

รายงานการวิจัย ปีที่ 1

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST 3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์ หัวหน้าโครงการ

นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

อ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

อ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร

นายอนุมาศ บัวเขียว

ร.ศ.ดร.พลกฤษ์ แสงวณิช ที่ปรึกษาโครงการ

มีนาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจาก
รัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2555

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการ ช่วยให้คำปรึกษา
และแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ฟูราโซลิโดน (Furazolidone ,FZD) เป็นยาในกลุ่มสารไนโตรฟูแรนที่เกษตรกรนิยมใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารในสัตว์เพื่อการบริโภค ได้แก่ โค ,สุกร ,ไก่ ,ปลา และกุ้ง ยานี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมแทบอลิต์ คือ 3 – อะมิโน – 2 – ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone ,AOZ) ติดกับเนื้อเยื่อ อาจเป็นสารก่อมะเร็งและก่อให้เกิดกลายพันธุ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ หรือ สารอนุพันธ์ NPAOZ ซึ่งเป็นรูปสารสำหรับการตรวจหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์ โดยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยอนุพันธ์ CPAOZ ที่เชื่อมต่อกับ cBSA (CPAOZ-cBSA) และ AOZ ที่เชื่อมต่อกับ BSA (AOZ-BSA) จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า CPAOZ-cBSA เหมาะสมที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองมากกว่า AOZ-BSA เพราะสามารถผลิตไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดี ซึ่งมีความสามารถในการจับกับสาร NPAOZ ,CPAOZ และ FZD ในรูปอิสระได้ จากการคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ มีจำนวน 8 โคลน ได้แก่ เซลล์จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 มีค่าความไวในการจับกับสาร NPAOZ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.17 ,4.87 ,6.38 ,3.87 ,10.49 ,10.27 ,11.46 และ 11.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทุกโคลนเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร FZD และ CPAOZ จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยตรวจสอบไอโซไทป์ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หลุมต้น 8/12D และ 6/6E เป็นชนิด IgG_1 และ IgG_{2b} ตามลำดับ จึงทำการคัดเลือกโคลน หมายเลข 181 จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และหมายเลข 102 จากเซลล์หลุมต้น 6/6E เพื่อทำการผลิตเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Furazolidone (FZD) is a nitrofurane drug which is widely used in prevention and treatment of animals such as cattle, swine, chicken, fish and shrimp, for consumption. When FZD enters the body, it is metabolized to 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) which attached to the tissue and is considered to be a carcinogen and mutagen.

In this research, monoclonal antibody against AOZ or its nitrophenyl derivative (NPAOZ) which is the stabilized form for residue detection was produced. Immunization of mice was performed by using both carboxyphenyl derivative conjugated to cationized bovine serum albumin (CPAOZ-cBSA) and AOZ-BSA as the antigens. The results indicated that CPAOZ-cBSA was better than AOZ-BSA because it could induce hybridomas which produce antibodies with binding ability to NPAOZ, CPAOZ and FZD. After screening, eight hybridomas which produce antibody against NPAOZ were selected. Four hybridoma clones were obtained from the originated well no. 8/12D and were assigned as no. 75, 79, 89 and 181 while the others (assigned as no. 96, 102, 109 and 112) were obtained from the well no. 6/6E. Their sensitivities to NPAOZ in the term of 50 percent inhibition concentration were 5.1, 4.9, 6.4, 3.9, 10.5, 10.3, 11.5 and 11.8 nanogram per millilitre, respectively. Antibody from each clone cross-reacted to FZD and CPAOZ. The isotype of antibody from well no. 8/12D and 6/6E was found to be IgG₁ and IgG_{2b}, respectively. Monoclonal antibodies from clone no. 181 and 102 will be produced and partially purified for further studies.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฏ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	3
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2. วิธีดำเนินการวิจัย	7
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	7
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	7
2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	8

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (AOZ-OVA และ CPAOZ-OVA)	12
2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร AOZ เป็น CPAOZ	12
2.2.2 การเชื่อมต่อ CPAOZ กับ cBSA และ AOZ กับ BSA	12
2.2.3 การเชื่อมต่อ AOZ และ CPAOZ กับ OVA	13
2.2.4 การหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี BCA	13
2.2.5 การวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS	13
2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร AOZ และ NPAOZ	14
2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง	14
2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA	14
2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ โดยวิธี Indirect competitive ELISA	15
2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร AOZ หรือ NPAOZ	15
2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)	15
2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์	15
2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี indirect ELISA	16
2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution	16

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	17
2.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	17
2.5.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA	17
2.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA	17
2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์	18
2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์	18
2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A หรือ protein G affinity chromatography	18
2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ	19
3. ผลการวิจัย	20
3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA)	20
3.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ และ AOZ	23
3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	34
3.4 การศึกษาลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	40
3.4.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะ	40
3.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	47
3.4.3 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA	48

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	49
4. สรุปและอภิปรายการทดลอง	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย	60

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่า R_0 ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ	21
ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติระหว่างสารกับโปรตีน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	23
ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 1 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA และ หนูชุดที่ 2 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA	25
ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	27
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย AOZ-BSA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	29
ตารางที่ 6 แสดงค่า IC_{50} ของการจับกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ	30
ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA เคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA ,AOZ-OVA ,CPAOZ-OVA ,BSA และ OVA ของหนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	31
ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA กับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA	32

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 5 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA	33
ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร CPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	35
ตารางที่ 11 การทดสอบแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	37
ตารางที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	39
ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร ต่างๆของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA	41
ตารางที่ 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร ต่างๆของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA	43
ตารางที่ 15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA	48
ตารางที่ 17 แสดงค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA	52

สารบัญภาพ (List of Illustration)

	หน้า
รูปที่ 1 โคโรมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ	20
รูปที่ 2 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD โดยวิธี indirect competitive ELISA	50
รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA	50
รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA	51

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

AOZ	3-amino-2-oxazolidinone
NFZ	Nitrofurazone
NFT	Nitrofurantoin
FZD	Furazolidone
FTD	Furaltadone
SEM	Semicarbazide
AHD	1-Aminohydantoin
AMOZ	3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
MRPL	minimum required performance limit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
CPAOZ	3-[[3-carboxyphenylmethylene]amino]-2- Oxazolidinone
NPAOZ	2-nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone
CBA	3-Carboxybenzaldehyde
TLC	Thin Layer Chromatography
BCA	Bicinchoninic acid assay
TNBS	Trinitrobenzene sulphonic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
FCA	Freund's complete adjuvant
FICA	Freund's incomplete adjuvant
DMF	Dimethyl Sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide
OVA	Ovalbumin
CO ₂	Carbondioxide
FCS	Fetal calf serum
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HT	Hypoxanthine และ Thymidine

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

HRP	Horseradish peroxidase
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%
LOD	limit of detection
MW	Molecular weight
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with tween20
PEG	polyethylene glycol
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxide
H ₂ SO ₄	Sulfuric acid
ppb	part per billion
ppm	part per million

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารไนโตรฟูแรนถูกใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Escherichia coli*, *Coccidia* และ *Salmonella spp.* โดยเกษตรกรนิยมใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ ผสมลงในอาหารสัตว์ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคดังกล่าวในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคเช่น โค หมู ไก่ ปลาและกุ้ง โดยพบว่ายาในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีอยู่ 4 ชนิดได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone ,NFZ) ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin ,NFT) ฟูราซิลิดอน (Furazolidone ,FZD) และ ฟูรัลทาโดน (Furaltadone ,FTD) ซึ่งสารทั้ง 4 ชนิดนี้ มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสาร เมแทบอลไลต์ ได้แก่ เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide ,SEM) ,1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-Aminohydantoin ,AHD) ,3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone ,AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone ,AMOZ) ตามลำดับ โดยจะถูกดูดซึมผ่านเยื่อเมือกของลำไส้ ของสัตว์ (Kumar และคณะ ,1994 ; Keffe และคณะ ,2004) สารในกลุ่มดังกล่าวมีรายงานว่ามีความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะถูกเมแทบอลไลต์เร็วมาก ภายใน 2-3 ชั่วโมง หลังเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์สารฟูราซิลิดอนโดยตรงนั้นจึงทำได้ยาก ซึ่งสาร เมแทบอลไลต์ ที่ได้ จะอยู่ในรูป AOZ ติดอยู่ที่เนื้อเยื่อ โดยจะคงอยู่นานหลายสัปดาห์ ในการใช้ยาและสารเหล่านี้จะใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ เช่น ในนม เนื้อ หรือ ไข่ เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค (Bryan ,1978) จากสาเหตุดังกล่าว จึงทำให้หลายประเทศหันมาเน้นเรื่องความปลอดภัยของอาหารโดย ไนโตรฟูแรน เป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะที่มีการสั่งห้ามไม่ให้ใช้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคในหลายประเทศโดยเฉพาะประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป และ สหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1995 ได้ประกาศห้ามใช้สารฟูราซิลิดอนในสินค้าเกษตรและอาหารโดยมีข้อกำหนดความสามารถในการตรวจหาสารปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Minimum Required Performance Limits ,MRPL) ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มอกช.9007-2548) เรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกำหนดให้สาร สารเมแทบอลไลต์ (metabolite) ทั้ง 4 ตัวของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนต้องไม่พบในสินค้าเกษตรและอาหารโดยกำหนดให้มีค่า MRPL อยู่ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ SEM และ AHD จึงได้มีการตรวจวิเคราะห์หาสาร ตกค้างของยาปฏิชีวนะดังกล่าวในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้วงปฏิบัติการโดยวิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ,Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) (Leitner ,Zöllner and Lindner ,2001 ; Keffe และคณะ ,2004) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลามาก ทำให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทำได้ไม่

ครอบคลุมดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการตรวจสอบที่ง่าย สะดวก ได้ผลเร็วแม่นยำและ ค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อใช้ในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ก่อนการนำเข้าและส่งออก

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้าง ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการตรวจวัดปริมาณ แอนติเจน โดยการใช้ แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำ รวดเร็ว และ มีความแม่นยำสูง และเนื่องจากทีมผู้วิจัยได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับสาร AMOZ และมีการพัฒนาชุดตรวจสอบสารดังกล่าวได้สำเร็จแล้ว (Pimpitak และคณะ ,2009) ทางทีมวิจัยจึงมีความต้องการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและชุดตรวจสอบที่จำเพาะต่อสาร AOZ ซึ่งปัจจุบันมีความต้องการเป็นอย่างมากและยังไม่พบชุดตรวจสอบสาร AOZ โดยวิธี ทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ผลิตขึ้นเองในประเทศ ดังนั้น จึงควรมีการพัฒนาความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสาร AOZ ทำให้การตรวจโดยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยามีความจำเพาะสูงชันและสามารถควบคุมคุณภาพการผลิตได้ง่ายขึ้นเพื่อพัฒนาต่อในขั้นทำชุดตรวจ (ELISA test kit) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสารนี้ลดลง มีความสะดวกในการใช้งานได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งยังสามารถทำให้รู้ปริมาณของสารในระดับต่ำพร้อมทั้งยังสามารถตรวจได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงได้รับความนิยมสูงชันมากจนทำให้การตรวจโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจหลักในปัจจุบัน

1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ หรือ NPAOZ
- ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- เปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร AOZ ให้อยู่ในรูป 3-(3-คาร์บอกซิเฟนิลเมธิลอะมิโน)-2-ออกซาโซลิดีโนน (CPAOZ) และเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เพื่อใช้เป็นแอนติเจน
- จัดกระตุ่นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ สาร AOZ และ/หรือ NPAOZ
- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี
- คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ และ/หรือ NPAOZ โดยวิธี ELISA

- ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

- การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์

(isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich ,USA)

- การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และสารนอกกลุ่มด้วยวิธี Indirect

competitive ELISA

- การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง ทำรายงานฉบับสมบูรณ์

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตและเป็นยาต้านจุลชีพ ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกาตทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และออกฤทธิ์ต่อเชื้ออมีบา โปรโตซัว รวมทั้งเชื้อราบางชนิด ซึ่งนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้ในการป้องกันรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ กระเพาะอาหารและโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของสัตว์โดยเกิดจาก แบคทีเรีย เช่น *Salmonella spp.* (โรค Salmonellosis) *Escherichia coli* (โรค Colibacillosis) โรคที่เกิดจาก *Coccidia* (โรค Coccidiosis) เชื้อทำออักเสบจากการติดเชื้อ (infectious synovitis) โรคหงอนดำ (Blackhead) หรือ Histomoniasis ที่พบในสัตว์ ได้แก่ สุนัข แพะ แกะ โค กระบือ เป็ด ไก่ และ กุ้ง เป็นต้น โดยยาต้านกลุ่มไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดนี้จัดเป็นสารประกอบไนโตร (nitro compounds) มีสมบัติที่ไม่เสถียรไวต่อแสง และจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อยาต้านทั้ง 4 ชนิดได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone ,NFZ) ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin ,NFT) ฟูราโซลิโดน (Furazolidone ,FZD) และ ฟูรัลทาโดน (Furaltadone, FTD) เข้าสู่ร่างกาย สิ่งมีชีวิตจะมีวิธีในการกำจัดสารเคมีเหล่านั้นโดยกระบวนการ เมแทบอลิซึม ซึ่งยาส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารที่ละลายได้และถูกกำจัดออกไปจากร่างกาย แต่ในบางกรณีสารเมแทบอลิต์ อาจไปจับกับโปรตีนในร่างกายสัตว์ เป็นผลให้ขบวนการขับออกไปเป็นไปได้ช้า และมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหาร เพราะสามารถคงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นระยะเวลานานภายหลังจากการหยุดให้ยาไปแล้ว กระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้เกิดสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญ ได้แก่ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone , AMOZ) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone , AOZ) เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide ,SEM) และ 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin , AHD) (Leitner และ คณะ ,2001) เมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มียาสัตว์ตกค้างในรูปของ bound residues เหล่านี้จะถูกกรดในกระเพาะอาหารย่อยและปลดปล่อยสารตกค้างออกมาจากโปรตีนที่เกาะอยู่ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

(Keefle และ Home ,1999) จากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ถ้าได้รับการบริโภคเป็นระยะเวลาสั้น โดยพบว่า ฟูราโซลิโดน มีผลยับยั้งหน้าที่เอนไซม์บางประเภท โดยข้อมูลจาก Irish Agriculture and Food Development Authority ตามโครงการศึกษา Project Armis No. 4036 ของสหภาพยุโรปในปี 1999 พบว่าเมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีสารเมแทบอลิต์จับกับโปรตีนในเนื้อเยื่อสุกรเข้าไปกรดในกระเพาะจะย่อย AOZ side-chain ออกมาและเปลี่ยนรูปไปเป็น β -hydroxyethylhydrazine ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อมะเร็ง โดยสารดังกล่าวมีการห้ามนำมาใช้ในสัตว์เพื่อการบริโภคและห้ามมีตกค้างไม่ว่าในปริมาณเท่าใดแม้ว่าจะอยู่ในรูปยาตั้งต้น หรือเมแทบอลิต์ ซึ่งส่งผลทำให้หลายๆ ประเทศ จำกัดการใช้ โดยเฉพาะการใช้ผสมในอาหารสัตว์ที่ใช้สำหรับบริโภค สารกลุ่มนี้จึงถูกห้ามใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น สิงคโปร์ บังคลาเทศ และกลุ่มสหภาพยุโรป (Bryan ,1978) ส่งผลทำให้ประเทศต่างๆ ได้ออกกฎหมายควบคุมระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ของสารตกค้างกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ โดยปกติจะกำหนดเป็นขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุด ซึ่งเรียกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) โดยสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีการกำหนดค่า MRL อยู่ในระดับที่เรียกว่า zero tolerance level คือต้องไม่มีการตกค้างของสารกลุ่มนี้อยู่ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (European Commission ,2001) ทำให้หลายประเทศได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์และได้กำหนดค่าขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์สารไนโตรฟูแรน โดยห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถใช้วิธี ELISA ในการตรวจวิเคราะห์ ได้ตามความเหมาะสม และอาจยืนยันผลการตรวจวัดสารดังกล่าวด้วยเทคนิคอื่น เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS-MS) สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุข ได้กำหนดให้เพิกถอนทะเบียนตำรับยาที่ใช้สำหรับสัตว์ที่มีตัวยาในกลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน และฟูราโซลิโดน นอกจากนี้ยังห้ามนำเข้ายา เกล็ดซีเคมีภัณฑ์ และเกลือของเกล็ดซีเคมีภัณฑ์เหล่านี้ และมีข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกำหนดให้สารสารเมแทบอลิต์ (metabolite) ทั้ง 4 ตัวของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนต้องไม่พบในสินค้าเกษตรและอาหารโดยกำหนดให้มีค่า MRPL อยู่ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ SEM และ AHD (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ,2551) แต่อย่างไรก็ตามยังมีการลักลอบนำสารเหล่านี้เข้าภายในประเทศได้ในรูปของอาหารสัตว์ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้าเพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อน แต่การวัดปริมาณยาตกค้างดังกล่าวสามารถทำได้ในขีดจำกัด เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีราคาแพงมาก ดังนั้น ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ โดยใช้หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับตรวจวัดสารตกค้างโดยอาศัยหลักการการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน วิธี ELISA นี้เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็วทั้งนี้ทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย จึงได้สนใจทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOZ เพื่อใช้พัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออกต่อไปได้

1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากได้มีมาตรการควบคุมและติดตามการใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรนนี้ ดังนั้น เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้า โดยพบว่า สารกลุ่มไนโตรฟูแรน ในรูปยาตั้งต้นได้แก่ ฟุรัลทาโดน ฟุราโซลิโดน ไนโตรฟูแรนโทอิน และ ไนโตรฟูราโซน จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ภายใน 2-3 ชั่วโมง เปลี่ยนไปอยู่ในรูปสาร เมแทบอลไลต์ คือ AMOZ ,AOZ ,SEM และ AHD ตามลำดับ ปกติสารเมแทบอลไลต์ ของไนโตรฟูแรน จะอยู่ในรูปสารเมแทบอลไลต์ที่จับกับโปรตีนโดยการทำให้สารเมแทบอลไลต์อยู่ในรูปอิสระโดยอาศัยการย่อยสลายพันธะด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) แต่สาร เมแทบอลไลต์ ที่ได้จะมีขนาดโมเลกุลเล็กมากยากต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงต้องทำให้สาร เมแทบอลไลต์ เหล่านี้อยู่ในรูปอนุพันธ์ุ เรียกกระบวนการนี้ว่า derivatization ซึ่งสารที่นิยมใช้ให้เกิดอนุพันธ์ุ คือ 2-Nitrobenzaldehyde (NBA) โดยการตรวจวิเคราะห์สารเมแทบอลไลต์ ของไนโตรฟูแรน ปัจจุบัน นิยมใช้เทคนิค Liquid chromatography (LC) และ Mass spectrometry (MS) โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS เพื่อยืนยันชนิดของสารและปริมาณ เนื่องจากมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณเล็กน้อย ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะใช้ตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อยสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี colour test ส่วนการตรวจยืนยันผลใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) และวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) (Cieri และ คณะ 1978 ,McCracken และ คณะ 1997) ข้อได้เปรียบของเทคนิค HPLC เมื่อเทียบกับเทคนิค TLC คือ จะใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆได้ดี และให้ค่าความแม่นยำและเที่ยงตรงได้ดีกว่า จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์สารตกค้างที่ได้รับความนิยม แต่เนื่องจากเทคนิคต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและวิธีการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากกว่า ส่วนวิธี Mass Spectrometry (MS), Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) นี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเนื่องจากสามารถตรวจสอบเพื่อยืนยันระบุชื่อสารในระดับน้อยมากๆได้แม่นยำสูง และยังใช้สารตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นวิธีการนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดี แต่เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก และยังต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญการโดยเฉพาะ ดังนั้นเทคนิคจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้ในงานประจำ (McCracken และคณะ ,1995) ปัจจุบันจึงมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออก ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว ดังได้มีการผลิตและศึกษาลักษณะพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่ออนุพันธ์ุของ AOZ ด้วยวิธี ELISA โดยเปลี่ยน AOZ เป็น CPAOZ แล้วนำไปเชื่อมกับโปรตีนพาหะ HAS เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นกระต่ายที่ความเข้มข้นและช่วงเวลาในการกระตุ้นต่างๆ พร้อมทั้งทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยวิธี competitive ELISA พบว่าการลด

ปริมาณแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นและเพิ่มระยะเวลาในการกระตุ้นจะส่งผลให้แอนติบอดีที่ได้มีความไวต่อสาร NPAOZ เพิ่มขึ้น และสามารถนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ตรวจหาสาร AOZ ในรูปอนุพันธ์ได้ (Cooper และคณะ, 2004) หลังจากนั้นได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ ที่เกิดจากการฉีดกระตุ้นสาร CPAOZ และ AOZ ที่ติดกับโปรตีนพาหะด้วยวิธีต่างๆ ผลที่ได้พบว่าไม่สามารถผลิตโมโนโคลนต่อ AOZ ได้ มีเพียงแต่ CPAOZ เท่านั้นที่สามารถผลิตโมโนโคลนต่อ NPAOZ ได้โดยสามารถตรวจหาสาร AOZ ที่ต้องเปลี่ยนไปอยู่ในรูป NPAOZ ได้ค่า IC_{50} (50 percent binding inhibition) อยู่ในช่วง 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง ไข่ วัว และ สุกร ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบวิธีทดสอบแบบ ELISA กับ LC-MS/MS ในเนื้อกึ่งและไข่ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0 - 32.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 0 - 10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Diblikova และ คณะ, 2005)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสาร NPAOZ และ/หรือ AOZ เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบ ตรวจหาปริมาณสารตกค้างในอาหาร

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

หนูขาว (swiss mice) สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์มะเร็งอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NSI)	ATCC No: TIB 18
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
ขวดแก้ว	Boro (Germany)
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
เข็มฉีดยาขนาด 18G, 21G และ 22G	Nipro (Thailand)
หลอดฉีดยาขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
เครื่องชั่งน้ำหนัก AG204	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องชั่งน้ำหนัก PG4002-5	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE (England)
เครื่องมือนับเซลล์	Boeco (Germany)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับเลี้ยงเซลล์	Nunc (Denmark)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA	Nunc (Denmark)
จานชนิด 24 หลุม	Nunc (Denmark)

ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson (France)
ไมโครปิเปต	Biohit (Finland)
บีกิ้งสุญญากาศ	Iwaki (Japan)
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige (Thailand)
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
หม้อน้ำแช่แข็ง	Udono-RII (Japan)
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
1-aminohydantoin (AHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-(2-Nitrobenzylidenamino)-2, 4-imidazolidinedione (NPAHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride (EDC)	Sigma-Aldrich	USA
2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)	Pierce	USA
2-Nitrobenzaldehyde semicarbazone(NPSEM)	Sigma-Aldrich	USA

3-[[[(2-nitrophenyl)methylene] amino]-2-oxazolidinone) (NPAOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-carboxybezaldehyde (CBA)	Sigma-Aldrich	USA
5-(Morpholinomethyl)-3-(2-nitrobenzylidenamino)-2-oxazolidinone (NPAMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
5-morpholinomethyl-3-amino-oxazolidinone (AMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich	USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich	USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	USA
Butanol	Merck	Germany
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	USA
Citric monohydrate	Merck	Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich	USA
Copper sulfate	Fluka	Switzerland
D-glucose	Sigma-Aldrich	USA
Diethyl ether	Sigma-Aldrich	USA
Dimethyl sulfoxide	Fluka	Switzerland

Disodium carbonate	Fluka	Switzerland
Disodium hydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich	USA
Fetal bovine serum	Invitromex	USA
Folin-Ciocalteu Phenol reagent	Sigma-Aldrich	USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich	USA
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich	USA
Glycerol	Sigma-Aldrich	USA
Glycine	Merck	Germany
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	USA
Hydrogen peroxide	Fluka	Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich	USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich	USA
Methanol	BDH	England
N-hydroxysuccimide ester (NHS)	Fluka	Switzerland
Skim milk	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.	India
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich	USA
Ovalbumin (OVA)	Ovalbumin (OVA)	USA
Oxytetracycline	Fluka	Switzerland

Penicillin G	Sigma-Aldrich	USA
Peroxidase Goat anti-mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	USA
Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich	USA
Potassium chloride	Sigma-Aldrich	USA
Potassium dihydrogen phosphate	Sigma-Aldrich	USA
Pyridine	Carlo Erba	USA
Pyruvic acid	Invitromex	USA
RPMI 1640 medium	Invitromex	USA
Salbutamol	Sigma-Aldrich	USA
Semicarbazide (SEM)	Sigma-Aldrich	USA
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich	USA
Sodium carbonate	Merck	Germany
Sodium chloride	Merck	Germany
Sodium dihydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Sodium dodecyl sulphate	Merck	Germany
Sodium hydrogen carbonate	Merck	Germany
Sodium hydroxide	Merck	Germany
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich	USA

Sulfamethazine	Sigma-Aldrich	USA
Sulfuric acid	Merck	Germany
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	USA
Trisodium citrate	Fluka	Switzerland
Tween 20	Sigma-Aldrich	USA

2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับ

เคลือบจาน 96 หลุม (AOZ-OVA และ CPAOZ-OVA)

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AOZ เป็น CPAOZ

โดยนำสาร AOZ มาทำปฏิกิริยากับสาร 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ด้วยวิธีการ reflux ซึ่งมี dry pyridine เป็นตัวกลางช่วยให้เกิดปฏิกิริยา และมี molecular sieve ช่วยดูดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นดึง pyridine ออกจากระบบด้วยแก๊สไนโตรเจน ทดสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยหลักการของเทคนิค ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ดูแถบของสาร CPAOZ ด้วยแสงยูวี และดูแถบของสาร AOZ โดยย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน

2.2.2 การเชื่อมต่อ CPAOZ กับ cBSA และ AOZ กับ BSA

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ของยาไนโตรฟูแรน ฟุราโซลิโดน ในขั้นต้นทำการเตรียมอนุพันธ์ของ AOZ ให้อยู่ในรูปของ CPAOZ ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นแฮปเทน (hapten) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและใช้ในการเคลือบจาน 96 หลุมที่ผลิตจากพลาสติกได้ ต้องมีการเชื่อมแฮปเทนกับสารโมเลกุลใหญ่เช่น โปรตีน จึงทำการเชื่อมต่อ CPAOZ กับโปรตีนพาหะ cBSA (BSA ที่ผ่านปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนหมู่เอมีน ,cationized BSA) และ AOZ กับ BSA โดยใช้ NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำ CPAOZ หรือ AOZ ผสมกับ NHS และ EDC ละลายใน DMF เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA ใน 0.5 โมลาร์ carbonate buffer พีเอช 9.6 ลงไปที่ละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป ไดแอกไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร CPAOZ-ed-cBSA และ AOZ-BSA ด้วยวิธี TNBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

2.2.3 การเชื่อมต่อกับ AOZ และ CPAOZ กับ OVA

ทำการเชื่อมสาร AOZ และ CPAOZ กับ OVA ได้เป็น AOZ-ed-OVA และ CPAOZ-ed-OVA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมและคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ และ CPAOZ โดยนำสาร AOZ และ CPAOZ ละลายใน DMF เติม EDC หลังจากนั้นค่อยๆเติม OVA ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี พีเอช 7.4 กวนเบาๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร AOZ-ed-OVA และ CPAOZ-ed-OVA ด้วยวิธี TNBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA

2.2.4 การหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี BCA

ทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยเจือจางโปรตีน BSA มาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS และเจือจางสารตัวอย่าง จากนั้นเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง

2.2.5 การวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS

ทำการวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอมีนอิสระบนโปรตีนด้วยวิธี TNBS โดยเตรียมสารละลายโปรตีนพาหะ ได้แก่ BSA และ OVA สารละลายของสารที่จะเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ ได้แก่ AOZ และ CPAOZ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (sodium bicarbonate buffer) พีเอช 8.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายโปรตีน และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ จากนั้นเติมสารละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เชื่อมติดกับสาร

เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ ลบ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนที่เชื่อมกับสาร หาดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ คูณ 100

2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร Aoz และ NPAoz

2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 (CPAOZ-cBSA) ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 4-6 ครั้ง ทุกๆ 2 อาทิตย์ โดยผสมแอนติเจน จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดียังอยู่ในระดับต่ำก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีการเดิมทุกๆ 2 อาทิตย์ เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอ ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ด้วยแอนติเจนที่ผสมกับน้ำเกลือเข้าช่องท้องในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนูทดลองหนึ่งตัว ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน ถัดไป

2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจน (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-OVA ,BSA หรือ OVA) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS พีเอช 7.4 ที่มี tween 20 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำอย่าง (ซีรัมหนู หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase เชื่อมติดอยู่ (GAM-HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายสับสเตรตของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) และ H₂O₂ ละลายอยู่ใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer ,พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 1 โมลาร์ H₂SO₄ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำจานทดสอบชนิด 96 หลุม ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี Indirect competitive

ELISA

ทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู หรือในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถจับกับ NPAOZ หรือ

AOZ ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยเติมสารละลาย NPAOZ หรือสารที่ต้องการทดสอบอื่นๆ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานทดสอบ ELISA ที่เคลือบด้วย AOZ-OVA และผ่านการเติมสารละลายนมพว่องมันเนย และล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นเติมซีรัมหนูที่เจือจางแล้ว หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ให้ผลบวก (จากข้อ 2.3.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หรือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติมสารทดสอบในรูปอิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าหลุมที่ไม่เติมสาร แสดงว่า แอนติบอดีในซีรัมหนู หรืออาหารเลี้ยงเซลล์สามารถจับกับสารในรูปอิสระได้

2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร AOZ และ NPAOZ

2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)

โดยนำเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน CPAOZ-cBSA หรือ AOZ-BSA เพื่อสร้างแอนติบอดีที่ต้องการผสมกับเซลล์มัยอีโลมา ในอัตราส่วน 1:2 โดยที่เซลล์ทั้งสองจะถูกนำมาเลี้ยงให้อยู่ในระยะที่กำลังจะแบ่งตัว มารวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ หยด 50 เปอร์เซ็นต์ พอลิเอทิลีนไกลคอล (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับหมุนหลอดซ้ำๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FCS เพื่อล้าง 50 เปอร์เซ็นต์ PEG ออกให้หมด ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก โดยการเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ก่อนนำเซลล์ไปหยอดในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂

2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ทุก 3-4 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 6-7 วัน สังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสงขึ้นเป็นกลุ่ม เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มหลุมแล้วจะต้องเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะให้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS โดยจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ถ้ามีสีเหลืองให้ดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า

ทิ้งแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2)

2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี indirect ELISA

เพื่อตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ จึงทำการเคลือบ จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน 4 ชนิด คือ CPAOZ-OVA , AOZ-OVA , OVA และ BSA เพื่อเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2) ถ้าเซลล์ในหลุมใดมีค่าดูดกลืนแสงของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย OVA และ BSA ต่ำ ก็จะเลือกเซลล์ในหลุมนั้นไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม และทำการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วให้ค่าเหมือนเดิม และทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับสาร NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA ตามหัวข้อ 2.3.3 เลือกหลุมที่แอนติบอดีจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากนั้นจึงทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวต่อไป

2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution

หลังจากที่คัดเลือกจนได้เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่ต้องการแล้วเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่ละเซลล์มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยว ซึ่งวิธี limiting dilution ทำได้โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า จนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปหยอดลงในจานชนิด 96 หลุมจำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม) จะได้เซลล์ไฮบริโดมาปริมาณ 8 , 4 , 2 และ 1 เซลล์ ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเริ่มต้นเซลล์เพียงเซลล์เดี่ยว

2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

2.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จะทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยนำ Isotyping specific antibody ชนิด IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA และ IgM มาทำการเจือจาง 1,000 เท่า ใน PBS นำไปเติมในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (พีเอช 7.4) ที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างส่วนที่ไม่จับออก เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมติดกับ HRP ซึ่งจำเพาะต่อ F_{ab} (HRP-Rabbit anti-mouse IgG [F_{ab} specific]) เจือจาง 2,000 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายสับสเตรทของเอนไซม์ บ่ม อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แอนติบอดีเป็นชนิดใดจะให้ค่าผลบวกตามชนิดของแอนติบอดี ที่เคลือบหลุมไว้

2.5.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นมาก และไม่ทราบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่แน่นอน ดังนั้น เมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA อาจทำให้มีสัญญาณรบกวน ส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จได้ และยังเป็นกรสลับเปลี่ยนแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย จึงต้องหาความเข้มข้นและความเจือจางที่เหมาะสมทั้งของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใกล้เคียงกันกับสูงสุดเมื่อ เจือจางสูงสุด หรือประมาณ 1.0 – 1.5 เพื่อนำความเข้มข้นและความเจือจางที่ได้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป โดยจะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติเจน AOZ-OVA ความเข้มข้นต่างๆ และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2)

2.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเมแทบอลิต์ AOZ ,NPAOZ หรือ ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนเพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะและความไวต่อสาร AOZ ,NPAOZ ปริมาณเท่าใด และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือไม่ จึง ทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.3) ถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสารทดสอบ ก็

จะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ โดยจะคิดเป็นค่า inhibition concentration (IC_{50}) และ limit of detection (LOD) ซึ่งค่า IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสารแข่งขัน และค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOZ และ NPAOZ มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกววนขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกววนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A หรือ protein G affinity chromatography

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOZ และ NPAOZ โดยจะใช้ protein A หรือ protein G sepharose ขึ้นอยู่กับไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่ได้ โดยนำไปโปรตีน A หรือ G sepharose แช่ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่คอลัมน์ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้เติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 โมลาร์ citrate buffer, พีเอช 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ พีเอช สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 7.4 โดยใช้ 1 โมลาร์ Tris buffer ,พีเอช 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer ,พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดเอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

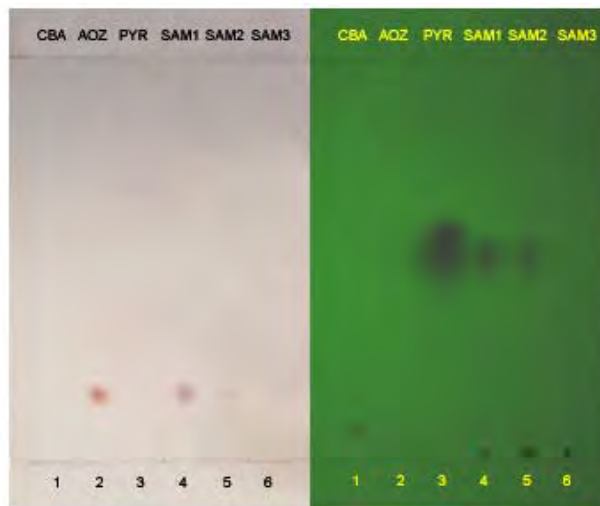
หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้ทำการทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความสามารถในการจับกับ AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม AOZ ที่เชื่อมต่อกับ OVA หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลาย BSA 1 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม AOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HRP-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer ,พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์ H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3. ผลการวิจัย (Results)

3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับ

เคลือบจาน 96 หลุม (CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA)

สาร AOZ เป็นสารเมแทบอลไลต์ของฟูราโซลิโดน ซึ่งเป็นยาในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็น แฮปเทน (Hapten) ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองได้ และไม่สามารถเคลือบติดบนจาน 96 หลุม ได้ ดังนั้นจึงต้องเชื่อมต่อกับสาร AOZ กับโปรตีนขนาดใหญ่ ได้แก่ BSA และ OVA เพื่อนำไปฉีดกระตุ้นหนู และเคลือบจาน 96 หลุม สำหรับทดสอบแอนติบอดีโดยวิธี ELISA เพื่อให้ AOZ สามารถจับกับโปรตีนได้ดีขึ้นจึงทำการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร AOZ ให้เป็นสาร CPAOZ ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสาร NPAOZ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร AOZ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ผลการเปลี่ยน AOZ ให้เป็นอนุพันธ์ CPAOZ จากการวิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) แสดงดังรูปที่ 1 และนำมาคำนวณค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ได้ค่าดังตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้จากของ Copper และคณะ (2004)



ก)

ข)

รูปที่ 1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ

ก) ย้อมด้วยสารนินไฮดริน ข) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยที่ช่องที่ 1 คือ 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ,2 คือ AOZ ,3 คือไพริดีน (pyridine) ,4 คือ ตัวอย่างก่อนทำรีฟลัค ,5 คือ ตัวอย่างหลังทำรีฟลัค และ 6 คือ ตัวอย่างทำรีฟลัคและให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน

ตารางที่ 1 ค่า R_f ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ

สาร	ค่า R_f			
	การทดลองนี้		Copper และคณะ (2004)	
	ย้อมด้วยนินไฮดริน	ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต	ย้อมด้วยนินไฮดริน	ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต
CBA	-	0.08	-	0.11
AOZ	0.18	-	0.27	-
CPAOZ	-	-	-	0.03
ไพริดีน	-	0.55	-	-
ตัวอย่างก่อนทำการไหลกลับด้วยไพริดีน	-	0.03	-	-
	-	0.09		
	0.18	-		
	-	0.53		
ตัวอย่างหลังทำการไหลกลับด้วยไพริดีน	-	0.03	-	-
	0.18	-		
	-	0.53		
ตัวอย่างหลังทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน	-	0.03	-	-
	0.18	-		

จากการคำนวณค่า R_f ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังจากการทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.03 และ 0.18 เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้ดังกล่าวกับค่า R_f ของสารต่างๆในปฏิกิริยาสรุปได้ว่า น่าจะเป็นสาร CPAOZ และ AOZ

ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า R_f ของสาร CPAOZ ในการทดลองนี้กับของ Cooper และคณะ (2004) พบว่าให้ค่าเท่ากัน แสดงว่าสามารถทำการเตรียมสาร CPAOZ ได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม ยังสามารถตรวจพบ AOZ ในปริมาณน้อยได้ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์นั้นได้ใช้สาร AOZ ปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยากับสาร CBA ทำให้พบสาร AOZ เหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยา

เมื่อทำการเชื่อมต่อน้ำสาร CPAOZ และ AOZ กับโปรตีนพวหะ ได้แก่ BSA ,cBSA และ OVA และนำไปตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA พบว่าสาร CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 2.14 ,9.70 ,8.40 และ 8.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากนั้นนำสารที่เตรียมได้มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนโดยวิธี TNBS โดยมีหลักการคือ สาร TNBS จะไปจับกับหมู่เอมีนอิสระแล้วเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีส้ม สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารจาก เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพวหะ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพวหะ ลบ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนที่เชื่อมกับสาร หาดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพวหะ คูณ 100

ผลการทดสอบพบว่า โปรตีน BSA ,OVA ,CPAOZ-cBSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-BSA และ AOZ-OVA ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร เท่ากับ 0.878 ,0.585 ,0.824 ,0.530 ,0.825 และ 0.532 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่างสารและโปรตีนพวหะ ได้แก่ CPAOZ-cBSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-BSA และ AOZ-OVA เท่ากับ 11.29 ,9.40 ,6.04 และ 9.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่างสารกับโปรตีน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 1,000 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร

สารโปรตีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติด
BSA	0.878	-
cBSA	0.917	-
OVA	0.585	-
CPAOZ-cBSA	0.824	11.29
CPAOZ-OVA	0.530	9.40
AOZ-BSA	0.825	6.04
AOZ-OVA	0.532	9.06

3.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ หรือ AOZ

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยแบ่งหนูเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ฉีดกระตุ้นด้วยสาร CPAOZ-cBSA ชุดที่ 2 กระตุ้นด้วยสาร AOZ-BSA ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก ทุกๆ 2 อาทิตย์ จำนวน 4-6 ครั้ง โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FICA) จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบดูระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมของหนู ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า เมื่อทำการทดสอบปริมาณแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA เปรียบเทียบกับ CPAOZ-cBSA ทำการเจาะซีรัมหนูด้วย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) (เพื่อให้ BSA จับกับแอนติบอดีต่อ BSA ในซีรัม) เจาะจางที่การเจาะจาง 1:500 ถึง 1:1,024,000 เท่า ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู พบว่า ซีรัมหนูชุดที่ 1 ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA ทำปฏิกิริยาได้ดีกับ AOZ-BSA และ CPAOZ-cBSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดประมาณ 1.7 และให้ค่าไคเตอร์ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 ในระดับสูงคือ 1:1,024,000 และ 1:128,000 ตามลำดับ ส่วนซีรัมหนูชุดที่ 2 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AOZ-BSA ทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจน AOZ-BSA ได้ดีกว่า CPAOZ-cBSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดประมาณ 1.7 และ 1.3 ตามลำดับ และให้ค่าไคเตอร์ สูงกว่า 1:1,024,000 และ 1:4,000 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดี

ในซีรัมหนูโดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 1 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA และ หนูชุดที่ 2 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA

เชื้อจาก ซีรัมหนู (X 10 ³ เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	เคลือบหลุมทดสอบด้วย CPAOZ-cBSA						เคลือบหลุมทดสอบด้วย AOZ-BSA					
	หนูชุดที่ 1			หนูชุดที่ 2			หนูชุดที่ 1			หนูชุดที่ 2		
	กระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA			กระตุ้นด้วย AOZ-BSA			กระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA			กระตุ้นด้วย AOZ-BSA		
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3
0.5	1.77	1.78	1.75	1.10	1.59	1.28	1.75	1.75	1.74	1.78	1.79	1.75
1	1.72	1.75	1.74	0.73	1.19	0.86	1.73	1.72	1.73	1.75	1.75	1.74
2	1.77	1.79	1.78	0.48	0.74	0.53	1.76	1.73	1.77	1.79	1.79	1.78
4	1.78	1.79	1.78	0.31	0.50	0.32	1.75	1.62	1.76	1.80	1.79	1.77
8	1.79	1.82	1.80	0.25	0.42	0.26	1.66	1.40	1.71	1.85	1.85	1.81
16	1.76	1.78	1.77	0.20	0.31	0.22	1.40	1.05	1.47	1.83	1.82	1.78
32	1.70	1.73	1.64	0.16	0.23	0.18	0.92	0.70	1.17	1.76	1.77	1.78
64	1.49	1.64	1.33	0.11	0.14	0.17	0.55	0.41	0.79	1.74	1.74	1.75
128	1.14	1.32	0.94	0.08	0.10	0.15	0.34	0.22	0.48	1.79	1.77	1.76
256	0.81	0.99	0.65	0.08	0.08	0.16	0.21	0.12	0.28	1.79	1.77	1.76
512	0.53	0.62	0.42	0.09	0.09	0.14	0.16	0.11	0.20	1.82	1.78	1.81
1,024	0.33	0.40	0.31	0.11	0.12	0.14	0.12	0.11	0.16	1.79	1.66	1.73

ทำการฉีดกระตุ้นหนูชุดที่ 3 จำนวน 3 ตัว ด้วย CPAOZ-cBSA หลังจากฉีดกระตุ้นจำนวน 4 ครั้ง ทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมที่ทดสอบด้วย AOZ-OVA ,BSA และ OVA เมื่อเจือจางซีรัมหนูด้วย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:256,000 ได้ผลดังตารางที่ 4 หนูทั้ง 3 ตัว ผลิตแอนติบอดีในระดับสูง ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงประมาณ 1.8 และหนูตัวที่ 1 ,2 และ 3 มีค่าไตเตอร์ 1:64,000 ,สูงกว่า 1:256,000 และ 1:128,000 ตามลำดับ แอนติบอดีในซีรัมหนูไม่จับกับหลุมที่เคลือบด้วย BSA และ OVA

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู

โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

เจือจาง ซีรัมหนู (X 10 ³ เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	เคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA				เคลือบหลุมด้วย BSA				เคลือบหลุมด้วย OVA			
	1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร				1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร				1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	NMS	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	NMS	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	NMS
0.5	1.71	1.82	1.82	0.15	0.28	0.34	0.63	0.16	0.23	0.28	0.42	0.18
1	1.60	1.81	1.80	0.13	0.19	0.22	0.41	0.12	0.15	0.19	0.27	0.18
2	1.41	1.75	1.69	0.11	0.15	0.16	0.26	0.10	0.13	0.14	0.20	0.15
4	1.15	1.76	1.60	0.09	0.11	0.12	0.17	0.09	0.11	0.10	0.15	0.14
8	0.84	1.69	1.34	0.09	0.13	0.12	0.15	0.11	0.11	0.09	0.10	0.12
16	0.58	1.61	1.04	0.09	0.15	0.10	0.13	0.12	0.10	0.08	0.09	0.13
32	0.37	1.44	0.68	0.08	0.14	0.08	0.10	0.10	0.10	0.08	0.10	0.14
64	0.25	1.16	0.44	0.08	0.13	0.09	0.10	0.09	0.12	0.07	0.10	0.15
128	0.17	0.86	0.26	0.08	0.15	0.09	0.08	0.11	0.09	0.08	0.08	0.13
256	0.14	0.57	0.17	0.09	0.18	0.10	0.11	0.12	0.10	0.07	0.09	0.12
1%BSA	0.13	0.11	0.12	0.17	0.26	0.19	0.17	0.19	0.15	0.12	0.12	0.17
PBS	0.08	0.07	0.07	0.08	0.10	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09

NMS = ซีรัมหนูปกติ

จากนั้น นำแอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 3 ไปทดสอบการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA เจือจางแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยหนูตัวที่ 1 ,2 และ 3 เจือจางที่ 1:4,000 ,1:64,000 และ 1:16,000 ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ ที่ความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ดังตารางที่ 5 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา IC_{50} พบว่า แอนติบอดีในเลือดหนูทั้ง 3 ตัว มีความสามารถจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ดี โดยมีค่า IC_{50} ดังต่อไปนี้ หนูตัวที่ 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.78 และ 6.25 หนูตัวที่ 2 มีค่า IC_{50} 0.012 และ 0.049 หนูตัวที่ 3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.586 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีเพียงหนูตัวที่ 2 เท่านั้นที่แอนติบอดีในซีรัมสามารถจับกับ AOZ ในรูปอิสระได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี

indirect competitive ELISA เคลือบหลอดทดสอบด้วย AOZ-BSA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย

CPAOZ-cBSA

ความเข้มข้น ของสาร (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร								
	ซีรัมหนูตัวที่ 1			ซีรัมหนูตัวที่ 2			ซีรัมหนูตัวที่ 3		
	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	AOZ	CPAOZ	NPAOZ
0	1.45	1.49	1.41	1.43	1.43	1.41	1.62	1.61	1.54
0.003	1.44	1.46	1.44	1.39	1.06	1.29	1.59	1.57	1.57
0.006	1.41	1.41	1.43	1.35	0.91	1.31	1.57	1.58	1.56
0.012	1.44	1.40	1.41	1.38	0.76	1.18	1.61	1.52	1.51
0.024	1.41	1.33	1.38	1.28	0.62	0.87	1.55	1.45	1.48
0.049	1.40	1.26	1.34	1.30	0.46	0.77	1.52	1.38	1.42
0.098	1.38	1.17	1.28	1.28	0.37	0.59	1.55	1.24	1.32
0.196	1.37	1.05	1.21	1.31	0.31	0.53	1.51	1.03	1.10
0.391	1.42	0.91	1.27	1.39	0.21	0.78	1.61	0.95	1.25
0.781	1.44	0.69	1.13	1.32	0.14	0.51	1.58	0.67	1.18
1.563	1.29	0.51	1.01	1.22	0.11	0.36	1.56	0.50	1.07
3.125	1.32	0.36	0.87	1.09	0.09	0.24	1.56	0.37	0.88
6.25	1.39	0.26	0.70	0.94	0.09	0.17	1.53	0.30	0.71
12.5	1.37	0.20	0.52	0.82	0.07	0.12	1.52	0.28	0.55
25	1.39	0.18	0.37	0.73	0.09	0.10	1.49	0.27	0.44
50	1.44	0.18	0.28	0.69	0.11	0.11	1.55	0.23	0.36

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC₅₀ ของการจับกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

หนูตัวที่	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	สาร AOZ	สาร CPAOZ	สาร NPAOZ
1	> 50	0.781	6.250
2	25	0.024	0.049
3	> 50	0.586	6.250

ทำการฉีดกระตุ้นหนูชุดที่ 4 จำนวน 3 ตัว ด้วย AOZ-BSA หลังจากกระตุ้น 4 ครั้ง ทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดยใช้วิธี indirect ELISA แอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบหลุมได้แก่ AOZ-BSA ,AOZ-OVA ,CPAOZ-OVA ,BSA และ OVA ได้ผลดังตารางที่ 7 เมื่อเจือจางซีรัมหนูทั้ง 3 ตัว ด้วย สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:256,000 พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้ ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติเจน AOZ-BSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดประมาณ 2.7 และค่าไตเตอร์ เท่ากับ 1:256,000 จากนั้นนำซีรัมหนูไปทดสอบความสามารถในการจับกับสารในรูปอิสระ

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดย

วิธี indirect ELISA เคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA ,AOZ-OVA ,CPAOZ-OVA ,BSA และ OVA ของหนูชุดที่ 4

ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

เจือจาง ซีรัมหนู (X10 ³ เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร																			
	AOZ-BSA				AOZ-OVA				CPAOZ-OVA				BSA				OVA			
	1	2	3	NM	1	2	3	NM	1	2	3	NM	1	2	3	NM	1	2	3	NM
0.5	2.9	2.7	2.7	0.2	0.4	0.4	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5	0.2	1.0	1.6	1.5	0.1	0.3	0.3	0.5	0.2
1	2.6	2.7	2.4	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4	0.4	0.3	0.1	0.7	1.1	1.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1
2	2.5	2.7	2.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.4	0.8	0.7	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
4	2.3	2.5	2.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
8	2.1	2.5	1.9	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
16	1.6	2.3	1.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
32	1.3	2.1	0.9	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
64	0.8	1.6	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
128	0.6	1.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
256	0.3	0.7	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

เมื่อทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 4 ที่การเจือจาง 1:16,000 กับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ความเข้มข้นของสาร 0 – 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้ไม่จับกับสารทั้ง 4 ตัว ในรูปอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 8 ที่ความเข้มข้นของสาร สูงสุด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้นของสาร เท่ากับ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC₅₀ สูงกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แอนติบอดีในซีรัมหนูชุดที่ 4 ไม่จับกับ FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัม

หนูชุดที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA กับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยใช้วิธี

indirect competitive ELISA

ความเข้มข้น ของสาร (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	หนูตัวที่ 1				หนูตัวที่ 2				หนูตัวที่ 3			
	FZD	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	FZD	AOZ	CPAOZ	NPAOZ	FZD	AOZ	CPAOZ	NPAOZ
0	0.88	0.91	0.88	0.91	1.75	1.75	1.75	1.75	0.58	0.59	0.52	0.55
0.00001	0.90	0.89	0.83	0.87	1.84	1.79	1.84	1.85	0.61	0.60	0.61	0.59
0.0001	0.99	0.95	0.93	0.90	1.77	1.82	1.82	1.79	0.62	0.63	0.59	0.58
0.001	0.94	0.89	0.87	0.90	1.79	1.82	1.80	1.81	0.63	0.60	0.60	0.59
0.01	0.85	0.84	0.85	0.82	1.74	1.78	1.74	1.76	0.57	0.57	0.56	0.56
0.1	0.86	0.84	0.82	0.81	1.81	1.79	1.80	1.81	0.60	0.60	0.58	0.60
1	0.90	0.92	0.92	0.87	1.81	1.74	1.77	1.42	0.60	0.61	0.59	0.60
10	0.88	0.97	0.99	0.98	1.80	1.79	1.86	1.88	0.65	0.60	0.61	0.60

เมื่อทำการฉีดกระตุ้นหนูชุดที่ 5 จำนวน 2 ตัวด้วยแอนติเจน CPAOZ-cBSA และทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู ด้วยวิธี Indirect ELISA แอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบหลุม ได้แก่ CPAOZ-BSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-OVA ,BSA และ OVA โดยเจือจางซีรัมหนูด้วย สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่การเจือจาง 1:500 ถึง 1:256,000 พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูทั้ง 2 ตัว ไม่ทำปฏิกิริยากับ BSA แอนติบอดีในซีรัมหนูตัวที่ 1 และ 2 ทำปฏิกิริยากับ CPAOZ –cBSA ,CPAOZ-OVA ที่ระดับไตเตอร์สูงกว่า 1:1,024,000 ทำปฏิกิริยากับ AOZ-BSA ระดับไตเตอร์ 1:16,000 และ 1:2,000 ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา AOZ-OVA ที่ระดับไตเตอร์ 1:512,000 และ 1:1,024,000 ตามลำดับ และซีรัมของหนูทั้ง 2 ตัว ทำปฏิกิริยากับ OVA ที่ระดับไตเตอร์ 1:256,000 แสดงว่าแอนติบอดีในซีรัมบางส่วนทำปฏิกิริยากับ OVA ได้

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 5

ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

เจือจาง ซีรัมหนู (X 10 ³ เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร																	
	CPAOZ-cBSA			AOZ-BSA			CPAOZ-OVA			AOZ-OVA			BSA			OVA		
	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS	1	2	NMS
0.5	2.86	2.85	0.15	1.90	0.69	0.13	2.85	3.20	0.17	2.76	2.84	0.16	0.25	0.30	0.12	2.80	3.10	0.15
1	2.99	2.78	0.12	1.61	0.52	0.09	2.94	3.14	0.14	2.80	2.98	0.14	0.17	0.19	0.10	2.82	3.05	0.11
2	2.94	2.85	0.09	1.13	0.33	0.08	2.86	3.00	0.11	2.66	2.75	0.12	0.13	0.13	0.09	2.63	2.75	0.09
4	3.00	2.75	0.08	0.63	0.24	0.08	2.92	2.90	0.09	2.63	2.66	0.10	0.10	0.10	0.08	2.66	2.56	0.08
8	2.93	2.70	0.09	0.40	0.15	0.09	2.93	2.70	0.09	2.38	2.56	0.13	0.15	0.08	0.10	2.20	2.16	0.10
16	2.90	2.80	0.08	0.29	0.11	0.07	2.81	2.80	0.10	2.09	2.42	0.12	0.10	0.08	0.10	1.76	1.67	0.08
32	2.88	2.62	0.08	0.19	0.09	0.07	2.74	2.70	0.09	1.68	2.14	0.12	0.07	0.07	0.08	1.20	1.07	0.08
64	2.74	2.82	0.07	0.12	0.08	0.07	2.55	2.65	0.11	1.18	1.87	0.15	0.07	0.07	0.08	0.75	0.68	0.08
128	2.55	2.55	0.08	0.09	0.08	0.06	2.35	2.57	0.11	0.83	1.28	0.11	0.07	0.09	0.08	0.46	0.40	0.08
256	2.42	2.43	0.09	0.08	0.08	0.06	2.04	2.35	0.10	0.60	0.90	0.16	0.07	0.08	0.08	0.29	0.25	0.07
512	2.00	2.23	0.08	0.09	0.06	0.06	1.53	2.00	0.11	0.35	0.57	0.12	0.07	0.07	0.08	0.18	0.17	0.07
1,024	1.46	1.88	0.07	0.09	0.06	0.06	1.00	1.56	0.08	0.21	0.38	0.09	0.07	0.07	0.08	0.13	0.12	0.07

3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากทดสอบการผลิตแอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นแล้ว พบว่า มีปริมาณแอนติบอดีในระดับสูง จึงทำการหลอมรวม B-cell จากม้ามหนูกับ Myeloma cell และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีนั้น ผลการทดลอง พบว่า หนูชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ในการหลอมรวมเซลล์ไม่สามารถได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการได้

การหลอมรวมเซลล์ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA นั้น ผลการหลอมรวมเซลล์ได้เซลล์ไฮบริโดมา มากกว่า 90% เมื่อทำการคัดเลือกเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA พบว่าทุกหลุมให้ผลบวก ซึ่งยากต่อการคัดเลือกแอนติบอดีที่ต้องการ แต่เมื่อเคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA ได้เซลล์ที่ให้ผลบวก 88 หลุม จากทั้งหมด 768 หลุม คิดเป็น 11.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำทั้ง 88 หลุมไปทดสอบกับสาร AOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า เซลล์ที่ยังคงผลิตแอนติบอดีและจับกับสาร CPAOZ ในรูปอิสระได้ มีจำนวน 53 หลุม และมีเพียง 9 หลุม ซึ่งจับกับสาร AOZ ได้บางส่วน ได้แก่ เซลล์หลุม 1/6C ,2/8A ,2/5E ,4/4B ,4/9C ,8/6E ,4/9A ,4/2E และ 7/11H ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต

แอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร CPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect

competitive ELISA

กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	PBS	AOZ	CPAOZ		PBS	AOZ	CPAOZ		PBS	AOZ	CPAOZ
1/1A	1.14	1.08	0.41	1/1C	1.88	1.87	0.22	1/2B	0.90	0.83	0.08
1/5A	1.44	1.45	0.08	1/5C	1.85	1.84	0.16	1/5G	1.72	1.75	0.11
1/6C	0.70	0.47	0.07	1/8D	0.85	0.66	0.07	2/5E	1.29	0.75	0.06
2/7G	1.26	1.23	0.07	2/8A	1.61	1.18	0.07	2/10A	1.69	1.60	0.19
2/11G	0.83	0.72	0.08	2/2G	1.77	1.77	0.88	2/12H	0.76	0.61	0.08
3/1F	1.79	1.70	0.18	3/2F	0.81	0.69	0.07	3/4E	1.29	1.12	0.07
3/6A	1.87	1.79	0.09	3/6C	1.20	1.05	0.06	3/9B	1.30	1.26	0.09
3/9H	0.88	0.65	0.42	3/10D	1.74	1.58	0.07	3/11C	1.82	1.79	0.19
4/1G	0.89	0.68	0.08	4/1H	1.67	1.62	0.08	4/2E	1.50	1.17	0.07
4/4B	1.48	0.86	0.06	4/5E	1.31	1.21	0.07	4/5G	1.19	1.04	0.08
4/6D	1.95	1.89	0.78	4/7C	1.98	1.94	0.07	4/8E	1.65	1.65	0.08
4/9C	0.72	0.35	0.07	4/9A	1.01	0.80	0.06	4/10F	0.60	0.47	0.25
4/12B	1.96	1.94	0.15	6/1A	1.26	1.30	0.08	6/1C	1.80	1.68	0.10
6/5H	1.92	1.96	0.76	6/6H	1.14	1.09	0.12	6/8D	0.73	0.80	0.59
6/10B	1.74	1.66	0.09	7/4E	1.70	1.53	0.12	7/6H	1.88	1.80	0.53
7/7B	1.21	1.30	0.08	7/7D	0.92	0.85	0.08	7/7H	0.97	0.79	0.08
7/11A	1.38	1.19	0.11	7/11H	0.71	0.22	0.07	8/2F	1.77	1.70	0.12
8/6E	1.03	0.57	0.06	8/8H	1.88	1.80	0.40				

จากนั้นนำหลุมที่ให้ผลบวกและจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ มาทำ subclone ซ้ำ โดยวิธี Limiting dilution ซ้ำ ครั้งที่ 2 เหลือหลุมที่ยังคงให้ผลบวกและจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ จำนวน 20 หลุม ได้แก่ 1/1A ,1/1C ,1/2B ,2/8A ,2/10A ,2/12G ,3/6A ,3/9B ,4/1H ,4/8E ,4/12B ,6/11A ,6/5H ,7/4E ,7/6H ,7/7B ,7/7D ,7/11A ,8/2F และ 8/8H และเมื่อทำ subclone ครั้งที่ 3 เหลือหลุมที่ยังคงให้ผลบวกและจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระอยู่ 7 หลุม ได้แก่ 1/2B ,1/1C ,2/2G ,4/1H ,6/1A ,7/6H และ 8/8H เซลล์แต่ละหลุมคัดเลือกหลุมที่คาดว่าจะมาจากต้นกำเนิดเซลล์เดียวกัน 5 – 10 โคลน ได้เซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด 52 โคลน ทดสอบแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 52 โคลน กับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISAพบว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ทุกโคลนจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ แต่ไม่จับกับ AOZ และบางโคลนจับกับ NPAOZ บางส่วน จึงทำการเลือกเก็บโคลนที่จับกับ NPAOZ และ CPAOZ จำนวน 22 โคลน (จากหลุมต้น 7 หลุม ได้แก่ 1/2B , 1/1C ,2/2G ,4/1H ,6/1A ,7/6H และ 8/8H) ดังแสดงในตารางที่ 11 ทำการเก็บแช่แข็งเซลล์ที่ได้ในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่นำไปทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และกลุ่มยาปฏิชีวนะอื่นต่อไป

ตารางที่ 11 การทดสอบแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดย

วิธี indirect competitive ELISA

โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			
	PBS	AOZ	CPAOZ	NPAOZ		PBS	AOZ	CPAOZ	NPAOZ
1/2B/7A/12B/4H	1.58	1.52	0.25	0.72	4/1H/4D/12C/10H	1.83	1.82	0.21	0.90
1/2B/7A/12B/5F	1.63	1.60	0.31	1.04	4/1H/4D/9E/2H	0.81	0.89	0.14	0.19
1/2B/7A/9D/11G	1.54	1.75	0.31	0.88	6/1A/5F/10A/6H	0.84	0.76	0.08	0.15
1/2B/7A/9D/12B	1.58	1.54	0.24	0.87	7/6H/3H/9B/1D	1.70	1.65	0.39	1.28
1/1C/4A/5C/5C	1.84	1.84	0.23	0.86	7/6H/3H/9C/12B	1.18	1.56	0.36	1.03
1/1C/4A/5C/3C	1.87	1.87	0.23	1.41	8/8H/9E/10G/4E	1.72	1.54	0.27	1.01
2/2G/4D/2D ₁ /2F	1.73	1.69	0.35	1.62	8/8H/9E/10G/5A	1.72	1.69	0.34	1.23
2/2G/4D/2D ₁ /6E	1.89	1.87	0.36	1.72	8/8H/9E/11B/8A	1.67	1.50	0.26	0.99
2/2G/4D/3G ₁ /7G	1.84	1.84	0.33	1.77	8/8H/9E/11B/9E	1.66	1.39	0.22	0.84
2/2G/4D/3G ₁ /11B	1.93	1.92	0.40	1.76	8/8H/9E/11B/11B	1.62	1.50	0.21	0.82
4/1H/4D/12C/10C	1.86	1.83	0.30	1.04	8/8H/9E/11B/12C	1.70	1.57	0.23	1.10

สำหรับการหลอมรวมเซลล์ของหนูชุดที่ 4 จำนวน 3 ตัว ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA หลังการหลอมรวมเซลล์ และเลี้ยงเซลล์ไว้ประมาณ 10 – 14 วัน มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้น 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูไม่ทำปฏิกิริยากับหลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA ดังนั้นจึงทำการทดสอบแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี indirect ELISA โดยการเคลือบหลุมด้วย AOZ-BSA เปรียบเทียบกับ CPAOZ-BSA พบว่า หลุมที่เคลือบด้วย AOZ-BSA ให้หลุมที่เป็นผลบวก 59 หลุม ส่วนหลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-BSA ให้ผลบวก 3 หลุม และหลุมที่ให้ผลบวกทั้ง AOZ-BSA และ CPAOZ-BSA จำนวน 33 หลุม แต่เมื่อทำการย้ายเซลล์ที่ให้ผลบวกลงในจาน 48 หลุม และเมื่อเซลล์มีจำนวนมากพอ นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบแอนติบอดี พบว่า เซลล์ที่ยังคงให้ผลบวกเหลือเพียง 30 หลุม และนำไปทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ในการจับกับ FZD ,AOZ ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระ พบว่าไม่มีแอนติบอดีตัวใดจับกับสารเหล่านี้ได้เลย

เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์ของหนูชุดที่ 5 จำนวน 2 ตัว ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วยภูมิคุ้มกันด้วย CPAOZ-cBSA มีเซลล์ไฮบริโดมาขึ้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA หลุมที่ให้ผลบวกมีจำนวน 146 หลุม จากนั้น ย้ายเซลล์ไฮบริโดมาลงในจาน 48 หลุม หลังจากเลี้ยงไว้ 2 – 3 วัน เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามีจำนวน 22 หลุม ที่แอนติบอดีสามารถจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ และจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จำนวน 18 หลุม ดังแสดงในตารางที่ 12 จากนั้น ทำการ subclone โดยวิธี limiting dilution เพื่อให้ได้โคลนเดี่ยว ในแต่ละครั้งจะทำการคัดเลือกโคลนที่จับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยนำโคลนที่ยังคงผลิตแอนติบอดีให้ผลบวกจากการทดสอบ indirect ELISA และทดสอบความสามารถในการจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA หลังจาก subclone 3 ครั้ง เลือกเก็บโคลนที่ยังคงให้ผลบวกไว้จำนวน 221 โคลน (ดังแสดงในภาคผนวก) จากเซลล์หลุมต้น 9 หลุม ได้แก่ 2/9A ,2/11E ,4/10G ,4/11H ,6/1D ,6/6E ,6/12E ,7/10F และ 8/12D ทำการเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ทดสอบคุณสมบัติต่อไป

ตารางที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการทดสอบความสามารถของแอนติบอดี

ในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			กลุ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	PBS	CPAOZ	NPAOZ		PBS	CPAOZ	NPAOZ
6/1D	1.94	0.28	1.17	4/3F	1.84	0.08	0.13
6/5E	1.92	0.10	0.28	5/5E	0.86	0.07	0.08
6/12B	1.30	0.23	0.36	2/11E	1.18	0.09	0.34
6/12E	1.92	0.24	1.45	4/4H	1.32	0.07	0.08
8/4C	2.11	0.11	0.14	7/10F	1.39	0.12	0.56
2/9A	0.99	0.09	0.11	4/10G	1.37	0.43	1.30
2/12C	1.81	0.15	0.28	5/5F	2.48	0.21	2.16
3/12A	2.42	0.11	0.11	8/12D	2.23	0.10	0.34
4/1H	2.55	0.11	0.11	4/11H	1.37	0.10	0.12
5/9F	1.34	0.08	0.08	6/6E	2.08	0.30	0.65
8/2D	1.76	0.12	0.96	8/10H	1.02	0.12	0.13

3.4 การศึกษาลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากได้ทำการเลือกเก็บโคลนไว้เป็นจำนวนมาก จากหนูชุดที่ 3 จำนวน 22 โคลน จาก 7 หลุมต้น และ หนูชุดที่ 5 จำนวน 221 โคลน จาก 9 หลุมต้น จึงทำการคัดเลือกโคลน โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้จากการเก็บแช่แข็งเซลล์ มาทดสอบแอนติบอดี เลือกโคลนที่ยังคงมีการผลิตแอนติบอดี และเลือกบางโคลนในแต่ละหลุมต้น เพราะโคลนที่มาจากหลุมต้นเดียวกันมีโอกาสที่จะมีคุณสมบัติเหมือนกันสูง โดยมีโคลนที่เลือกมาดังนี้ คือ หนูชุดที่ 3 เลือกโคลนจากหลุมต้น 1/2B ,2/2G ,4/1H และ 7/6H หมายเลข 3 ,4 ,6 ,8 ,17 ,19 ,21 ,26 ,28 ,32 ,37 และ 42 สำหรับหนูชุดที่ 5 เลือกโคลนจากหลุมต้น 6/12D ,6/1D ,2/9A ,8/12D ,6/6E ,4/11H ,7/10F ,4/10G และ 7/6H หมายเลข 2 ,4 ,10 ,72 ,73 ,43 ,50 ,62 ,66 ,75 ,79 ,89 ,181 ,96 ,102 ,112 ,109 ,117 ,123 ,217 ,140 ,152 ,194 ,163 ,164 ,165 ,172 ,177 และ 207 รวมทั้งหมด 41 โคลน มาทดสอบคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนและยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

3.4.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะ

นำโคลนที่ทำการคัดเลือกมาทดสอบคุณสมบัติการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ หรือการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ในรูปยาตั้งต้น (parent drugs) รูปอนุพันธ์ รูปเมแทบอลิต์ ยาในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ได้แก่ เคนลนบูเทอรอล, ซัลบูตามอล และยาปฏิชีวนะ โดยนำแอนติบอดีจากโคลนทั้ง 40 โคลน มาทดสอบสารต่างๆเหล่านี้ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA เคลือบหลุมด้วย AOZ-OVA เนื่องจากสารส่วนใหญ่ละลายอยู่ใน DMF ขณะทดสอบสาร DMF จะเจือจาง 50 เท่า จึงใช้เป็นตัวควบคุมลบ และ PBS ซึ่งไม่มีสารแย่งจับ ผลการทดสอบ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูชุดที่ 3 หมายเลข 3 ,4 ,6 ,8 ,17 ,19 ,21 ,26 ,28 ,32 ,37 และ 42 จำนวน 12 โคลน ทำปฏิกิริยากับ DMF ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง และจับกับสารเกือบทุกตัวยกเว้น AOZ ,AMOZ และ NPAMOZ ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อเพราะไม่มีความจำเพาะ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูชุดที่ 5 ผลการทดสอบพบว่า โคลนจากหลุมต้น 2/9A ,4/11H ,7/10F ,4/10G และ 2/11E แอนติบอดีทำปฏิกิริยาจับกับ DMF ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง และจับกับสารเกือบทุกตัว ส่วนแอนติบอดีของโคลนจากหลุมต้น 6/12D และ 6/1D ไม่ทำปฏิกิริยากับ DMF และจับกับ FZD และ CPAOZ ในรูปอิสระ แต่ไม่จับกับ NPAOZ โคลนจากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากหลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 ทั้ง 8 โคลนนี้มีความจำเพาะในการจับกับ FZD ซึ่งเป็นยาตั้งต้น CPAOZ รูปอนุพันธ์ และ NPAOZ ในรูปเมแทบอลิต์ ดังแสดงในตารางที่ 14 ดังนั้นจึงคัดเลือกทั้ง 8 โคลนนี้ไปทำการศึกษานิตยของแอนติบอดีในการหา Isotype และทดสอบความไวของแอนติบอดี เพื่อคัดเลือกโคลนที่ดีที่สุด เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโน

โคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	3	4	6	8	17	19	21	26	28	32	37	42
FZD	0.11	0.13	0.10	0.10	0.08	0.09	0.08	0.13	0.13	0.11	0.13	0.08
AOZ	0.84	0.95	0.80	0.79	0.39	0.44	0.83	0.48	0.94	1.54	1.57	1.37
NPAOZ	0.30	0.45	0.30	0.29	0.19	0.25	0.36	0.25	0.51	0.63	0.53	0.14
CPAOZ	0.12	0.12	0.11	0.10	0.08	0.10	0.09	0.13	0.11	0.11	0.13	0.09
FTD	0.17	0.20	0.15	0.15	0.09	0.09	0.11	0.14	0.13	0.43	0.49	0.51
AMoz	0.92	1.11	1.01	1.01	0.72	0.73	1.18	0.80	1.21	1.65	1.66	1.32
NPAMoz	1.05	1.18	1.08	1.12	0.76	0.75	1.06	0.84	1.24	1.68	1.62	1.42
CPAMoz	0.16	0.19	0.16	0.16	0.10	0.09	0.13	0.17	0.15	0.44	0.49	0.51
NFZ	0.16	0.17	0.14	0.13	0.10	0.10	0.10	0.18	0.15	0.27	0.31	0.54
SEM	0.13	0.17	0.13	0.13	0.10	0.09	0.11	0.09	0.11	0.39	0.46	0.56
NPSEM	0.16	0.18	0.15	0.16	0.15	0.09	0.12	0.16	0.14	0.43	0.47	0.54
CPSEM	0.20	0.19	0.15	0.16	0.10	0.11	0.13	0.15	0.13	0.40	0.44	0.54

ตารางที่ 13 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร											
	3	4	6	8	17	19	21	26	28	32	37	42
NFT	0.12	0.15	0.12	0.12	0.08	0.08	0.11	0.11	0.10	0.29	0.29	0.28
AHD	0.15	0.17	0.11	0.09	0.10	0.08	0.10	0.15	0.15	0.29	0.27	0.35
NPAHD	0.16	0.15	0.11	0.13	0.10	0.09	0.11	0.14	0.15	0.32	0.33	0.40
3-Carboxy benzaldehyde	0.27	0.39	0.25	0.33	0.16	0.16	0.23	0.21	0.24	0.93	0.97	0.87
Salbutamol	0.13	0.18	0.14	0.12	0.11	0.08	0.11	0.15	0.16	0.37	0.37	0.40
Clenbuterol	0.17	0.16	0.15	0.13	0.10	0.09	0.11	0.14	0.18	0.30	0.37	0.45
Chloramphenicol	0.73	0.97	0.75	0.75	0.49	0.60	0.97	0.50	0.86	1.42	1.41	1.19
Ciprofloxacin	0.15	0.15	0.15	0.14	0.11	0.11	0.10	0.18	0.17	0.35	0.49	0.78
Oxytetracycline – HCl	0.21	0.15	0.11	0.13	0.12	0.08	0.11	0.16	0.15	0.38	0.36	0.42
Tetracycline - HCl	0.30	0.31	0.25	0.26	0.16	0.13	0.21	0.14	0.26	0.78	0.80	0.85
Doxycycline hydrate	0.20	0.17	0.15	0.15	0.14	0.09	0.11	0.18	0.18	0.34	0.31	0.33
DMF (1:50)	0.20	0.16	0.14	0.18	0.11	0.09	0.11	0.20	0.20	0.32	0.32	0.30
PBS	0.76	0.81	0.82	0.84	0.45	0.59	1.03	0.53	0.91	1.36	1.32	1.06

ตารางที่ 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโน

โคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร														
	2	4	10	72	73	43	50	62	66	75	79	89	181	96	102
FZD	0.21	0.18	0.23	0.19	0.19	0.18	0.16	0.14	0.15	0.16	0.16	0.17	0.16	0.74	0.70
AOZ	2.15	2.03	1.93	1.96	1.93	1.49	1.54	1.06	0.91	1.15	1.86	1.78	1.23	2.52	2.41
NPAOZ	1.61	1.44	0.78	0.72	0.45	0.20	0.19	0.15	0.14	0.22	0.43	0.37	0.23	0.48	0.41
CPAOZ	0.35	0.26	0.27	0.23	0.20	0.17	0.16	0.15	0.15	0.14	0.17	0.14	0.15	0.39	0.37
FTD	1.87	1.77	1.21	1.10	0.81	0.21	0.21	0.17	0.15	0.80	1.44	1.32	0.77	2.34	2.38
AMOZ	2.15	2.19	2.02	1.98	1.96	1.19	1.25	0.77	0.78	2.04	2.17	2.22	2.11	2.52	2.47
NPAMOZ	2.18	2.16	2.00	1.99	1.93	1.54	1.59	1.10	0.05	2.12	2.22	2.23	2.22	2.34	2.27
CPAMOZ	1.79	1.77	1.25	1.04	0.76	0.21	0.21	0.17	0.15	0.78	1.47	1.33	0.81	2.20	2.22
NFZ	1.88	1.80	1.12	1.06	0.81	0.21	0.21	0.17	0.15	0.84	1.49	1.27	0.75	2.37	2.42
SEM	1.88	1.74	1.15	1.15	0.82	0.22	0.21	0.18	0.17	0.78	1.46	1.33	0.74	2.39	2.40
NPSEM	1.78	1.75	1.17	1.08	0.82	0.24	0.24	0.19	0.18	0.76	1.59	1.36	0.82	2.30	2.33
CPSEM	1.76	1.76	1.16	1.12	0.82	0.24	0.22	0.19	0.19	0.84	1.47	1.35	0.76	2.25	2.30

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร														
	2	4	10	72	73	43	50	62	66	75	79	89	181	96	102
NFT	1.75	1.67	1.54	1.06	0.82	0.19	0.18	0.16	0.16	0.80	1.51	1.28	0.77	2.33	2.22
AHD	1.79	1.67	1.11	1.05	0.69	0.22	0.21	0.17	0.18	0.78	1.46	1.31	0.78	2.37	2.32
NPAHD	1.78	1.75	1.14	1.10	0.78	0.21	0.18	0.15	0.16	0.83	1.54	1.40	0.80	2.34	2.33
3-Carboxy benzaldehyde	2.01	1.97	1.72	1.68	1.54	0.37	0.39	0.25	0.22	1.76	2.08	1.91	1.78	2.49	2.44
Salbutamol	1.73	1.65	1.12	1.04	0.76	0.23	0.23	0.18	0.18	0.81	1.42	1.35	0.84	2.33	2.29
Clenbuterol	1.78	1.67	1.14	1.12	0.78	0.24	0.21	0.20	0.18	0.84	1.52	1.35	0.88	2.40	2.37
Chloramphenicol	1.81	1.69	1.19	1.11	0.82	0.24	0.23	0.19	0.17	0.79	1.50	1.37	0.79	2.32	2.34
Ciprofloxacin	2.07	2.07	2.03	1.93	1.93	1.66	1.58	1.36	1.28	2.13	2.07	2.22	2.13	2.53	2.52
Oxytetracycline – HCl	1.85	1.74	1.14	1.11	0.77	0.24	2.19	0.19	0.18	0.81	1.51	1.43	0.83	2.39	2.40
Tetracycline - HCl	1.92	1.94	1.47	1.45	1.10	0.27	0.28	0.21	0.19	1.49	1.82	1.79	1.42	2.29	2.24
Doxycycline hydrate	1.58	1.54	0.92	0.78	0.56	0.19	0.19	0.16	0.15	0.65	1.32	1.13	0.52	2.21	2.15
DMF (1:50)	1.86	1.73	1.16	1.14	0.86	0.26	0.24	0.19	0.16	0.84	1.52	1.37	0.77	2.43	2.39
PBS	2.11	2.11	2.01	2.00	1.93	1.71	1.69	1.42	1.30	2.17	2.22	2.38	2.16	2.51	2.47

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร													
	109	112	117	123	217	140	152	194	163	164	165	172	177	207
FZD	0.54	0.97	0.20	0.19	0.19	0.21	0.16	0.16	0.42	0.42	0.34	0.18	0.16	0.18
AOZ	2.43	2.50	1.67	1.65	1.06	0.51	0.56	0.63	1.15	1.22	1.09	1.47	1.03	1.50
NPAOZ	0.33	0.56	0.17	0.19	0.17	0.43	0.38	0.42	0.43	0.54	0.45	0.20	0.14	0.20
CPAOZ	0.26	0.45	0.17	0.17	0.17	0.19	0.16	0.16	0.33	0.40	0.37	0.16	0.14	0.19
FTD	2.21	2.35	0.22	0.20	0.18	0.59	0.58	0.59	0.43	0.55	0.51	0.19	0.14	0.20
AMoz	2.42	2.49	1.23	1.25	0.93	1.63	1.49	1.46	1.26	1.25	1.18	0.71	0.41	0.70
NPAMoz	2.21	2.36	1.62	1.69	1.42	0.87	0.85	0.88	1.19	1.35	1.21	1.48	1.27	1.41
CPAMoz	2.14	2.32	0.22	0.22	0.20	0.54	0.58	0.63	0.47	0.50	0.42	0.20	0.16	0.20
NFZ	2.26	2.36	0.25	0.24	0.21	0.49	0.56	0.60	0.42	0.54	0.47	0.19	0.15	0.18
SEM	2.31	2.38	0.19	0.21	0.19	0.48	0.58	0.64	0.46	0.56	0.44	0.16	0.14	0.18
NPSEM	2.33	2.36	0.23	0.22	0.19	0.43	0.59	0.63	0.44	0.53	0.43	0.19	0.15	0.21
CPSEM	2.14	2.34	0.18	0.21	0.16	0.34	0.49	0.53	0.43	0.49	0.43	0.19	0.14	0.19

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร													
	109	112	117	123	217	140	152	194	163	164	165	172	177	207
NFT	2.14	2.39	0.14	0.15	0.12	0.40	0.52	0.57	0.46	0.54	0.42	0.18	0.13	0.19
AHD	2.30	2.48	0.16	0.18	0.15	0.38	0.49	0.56	0.44	0.51	0.41	0.18	0.13	0.19
NPAHD	2.21	2.41	0.15	0.19	0.19	0.43	0.52	0.61	0.49	0.54	0.43	0.20	0.13	0.17
3-Carboxy benzaldehyde	2.44	2.57	0.27	0.31	0.26	0.97	1.07	1.11	1.09	1.15	1.07	0.36	0.18	0.29
Salbutamol	2.29	2.43	0.19	0.19	0.16	0.49	0.55	0.56	0.47	0.51	0.42	0.18	0.13	0.18
Clenbuterol	2.35	2.45	0.21	0.19	0.20	0.47	0.54	0.59	0.49	0.55	0.44	0.20	0.13	0.19
Chloramphenicol	2.38	2.41	0.20	0.19	0.18	0.42	0.54	0.59	0.46	0.54	0.41	0.20	0.13	0.19
Ciprofloxacin	2.44	2.56	1.48	1.55	1.21	1.39	1.50	1.54	1.29	1.40	1.26	1.51	1.13	1.38
Oxytetracycline – HCl	2.37	2.48	0.20	0.25	0.19	0.42	0.56	0.59	0.56	0.58	0.48	0.19	0.13	0.18
Tetracycline - HCl	2.19	2.20	0.29	0.28	0.19	0.83	1.03	1.09	1.24	1.31	1.26	0.34	0.21	0.33
Doxycycline hydrate	2.10	2.15	0.21	0.19	0.16	0.39	0.49	0.55	0.58	0.61	0.53	0.20	0.16	0.22
DMF (1:50)	2.34	2.46	0.18	0.24	0.21	0.46	0.60	0.62	0.46	0.50	0.45	0.21	0.16	0.20
PBS	2.40	2.43	1.71	1.54	1.41	1.45	1.51	1.53	1.34	1.45	1.36	1.70	1.41	1.47

3.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถจับได้เฉพาะกับ FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระ ได้แก่ โคลน 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลน 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 มาทดสอบชนิดของแอนติบอดีที่ได้โดยชุดตรวจหาไอโซไทป์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า แอนติบอดีจากกลุ่ม 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 เป็นแอนติบอดีชนิด IgG₁ และแอนติบอดีจากกลุ่ม 6/6F หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 เป็นแอนติบอดีชนิด IgG_{2b}

ตารางที่ 15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล

แอนติบอดี

โมโนโคลนอล แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร					
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	IgM
75	3.95	0.38	0.10	0.11	0.11	1.09
79	3.96	0.48	0.10	0.11	0.11	1.24
89	3.98	1.64	0.29	0.24	0.27	2.55
181	3.78	0.39	0.11	0.11	0.11	1.06
96	0.13	0.29	3.05	0.22	0.12	0.38
102	0.12	0.26	3.16	0.21	0.11	0.34
109	0.13	0.26	3.04	0.21	0.11	0.34
112	0.13	0.32	3.13	0.22	0.11	0.43

3.4.3 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่ต่างกัน และประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการจับกับแอนติเจนยังอาจแตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติบอดีแต่ละตัวที่เหมาะสมในการทำ ELISA เพื่อทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของแต่ละโคลน ดังนั้นจึงทำการเจือจางแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละโคลน โดยเจือจางที่ 5 ,10 ,20 ,40 ,80 ,160 ,320 ,640 และ 1280 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เจือจาง ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำปฏิกิริยา indirect ELISA ประมาณ 2.0 จึงทำการเลือกความเข้มข้นแอนติบอดีที่เจือจางแล้วได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.5 – 1.7 (หาค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่ได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงค่าสูงสุด) จากผลการทดสอบ แอนติบอดีหมายเลข 75 และ 181 เลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เจือจาง 40 เท่า แอนติบอดีหมายเลข 79 ,89 ,96 ,102 ,109 และ 112 เลือกเจือจาง 80 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่

เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

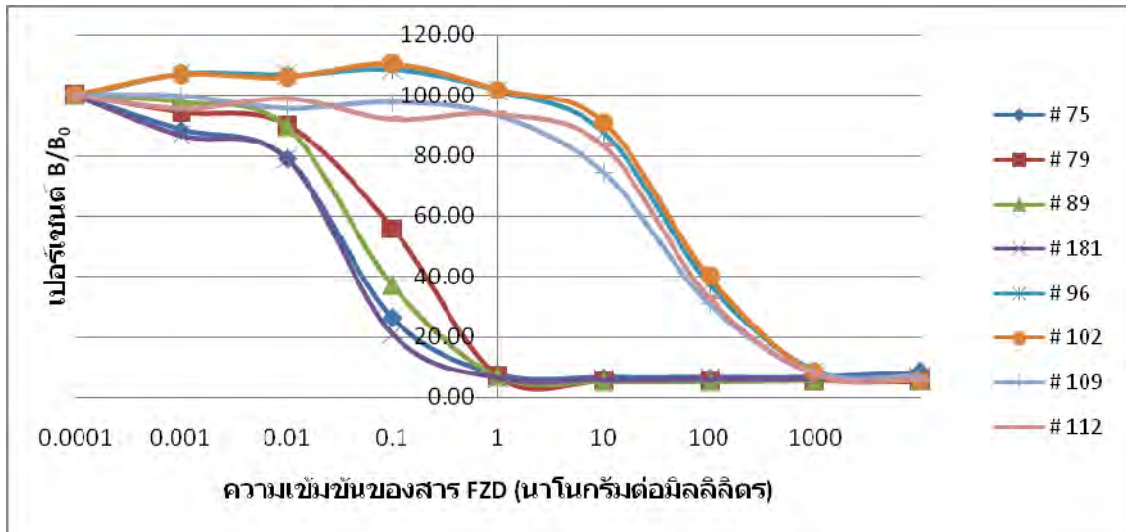
แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร									
	การเจือจางแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ (เท่า)									
	ไม่เจือจาง	5	10	20	40	80	160	320	640	1,280
75	2.07	2.00	1.93	1.74	1.63	1.33	1.05	0.72	0.50	0.40
79	2.00	1.98	1.99	1.91	1.88	1.72	1.58	1.28	1.08	0.78
89	1.94	1.98	1.95	1.98	1.81	1.68	1.46	1.20	0.92	0.65
181	1.92	1.82	1.80	1.69	1.51	1.31	1.01	0.71	0.50	0.36
96	2.19	2.17	2.09	2.06	1.92	1.64	1.43	1.23	1.01	0.82
102	2.21	2.10	2.05	1.94	1.84	1.68	1.56	1.42	1.18	0.94
109	2.25	2.10	2.02	1.90	1.78	1.60	1.42	1.21	0.98	0.73
112	2.38	2.19	2.01	2.01	1.90	1.74	1.55	1.39	1.19	0.98

3.4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

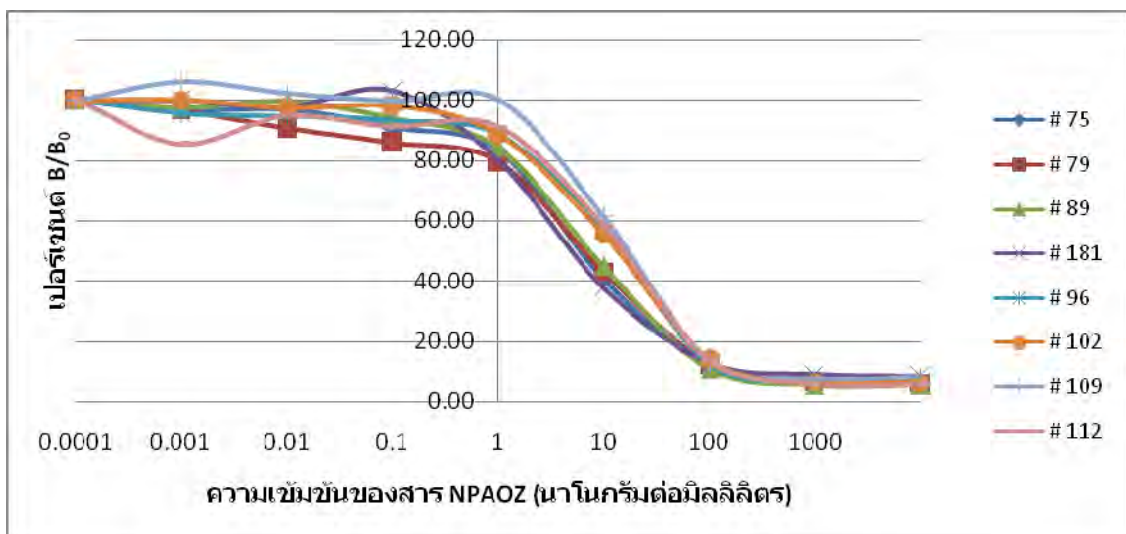
เนื่องจากการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 75 ,79 ,89 ,181 ,96 ,102 ,109 และ 112 โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับ FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ จึงทำการทดสอบความไวในการจับสารทั้ง 3 ตัว โดยแปรความเข้มข้นเป็น 10,000 ,1,000 ,100 ,10 ,1 ,0.01 ,0.001 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 75 และ 181 เจือจาง 40 เท่า หมายเลข 79 ,89 ,96 ,102 ,104 และ 112 เจือจาง 80 เท่า โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังกราฟรูปที่ 2 ,3 และ 4 พบว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 สามารถจับกับสาร FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ได้ดีกว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 จากกราฟที่ได้นำไปคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D สามารถจับได้ดีกับ FZD ,CPAOZ และ NPAOZ ตามลำดับ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E จับได้ดีกับ CPAOZ ,NPAOZ และ FZD ตามลำดับ โคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D สามารถจับกับ NPAOZ ได้ดีกว่า โคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E โดยโคลนที่ได้จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.17 ,4.67 ,6.38 และ 3.87 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนโคลนที่ได้จากหลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.49 ,10.27 ,11.46 และ 11.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD และ CPAOZ โดยนำค่า IC_{50} ที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม} = (IC_{50} \text{ ของสาร NPAOZ} / IC_{50} \text{ ของสารที่เกิดปฏิกิริยาข้าม}) \times 100$$

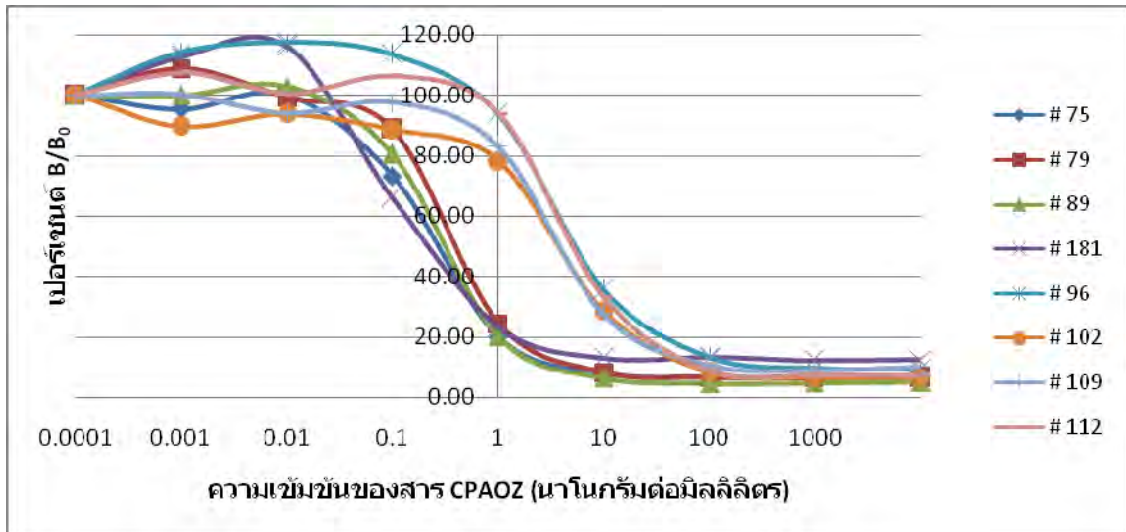
พบว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร FZD และ CPAOZ สูงกว่า โคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 และโคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีความไวในการจับกับสาร NPAOZ ,CPAOZ และ FZD สูงกว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E จึงทำการคัดเลือกโคลน หมายเลข 181 จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และ 102 จากเซลล์หลุมต้น 6/6E ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน คือ มี isotype และความไวแตกต่างกัน เพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 2 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD โดยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตารางที่ 17 แสดงค่า IC₅₀ และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA

โมโนโคลนอล แอนติบอดี หมายเลข	สาร				
	NPAOZ	FZD		CPAOZ	
	IC ₅₀ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC ₅₀ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดปฏิกิริยาข้าม	IC ₅₀ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดปฏิกิริยาข้าม
75	5.17	0.03	1.7 × 10 ⁴	0.22	2.4 × 10 ³
79	4.67	0.10	4.6 × 10 ³	0.31	1.5 × 10 ³
89	6.38	0.06	1.1 × 10 ⁴	0.27	2.3 × 10 ³
181	3.87	0.03	1.3 × 10 ⁴	0.11	3.5 × 10 ⁴
96	10.49	40.68	25.8	3.36	3.1 × 10 ²
102	10.27	45.12	22.8	2.97	3.5 × 10 ²
104	11.46	28.69	39.9	3.25	3.5 × 10 ²
112	11.83	41.29	28.7	4.34	2.7 × 10 ²

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจนในรูปแบบ AOZ-BSA กับ CPAOZ-cBSA พบว่า ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AOZ-BSA เมื่อทำการทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA แอนติบอดีที่ได้จะจับกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุม คือ CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA แต่จะไม่จับกับ CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA และเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์จากม้ามกับมัยอิโลมาเซลล์ จะผลิตแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสาร FZD ,AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ สำหรับหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย CPAOZ-cBSA แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุมได้ คือ CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA หลังการหลอมรวมเซลล์จะได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับได้กับ FZD ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ โดยทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA และเคลือบหลุมด้วยแอนติเจน AOZ-OVA แต่ถ้าเคลือบหลุมด้วย CPAOZ-OVA แอนติบอดีที่ได้ก็ไม่สามารถจับกับสาร FZD ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ หลังจากทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่ที่ได้ทำปฏิกิริยากับสารที่ใช้ทดสอบเกือบทั้งหมด รวมทั้งสารละลาย DMF ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารที่ใช้ทดสอบ จึงทำการคัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DMF ได้แก่ โคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 ทั้งหมด จำนวน 8 โคลน เมื่อทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีไอโซไทป์เป็น IgG₁ และจากเซลล์หลุมต้น 6/6E มีไอโซไทป์เป็น IgG_{2b} โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ตัว สามารถจับกับ FZD ,CPAOZ ,และ NPAOZ ในรูปอิสระได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีความไวในการจับกับสาร FZD ,CPAOZ และ FZD ได้ดีกว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E ทำการเลือกโคลนที่มีความไวสูงสุดในแต่ละเซลล์หลุมต้นอย่างละ 1 โคลน ได้แก่ โคลนหมายเลข 181 จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และโคลนหมายเลข 102 จากเซลล์หลุมต้น 6/6E ซึ่งมีความไวในการจับกับ NPAOZ สูงสุด คือมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.87 และ 10.27 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นจะทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 2 โคลนนี้ เพื่อผลิตแอนติบอดีในปริมาณมาก และเก็บแช่แข็งเซลล์ในไนโตรเจนเหลว และทำการแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยวิธี affinity chromatography เพื่อใช้งานและทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้ต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ(มอกช.9007-2548).2551.เรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสัตว์ปีก
เกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Angelini, N. M., Rampini, O. D., and Mugica, H. 1997. Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurans in Bovine Muscle Tissues. J. AOAC Int. 80(3): 481-485.

Bryan, G. T. 1978. Nitrofurans: chemistry, metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Raven Press, New York : 3-9.

Conneely, A., Nugent, A., Keeffe, M. O., Mulder, P.P.J., Rhijn, J.A. v., Kovacsics, L., Fodor, A., McCracken, R.J., and Kennedy, D.G. 2003. Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection. Anal. Chim. Acta. 483: 91-98.

Cooper, K. M., Caddell, A., Elliott, C.T., and Kennedy, D. G. 2004. Production and characterization of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurans furazolidone. Anal. Chim. Acta. 520: 79-86.

Cooper, K. M., and Kennedy, D. G. 2005. Nitrofurans antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs—a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurans abuse. Analyst. 130: 466–468.

Delatour, T., Gremaud, E., Mottier, P., Richoz, J., Vera, F. A., and Stadler, R. H. 2003. Preparation of Stable Isotope-Labeled 2-Nitrobenzaldehyde Derivatives of Four Metabolites of Nitrofurans Antibiotics and Their Comprehensive Characterization by UV, MS, and NMR Techniques. J. Agric. Food Chem. 51: 6371-6379.

Diaz, T. G., Cabanillas, A. G., Valenzuela, M.I. A., Correa, C.A., and Salinas, F. 1997. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. A. 764: 243-248.

Diblikova, I., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Franek, M. 2005. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurantoin metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation. Anal. Chim. Acta. 540: 285-292.

Franek, M., and Hruska, K. 2005. Antibody based methods for environmental and food analysis: a review. Vet. Med. 50(1): 1-10.

Keeffe, M. O., Conneely, A., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Kovacsics, L., Andrea, F., Mulder, P.P.J., van Rhijn, J.A., Trigueros, G. 2004. Nitrofurantoin antibiotic residues in pork The FoodBRAND retail survey. Anal. Chim. Acta. 520: 125-131.

Kumar, L., Toothill, J. R., and Ho, K. B. 1994. Determination of nitrofurantoin residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. J. AOAC Int . 77(3): 591-595.

Leitner, A., Zollner, P., and Lindner, W. 2001. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J.Chromatography. A. 939: 49-58.

Lipinto, J. M., Arriba, A. F., Tipton, K. F., and Unqeta, M. 1996. Inhibition of Bovine Lung SCAIcarbazine Sensitive Amine Oxidase (SSAO) by Some Hydrazine Derivatives. Biochemical Pharmacology. 52:187-195.

Rupp, H. S., Munns, R. K., and Long, A. R. 1994. Simultaneous determination of nitrofurantoin, nitrofurantoin, and Furazolidone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue by liquid chromatography. J.AOAC Int. 77(2): 344-350.

Situ, C., and Elliott, C. T. 2005. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. Analytica Chimica Acta 529: 89-96.

Pimpitak, U., Puthong, S., Komolpis, K., Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

Vass, M., Kotkova, L., Dibkikova, I., Nevorankova, Z., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Franek, M., 2005. Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone. Vet. Med. 50(7): 300-310.

ภาคผนวก (Appendix)

โคลนที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากหนูชุดที่ 5

No.	Clone	No.	Clone	No.	Clone
1	6/12E/12A/12H/4D	30	2/9A/4A/7F/10D	59	2/9A/6E/12A/2F
2	6/12E/12A/12H/5E	31	2/9A/4A/8E/11D	60	2/9A/6E/12E/3G
3	6/12E/7B/3A/8D	32	2/9A/4A/8E/12C	61	2/9A/6E/12E/4G
4	6/12E/7B/3A/9D	33	2/9A/2G/1E/1G	62	2/9A/2G ₁ /3A/5G ₁
5	6/1D/3H/2G/1E	34	2/9A/2G/1E/2G	63	2/9A/2G ₁ /3A/6H
6	6/1D/3H/2G/2C	35	2/9A/2G/1E/3F	64	2/9A/9C/6H/7H
7	6/1D/3H/3F/4B	36	2/9A/2G/1F/4F	65	2/9A/9C/6H/8G
8	6/1D/3H/9F/6G	37	2/9A/2G/1F/5E	66	2/9A/11A/9A ₁ /9H ₁
9	6/1D/3H/12B/8D	38	2/9A/2G/1F/6F	67	2/9A/11A/9A ₁ /10F
10	6/1D/3H/12B/9E ₁	39	2/9A/4A/5E/7F	68	2/9A/11B/10H ₁ /11H
11	6/1D/3H/12G/11D	40	2/9A/4A/5E/8F	69	2/9A/11B/10H ₁ /12G
12	6/1D/3H/12G/12E	41	2/9A/4A/5E/9E	70	6/1D/1H/6F/5G
13	6/1D/11A/12A/1H	42	2/9A/4A/5G/10F	71	6/1D/2A/8F/7F
14	6/1D/11A/12D/4E	43	2/9A/4A/5G/11G ₁	72	6/1D/2A/8F/8H
15	6/1D/11A/12D/5F ₁	44	2/9A/4A/5G/11H ₁	73	6/1D/2H/11A/10D ₁
16	6/1D/11A/12D/6E	45	2/9A/4A/5G/12F	74	-
17	6/1D/5G/5A/3F	46	2/9A/5D/9H/1G	75	8/12D/2F/2G ₁ /2F ₁
18	6/1D/5G/1D/2E	47	2/9A/5D/10A/2F	76	8/12D/3H/3G ₁ /3F
19	6/1D/5G/1G/8E ₁	48	2/9A/5D/10C/3F	77	8/12D/3H/3G ₁ /4E
20	6/1D/5G/1G/9E ₁	49	2/9A/5D/10F/4F	78	8/12D/3H/4G ₁ /6G
21	2/9A/2G/2H/1F	50	2/9A/5D/10H/5F	79	8/12D/4A/6G ₁ /7H
22	2/9A/2G/2H/2E	51	2/9A/5D/10H/6F	80	8/12D/4A/6G ₁ /8H
23	2/9A/2G/3C/3E	52	2/9A/5D/11C/7G	81	8/12D/5F/7G/9H
24	2/9A/2G/3C/4D	53	2/9A/5D/11C/8F	82	8/12D/5F/7G/10H
25	2/9A/2G/4A/5E	54	2/9A/5D/12A/9H	83	8/12D/5F/8F/11H
26	2/9A/2G/4A/6F	55	2/9A/5D/12A/10H	84	8/12D/5F/8F/12H
27	2/9A/4A/6H/7E	56	2/9A/5D/12D/11H	85	8/12D/5F/9F/1G
28	2/9A/4A/6H/8D	57	2/9A/5D/12D/12G	86	8/12D/5F/9F/3G
29	2/9A/4A/7F/9E	58	2/9A/6E/12A/1G	87	8/12D/6D/10H/4G

ภาคผนวก (ต่อ)

โคลนที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากหนูชุดที่ 5

No.	Clone	No.	Clone	No.	Clone
88	8/12D/6D/10H/5G	117	4/11H/7C/1F/3H ₁	146	7/10F/1D/12F ₁ /10H
89	8/12D/6D/11G/7F ₁	118	4/11H/7C/1F/4G	147	7/10F/1D/12F ₁ /11H
90	8/12D/6D/11G/9F ₁	119	4/11H/7E/6G/5F	148	7/10F/1D/12F ₁ /12H
91	8/12D/6D/12G/11H	120	4/11H/7E/6G/6H	149	7/10F/1C/1F/1F ₁
92	8/12D/6D/12G/12H	121	4/11H/7E/6G/7G	150	7/10F/1C/1F/2G
93	6/6E/8B/3H ₁ /1G	122	4/11H/7E/6G/8G	151	7/10F/1C/1F/3H
94	6/6E/8B/3H ₁ /2F	123	4/11H/8F/7E/9G ₁	152	7/10F/1C/1G ₁ /4H
95	6/6E/8F/4F ₁ /3H	124	4/11H/8F/7E/10H ₁	153	7/10F/1C/1G ₁ /5H
96	6/6E/8F/4F ₁ /4G ₁	125	4/11H/8F/7E/11G	154	7/10F/1C/1G ₁ /6H
97	6/6E/8F/6G ₁ /5H	126	4/11H/8F/7E/12H	155	7/10F/1C/2F ₁ /7H
98	6/6E/8F/6G ₁ /6H	127	4/11H/8F/8E/1F	156	7/10F/1C/2F ₁ /8G
99	6/6E/9D/9H ₂ /8H	128	4/11H/8F/8E/2G ₁	157	7/10F/1C/2F ₁ /9H ₁
100	6/6E/9D/9H ₂ /9H	129	4/11H/8F/8E/4G ₁	158	-
101	6/6E/10C/10F ₁ /10H	130	4/11H/8F/9F/6H	159	7/10F/1C/4F ₁ /11E
102	6/6E/10C/10F ₁ /11G ₁	131	4/11H/8F/9F/7H	160	7/10F/1C/4F ₁ /12H ₁
103	6/6E/10G/1F/1F	132	4/11H/8F/9F/8H	161	4/10G/7E/5F/6D ₁
104	6/6E/10G/1F/2H ₁	133	4/11H/12H/12E/9F	162	4/10G/7E/5F/7D ₁
105	6/6E/10H ₁ /6G ₁ /3H	134	4/11H/12H/12E/10E	163	4/10G/7E/5F/7G ₁
106	6/6E/10H ₁ /6G ₁ /4H	135	4/11H/12H/12E/11F	164	4/10G/7E/5F/8E ₁
107	6/6E/11B/8G ₁ /5H	136	4/11H/12H/12E/12G ₁	165	4/10G/7E/5F/8H ₁
108	6/6E/11B/8G ₁ /6F	137	4/11H/8F/9F/5H	166	4/10G/7E/6G/10F
109	6/6E/11B/9G ₁ /7H	138	7/10F/1C/6F ₁ /1G	167	2/11E/7G/1G/2B
110	6/6E/11B/9G ₁ /8G	139	7/10F/1C/6F ₁ /2H	168	2/11E/7G/1G/2G
111	6/6E/11E/11F/9H	140	7/10F/1C/6F ₁ /3H ₁	169	2/11E/7G/1G/4A
112	6/6E/11E/11F/10H ₁	141	7/10F/1D/10E/4G	170	2/11E/7G/1G/4H
113	6/6E/8B/3G ₁ /11H	142	7/10F/1D/10E/6G	171	2/11E/7G/2G ₁ /6E
114	6/6E/8B/3G ₁ /12H	143	7/10F/1D/11E/7G	172	2/11E/7G/2G ₁ /7D ₁
115	4/11H/7C/1F/1H	144	7/10F/1D/11E/8F	173	2/11E/7G/2G ₁ /7E ₁
116	4/11H/7C/1F/2G ₁	145	7/10F/1D/11E/9G	174	2/11E/7G/2G ₁ /8E ₁

ภาคผนวก (ต่อ)

โคลนที่สามารถจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากหนูชุดที่ 5

No.	Clone	No.	Clone	No.	Clone
175	2/11E/7G/3F/10F	191	7/10F/4D/1E/1H	208	2/11E/11F/11D/10H
176	2/11E/7G/3F/10H	192	7/10F/4D/2E/2G	209	2/11E/11F/12F/11G
177	2/11E/7G/3F/11B	193	7/10F/4F/3E/3H	210	2/11E/11F/12F/12H
178	2/11E/7G/3F/12D	194	7/10F/4F/4G ₁ /4E	211	4/11H/8C/1F/1H
179	8/12D/2H/1F/1F	195	7/10F/4C/5D/5F	212	4/11H/8D/2H/2F
180	8/12D/2H/1F/3C	196	7/10F/4C/6C/6C ₁	213	4/11H/8E/3F ₁ /3E
181	8/12D/2H/1F/4C	197	7/10F/5B/7D/7G	214	4/11H/9F/10E/4D
182	8/12D/2H/1F/4H	198	7/10F/5B/7G/8F	215	4/11H/9G/5F/5F
183	-	199	7/10F/5D/9F ₁ /9G	216	4/11H/10F/6G ₁ /6F
184	8/12D/5A/6G/6B	200	7/10F/5D/10G ₁ /10H	217	4/11H/10G/7F ₁ /7F ₁
185	8/12D/5A/6G/6C	201	7/10F/6A/11C/11D	218	4/11H/10G/8F/8C
186	8/12D/5A/6G/6H	202	7/10F/6C/12D ₁ /12H	219	4/11H/10G/10G/10F
187	8/12D/5A/6G/8H	203	2/11E/9G/1F/1E	220	4/11H/10G/11F/11E
188	8/12D/5B/9G/9D	204	2/11E/9G/2F/2G	221	4/11H/10G/12F/12G
189	8/12D/5B/9G/10B	205	2/11E/9G/3E/3H		
190	-	206	2/11E/11C/9F/8G		

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

1.1 ชื่อ-สกุล นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

Ms. Umaporn Pimpitak

1.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 911

1.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

1.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

E-mail umaporn.p@chula.ac.th

1.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2549
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล	ปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542

1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

1.7 ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

1.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

1.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Pimpitak U., Puthong, S., Komolpis, K., Petsom, A., Palaga T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- 1.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน
- 2.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน
3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโกลินในผลิตภัณฑ์อาหาร
4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิมมิวโนซอร์เบนต์เอสเสย์

2. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1

2.1 ชื่อ-สกุล

นางทรงจันทร์ ภูทอง

Mrs.Songchan Puthong

2.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0

2.3 ตำแหน่งทางวิชาการ

นักวิจัย ระดับชำนาญการพิเศษ

2.4 หน่วยงาน

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์

02-218-8076

โทรสาร

02-253-3543

E-mail songchan.p@chula.ac.th

2.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2539
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2529

2.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

การเตรียมและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

2.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

2.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับโดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

2.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Roengsumran, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Nilaiwan, T., Ngamrojnavanich, N., Chaichantipyuth, C. and Puthong, S. (2001) Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* 56: 103 – 107.

2. Chaichantipyuth, C., Tiaworanon, S., Mekaroonreung, S., Ngamrojnavanich, N., Roengsumran, S., Puthong, S., Petsom, A. and Ishikawa, T. (2001) Oxidized heptenes from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry* 58: 1311 – 1315.

3. Roengsumran, S., Musikul, K., Petsom, A., Vilaivan, T., Sangvanich, P., Pornpakakul, S., **Puthong, S.**, Chaichantipyuth, C., Jaiboon, N., Chaichit, N. (2002) Croblonhifolin, a new anticancer Clerodane from *Croton oblongifolius*. *Planta Medica* 68: 274 – 277.
4. Ngamrojnavanich, N., Tonsiengsom, S., Lertpratchya, P., Roengsumran, S., **Puthong, S.**, and Petsom, A. (2003) Diterpenoids from the Stem Barks of *Croton robustus*. *Archives of Pharmacal Research* 26(11): 898 – 901.
5. Roengsumran, S., Pornpakakul, S., Muangsin, N., Sangvanich, P., Nhujak, T., Singtothong, P., Chaichit, N., **Puthong, S.**, Petsom, A. (2004) New Halimane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Planta Med* 70:1 - 3.
6. Chaichantipyuth, C., Taweechotipatr, P., Petsom, A., **Puthong, S.**, Roengsumran, S., Watanabe, T. and Ishikawa, T. Chemical constituents of *Croton Oblongifolius*. เอกสาร Proceeding ของ JSPS-NRCT.
7. Tungpradabkul, S., Sandee, D., **Puthong, S.** and Laohathai, K. (2005) Construction of scFv derived from a tumor-associated monoclonal antibody having tumoricidal activity on human hepatocellular carcinoma. *Molecular Immunology* 42: 713 – 719.
8. Chaichatipyuth, C., Petsom, A., Taweechotipatr, P., Muangsin, N., Chaichit, N. **Puthong, S.**, Roengsumran, S., Kawahata, M., Watanabe, T. and Ishikawa, T.(2005) New labdane-type diterpenoids from *Croton oblongifolius* and their cytotoxic activity. *HETEROCYCLES* 65(4): 809 – 822.
9. Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2006) Cytotoxic Activity of Four Xanthenes from *Emericella varicolor* an Endophytic Fungus Isolated from *Croton oblongifolius*. *Archives of Pharmacal Research* 29(2): 140 – 144.
10. Mattanavee, W., Suwantong, O., **Puthong, S.**, Bunaprasert, T., Hoven, P.V. and Supaphol, P. (2009) Immobilization of Biomolecules on the Surface of Electrospun Polycaprolactone Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *ACS APPLIED Materials & Interfaces* 1(5): 1076 – 1085.

11. Pimpitak, U., Puthong, S., Komolpis, K., Petsom, A. and Palaga, T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzymed-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp. Food Chemistry 116: 785 – 791.
12. Puthong, S., Rojpibulstit, P. and Buakeaw, A. (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. Thammasat Int. J. Sc. Tech. 14(1): 95 – 104.
13. Umthong, S., Puthong, S. and Chanchao, C. (2009) *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand : Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. The American Journal of Chinese Medicine. 37(5): 855 – 865.
14. Roengsumran, S., Pata, P., Ruengraweewat, N., Tummatorn, J., Pornpakakul, S., Sangvanich, P., Puthong, S. and Petsom, A. (2009) New Cleistanthane Diterpenoids and 3,4-seco-Cleistanthane Diterpenoids from *Croton cblongifolius*. Chemistry of Natural Compounds. 45(5): 641 – 646.
15. Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., Puthong, S. and Palaga, T. (2010) Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 16: 567 – 571.

1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิอิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน
2. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร
3. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิอิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

3. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

3.1 ชื่อ-สกุล นายกิตตินันท์ โกมลภิส

Mr. Kittinan Komolpis

3.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

3.3 ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

3.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 โทรสาร 02-253-3543

E-mail kittinan.k@chula.ac.th

3.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาเอก	Chemical Engineering	2545
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาโท	Chemical Engineering	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2532

3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

3.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : การผลิตกรดอะมิโนโดยยีสต์ที่ตรงกับความต้องการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ได้รับการสนับสนุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2549)

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2548 และ 2549)

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคอานบูเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay (ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2549-2551)

การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนทเอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน และ 3-อะมิโน-5-เมอร์พอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2550-2552)

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. **Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T.** 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16: 567-571

2. Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K., Petsom, A., Palaga T.** (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. *Food Chemistry* 116: 785-791

3. Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K.** and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14: 202-206

4. **Komolpis K., Gulari E.** 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. *Biotechnology Progress*, 18:641-646.

5. Wang H.Y., **Komolpis K., Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A.** 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*). *Biotechnology Progress*; 17:421-430.

6. Wu E., **Komolpis K., Wang H.Y.** 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. *Biotechnology Techniques*, 13:567-569.

7. **Komolpis K., Kaufman P.B., Wang H.Y.** 1998. Chemical permeabilization and *in situ* removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds. *Biotec. Techniques*, 12:697-700.

4.5 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2539	ตรี	วท.บ.	ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2542	โท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2547	เอก*	วท.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

4.6 สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ

Immunology: Monoclonal Antibody Production, Protein Purification

4.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

4.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

4.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

สรยชัยยังจุลินทรีย์จากเฟรียงทราย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุด

ตรวจสอบด้วยวิธี เอนไซม์ลิงคิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ (ปีที่ 1)

4.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Techaprempreecha S, Khongchareonpom N, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. 2011. Nutritional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Animal Feed Science*. 169:265-269

2. Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat S. 2011. Detection by using monoclonal antibodies of *Yersinia enterocolitica* in artificially contaminated pork. *Microbiology and Immunology*. 55: 605-615.
3. **Panchan N**, Sithigorngul P, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia*. 31: 29-35.
4. **Panchan N**, Bendena WG, Browser P, Lungchukiet P, Tobe SS, Sithigorngul W, Chaivisurhangkuru P, Rangsiruji A, Pewnim T and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 24(10):1563-1570.
5. Sithigorngul P, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 23: 1934-1952
6. Sithigorngul P, Pupurm J, Krungkasem C, Longyant S, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P and Sithigorngul W. 2002. Four novel PYFs: members of NPY /PP peptide superfamily from the the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 23: 1895-1906.
7. Sithigorngul P, Saraithongkum W, Longyant S, **Panchan N**, Sithigorngul W and Petsom A. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Peptide*. 22 : 191-197.
8. Sithigorngul P, **Panchan N**, Vilaivan T, Sithigorngul W and Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol B*. 124 : 73-80.

Proceeding

1. Noiprapai K, **Khongchareonporn N** and Rengpipat S. 2011. Production of monoclonal antibodies against *Vibrio parahaemolyticus*. The 23 Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand.

2. Nuntanidvorakul P, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.
3. Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.
4. Tesvichian S, Komolpis K, **Khongchareonporn N**, Puthong S, Pimpitak U and Buakeaw A. Development of tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 3th Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). 4-6 March 2010. Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand.
5. **Khongchareonporn N**, Komolpis K and Puthong S. Production and Characterization of monoclonal antibodies against oxytetracycline. The 1st CMU Graduate Research conference . 27th November 2009. Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.
- 6 . Kanchanabanca C, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.
7. Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. Production of monoclonal antibodies against *Yersinia enterocolitica*. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 120.
8. Kongkaviton P, **Khongchareonporn N** and Komolpis K. Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008 : Biotechnology for Global Care". October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138.

9. Saneewong S, **Khongchareonporn N** and Komolpis K. Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008 : Biotechnology for Global Care". October 14th- 17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129.

Poster

1. Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. Proximate composition of farmed and wild sandworms (*Perinereis nantia* Savigny). 4th International Greek Biotechnology Forum. 2-3 February 2008. Zappeio, Megaro, Athens.

4.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจสอบแรกโตปามี้นด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2555 การวิจัยลุล่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 70

2.การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงคิอิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (ELISA) แหล่งทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 การวิจัยลุล่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 50

5. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 4

5.1 ชื่อ-สกุล นายอนุมาศ บัวเขียว

Mr. Anumart Buakeaw

5.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3

5.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

5.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์

02-218-8076

โทรสาร

02-253-3543

E-mail

anumart.b@chula.ac.th

5.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2545
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2541

5.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

5.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

5.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

5.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

5.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Puthong, S., Rojpiulstitt, P. and Buakeaw, A. (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. *Thammasat Int. J. Sc. Tech.* 14(1): 95 – 104.

2. Somwong, P., Suttisri, R., and Buakeaw, A. (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. *Fitoterapia.* 82 : 1047 -1051.

5.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิ

โนไฮแดนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสอบสารกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โปรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์