บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. <u>การหาปริมาณอิมมูโนโกลบลูลินจี(IgG)ในสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนน้ำในช่องท้องหนู(ascites)ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 50</u>

นำน้ำในช่องท้องหนูที่ได้มาตกตะกอน IgG ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 50 ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7:4 เท่ากับปริมาณน้ำในช่องท้องหนูเริ่มต้น นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร(absorbance,OD_{280}) ด้วยเครื่องspectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนหาปริมาณ IgG ได้จาก

$$\text{ปริมาณ IgG} = \frac{\text{ค่า } OD_{280} \times 10}{13.6} \text{ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ปริมาณ IgG ที่ผลิตโดยโคลนเซลล์ต่างๆในสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนน้ำในช่องท้องหนูด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

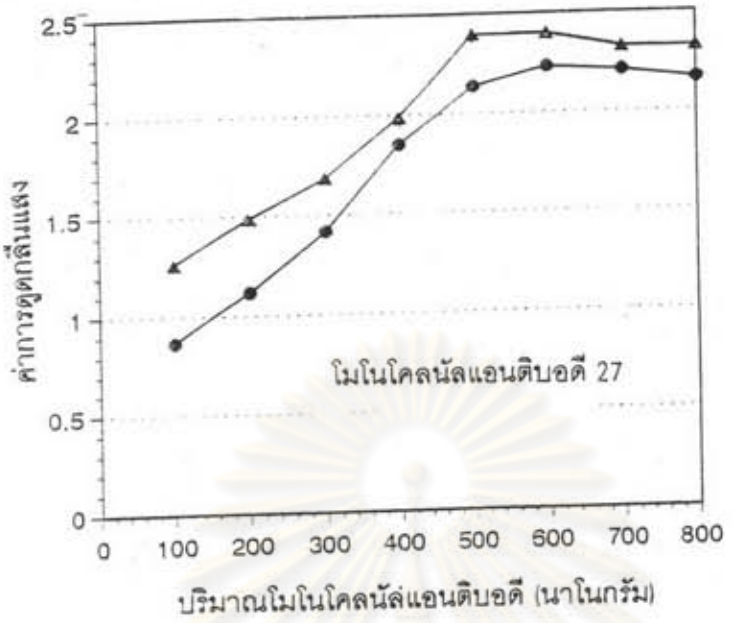
หมายเลขโมโนโคลนัลแอนติบอดี	ปริมาณIgG(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
40	8
43	5
51	15.5
75	9
36	7
52	5.7
44	6.8
54	13.4
57	11.2
20	5.3
27	11.4
16	10.2
74	10.5
58	7.2

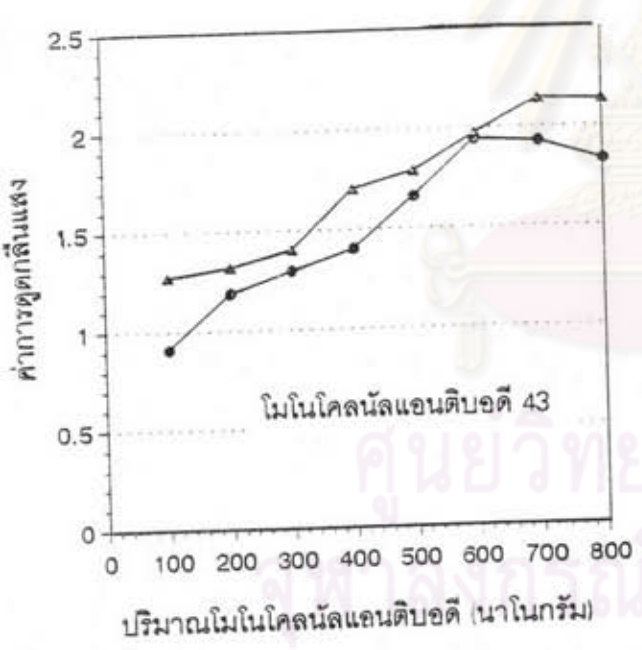
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

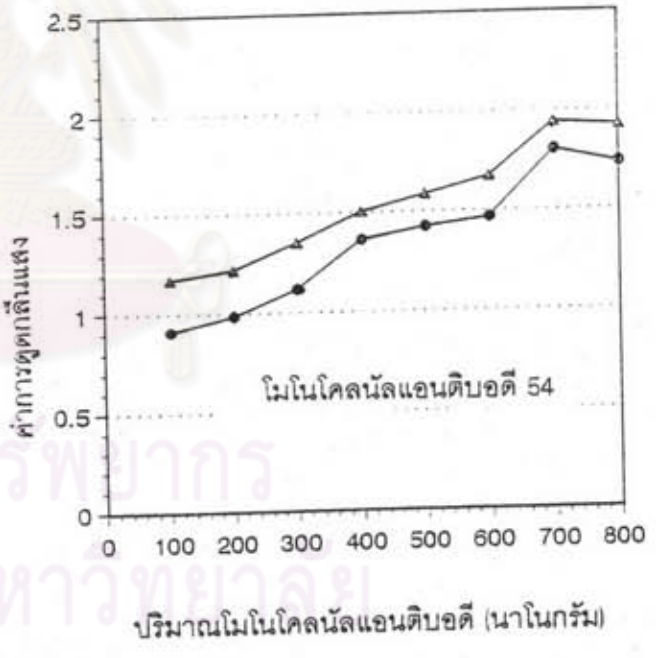
2. <u>เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีจากน้ำในช่องท้องหนูก่อนและหลังตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50</u>

นำน้ำในช่องท้องหนูก่อนและหลังตกตะกอน มาเจือจางให้มีปริมาณ IgG เท่ากัน นำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ (เซลล์S102) โดยวิธี ELISAตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟที่ปริมาณ IgGต่างๆกัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 2 พบว่าน้ำในช่องท้องหนูหลังตกตะกอนสามารถทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับได้ดีกว่าก่อนตกตะกอน ซึ่งน่าจะเนื่องมาจากน้ำในช่องท้องหนูก่อนตกตะกอนมีโปรตีนหลายชนิดปนอยู่มากกว่าหลังตกตะกอน โปรตีนเหล่านั้นอาจมาบังแอนติเจนบางส่วน ทำให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีเข้าไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งตับได้น้อยลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







รูปที่ 2 เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีจากน้ำในช่องท้องหนูก่อนและหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 50

โดยที่ ●—● โมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนตกตะกอน

▲—▲ โมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังตกตะกอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การแยก IgG_{2a} ออกจากน้ำในช่องท้องหนู ด้วยวิธี protein A affinity chromatography

เมื่อใช้วิธีprotein A affinity chromatographyในการแยกโมโนโคลนัลแอนติบอดีจากน้ำในช่องท้องหนูที่ผลิตได้ จะได้โมโนโคลนัลแอนติบอดีบริสุทธิ์ในรูปของ IgG_{2a} นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และนำมาคำนวณปริมาณโปรตีน ได้จาก

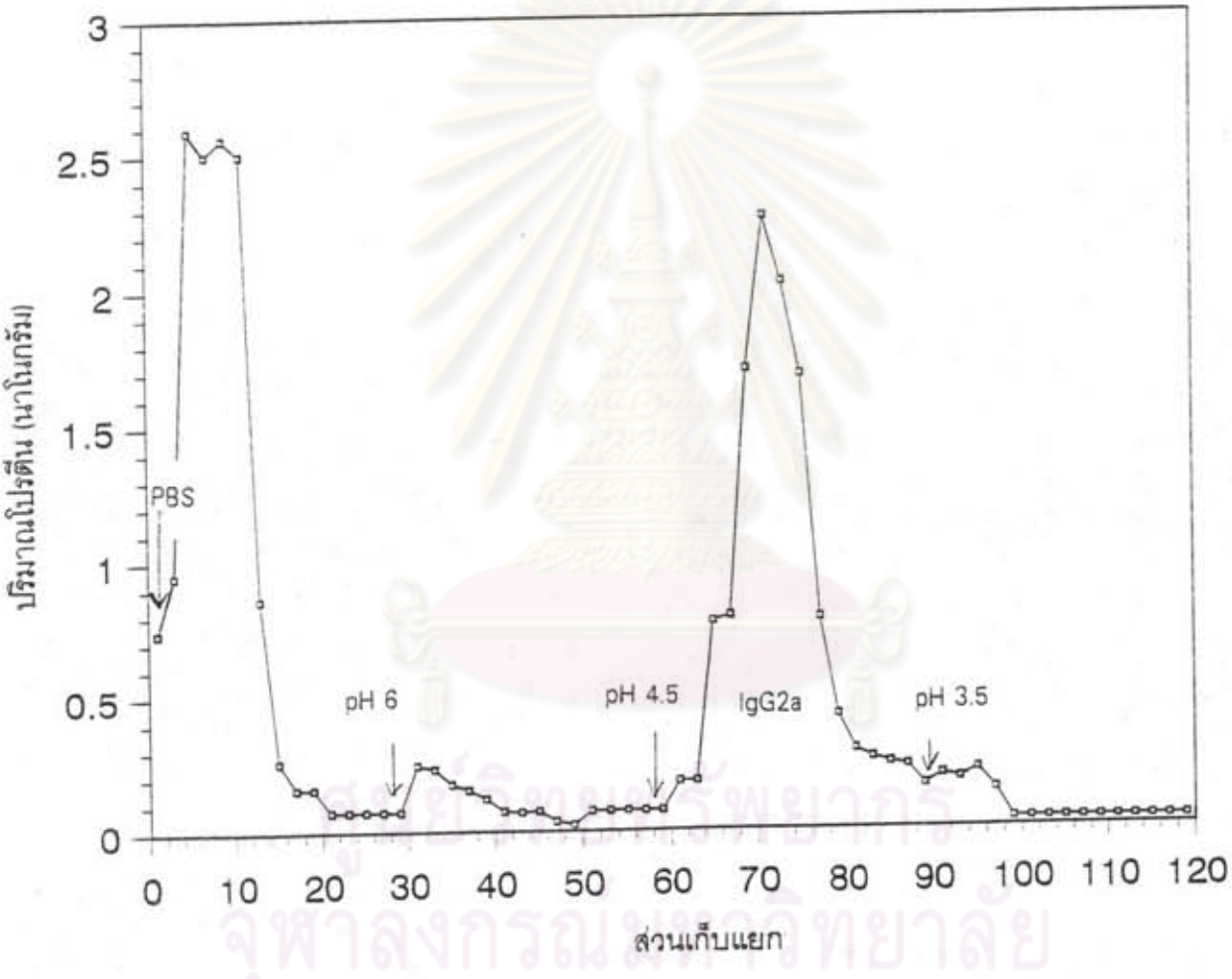
ปริมาณโปรตีน = $(OD_{280} \times 1.55)-(OD_{260} \times 0.77)$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ในแต่ละส่วนเก็บแยกมาเขียนกราฟ ได้ผลดังรูปที่ 3 เมื่อนำโปรตีนในแต่ละส่วนเก็บแยกที่ได้มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธีELISA พบว่าส่วน IgG_{2a} ที่ถูกชะด้วย 0.1โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.5 เป็นส่วนที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ

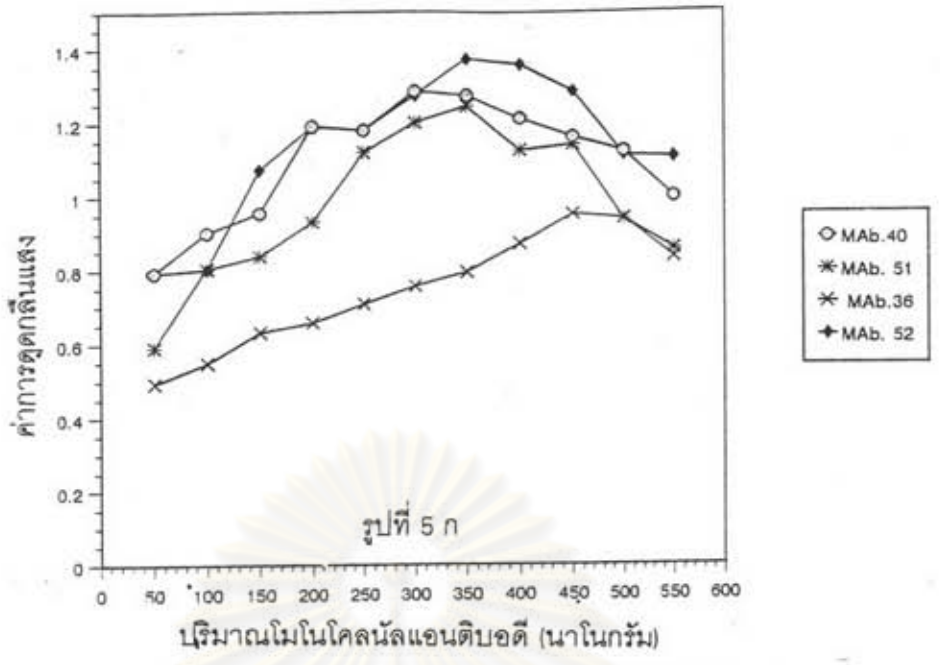
4. การหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งตับจำนวนคงที่ (เซลล์ S102)

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดมาเจือจางให้มีปริมาณ IgG เท่ากับ 50 , 100,150,250,350,450,550 นาโนกรัม ต่อ 100ไมโครลิตร และนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธี ELISA ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟ ได้ผลดังรูปที่ 4 พบว่าปริมาณสูงสุดที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27, 16, 75, 52, 51เท่ากับ 350 นาโนกรัม โมโนโคลนัลแอนติบอดี 43,44 มีค่าเท่ากับ 400 นาโนกรัม โมโนโคลนัลแอนติบอดี 40,58 มีค่าเท่ากับ 300 นาโนกรัม โมโนโคลนัลแอนติบอดี 74 , 57

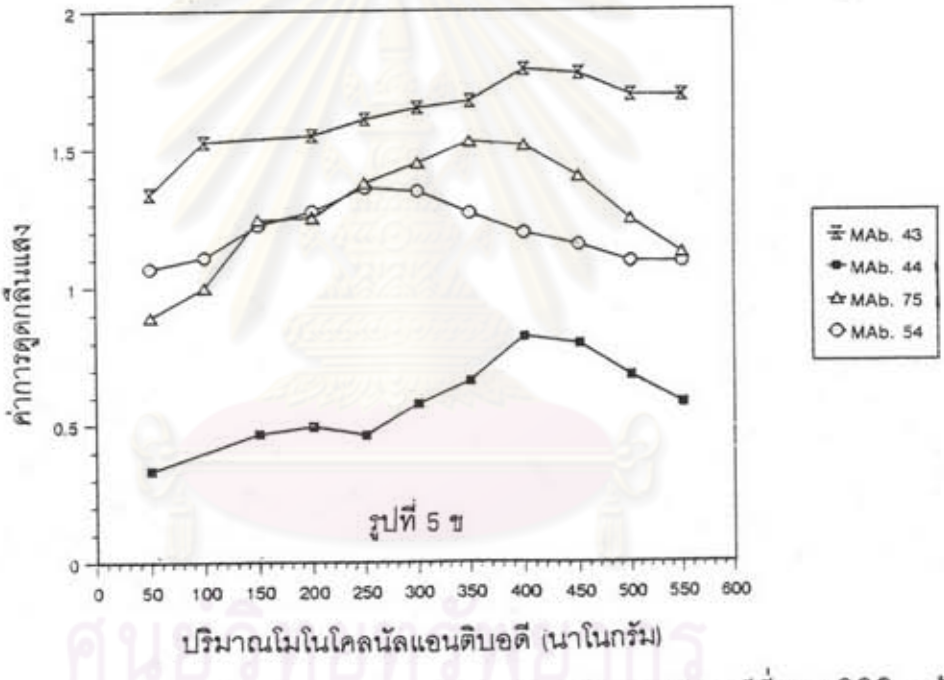
มีค่าเท่ากับ 200 นาโนกรัม และโมโนโคลนัลแอนติบอดี 36,54,20 มีค่าเท่ากับ 450,250 และ 100 นาโนกรัมตามลำดับ



รูปที่ 3 การแยก IgG_{2a} จากน้ำในช่องท้องหนู ด้วยวิธี protein A affinity chromatography



รูปที่ 5 ก



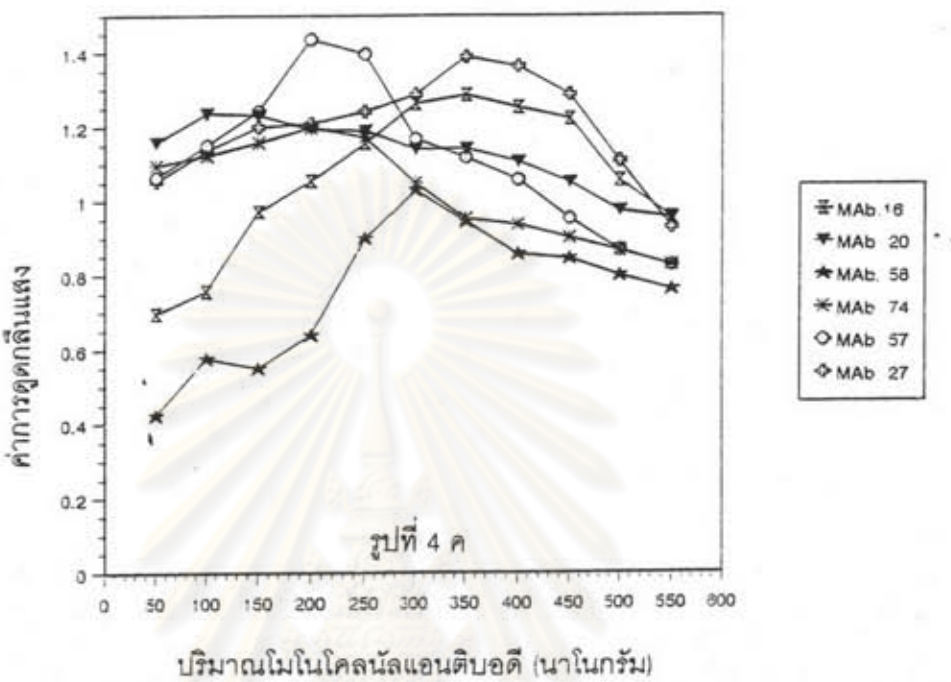
รูปที่ 5 ข

รูปที่ 4 ผลการหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ ด้วยวิธี ELISA

โดยที่ รูปที่ 4 ก เป็นโมโนโคลนัลแอนติบอดีในกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับชนิดที่มี tetraploid chromosome โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตับเด็กปกติระยะตัวอ่อน

รูปที่ 4 ข เป็นโมโนโคลนัลแอนติบอดีในกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับชนิดที่มี tetraploid chromosome โดยทำปฏิกิริยากับเซลล์ตับเด็กปกติ

I17192201



รูปที่ 4 ค

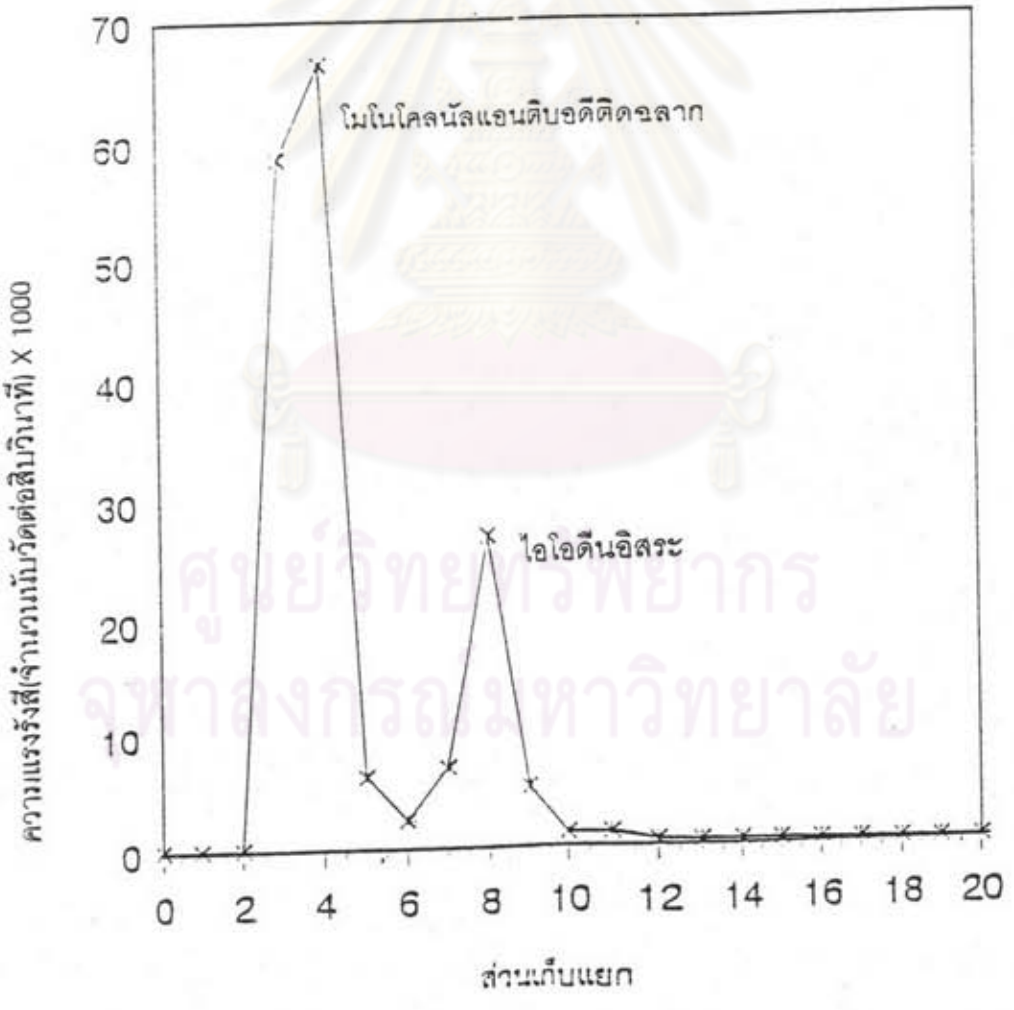
รูปที่ 4 ผลการหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ ด้วยวิธี ELISA

โดยที่ รูปที่ 4 ค เป็นโมโนโคลนัลแอนติบอดีในกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับทุกชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. <u>การติดฉลากไอโอดีน-125 บนโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธีคลอรามีนที</u>

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein A affinity chromatography ปริมาณ 30ไมโครกรัม มาติดฉลากไอโอดีน-125 ด้วยวิธีคลอรามีนทีตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.4 หลังจากแยกไอโอดีน-125 อิสระออกด้วยคอลัมน์พีดี-10 วัดค่าความแรงรังสีในแต่ละส่วนที่เก็บได้ และนำมาเขียนกราฟ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5 คำนวณหาร้อยละของการติดฉลากตามวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข ได้ร้อยละ70 และค่าความแรงรังสีจำเพาะได้เท่ากับ 4.6 ไมโครคิวรีต่อไมโครกรัม



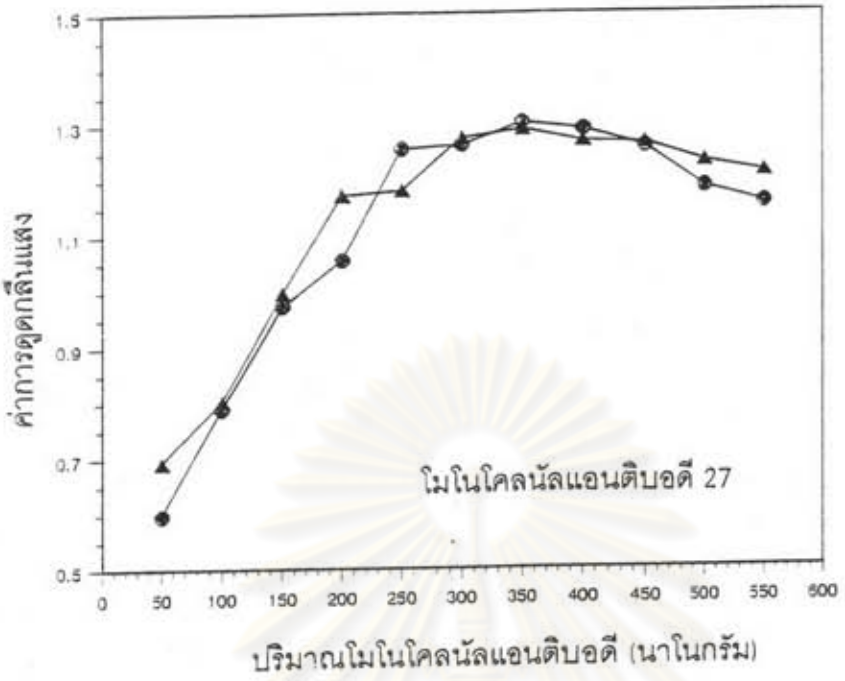
รูปที่ 5 แสดงความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากในส่วนเก็บแยกๆต่าง ที่ได้จากการแยกไอโอดีนอิสระออกด้วยคอลัมน์พีดี-10

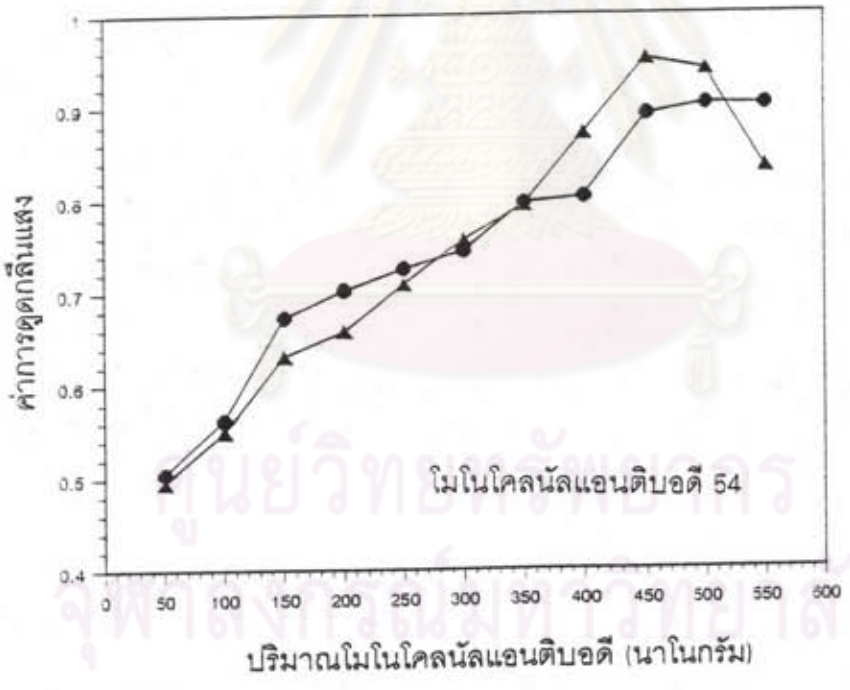
6. การหาความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลาก

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากที่แยกได้จากคอลัมน์พีดี-10 มารวมเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกรวมในส่วนที่ 3,4,5 และกลุ่มที่ 2 รวมในส่วนที่ 6,7,8,9 นำแต่ละกลุ่มมาหาร้อยละของความบริสุทธิ์ ด้วยวิธีเปเปอร์อิเลคโตรโฟรีซีส ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.4 นำค่าความแรงรังสีที่ระยะห่างจากจุดตั้งต้นทุกๆ 2 เซนติเมตร มาเขียนกราฟ ได้ผลดังรูปที่ 6 คำนวณหาร้อยละของความบริสุทธิ์ตามวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข พบว่าสารละลายกลุ่มที่ 1 มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 กล่าวคือ มีปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลาก 99 ส่วน และเป็นไอโอดีนอิสระ 1 ส่วนในร้อย และในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มของไอโอดีนอิสระ มีความบริสุทธิ์เพียงร้อยละ 2 ดังนั้นกลุ่มที่ 1 จะถูกนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาทางเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ต่อไป

7. เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลาก

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,43และ 54 ก่อนและหลังติดฉลากมาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้มีปริมาณเท่ากัน และนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ(เซลล์ S102) ด้วยวิธี ELISA ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.3 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 7 พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลากให้ผลการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับใกล้เคียงกัน แสดงว่าขั้นตอนการติดฉลากไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดี

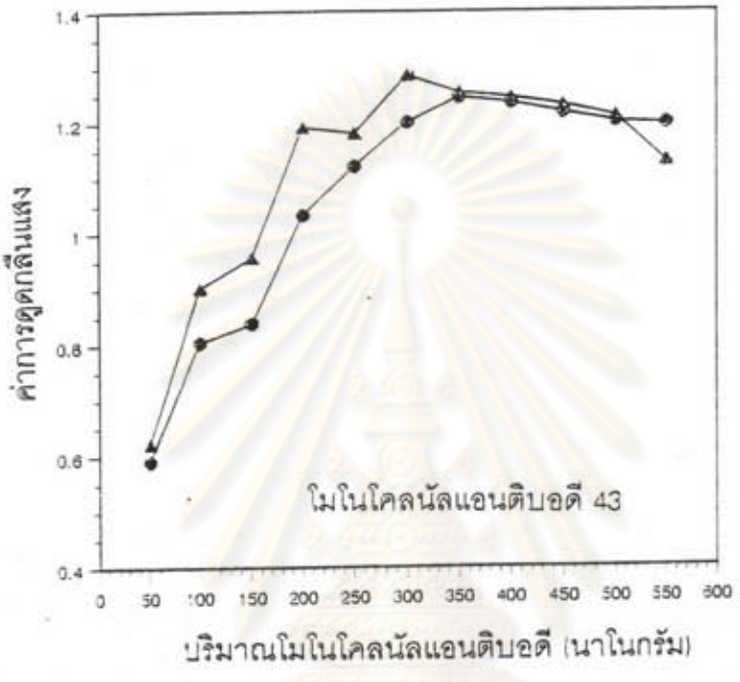




รูปที่ 7 เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ(เซลล์S102)ระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลากด้วยวิธี ELISA

โดยที่ ▲—▲ โมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนติดฉลาก

●—● โมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังติดฉลาก



รูปที่ 7 (ต่อ) เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ(เซลล์S102) ระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลากด้วยวิธี ELISA

โดยที่ ▲—▲ โมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนติดฉลาก

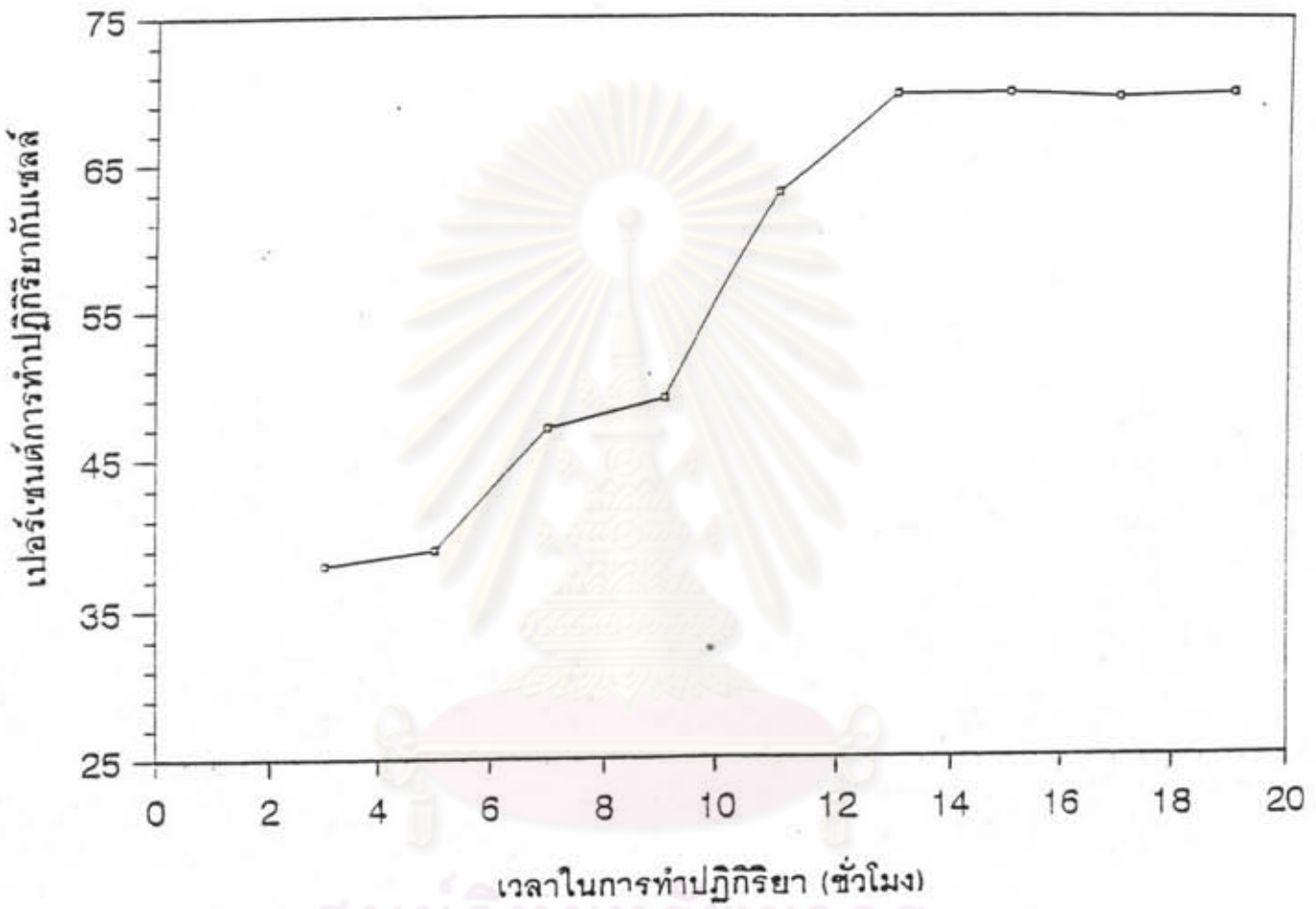
●—● โมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังติดฉลาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. <u>การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ</u>

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 ที่ติดฉลากไอโอดีน-125 มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้มีค่าความแรงรังสีประมาณ 40,000 จำนวนนับวัดต่อนาทีต่อ100ไมโครลิตร เติมลงในเซลล์ S102 ที่เตรียมจากวิธีการทดลองขั้นที่ 2.1ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆ คือ 1,3,5,7,9,11,13,15,17 และ19 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และวัดค่าความแรงรังสีด้วยเครื่องนับวัดรังสีแกมมา นำค่าความแรงรังสีที่ได้มาคำนวนร้อยละของการทำปฏิกิริยาตามวิธีการคำนวนในภาคผนวก ข เมื่อเขียนกราฟการทำปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 8 พบว่าที่เวลา 13 จนถึง19ชั่วโมง ให้ผลการทำปฏิกิริยาสูงสุด ดังนั้นการทำวิจัยต่อไปเลือกให้ทำปฏิกิริยาที่เวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อความสะดวกในการทำงาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ผลการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ(เซลล์ S102)ที่เวลาต่างๆ

9. <u>การทดสอบการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ</u> (เซลล์ S102 และ เซลล์ HepG-2)

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากส่วนที่มีร้อยละของความบริสุทธิ์สูง(กลุ่มที่ 1 จากผลการทดลองข้อ 6) มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้มีความแรงรังสีต่างๆกัน นำมาทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.5 วัดค่าความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ นำค่าความแรงรังสีที่ได้มาคำนวณเปอร์เซนต์การทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ ตามวิธีการคำนวณในภาคผนวก ข ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3 พบว่าร้อยละของการทำปฏิกิริยาสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,54,43กับเซลล์ S102ได้แก่ 72.5,35.7 และ 44.5 ตามลำดับ และกับเซลล์HepG-2 ได้แก่ 68.4,27.5 และ 21.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ค่าร้อยละของการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติด ฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ (เซลล์ S102 และ HepG-2)

หมายเลข MAb	ความแรงรังสีเริ่มต้น(CPM)	ความแรงรังสีเฉลี่ย(CPM) S102	HepG-2	ร้อยละของการทำปฏิกิริยา S102	HepG-2
43	8984	3958	1778	44	19.8
	19398	8452	4242	43.6	21.5
	38568	17187	8287	44.6	21.4
	65766	28502	9318	43.3	15.7
	126820	49954	18008	28.7	7.4
	242966	69919	18008	28.3	7.4
	485102	99697	21914	20.5	4.4
	878832	136776	38008	15.6	4.2
54	7172	1539	1948	21.4	27.1
	13056	3689	3445	28.3	26.4
	25420	9091	4919	35.7	19.3
	47000	11649	8825	24.7	18.7
	90372	20178	16998	22.3	18.3
	168258	34539	27850	20.5	16.6
	344494	54430	36940	15.8	10.7
27	8650	6184	5917	71.5	68.4
	18102	12729	12128	70.3	66.9
	33014	21518	20878	65	63.2
	58484	42409	35706	72.5	61
	15774	79381	65426	68.5	56.5
	226328	148012	105514	67	47.9
	386864	260063	179651	66.2	46.1

10. <u>การหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งตับในการทำ inhibition binding assay</u>

ทำ inhibition binding assay ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.6.1โดยมีการทดลอง 2 แบบ แบบที่ 1 คือ การเติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ไม่ติดฉลากสารรังสี (cold MAb 27) ก่อน หลังจากล้างcold MAb ส่วนเกินออกแล้ว เติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลาก (hot MAb)27 แบบที่ 2 คือการเติม hot MAb 27 ก่อน หลังจากล้าง hot MAb 27 ส่วนเกินออกแล้ว จึงเติม cold MAb 27

ในการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงเวลาในการทำปฏิกิริยาของhot MAb 27 และ cold MAb 27กับเซลล์มะเร็งตับที่อุณหภูมิ25องศาเซลเซียส เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในแต่ละช่วงของการทำปฏิกิริยา ได้ผลดังตารางที่ 4เลือกใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส เป็นเวลา16-18ชั่วโมง ทั้งสองช่วงของการทำปฏิกิริยาเนื่องจากเมื่อเติมเฉพาะ hot MAb 27 ให้ค่าการทำปฏิกิริยาสูงที่สุด และให้ผลการทดลองตามที่ควรจะเป็นเมื่อเติม cold MAb ลงไปก่อน คือ ร้อยละการทำปฏิกิริยากับเซลล์มีค่าต่ำ (4.4%)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 จะเห็นว่าเป็นไปตามสมการผันกลับได้ของการเกิดสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดี ดังนี้ $Ag + Ab \underset{K_d}{\overset{K_a}{\rightleftharpoons}} Ag\text{-}Ab$ โดยเฉพาะเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระบบในการเกิดปฏิกิริยา เช่น การล้าง และการเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีเพิ่ม ยิ่งเป็นผลให้สมดุลย์ในสมการดังกล่าวเปลี่ยนแปลงได้

ตารางที่ 4 ค่าร้อยละของการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งตับในการทำ inhibition binding assay ที่เวลาต่างๆ(ความแรงรังสีเริ่มต้นที่ใส่เท่ากับ 45,288 จำนวนนับวัดต่อนาที (CPM))

แบบที่ 1 เติม cold MAbก่อน

เวลาในการทำปฏิกิริยา		ความแรงรังสีเฉลี่ยที่ทำปฏิกิริยา(CPM)	ร้อยละของการทำปฏิกิริยา
cold MAb	hot MAb		
5 ชั่วโมง	5 ชั่วโมง	2355	5.2
5 ชั่วโมง	7 ชั่วโมง	5938	13.1
5 ชั่วโมง	9 ชั่วโมง	8527	18.8
5 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	20649	45.6
18 ชั่วโมง	5 ชั่วโมง	1041	2.3
18 ชั่วโมง	7 ชั่วโมง	1267	2.8
18 ชั่วโมง	9 ชั่วโมง	1811	4.0
18 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	1992	4.4

แบบที่ 2 เติม hot MAbก่อน

เวลาในการทำปฏิกิริยา		ความแรงรังสีเฉลี่ยที่ทำปฏิกิริยา(CPM)	ร้อยละของการทำปฏิกิริยา
hot MAb	cold MAb		
5 ชั่วโมง	5 ชั่วโมง	26852	49.3
5 ชั่วโมง	7 ชั่วโมง	12473	27.5
5 ชั่วโมง	9 ชั่วโมง	10959	24.2
5 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	5796	12.8
18 ชั่วโมง	5 ชั่วโมง	14582	32.2
18 ชั่วโมง	7 ชั่วโมง	12363	27.3
18 ชั่วโมง	9 ชั่วโมง	9339	20.4
18 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	8560	18.9
18 ชั่วโมง	-	26901	59.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. <u>การหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในแง่ของการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ</u>(เซลล์ S102)

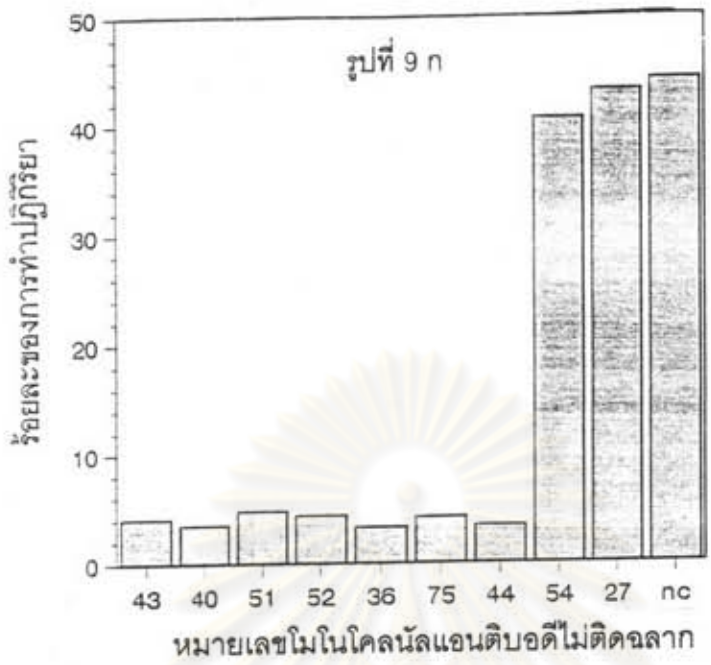
11.1 หาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยใช้หลักการยับยั้งการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จับกับเอพิโทปเดียวกัน ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.6 โดยหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีภายในกลุ่มก่อน(ดูการจัดกลุ่มในบทนำ)คือ ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 43ติดฉลาก เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับมะเร็งตับที่มี tetraploid chromosome และใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 ติดฉลาก เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับมะเร็งตับที่มีทั้ง tetraploid และ abberative chromosome จากนั้นหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีข้ามกลุ่ม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี 40,51,52,75,36,44สามารถจับเอพิโทปเดียวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี 43 และโมโนโคลนัลแอนติบอดี 58,20,16, 57,74 สามารถจับเอพิโทปเดียวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 สำหรับโมโนโคลนัลแอนติบอดี 54 จับคนละเอพิโทปกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีอื่น

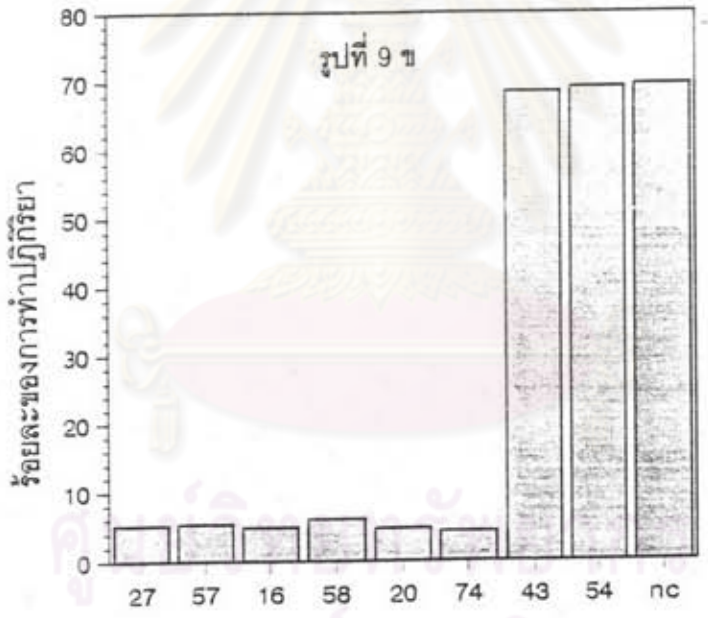
วิธีดูผลการทดลอง ใช้หลุมที่เติมเฉพาะ hot MAb กับหลุมที่เติม cold MAb ชนิดเดียวกับ hot MAb เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ กล่าวคือ ถ้าหลุมที่เติม cold MAb ชนิดใด ให้ร้อยละการทำปฏิกิริยาใกล้เคียงกับหลุมที่เติมเฉพาะ hot MAb แสดงว่าจับคนละเอพิโทป แต่หลุมใดที่ให้ร้อยละการทำปฏิกิริยาใกล้เคียงกับหลุมที่เติม cold MAb ชนิดเดียวกับ hot MAb แสดงว่าจับเอพิโทปเดียวกัน

ตารางที่ 5 ค่าร้อยละของการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ (S102) ของโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยวิธี inhibition binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ

cold MAb	hot MAb	ความแรงรังสีเริ่มต้น(CPM)	ความแรงรังสีที่ทำปฏิกิริยา(CPM)	ร้อยละของการทำปฏิกิริยา
1. -	27	38652	26709	69.1
27			2025	5.2
57			2099	5.4
16			1894	4.9
20			1820	4.7
74			1658	4.3
58			1819	4.7
2. -	43	39059	15764	40.3
43			1636	4.1
44			1639	4.2
40			1367	3.5
51			1894	4.8
52			1733	4.4
36			1289	3.3
54			15865	40.6
3. -	27	38541	25356	65.7
27			1736	4.5
43			26400	68.5
54			25493	69.1
4. -	43	40026	16523	41.3
43			1921	4.8
27			17291	43.2
5. -	54	31521	9661	30.5
54			1677	5.2
27			9535	30.2
43			9843	31.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



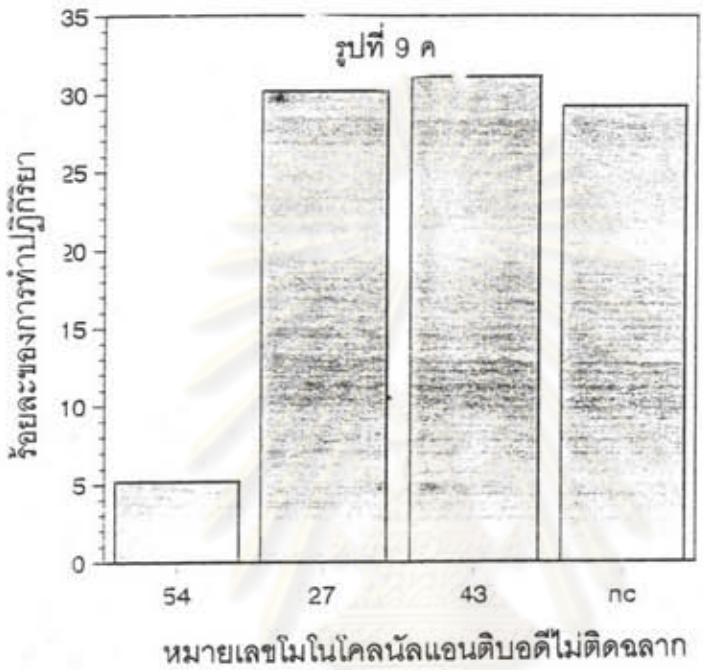


รูปที่ 9 ผลการทำ inhibition binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ

โดยที่ รูปที่ 9 ก หาความแตกต่างโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 43 ติดฉลาก

รูปที่ 9 ข หาความแตกต่างโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 ติดฉลาก

nc คือ negative control (สารควบคุมคุณภาพทางลบ)



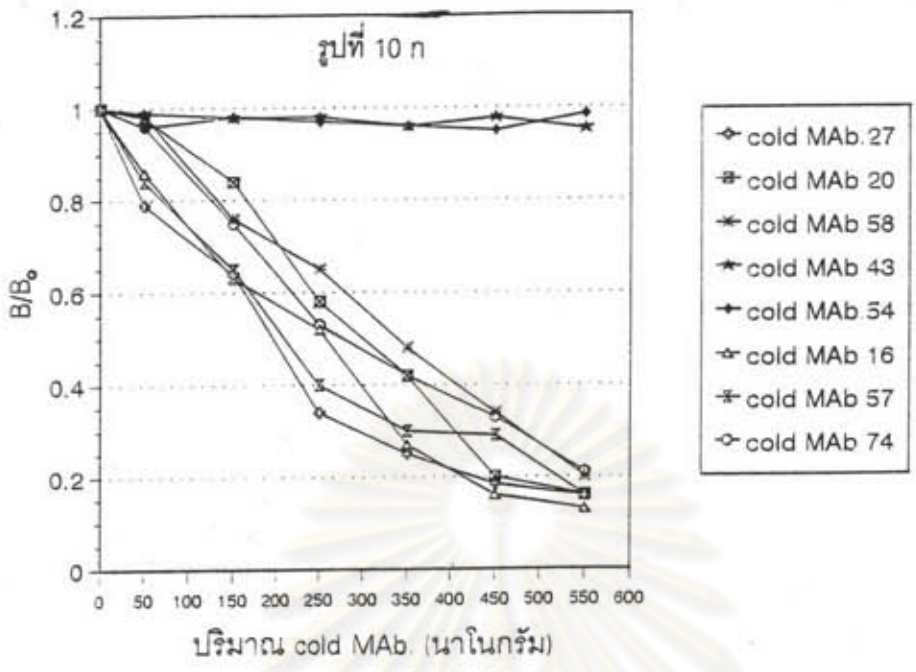
รูปที่ 9 (ต่อ) ผลการทำ inhibition binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ

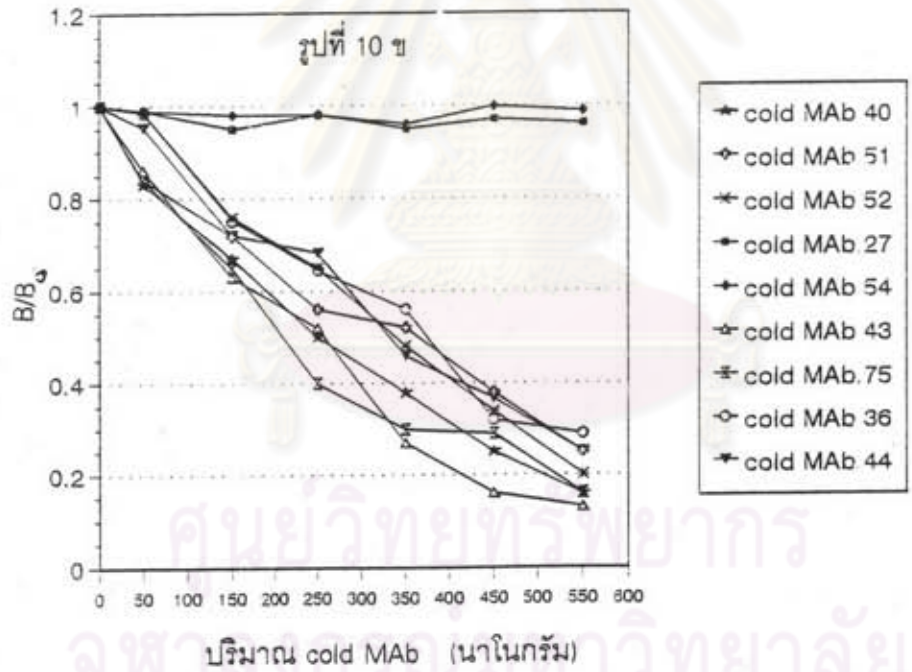
โดยที่ รูปที่ 9 ค หาความแตกต่างโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 54 ติดฉลาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2 หาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยใช้หลักการแย่งทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จับเอพิโทปเดียวกัน ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.6 คำนวณค่า B/B_0 (B_0 คือ ร้อยละของการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับในหลุมที่เติมเฉพาะ hot MAb ,B คือ ร้อยละของการทำปฏิกิริยาในหลุมที่เติม cold MAb ผสมกับ hot MAb) นำค่า B/B_0 ที่คำนวณได้มาเขียนกราฟกับปริมาณ cold MAb ต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 10 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของ cold MAb ที่จับกับเอพิโทปเดียวกับ hot MAb จะทำให้ร้อยละของการทำปฏิกิริยาของ hot MAb กับเซลล์ลดลง เนื่องจาก cold MAb ไปแย่งที่ hot MAb ในการจับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



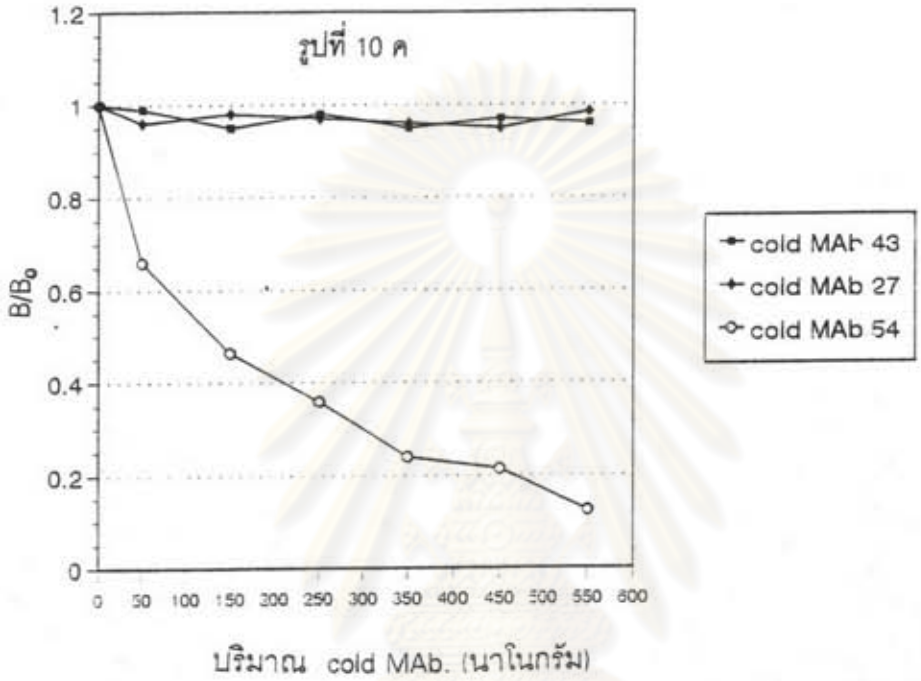


รูปที่ 10 แสดงผลการทำ competitive binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ

โดยที่ รูปที่ 10 ก ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 ติดฉลาก

รูปที่ 10 ข ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 43 ติดฉลาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10(ต่อ) ผลการทำ competitive binding assayเพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ โดยที่ รูปที่ 10 ค ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี 54 ติดฉลาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. <u>การหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ (S102 และ HepG-2) จำนวนคงที่ ด้วยวิธีทางเรดิโออิมมูโนแอสเสย์</u>

นำ hot MAb มาเจือจางให้มีความแรงรังสีประมาณ 40,000 จำนวนนับวัดต่อนาทีต่อ100 ไมโครลิตร คิดเป็นปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดี 5 ไมโครกรัม (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ข)(เนื่องจากผลการทดลองในตารางที่ 3 ค่าความแรงรังสีที่ใส่เริ่มต้นของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากมีค่าร้อยละของการทำปฏิกิริยาค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 20,000-40,000 จำนวนนับวัดต่อนาที จึงเลือกใช้ที่ความแรงรังสี 40,000 จำนวนนับวัดต่อนาที) ผสมกับ cold MAb (ชนิดเดียวกับ hot MAb) ปริมาณต่างๆ เติมลงในเซลล์ S102 และHepG-2 จากนั้นทำตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.7 ได้ผลดังตารางที่ 6 คำนวณปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ โดยวิธีการคำนวณในภาคผนวกข นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ ได้ผลดังรูปที่ 11 พบว่าปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดี27,54,43 ที่ทำปฏิกิริยาสูงสุดกับเซลล์ S102 จำนวน $2.5x10^4$ เซลล์ เท่ากับ 155,155,80 นาโนกรัม และ สำหรับเซลล์ HepG-2 เท่ากับ 80,205,80 นาโนกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ S102 (X_1) และเซลล์ HepG-2(X_2) จำนวน 2.0-2.5x10^4 เซลล์

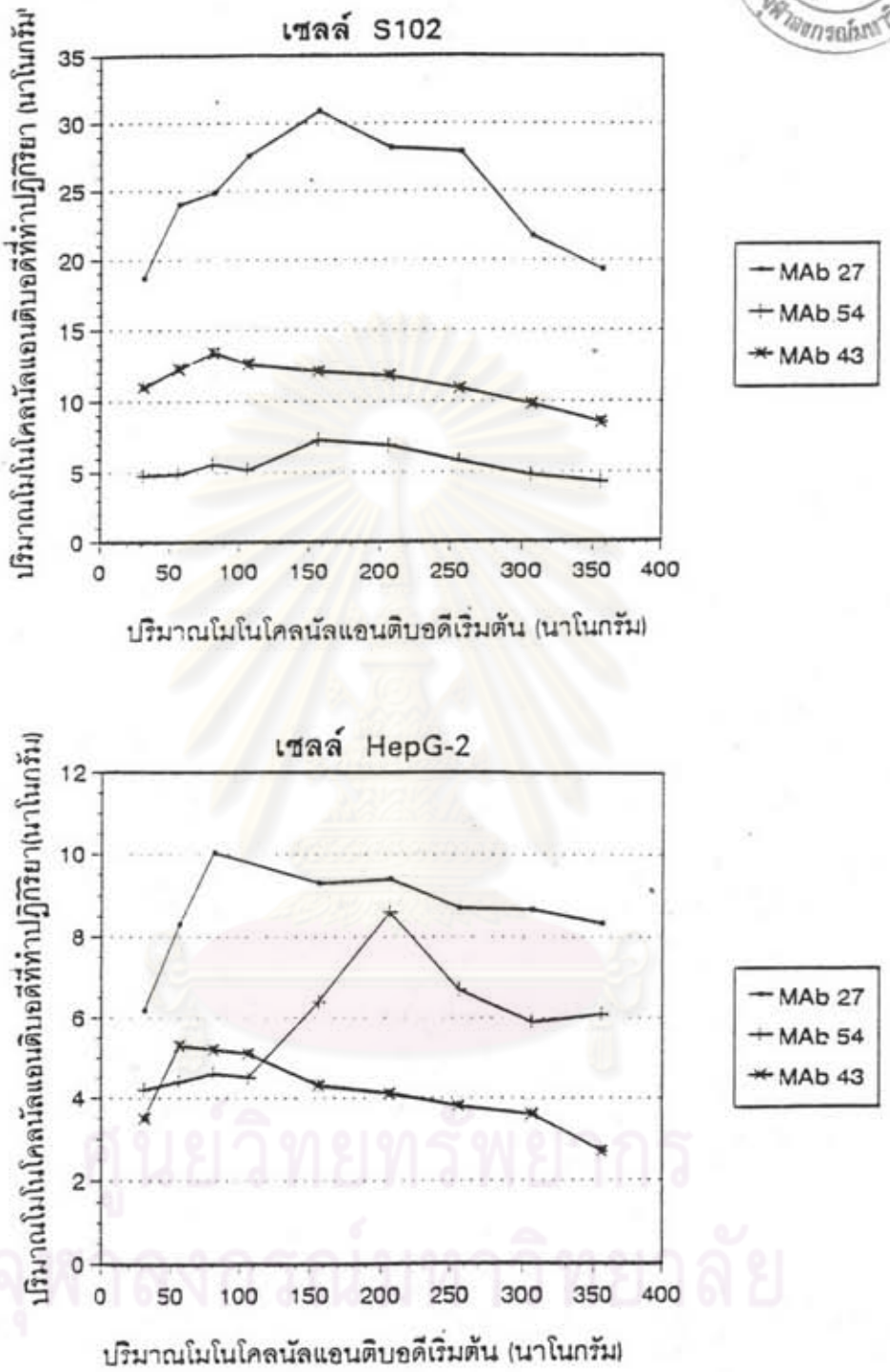
หมายเลขโมโนโคลนัลแอนติบอดี	ปริมาณ MAb. ทั้งหมดที่เติม (นาโนกรัม)	SA	ร้อยละของการทำปฏิกิริยา (นาโนกรัม)		ปริมาณMAb. ที่ทำปฏิกิริยา (นาโนกรัม)	
			X_1	X_2	X_1	X_2
27	355	0.072	2.9	2.5	10.3	8.9
	305	0.084	7.1	2.7	21.7	8.3
	255	0.1	10.9	4.2	27.9	8.1
	205	0.13	13.7	4.6	28.2	9.5
	155	0.165	19.8	5.8	30.9	9.0
	105	0.24	26.0	6.9	27.6	6.2
	80	0.38	30.8	12.4	24.9	10.0
	55	0.46	35	14.6	24.0	8.7
	30	0.83	53.9	25.2	16.7	5.2
54	355	0.072	1.7	1.7	6.0	6.1
	305	0.084	1.6	2.2	5.8	6.7
	255	0.1	1.9	2.3	4.8	5.9
	205	0.13	2.1	4.2	4.3	8.6
	155	0.165	4.7	4.1	7.3	6.4
	105	0.24	4.9	4.2	5.2	4.5
	80	0.32	6.9	5.8	5.6	4.6
	55	0.46	8.8	7.5	4.9	4.4
	30	0.83	15.5	14.2	4.8	4.2
43	355	0.072	2.4	1.4	8.5	5.1
	305	0.084	3.2	1.6	9.8	4.9
	255	0.1	4.3	2.0	11.0	5.1
	205	0.13	6.3	2.2	12.1	4.5
	155	0.165	7.6	2.8	11.8	5.2
	105	0.24	10.3	3.1	10.9	3.9
	80	0.32	16.6	6.3	13.4	5.3
	55	0.46	19.8	4.2	11.0	3.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,54 และ 43 ที่ทำปฏิกริยากับเซลล์มะเร็งตับ (S102 และ HepG-2) จำนวน 1 เซลล์

หมายเลขโมโนโคลนัลแอนติบอดี	ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ1เซลล์ (พิโครกรัม)	
	S102	HepG-2
27	1.2-1.5	0.4-0.5
54	0.29-0.36	0.34-0.43
43	0.54-0.67	0.21-0.27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



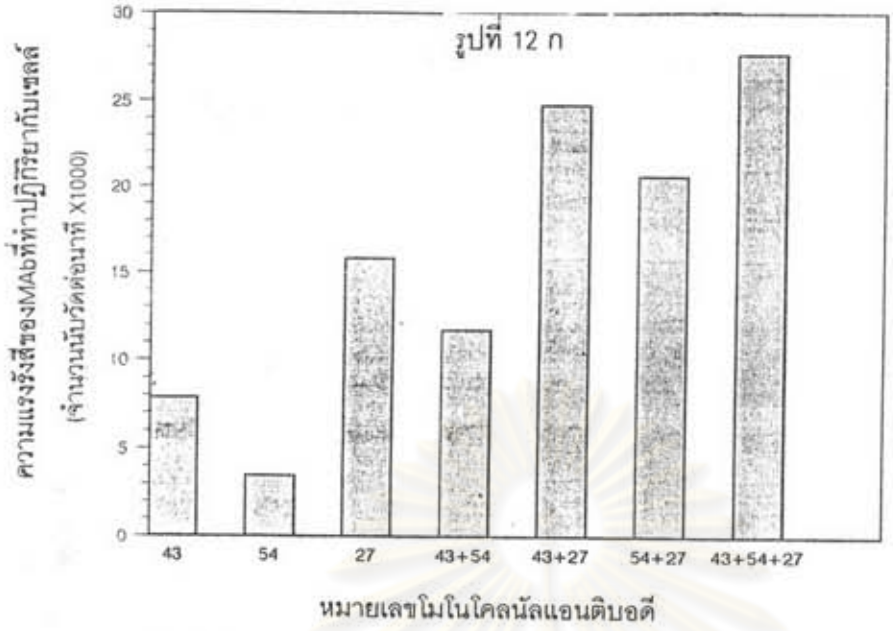
รูปที่ 11 ปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับจำนวน $2.0-2.5 \times 10^4$ เซลล์

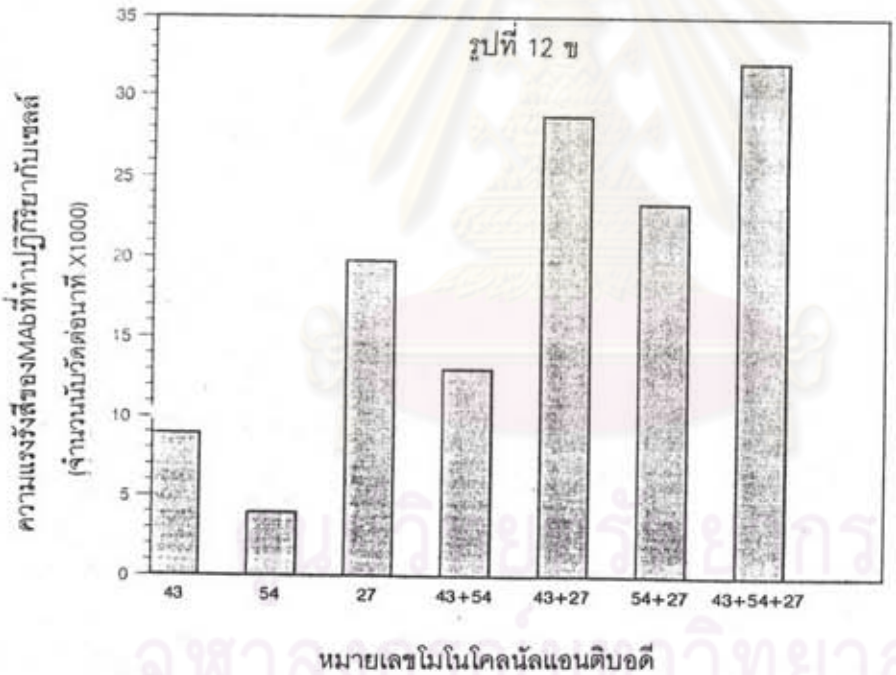
13. <u>การเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ (S102 และ HepG-2) ระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม</u>

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,43และ54 มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาสูงสุดกับเซลล์มะเร็งตับที่หาได้จากผลการทดลองที่ 12และปริมาณลดลงครึ่งหนึ่ง นำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ (เซลล์ S102และเซลล์ HepG-2) ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.8(ทำ5ซ้ำ)ได้ผลดังนี้

เมื่อเปรียบเทียบความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวและความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 12-13 พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม 2 โคลน ให้ค่าความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับสูงกว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวและโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม 3 โคลน ให้ความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับสูงกว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม 2 โคลน ดังนั้นสรุปได้ว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี27,54 และ43 ผสม สามารถเพิ่มการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

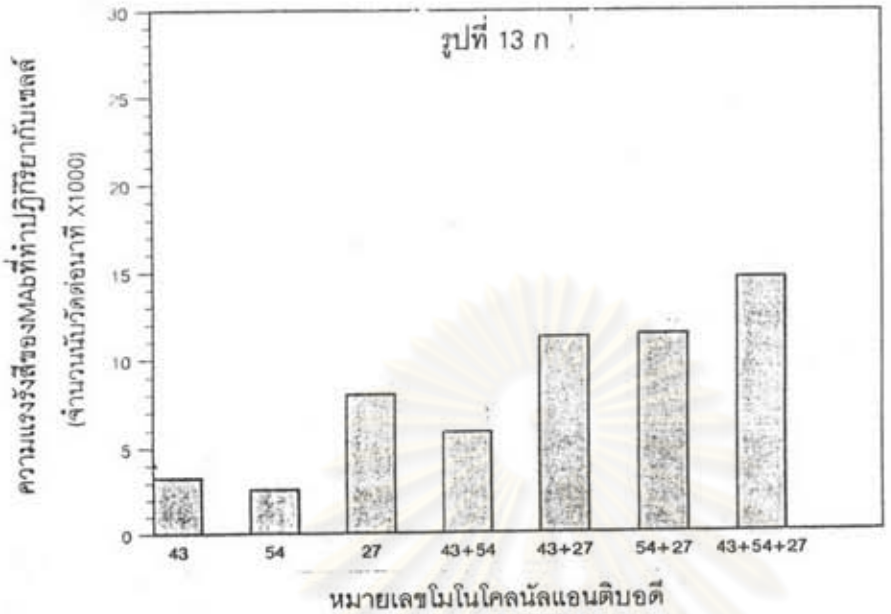


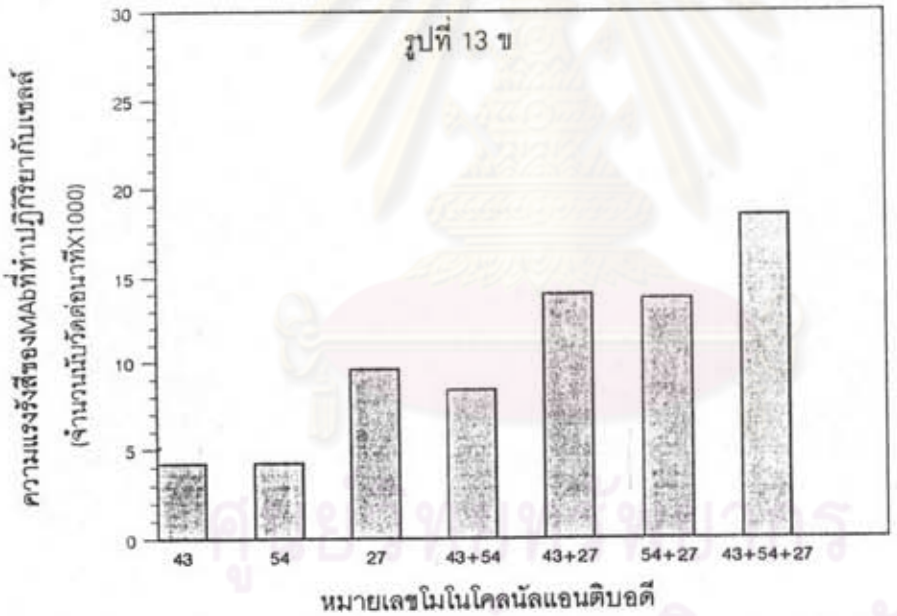


รูปที่ 12 เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์ S102 ของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,43และ54 เดี่ยวและผสม

โดยที่ รูป 12 ก ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดเท่ากับปริมาณสูงสุดที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์

รูป 12 ข ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดลดลงครึ่งหนึ่ง

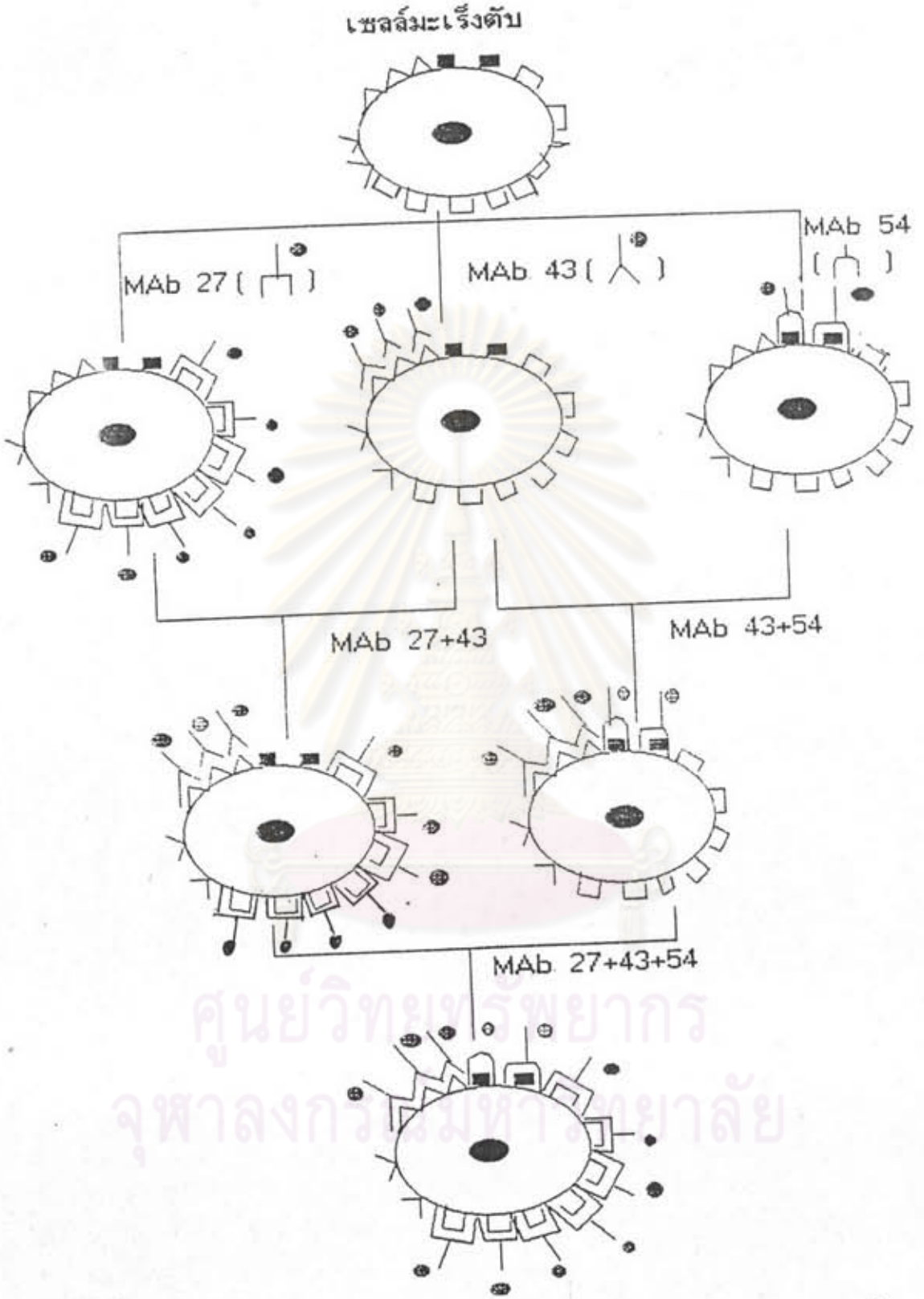




รูปที่ 13 เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์ HepG-2 ของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,43และ54 เดี่ยวและผสม

โดยที่ รูป 13 ก ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดเท่ากับปริมาณสูงสุดที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์

รูป 13 ข ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดลดลงครึ่งหนึ่ง



รูปที่ 14 แผนภาพการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,43,54 เดี่ยวและผสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย