Feil, V.J., Smith, D.J., Larsen, G.L. and Mcfarland, D.C. 2000. Response of C_2C_{12} mouse and turkey skeletal muscle cells to the β–adrenergic agonist ractopamine. Journal of Animal Science. 78: 699-708.

Shelver, W.L., Smith, D.J. and Berry, E.S. 2000. Production and characterization of a monoclonal antibody against the beta-adrenergic agonist ractopamine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(9): 4020-4026.

Shelver, W.L. and Smith, D.J. 2002. Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 2742-2747.

Shelver, W.L. and Smith, D.J. 2003. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor Analysis: comparative study with HPLC and ELISA. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 3715-3721.

Smith, D.J. and Shelver, W.L. 2002. Tissue residues of ractopamine and urinary excretion of ractopamine and metabolites in animals treated for 7 days with dietary ractopamine. Journal of Animal Science. 80: 1240-1249.

Thompson, C.S., Haughey, S.A., Traynor, I.M., Fodey, T.L. and Elliott, C.T. 2008. Effective monitoring for ractopamine residues in samples of animal origin by SPR biosensor and mass spectrometry. Analytica Chemica Acta. 608: 217-225.

Wang, J.P., Zhang, S.X. and Shen, J.Z. 2006. Technical Note: A monoclonal antibody-based immunoassay for determination for ractopamine in swine feeds. Journal of Animal Science. 84: 1248-1251.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

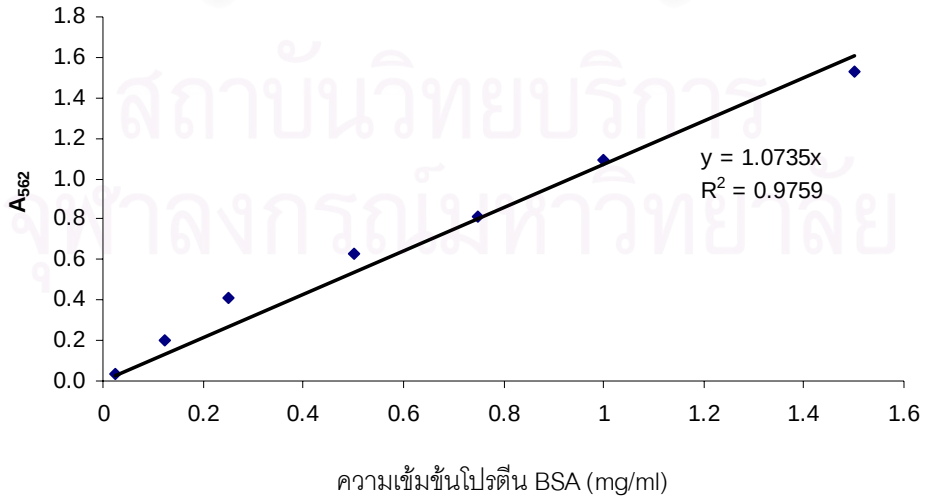
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA

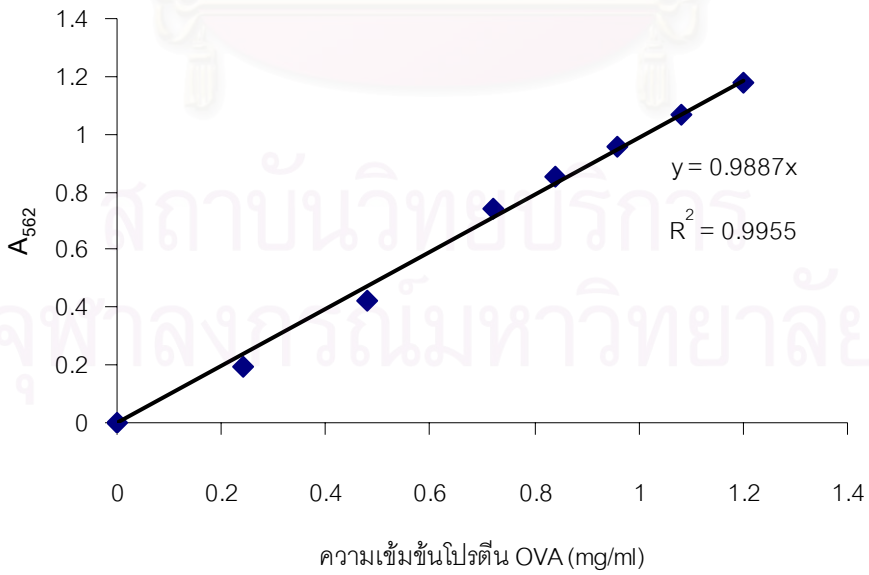
ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.025	0.035
0.125	0.197
0.250	0.408
0.500	0.633
0.750	0.816
1.000	1.094
1.500	1.531



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
0.24	0.193
0.48	0.425
0.72	0.740
0.84	0.850
0.96	0.954
1.08	1.068
1.20	1.181



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย OVA ด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 1 ด้วยวิธี indirect ELISA

ระดับการเจือจางของซีรัม	สารที่ใช้เคลือบบนหลุมของจานทดสอบ ELISA ด้วยความเข้มข้น 3 μg/ml	
	RAC-OVA	OVA
1:1000	2.601	0.080
1:2000	2.440	0.054
1:4000	2.037	0.035
1:8000	1.638	0.040
1:16000	1.195	0.041
1:32000	0.697	0.042
1:64000	0.394	0.050
1:128000	0.176	0.051
1:256000	0.085	0.054
1:512000	0.044	0.049
1:1024000	0.054	0.062

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 2 ด้วยวิธี indirect ELISA

ระดับการเจือจางของซีรัม	สารที่ใช้เคลือบบนหลุมของจานทดสอบ ELISA ด้วยความเข้มข้น 3 μg/ml	
	RAC-OVA	OVA
1:1000	2.515	0.243
1:2000	2.707	0.147
1:4000	2.531	0.082
1:8000	2.398	0.069
1:16000	2.058	0.045
1:32000	1.648	0.054
1:64000	1.066	0.055
1:128000	0.657	0.046
1:256000	0.424	0.033
1:512000	0.227	0.042
1:1024000	0.119	0.044

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 3 ด้วยวิธี indirect ELISA

ระดับการเจือจางของซีรัม	สารที่ใช้เคลือบบนหลุมของจานทดสอบ ELISA ด้วยความเข้มข้น 3 μg/ml	
	RAC-OVA	OVA
1:1000	2.508	0.049
1:2000	2.561	0.040
1:4000	2.386	0.082
1:8000	2.086	0.064
1:16000	1.653	0.055
1:32000	1.097	0.034
1:64000	0.671	0.055
1:128000	0.368	0.066
1:256000	0.137	0.063
1:512000	0.062	0.042
1:1024000	0.044	0.054

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลนต่อ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA 10 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น RAC (ng/ml)	A_{492}				
	2H3	3A6	4B12	10A4	10G3
0	1.250	1.302	1.452	1.494	0.961
0.1	1.277	1.418	1.602	1.565	0.942
0.5	1.212	1.286	1.479	1.424	0.882
1	1.264	1.374	1.398	1.401	0.984
5	1.216	1.352	1.423	1.235	0.993
10	1.005	1.223	1.310	0.830	0.934
50	0.688	1.017	1.100	0.227	1.011
100	0.504	0.833	0.956	0.145	1.011
500	0.226	0.287	0.326	0.065	0.731
1000	0.209	0.174	0.147	0.074	0.626
5000	0.095	0.112	0.055	0.069	0.267
10000	0.084	0.093	0.051	0.066	0.191

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลนต่อ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA 1 μg/ml เคลือบก้นหลุมในจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น RAC (ng/ml)	A_{492}				
	2H3	3A6	4B12	10A4	10G3
0	1.844	1.413	1.544	1.745	2.029
0.1	1.809	1.389	1.502	1.687	1.958
0.5	1.827	1.409	1.540	1.543	1.989
1	1.824	1.420	1.510	1.430	1.825
5	1.796	1.447	1.514	0.626	1.910
10	1.801	1.440	1.492	0.373	1.795
50	1.456	1.404	1.272	0.112	1.871
100	1.252	1.385	1.059	0.078	1.909
500	0.371	0.639	0.364	0.051	1.625
1000	0.265	0.469	0.199	0.048	1.370
5000	0.082	0.081	0.062	0.044	0.492
10000	0.099	0.081	0.056	0.052	0.336

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลนต่อสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA 10 μg/ml เคลือบก้นหลุมจานทดสอบ ELISA

ประเภทตัวแข่งขัน	ชนิดตัวแข่งขัน	A_{492}				
		10A4	2H3	4B12	3A6	10G3
Beta-agonists	ไม่มีตัวแข่งขัน	1.897	1.403	1.594	1.612	0.921
	Ractopamine	0.077	0.086	0.074	0.109	0.150
	Clenbuterol	1.872	1.398	1.697	1.628	1.178
	Clenproperol	1.856	1.403	1.758	1.604	1.140
	Brombuterol	1.886	1.445	1.764	1.679	1.181
	Bromchlorbuterol	1.887	1.351	1.683	1.618	1.089
	Cimbuterol	1.939	1.333	1.555	1.570	0.924
	Salbutamol	1.898	1.414	1.701	1.684	1.234
	Terbutaline-hemisulfate	1.861	1.328	1.759	1.539	0.940
Antibiotics	AMOZ	1.823	1.408	1.761	1.576	1.111
	AOZ	2.026	1.349	1.804	1.456	0.902
	MNZ	1.839	1.374	1.752	1.600	1.079
	Kanamycin	1.862	1.387	1.801	1.532	1.032
	Norfloxacin	2.002	1.279	1.849	1.493	0.861
	Penicilin G	1.850	1.440	1.819	1.499	1.118
	Streptomycin	1.877	1.444	1.796	1.494	1.144
	Sulfamethazine	1.848	1.435	1.754	1.638	1.170
	Chloramphenicol	1.888	1.429	1.856	1.445	1.072
	Tetracycline HCl	2.012	1.383	1.865	1.532	0.997
RPMI 1640 (ตัวควบคุมลบ)		0.045				

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก 5 โคลนต่อสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA 1 μg/ml เคลือบก้นหลุมจานทดสอบ ELISA

ประเภทตัวแข่งขัน	ชนิดตัวแข่งขัน	A_{492}				
		10A4	2H3	4B12	3A6	10G3
Beta-agonists	ไม่มีตัวแข่งขัน	1.673	1.382	1.894	1.704	0.941
	Ractopamine	0.107	0.096	0.121	0.132	0.125
	Clenbuterol	1.680	1.412	1.886	1.656	1.195
	Clenproperol	1.798	1.389	1.793	1.622	0.951
	Brombuterol	1.813	1.431	1.776	1.701	1.005
	Bromchlorbuterol	1.787	1.312	1.739	1.642	1.107
	Cimbuterol	1.816	1.329	1.745	1.589	0.919
	Salbutamol	1.798	1.380	1.724	1.707	1.131
	Terbutaline-hemisulfate	1.744	1.279	1.767	1.610	0.945
Antibiotics	AMOZ	1.806	1.393	1.772	1.612	1.075
	AOZ	1.598	1.331	1.804	1.556	0.963
	MNZ	1.648	1.419	1.768	1.650	0.814
	Kanamycin	1.762	1.423	1.822	1.597	0.867
	Norfloxacin	1.970	1.302	1.834	1.514	0.928
	Penicilin G	1.810	1.428	1.814	1.540	1.085
	Streptomycin	1.853	1.451	1.754	1.566	1.101
	Sulfamethazine	1.610	1.406	1.779	1.659	1.038
	Chloramphenicol	1.828	1.431	1.828	1.468	1.072
	Tetracycline HCl	1.739	1.394	1.840	1.534	1.085
RPMI 1640 (ตัวควบคุมลบ)		0.086				

ตารางที่ ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการทำ indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ที่ทำให้บริสุทธิ์

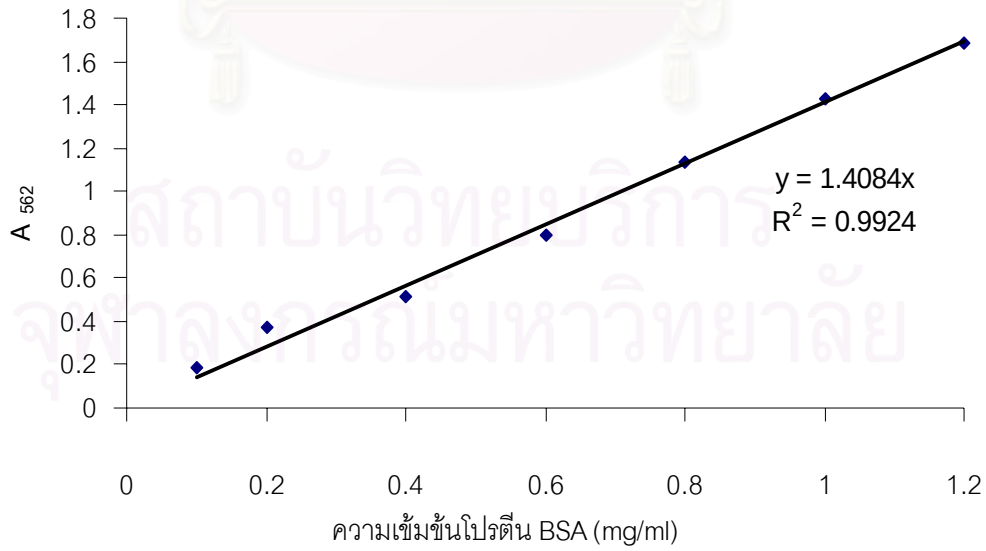
Fraction	A_{280}	A_{492}	Fraction	A_{280}	A_{492}
Unbound	0.113	0.213	16	0.118	-
1	0.125	0.183	17	0.102	0.077
2	0.135	-	18	0.102	-
3	0.149	0.239	19	0.118	0.075
4	0.170	-	20	0.139	-
5	0.164	0.200	21	0.110	0.115
6	0.169	-	22	0.115	-
7	0.260	0.618	23	0.113	0.071
8	2.633	-	24	0.138	-
9	3.157	1.629	25	0.116	0.070
10	2.945	-	26	0.124	-
11	1.256	1.521	27	0.132	0.082
12	0.548	-	28	0.104	-
13	0.283	0.516	29	0.112	0.079
14	0.197	-	30	0.094	-
15	0.146	0.167	31	0.107	0.071

หมายเหตุ เครื่องหมาย – ไม่ได้นำมาทำ indirect ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA

ความเข้มข้นสารละลาย BSA มาตรฐาน (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.186
0.2	0.369
0.4	0.518
0.6	0.799
0.8	1.133
1.0	1.432
1.2	1.686



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.12 ผลการหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:4	1.291	3.67
1:8	0.698	3.96
1:16	0.374	4.24
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		3.96

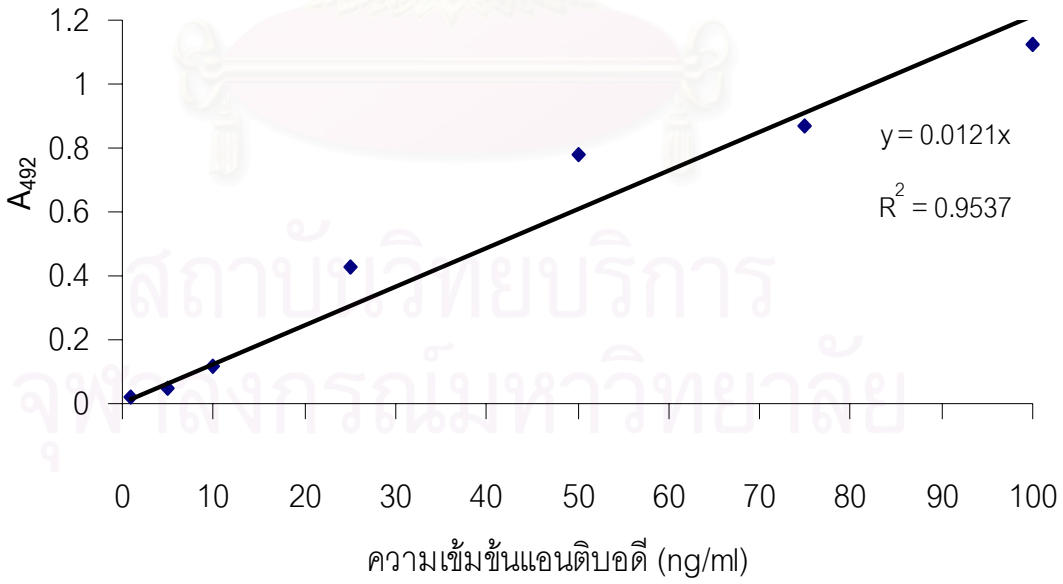
ตารางที่ ก.13 ผลการหาค่าความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

อัตราการเจือจาง	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:4	0.642	1.82
1:8	0.346	1.96
ความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย		1.89

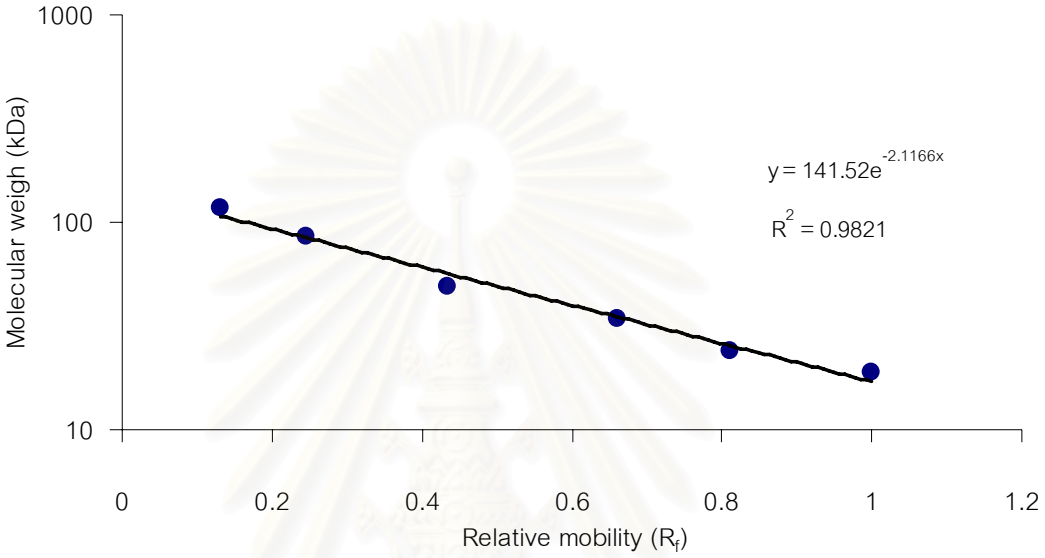
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect ELISA

ความเข้มข้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ng/ml)	A_{492}
1	0.021
5	0.049
10	0.120
25	0.431
50	0.779
75	0.872
100	1.127



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์



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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 หลังถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-OVA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น RAC (ng/ml)	A_{492}			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
0	1.033	1.036	0.963	1.010
0.01	0.986	1.054	1.055	1.032
0.02	1.276	1.208	1.141	1.208
0.05	1.120	1.069	1.029	1.073
0.10	1.007	1.062	1.066	1.045
0.20	1.121	1.054	1.028	1.068
0.50	0.958	0.939	0.892	0.930
1	0.828	0.823	0.809	0.820
2	0.621	0.681	0.647	0.650
5	0.351	0.342	0.315	0.336
10	0.216	0.208	0.219	0.214
20	0.122	0.112	0.122	0.119
50	0.069	0.068	0.063	0.067
100	0.054	0.061	0.059	0.058
200	0.053	0.050	0.048	0.050

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 10A4 หลังถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจน RAC-BSA เคลือบก้นหลุมของจานทดสอบ ELISA

ความเข้มข้น RAC (ng/ml)	A_{492}			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
0	1.267	1.282	1.294	1.281
0.01	1.173	1.206	1.244	1.208
0.02	1.200	1.210	1.202	1.204
0.05	1.266	1.277	1.213	1.252
0.10	1.175	1.155	1.193	1.174
0.20	1.138	1.125	1.093	1.119
0.50	1.063	1.133	1.120	1.105
1	0.841	0.845	0.885	0.857
2	0.625	0.574	0.621	0.607
5	0.401	0.387	0.400	0.396
10	0.245	0.209	0.272	0.242
20	0.126	0.122	0.122	0.123
50	0.076	0.080	0.082	0.079
100	0.060	0.068	0.063	0.064
200	0.051	0.055	0.053	0.053

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลาย สำหรับการเชื่อมโปรตีนพาหะ BSA กับ RAC

0.2 M Sodium carbonate buffer pH 9.0

$NaCO_3$	1.91	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH

ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ RAC 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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4) 1 N HCl

HCl (37%)	30.8	มิลลิลิตร

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย เป็น 1000 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	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4) 5% นมพร่องมันเนย (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) 0.15 M Phosphate Citrate buffer pH 5.0

Na_2HPO_4	9.5	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
Citric acid	7.3	กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย Citric acid จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) Substrate solution

O-phenylenediamine (OPD)	40	กรัม
0.15 M Phosphate Citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7) 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	256	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	744	มิลลิลิตร

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

<u>หมายเหตุ</u> Aminopterin ให้นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส จนกว่าจะละลาย เนื่องจากสาร Aminopterin ละลายในน้ำกลั่นยาก

2) 100X HT

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 μm แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 90 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 90 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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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	3.836	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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

น้ำกลั่น	1.204	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	250	ไมโครลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	504	ไมโครลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2O_8$	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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรรัตน์ คงคาวิทูร เกิดเมื่อวันที่ 11 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2549 เสนอผลงานเรื่องการผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ ครั้งที่ 20 ณ โรงแรมตักสิลา จังหวัดมหาสารคาม เมื่อวันที่ 14-17 ตุลาคม 2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย